

Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Guilherme Carneiro Montes

**DERIVADO N-METIL-ACILIDRAZÔNICO(LASSBIO-1359) REDUZ DOR E  
INFLAMAÇÃO EM MODELO DE MONOARTRITE**

Rio de Janeiro  
Outubro/2014



## DERIVADO N-METIL-ACILIDRAZÔNICO(LASSBIO-1359) REDUZ DOR E INFLAMAÇÃO EM MODELO DE MONOARTRITE

**Guilherme Carneiro Montes**



Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

Orientadores: Prof.<sup>a</sup> Dra. Gisele Zapata-Sudo

Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo

Rio de Janeiro  
Outubro/2014

## FICHA CATALOGRÁFICA

Montes, Guilherme Carneiro

Derivado *N*-metil-acilidrazônico(LASSBio-1359) reduz dor e inflamação em modelo de monoartrite/ Guilherme Carneiro Montes. - Rio de Janeiro: UFRJ/ ICB, 2014

xv, 114f.: il.; 31 cm

Orientadores: Prof.<sup>a</sup> Dra. Gisele Zapata-Sudo e Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo

Tese (Doutorado –UFRJ/ Instituto de Ciências Biomédica/ Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, 2014.

Referências Bibliográficas: f. 94-114.

1. Dor. 2. Inflamação. 3. Efeito antinociceptivo. 4.Efeito anti-inflamatório. 5.  $\alpha$ 2-adrenérgico. 6. Adenosina A<sub>2A</sub>. I. Montes, Guilherme Carneiro. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal. III Derivado *N*-metil-acilidrazônico (LASSBio-1359) reduz dor e inflamação em modelo de monoartrite

# Agradecimentos

À minha orientadora Professora Dr<sup>a</sup> Gisele Zapata-Sudo pela oportunidade, ensinamentos, disponibilidade em me ajudar a todo instante e pela amizade.

Ao meu co-orientador Professor Dr. Roberto Takashi Sudo pelos ensinamentos, oportunidade, orientação profissional e também pela amizade.

Aos membros da banca examinadora.

A minha mãe por caminhar ao meu lado, sempre me fortalecendo nos momentos difíceis, mostrando o caminho, iluminando os meus passos e me concedendo grandes alegrias.

Aos meus irmãos, Ricardo e Nayara Andrezza, por tudo que passamos juntos. A minha cunhada e meus sobrinhos que entraram na minha vida para completar a minha felicidade

Aos Professores Doutores Eliezer J. Barreiro e Carlos Alberto Manssour Fraga e por terem cedido de forma gentil a substância para este estudo.

À Professora Dr<sup>a</sup> Flávia Emenegilda por ter colaborado com os experimentos de *Western Blot*

À Professora Dr<sup>a</sup> Margarete pela amizade, orientação e ajuda em vários momentos.

À minha amiga Fernanda Antunes pelos aconselhamentos e principalmente pela ajuda nos meus momentos de maiores dificuldades dentro e fora do Laboratório

Aos meus grandes amigos Allan Kardec, Victor Hugo e Emilayne Souto pela, amizade, risadas, atenção, compreensão e valiosos ensinamentos, que guardarei para sempre em minha memória

A todos os amigos do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Laboratório de Farmacologia do Acoplamento Excitação-contração Muscular: Sharlene, Carlos Eduardo, Kelvin, Jaqueline, Thaiana, Carla, Daniela, Taís Frazão, Ananssa, Josenildo Segundo, Fábio, Jéssica, Mariana, Andrey, Luiza pelos momentos junto no laboratório.

À aluna de mestrado Nathália Hammes que me ajudou bastante nesse projeto e pela amizade

Ao aluno de Iniciação Científica Bismarck Rezende por ter colaborado com experimentos e pela paciência que teve comigo

Aos todos os meus amigos que fiz durante minha estadia no Rio de Janeiro e um agradecimento em especial Ruth Abrantes, Anna Erika, Luan, Thauan, Éverton, Kalif, Larissa, Renan, Bruno, Victor, Bia, Tadeu, Jardel, Leone, Rafael, Wanderson Kedley Jair, Solange.

Aos meus ex-professores do curso de Farmácia da Universidade Federal da Paraíba em especial para professora Dr<sup>a</sup> Bagnólia Costa e Luís Fernando pelos eternos ensinamentos de Farmacodinâmica e Biologia Celular

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação do Programa de Farmacologia e Química Medicinal

Aos técnicos do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e do Laboratório de Excitação-Contração Muscular Marly de Souza e Tadeu Montagnoli, pela amizade e ajuda técnica.

Ao Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio).

A CAPES, CNPq, INCT e FAPERJ pelo apoio financeiro.

Derivado *N*-metil-acilidrazônico(LASSBio-1359) reduz dor e

Inflamação em modelo de monoartrite

Guilherme Carneiro Montes

Orientadores: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gisele Zapata-Sudo

Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

Aprovada por:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Maria Martinez, Faculdade de Medicina/UFRJ

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Manssour Fraga, ICB/UFRJ

---

Prof. Dr. Nivaldo R. Villela, HUPE/UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lídia Moreira ICB/UFRJ

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Gisele Zapata-Sudo, ICB/UFRJ

---

Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo, ICB/UFRJ

Rio de Janeiro

Outubro/2014

## RESUMO

Derivado *N*-metil-acilidrazônico (LASSBio-1359) reduz dor e inflamação em modelo de monoartrite.

Guilherme Carneiro Montes

Orientadores: Prof.<sup>a</sup> Dra. Gisele Zapata-Sudo

Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

A artrite reumatoide é uma doença inflamatória auto-imune cujo principal sintoma é a dor. Este trabalho investigou a ação antinociceptiva de (E)-*N'*-(3,4-Dimetoxibenzilideno)-*N*-metilbenzoidrazida (LASSBio-1359) na dor inflamatória aguda e crônica em camundongos. A reatividade de camundongos à formalina foi reduzida após tratamento com LASSBio-1359 nas doses de 10 e 20 mg/kg por via intraperitoneal (i.p.) de  $56,3 \pm 6,0$  para  $32,7 \pm 2,2$  e  $23,8 \pm 2,6$  s, respectivamente na fase neurogênica. De forma semelhante, a resposta na fase inflamatória foi reduzida de  $305,0 \pm 39,1$  para  $128,8 \pm 20,5$  e  $140,0 \pm 16,0$  s. Ocorreu reversão da ação antinociceptiva de LASSBio-1359 tanto na fase neurogênica como inflamatória após pré-tratamento com ioimbina e ZM241385, respectivamente. LASSBio-1359 também apresentou atividade antinociceptiva central que foi revertida pela ioimbina. No modelo de inflamação aguda, a hiperalgesia térmica e mecânica induzida pela carragenina (1%) foi reduzida após tratamento com LASSBio-1359. O adjuvante completo de Freund (CFA) utilizado para indução da monoartrite reduziu o limiar de retirada da pata em resposta a estímulo térmico e mecânico de  $13,6 \pm 0,3$  para  $6,8 \pm 0,5$  s e de  $245,7 \pm 1,9$  para  $107,9 \pm 8,2$  g. A administração oral de LASSBio-1359 (10, 25, 50 e 100 mg/kg) melhorou de forma dependente da dose tanto a hiperalgesia térmica e a mecânica. A expressão de TNF $\alpha$  e iNOS aumentada nos animais com monoartrite, foi normalizada após o tratamento com LASSBio-1359. Este derivado *N*-acilidrazônico não apresentou toxicidade central indicando ser uma nova alternativa para o tratamento da monoartrite.

Palavras-chave: LASSBio-1359, monoartrite, nocicepção, inflamação, camundongos

Rio de Janeiro

Outubro/2014

ABSTRACT

The *N*-methyl-acilidrazônico (LASSBio-1359) reduces nociception and inflammation in the monoarthritis model

Guilherme Carneiro Montes

Orientadores: Prof.<sup>a</sup> Dra. Gisele Zapata-Sudo

Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo

Abstract da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal)

Rheumatoid arthritis is an inflammatory autoimmune disease whose main symptom is pain. This study investigated the antinociceptive action of (E)-*N'*-(3,4-Dimethoxybenzylidene)-*N*-methylbenzohydrazide (LASSBio-1359) in acute and chronic inflammatory pain in mice. The reactivity to formalin in mice was reduced after treatment with LASSBio-1359 at doses of 10 and 20 mg/kg intraperitoneally (i.p.) from  $56.3 \pm 6.0$  to  $32.7 \pm 2.2$  and  $23.8 \pm 2.6$  s respectively in neurogenic phase. In a similar way, the response was reduced in the inflammatory phase from  $305.0 \pm 39.1$  to  $128.8 \pm 20.5$  and  $140.0 \pm 16.0$ . There was a reversal of the antinociceptive action LASSBio-1359 in both neurogenic and inflammatory phase after pre-treatment with yohimbine and ZM241385, respectively. LASSBio-1359 also showed central antinociceptive activity that was reversed by yohimbine. In an acute inflammation model, the carrageenan (1%) induced thermal and mechanical hyperalgesia that was reduced after treatment with LASSBio-1359. Complete Freund's adjuvant (CFA) used for induction of monoarthritis reduced the paw withdrawal threshold after thermal and mechanical stimulation from  $13.60 \pm 0.3$  to  $6.8 \pm 0.5$  s and from  $245.7 \pm 1.9$  to  $107.9 \pm 8.2$  g. Oral administration of LASSBio-1359 (10, 25, 50 and 100 mg / kg), was able to control in a dose-dependent manner both thermal and mechanical hyperalgesia. The expression of TNF- $\alpha$  and iNOS increased in the animal with monoarthritis, and was normalized after treated with LASSBio-1359. This *N*-acylhydrazone derivate did not show central toxicity indicating that it could be a new alternative for the treatment of monoarthritis.

Key-words: LASSBio-1359, monoarthritis, nociception, inflammation, mice

Rio de Janeiro

Outubro/2014

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A <sub>1</sub>	-receptor de adenosina do tipo 1
A <sub>2A</sub>	- receptor de adenosina do tipo 2A
A <sub>2B</sub>	- receptor de adenosina do tipo 2B
A <sub>3</sub>	- receptor de adenosina do tipo 3
AC	- adenilato ciclase
ADP	-difosfato de adenosina
AR	- artrite reumatóide
AMP	- adenosina monofosfato
AMP <sub>c</sub>	- adenosina monofosfato cíclico
ATP	- adenosina trifosfata
CFA	- completo Adjuvante de Freund
CD	- células dendríticas
CD39	- trifosfato de nucleosídeo fosfoidrolase
CD73	- ecto-50-nucleotidase
CREB	- proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP <sub>c</sub>
COX <sub>2</sub>	- cicloxigenase2
DMSO	- dimetilsulfóxido
HAP	- hipertensão arterial pulmonar
H&E	- Hematoxilina e eosina
ICAM-1	-molécula de adesão intercelular 1
IFA	- adjuvante incompleto de Freund
IL-1	-interleucina 1
IL-2	- interleucina 2
IL-4	-interleucina 4
IL-6	-interleucina 6
IL-8	- interleucina 8
IL-10	-interleucina 10
IL-12	-interleucina 12
INF- $\gamma$	- interferon-gama
iNOS	- óxido nítrico sintase induzida
IP <sub>3</sub>	- trifosfato de inositol
i.p.	-intraperitoneal
Mac-1	-antígeno de macrófagos-1
mov/min	-movimento por minuto
NAH	- <i>N</i> -acilidrazona
PKA	-protéina quinase A
PLC	-fosfolipase C
ROS	-espécies reativas de oxigênio
rpm	-rotações por minuto
Th <sub>1</sub>	-linfócito T auxiliar 1
Th <sub>2</sub>	-linfócito T auxiliar 2
TNF- $\alpha$	- fator de necrose tumoral
VCAM-1	-moléculas de adesão de células vascular 1
VR-1	-receptor vanilóide
v.o.	-via oral

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Sumário do planejamento de um novo composto protótipo	3
<b>Figura 2:</b> Esquema do processo de desenvolvimento de fármaco	4
<b>Figura 3:</b> Esquema representativo da introdução do grupamento metila na molécula pode afetar diferentes parâmetros físico-químicos	6
<b>Figura 4:</b> Esquema representativo da estratégia de simplificação molecular	6
<b>Figura 5:</b> Representação da síntese de novos derivados <i>N</i> -acilidrazônicos pelo LASSBio-UFRJ usando safrol como matéria prima	7
<b>Figura 6:</b> Estrutura química do novo derivado NAH, LASSBio-294	7
<b>Figura 7:</b> Mudanças conformacionais através da inserção da metila no LASSBio-294, uma <i>N</i> -acilidrazona, obtendo LASSBio-785, um <i>N</i> -metil- <i>N</i> -acilidrazona	9
<b>Figura 8:</b> Estrutura química de LASSBio-1359 ( <i>E</i> )- <i>N'</i> -(3,4-Dimetoxibenzilideno)- <i>N</i> -metilbenzoidrazida)	9
<b>Figura 9:</b> Esquema representativa da degradação de nucleotídeos cíclico AMPc e GMPc catalisada por fosfodiesterases (PDEs)	10
<b>Figura 10:</b> Esquema representativa da formação de adenosina no meio intracelular e no meio extracelular	12
<b>Figura 11:</b> Representação esquemática de segundos mensageiros e algumas das mais relevantes vias de sinalização intracelular mediado pelos receptores de adenosina $A_1$ , $A_{2A}$ , $A_{2B}$ e $A_3$	14
<b>Figura 12:</b> Esquema representativo do receptor $A_{2A}$ acoplado à proteína Gs, que ativa a adenilato ciclase, aumentando os níveis do AMPc intracelular, que ativa a proteína quinase A	15
<b>Figura 13:</b> Representação esquemática da ativação do receptor $A_{2B}$	17
<b>Figura 14:</b> Esquema representativo da ativação dos receptores $A_{2A}$ nas células do sistema imune, células musculares e células epiteliais.	20
<b>Figura 15:</b> Efeitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios dos receptores de adenosina $A_1$ , $A_{2A}$ , $A_{2B}$ e $A_3$	21

<b>Figura 16:</b> Esquema representativo da ativação de receptores A <sub>3</sub> para o efeito anti-inflamatório	
<b>Figura 17:</b> Representação esquemática de uma articulação saudável e um joelho com artrite reumatoide	<b>22</b>
<b>Figura 18:</b> Esquema do status fisiopatológico de cada componente na articulação em que estão ligados a degeneração articular e percepção da dor	<b>24</b>
<b>Figura 19:</b> Resposta do animal de lambar a pata após ser submetido a injeção intraplantar de formalina	<b>26</b>
<b>Figura 20:</b> Aparelho placa quente usado na avaliação nociceptiva central	<b>36</b>
<b>Figura 21:</b> Injeção de CFA na pata traseira direita do camundongo anestesiado para desencadear monoartrite	<b>37</b>
<b>Figura 22:</b> Analgesímetro utilizado para avaliar a hiperalgesia mecânica	<b>39</b>
<b>Figura 23:</b> Avaliação da hiperalgesia mecânica usando analgesímetro	<b>39</b>
<b>Figura 24:</b> Avaliação da hiperalgesia térmica usando de um banho aquecido	<b>40</b>
<b>Figura 25:</b> Câmara aberta (LE 8811 IR Motor activity monitor, Leticia <sup>®</sup> ) utilizada para o teste de atividade sedativa	<b>41</b>
<b>Figura 26:</b> Aparelho da barra giratória (rota-rod) utilizado para avaliação da coordenação motora dos camundongos	<b>42</b>
<b>Figura 27:</b> Labirinto em cruz elevado utilizado para avaliação da ação ansiolítica	<b>44</b>
<b>Figura 28:</b> Efeito da administração intraperitoneal de LASSBio-1359 (5, 10 e 20 mg/kg), morfina (10 mg/kg) e AAS (150 mg/kg) durante a primeira fase do teste da formalina	<b>45</b>
<b>Figura 29:</b> Efeito da administração intraperitoneal de LASSBio-1359 (5, 10 e 20 mg/kg), morfina (10 mg/kg) e ASS (150 mg/kg) durante a segunda fase do teste da formalina	<b>49</b>
<b>Figura 30:</b> Influência da via adrenérgica e adenosinérgica no efeito antinociceptivo do LASSBio-1359 (10 mg/kg i.p.) na primeira fase do teste da formalina	<b>50</b>
<b>Figura 31:</b> Influência da via adrenérgica e adenosinérgica no efeito antinociceptivo do LASSBio-1359 (10 mg/kg i.p.) na segunda fase do teste da formalina	<b>51</b>
<b>Figura 32:</b> Efeito da administração intraperitoneal de DMSO, LASSBio-1359 (10 mg/kg i.p.) e morfina (10 e 20 mg/kg i.p.) no teste da placa quente	<b>52</b>
<b>Figura 33:</b> Influência da via adrenérgica no efeito antinociceptivo central de LASSBio-1359 (10 mg/kg i.p.) no teste da placa quente	<b>53</b>
<b>Figura 34:</b> Efeito da administração intraperitoneal de LASSBio-1359 (10 e 20 mg/kg i.p.) e indometacina (4 mg/kg i.p.) na hiperalgesia térmica induzida pela carragenina na pata	<b>54</b>

epsilateral após 150 min

**Figura 35:** Efeito da administração intraperitoneal de LASSBio-1359 (10 e 20 mg/kg) e 55  
indometacina (4 mg/kg i.p) na hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina na pata  
epsilateral após 150 min

**Figura 36:** Efeito da administração oral de LASSBio-1359 (10 mg/kg) e ácido 56  
acetilsalicílico (300 mg/kg) na hiperalgesia térmica induzida induzida pelo CFA no modelo  
de monorrite

**Figura 37:** Efeito da administração oral de LASSBio-1359 (25 50 e 100 mg/kg) na 57  
hiperalgesia térmica induzida induzida pelo CFA no modelo de monorrite

**Figura 38:** Efeito da administração oral de LASSBio-1359 (10 mg/kg) e ácido 58  
acetilsalicílico (300 mg/kg) na hiperalgesia mecânica induzida induzida pelo CFA no  
modelo de monorrite

**Figura 39:** Efeito da administração oral de LASSBio-1359 (25 50 e 100 mg/kg) na 59  
hiperalgesia mecânica induzida induzida pelo CFA no modelo de monorrite

**Figura 40:** Expressão da citocina TNF- $\alpha$  em patas epsilaterais de camundongos normais e 60  
camundongos com monoartrite

**Figura 41:** Expressão da proteína iNOS em patas epsilaterais de camundongos normais e 61  
camundongos que desencadearam a monoartrite

**Figura 42:** A avaliação histológica dos efeitos de LASSBio-1359 nas patas com artrite 62  
coradas com hematoxilina e eosina

**Figura 43:** Cortes histológicos da cartilagem corados com Safranina O/*Fast green-* 64

**Figura 44:** Efeito da administração intraperitoneal de LASSBio-1359 (1, 2, 5 e 10 mg/kg) 65  
e midazolam (2 mg/kg) nos camundongos sobre a porcentagem do número de entradas nos  
braços abertos no labirinto em cruz elevado

**Figura 45:** Efeito da administração intraperitoneal de LASSBio-1359 (1, 2, 5 e 10 mg/kg) 66  
e midazolam (2 mg/kg) nos camundongos sobre a porcentagem do número de entradas nos  
braços fechados no labirinto em cruz elevado

**Figura 46:** Efeito da administração intraperitoneal de LASSBio-1359 (1, 2, 5 e 10 mg/kg) 67  
e midazolam (2 mg/kg) nos camundongos sobre o tempo de permanência (s) nos braços  
abertos e fechados no labirinto em cruz elevado

**Figura 47:** Influência da via adrenérgica no efeito ansiolítico do LASSBio-1359 (1 mg/kg 68  
i.p.)

**Figura 48:** Influência da via adrenérgica no efeito ansiolítico do LASSBio-1359 (1 mg/kg 69

i.p.)

**Figura 49:** Influência da via benzodiazepínica no efeito ansiolítico do LASSBio-1359 (1 mg/kg i.p.) 70

**Figura 50:** Curso temporal do número mov/min avaliados em dez intervalos de cinco minutos, resultante da administração de LASSBio-1359 na dose de 1 mg/kg (i.p.) 71

**Figura 51:** Curso temporal do número mov/min avaliados em dez intervalos de cinco minutos, resultante da administração de LASSBio-1359 na dose de 2 mg/kg (i.p.) 72

**Figura 52:** Curso temporal do número mov/min avaliados em dez intervalos de cinco minutos, resultante da administração de LASSBio-1359 na dose de 5 mg/kg (i.p.) 72

**Figura 53:** Curso temporal do número mov/min avaliados em dez intervalos de cinco minutos, resultante da administração de LASSBio-1359 na dose de 10 mg/kg (i.p.) 73

**Figura 54:** Efeito de LASSBio-1359 (1, 2 e 5 mg/kg i.p.) e diazepam (4 mg/kg i.p.) sobre a coordenação motora dos animais nos tempos 30 min, 60 min e 120 min após administração das substâncias. 73

**Figura 55:** Vias descendentes da modulação da dor e via descendente noradrenérgica 74

**Figura 56:** Diagrama esquemático da via de sinalização da proteína Gs ativada pelo ligante 78

**Figura 57:** Provável mecanismo de ação de LASSBio-1359 no modelo de dor inflamatória 79

**Figura 58:** Representação de uma sensibilização mediante a resposta para diferentes moléculas 81

**Figura 59:** Representação de acúmulo de AMPc no meio intracelular, ativando PKA que fosforila CREB 82

**Figura 60:** Inibidores de PDE4 e seus efeitos sobre células inflamatórias e remodelamento estrutural de alguns tipos de células 84

**Figura 61:** Figura do apremilaste 85

**Figura 62:** Representação de ativação de receptor  $A_{2A}$  de adenosina inibindo recrutamento e ativação de células do sistema imune 86

**Figura 63:** Representação de receptor  $A_{2A}$  de adenosina ativado, desencadeando a ativação de CREB via PKA que culmina na secreção da interleucina 10 (IL-10) 87

**Figura 64:** Expressão do receptor de adenosina  $A_{2A}$  em linfócitos de ratos injetados com CFA e ratos sham 88

**Figura 62:** Níveis de IL-10 no soro de ratos sham e injetados com CFA 89

**Figura 63:** Esquema representativo da ativação de NF- $\kappa$ B em resposta ao estímulo pró-inflamatório do TNF- $\alpha$  89

# SUMÁRIO

## 1 INTRODUÇÃO

1.1 A Química Medicinal e o desenvolvimento de novos fármacos	2
1.2 Grupo funcional metila e sua importância na atividade dos fármacos	4
1.3 O grupo metila na obtenção de compostos protótipos pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®)	6
1.4 LASSBio-1359 e suas propriedades farmacológicas	10
1.5 Adenosina na homeostasia	11
1.6 Receptores de adenosina	13
1.6.1 Receptores de adenosina na regulação da inflamação	17
1.6.2. Receptores de adenosina como alvo terapêutico para tratamento da artrite reumatoide	23
1.7. Modelo de monoartrite	27
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Animais	33
3.2 Condições experimentais	33
3.3 Substâncias utilizadas	33
3.4. Derivado <i>N</i> -Acilidrazônico LASSBio-1359	34
3.5. Preparação da solução de LASSBio-1359 e demais substâncias	35
3.6. Avaliação da ação antinociceptiva em resposta a formalina	35
3.7. Avaliação da ação antinociceptiva em placa quente	37
3.8. Modelos de Inflamação para avaliação da hiperalgesia térmica e mecânica	38
3.8.1. Avaliação da hiperalgesia mecânica	39
3.8.2. Avaliação da hiperalgesia térmica (teste da imersão da pata)	41
3.9. Avaliação da ação sedativa em campo aberto	42
3.10. Avaliação da coordenação motora em barra giratória	43
3.11. Avaliação da ação ansiolítica em labirinto elevado	44
3.12. Avaliação histológica da inflamação	46

3.13. Expressão de proteínas – “Western blot”	47
3.14. Análise estatística	47
4 RESULTADOS	48
4.1. Avaliação da atividade antinociceptiva	49
4.6.1. Teste da Formalina	49
4.1.2. Teste da placa quente	52
4.1.3. Teste da carragenina	54
4.1.3.1. Hiperalgisia térmica	54
4.1.3.2. Hiperalgisia mecânica	55
4.2. Modelo de monoartrite	56
4.2.1. Hiperalgisia térmica	56
4.2.2. Hiperalgisia mecânica	58
4.3. Expressão de proteínas – “Western blot”	60
4.4. Avaliação Histopatológica	63
4.5. Investigação da atividade ansiolítica	66
4.6. Toxicidade	71
4.6.1. Atividade motora	71
4.6.2. Coordenação motora	74
5. DISCUSSÃO	75
6. CONCLUSÃO	93
7. REFERÊNCIAS	95

# **1 Introdução**

## 1.1. A Química Medicinal e o desenvolvimento de novos fármacos

Atualmente o uso de produtos naturais como matéria-prima para a síntese de substâncias bioativas ocorre de forma intensa; cerca de 48% dos medicamentos usados na terapêutica provêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

O planejamento de novos fármacos envolve vários bilhões de dólares e ocupa milhares de pesquisadores titulados, de diferentes áreas, em diversos laboratórios de pesquisa, tanto industriais como acadêmicos. As universidades e institutos de pesquisas vem contribuindo intensamente para a descoberta de novas substâncias bioativas e esses avanços estão diretamente ligados aos progressos da medicina e ciência relacionadas (DREWS, 2000; SIMÕES; SCHENKEL, 2002). É uma atividade complexa e transversal, pois requer interdisciplinaridade entre várias ciências como a química, farmacologia e ciências clínicas, entre outras (BUTLER, 2004). Há uma grande necessidade de obtenção de novos fármacos que apresentem eficácia, seletividade e que possuam, ao mesmo tempo, baixa toxicidade, diminuindo dessa forma o risco de aparecimento de reações adversas ou efeitos indesejáveis (McKENNA, 1996).

A Química Medicinal, segundo definição da IUPAC, é uma disciplina baseada na química, envolvendo aspectos das ciências biológicas, médica e farmacêutica, cujo objetivo é o planejamento, descoberta, invenção, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos (protótipos), o estudo do metabolismo, análise do mecanismo de ação a nível molecular para dispor das relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica. (LIMA, 2007). Com a aproximação dos químicos medicinais e farmacologistas criaram-se condições necessárias e essenciais para conduzir à descoberta de novos fármacos, inovações terapêuticas autênticas e com padrões moleculares originais, trazendo assim mecanismos moleculares antes não vistos (BARREIRO, 2009). Houve também o desenvolvimento de dispositivos automatizados para a realização de ensaios biológicos de alta performance que possibilitaram a avaliação de uma grande quantidade de substâncias frente a estes novos alvos moleculares gerando uma demanda crescente por substâncias estruturalmente inovadoras para avaliação de suas propriedades farmacológicas e na otimização/desenvolvimento de protótipos já existentes (DIAS et al., 2001).

Um projeto de Química Medicinal compreende as etapas de descoberta, otimização e desenvolvimento do protótipo (WERMUTH, 2003). O planejamento molecular para desenho de ligantes do alvo selecionado pode ser realizado utilizando as estratégias de modificação molecular clássicas, tais como bioisosterismo, homologação, simplificação e hibridação molecular, ou pelo emprego de técnicas computacionais como a modelagem molecular. Os ligantes desenhados são sintetizados e posteriormente realiza-se a determinação das atividades farmacológicas em ensaios *in vitro* e *in vivo*, assim como a descrição da eficácia em modelos animais de doença. O melhor composto selecionado nesta etapa *in vivo* é denominado de composto protótipo (Figura 1).

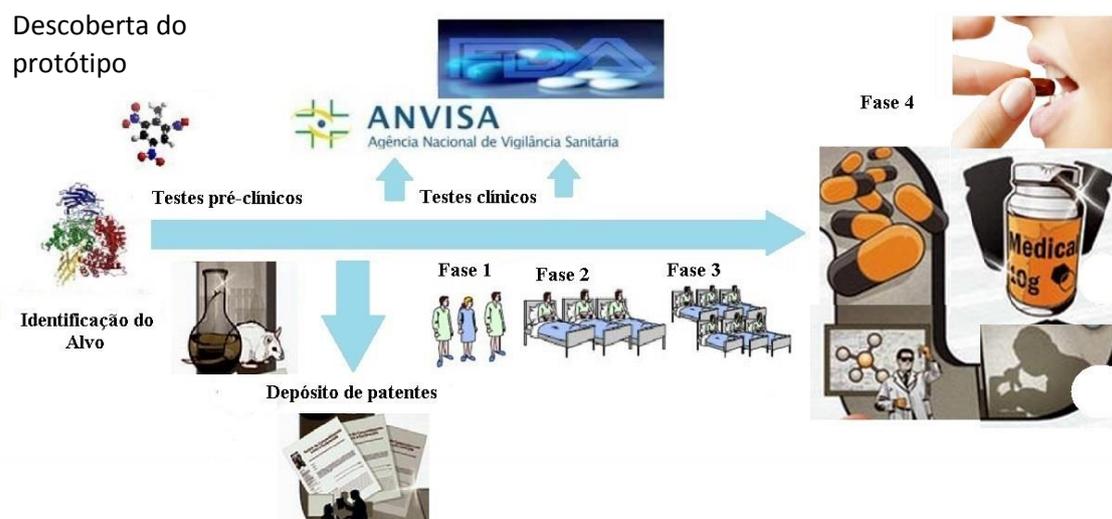


**Figura 1.** Sumário do planejamento de um novo composto protótipo. Adaptado de <http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/view/14/29> Acesso em fevereiro de 2012

A etapa de otimização do composto protótipo consiste no melhoramento da estrutura do protótipo, através de modificações planejadas com auxílio de técnicas definidas – capazes de identificar os diferentes níveis de contribuição farmacofórica, fornecer informações sobre a conformação bioativa e antecipar o índice de reconhecimento molecular pelo alvo selecionado. Estas características visam o aumento da potência, seletividade, diminuição da toxicidade, adequação do perfil

farmacocinético (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade, ADMET) (WERMUTH, 2003; BARREIRO, FRAGA, 2001).

Entretanto, para que um novo fármaco chegue ao mercado, 15 anos podem ser necessários até que o seu uso clínico seja aprovado (<http://www.phrma.org/innovation>, acesso em setembro de 2014). Após o processo de descoberta ou identificação do protótipo e seu alvo terapêutico, estudos pré-clínicos (*in vivo*) devem ser realizados, procedendo o depósito de patente da descoberta. O protótipo de melhor perfil de eficácia e segurança nos modelos pré-clínicos é denominado de novo candidato a fármaco. Numa etapa seguinte, os ensaios clínicos de fase I, II e III, são realizados em humanos saudáveis ou doentes para verificar a segurança e eficácia do novo fármaco. Com a autorização dos órgãos reguladores para a comercialização, é então realizada a fase IV na qual ocorre o monitoramento pós-comercialização (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema do processo de desenvolvimento de fármaco. Modificado de Alencar, 2011.

### 1.3. Grupo funcional metila e sua importância na atividade dos fármacos

A metila é um grupamento funcional que tem um papel importante nos processos de reconhecimento dos compostos de natureza orgânica, endógenos e exógenos pelos receptores biológicos. Faz apenas interações do tipo London, as mais fracas dentre todas as interações moleculares (BARREIRO; FRAGA, 2008). Entretanto,

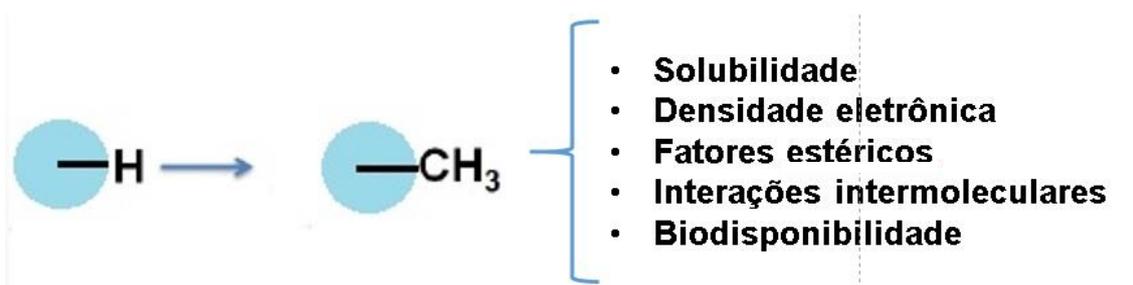
a metilação exerce efeitos estereoeletrônicos (CHU, 1980) sobre as micromoléculas ou biomacromoléculas, que podem levar a significativa diversidade de efeitos biológicos tais como: seletividade entre os receptores biológicos, aumento da potência e proteção frente ao metabolismo enzimático (WERMUTH, 2003).

Dentre os 10 fármacos mais vendidos em 2013, 4 apresentam substituintes metilados (em vermelho) representando 40% desse total. Porém tendo em vista que dos 10 medicamentos da tabela, 4 são biofármacos e portanto do valor relativo poderia ser corrigido para 66% considerando-se apenas os medicamentos de natureza não proteica no cálculo.

**Tabela 1.** Os 10 fármacos mais vendidos no ano de 2013 com número de vendas e fabricantes.

Rank	Nome da marca	Nome genérico	Vendas (\$)	Nome da empresa farmacêutica
1	Abilify ®	Aripiprazo	6,293,801	Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd
<b>2</b>	<b>Nexium ®</b>	<b>Esomeprazol</b>	<b>5,974,550</b>	<b>AstraZeneca Pharmaceuticals, LP</b>
3	Humira ®	Adalimumabe	5,428,479	AbbVie, Inc.
<b>4</b>	<b>Crestor ®</b>	<b>Rosuvastatina</b>	<b>5,195,930</b>	<b>AstraZeneca Pharmaceuticals, LP</b>
<b>5</b>	<b>Cymbalta ®</b>	<b>Duloxetina</b>	<b>5,083,111</b>	<b>Eli Lilly and Company</b>
<b>6</b>	<b>Advair Diskus ®</b>	<b>Propionato de fluticasona e Salmeterol</b>	<b>4,981,108</b>	<b>GlaxoSmithKline</b>
7	Enbrel ®	Etanercepte	4,585,701	Amgen Inc
8	Remicade ®	Infliximabe	3,980,556	Centocor Ortho Biotech, Inc
<b>9</b>	Copaxone ®	- Acetato de Glatirâmer -	3,603,958	Teva Pharmaceuticals
10	Neulasta ®	Pegfilgrastim	3,472,969	Amgen Inc.

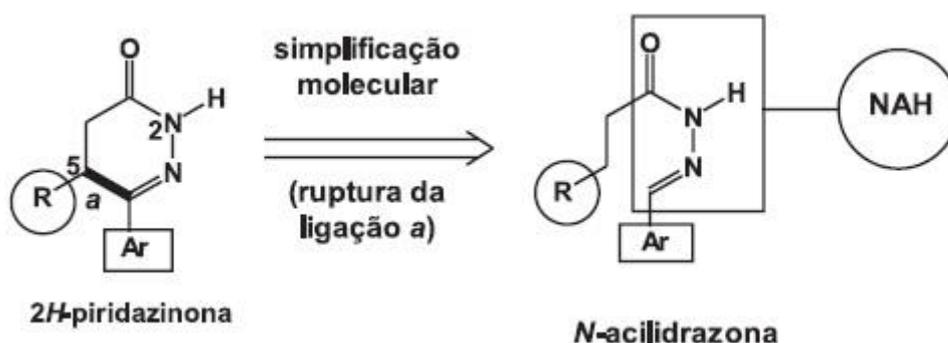
O grupo metila é muito utilizado nas estratégias de modificação molecular porque pode modificar bruscamente a potência, a duração e até a natureza do efeito farmacológico (Figura 3).



**Figura 3.** A introdução do grupamento metila na molécula pode afetar diferentes parâmetros físico-químicos e com isso pode acarretar algumas mudanças. Modificado de KÜMERLLE, 2009.

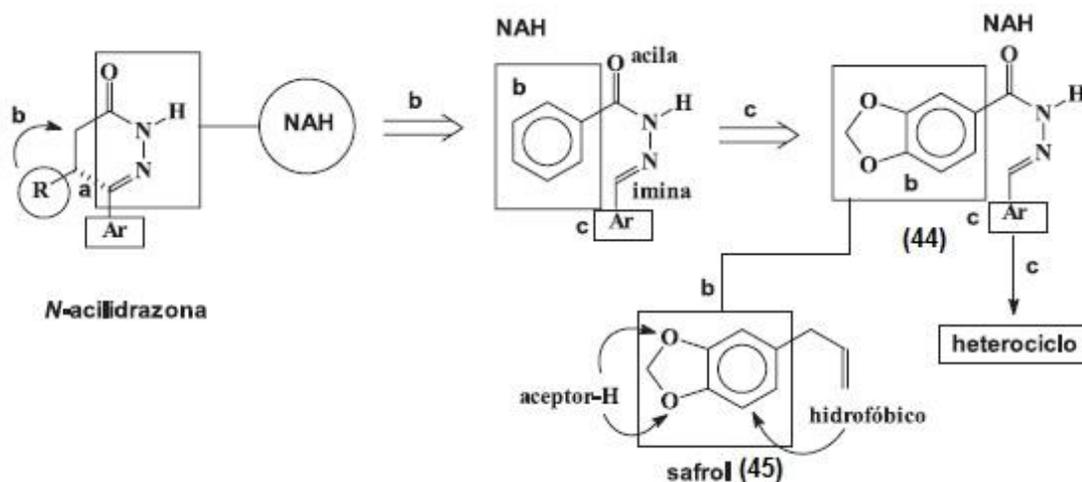
### 1.3. O grupo metila na obtenção de compostos protótipos pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio<sup>®</sup>)

O LASSBio<sup>®</sup> da Universidade Federal do Rio de Janeiro tem como linha de pesquisa o planejamento, a síntese e a avaliação de propriedades farmacológicas de novos derivados *N*-acilidrazônicos (NAH) bioativos (BARREIRO, et al., 2002). O emprego da estratégia de simplificação molecular (Figura 4) sobre os derivados diidro(*2H*)piridazinônicos, representado pela simples ruptura da ligação **a**, permitiu identificar a função NAH, mascarada no sistema heterocíclico.



**Figura 4.** Esquema representativo da estratégia de simplificação molecular usado para o rompimento da ligação **a** dos derivados *2H*-piridazinônicos obtendo-se como produto um derivado que apresentou a função NAH, antes mascarada. Adaptado de BARREIRO 2002.

A formação da nova série de derivados NAH (44) fundamentou-se na inclusão de uma unidade aromática **b** na função acila, eliminando-se o carbono estereogênico C-5, presente em derivados (2*H*)-piridazinônicos ativos como o pimobendamo e outros (Figura 5) (JONAS et al., 1994).



**Figura 5.** Representação da síntese de novos derivados *N*-acilidrazônicos pelo LASSBio-UFRJ usando safrol como matéria prima. Adaptado de BARREIRO 2002.

Vários novos compostos desta série congênere foram sintetizados e avaliados em diferentes ensaios farmacológicos resultando a identificação de um composto tiofênico denominado LASSBio-294 (Figura 6) como um agente cardiotrópico e vasodilatador (BARREIRO et al., 2002; SILVA et al., 2005).

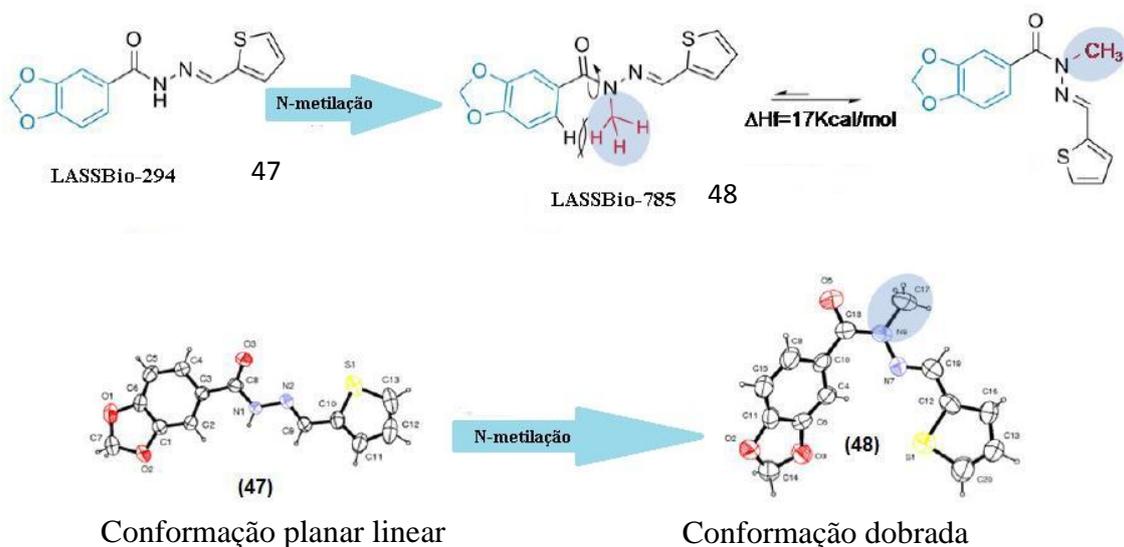


**Figura 6.** Estrutura química do novo derivado NAH, LASSBio-294.

Uma série de modificações estruturais foi introduzida na estrutura do protótipo LASSBio-294 na tentativa de otimização das propriedades farmacológicas, visando a potencialização da sua possível atividade terapêutica sobre o sistema cardiovascular. A *N*-metilação da função amida do grupamento NAH levou ao desenho e obtenção de um novo composto denominado LASSBio-785 (48) descrito como sendo seletivo para a musculatura lisa vascular e 7 vezes mais potente como vasodilatador quando comparado ao LASSBio-294 (SILVA et al., 2005).

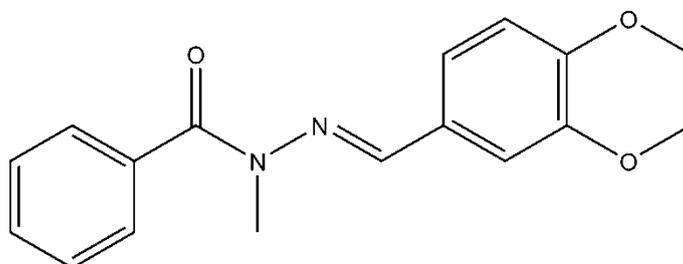
O estudo do mecanismo de ação molecular mostrou que a ação vasodilatadora de LASSBio-294 é totalmente dependente do endotélio vascular, enquanto que LASSBio-785 exerce vasodilatação de maneira independente do endotélio (SILVA et al., 2005). Estes resultados indicam mecanismos distintos envolvidos na vasodilatação sugerindo que a metilação de LASSBio-294 proporcionou diferenças estruturais mais relevantes do que simplesmente a perda de um sítio doador de ligação de H e o aumento da lipofilicidade em LASSBio-785.

A análise por difratometria de raios-X demonstrou que em estado sólido, LASSBio-294 e LASSBio-785, apresentam conformações distintas uma planar (hidrogênio da amida antiperiplanar ao oxigênio da carbonila) e uma dobrada (metila da amida sinperiplanar ao oxigênio da carbonila), respectivamente. A conformação dobrada de LASSBio-785 é devida provavelmente ao efeito estérico gerado pela metila adicionada ao nitrogênio da função *N*-acilidrazona de LASSBio-294 (Figura 7) (KUMMERLE et al., 2009).



**Figura 7.** Mudanças conformacionais através da inserção da metila no derivado NAH LASSBio-294, resultando no derivado *N*-metil-*N*-acilidrazônico LASSBio-785, Modificado de KÜMERLLE 2009.

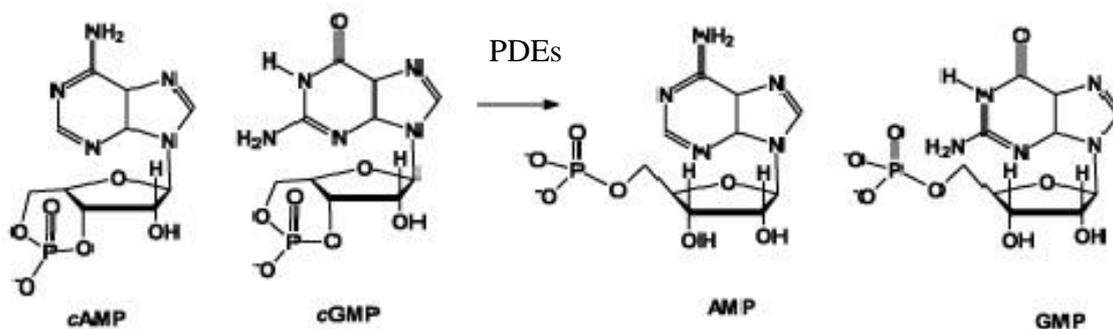
Portanto, estes estudos permitiram concluir que *N*-acilidrazonas e *N*-metil-*N*-acilidrazonas podem apresentar conformações distintas e provavelmente perfis farmacológicos diferenciados. Mais recentemente, outras séries de *N*-acilidrazona-*N*-metiladas foram preparadas destacando-se o composto (*E*)-*N'*-(3,4-Dimetoxibenzilideno)-*N*-metilbenzoidrazida (Figura 8), denominado LASSBio-1359, que foi selecionada para elaboração deste projeto de pesquisa para fim de estudar a atividade farmacológica desse composto em modelo de monoartrite em camundongos haja vista seu mecanismo de ação já identificado decorrente, como apresentado a seguir, de inibição da fosfodiesterase do tipo 4 (PDE4) e ativação dos receptores de  $A_{2A}$  de adenosina.



**Figura 8.** Estrutura química de LASSBio-1359 (*E*)-*N'*-(3,4-Dimetoxibenzilideno)-*N*-metilbenzoidrazida).

### 1.5. LASSBio-1359 e suas propriedades farmacológicas

LASSBio-1359 pertence à classe *N*-metil-*N*-acilidrazona e é sintetizado como sólido amorfo com ponto de fusão próximo de 105 °C. O composto apresentou uma concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) de 140 nM para a inibição da atividade da fosfodiesterase tipo 4 (PDE4) (Kürmmerle et al., 2012). As fosfodiesterases (PDE) são importantes classes de enzimas que promovem a hidrólise do monofosfato cíclico de adenosina e guanosina (AMPc e GMPc) (PERRY et al., 1998) (Figura 9). Estes segundos mensageiros intracelulares são responsáveis pela mediação de inúmeras respostas biológicas vitais, envolvendo diferentes hormônios, neurotransmissores ou autacóides.



**Figura 9.** Figura representativa da degradação de nucleotídeos cíclico AMPc e GMPc catalisada por fosfodiesterases (PDEs). Modificado de (BARREIRO, 2002).

O aumento da taxa celular destes nucleotídeos cíclicos promove, por exemplo, a ativação de proteínas quinases que, por sua vez, efetuam a fosforilação de diferentes tipos de substratos, regulando inúmeras respostas celulares (PERRY et al., 1998). Atualmente, foram descritas 11 famílias de PDE, cada uma com características enzimáticas e farmacológicas distintas, mas com três domínios funcionais gerais: um domínio regulatório amino-terminal, um domínio catalítico central, e outro domínio regulatório carboxi-terminal (SORDELING e BEAVO, 2000).

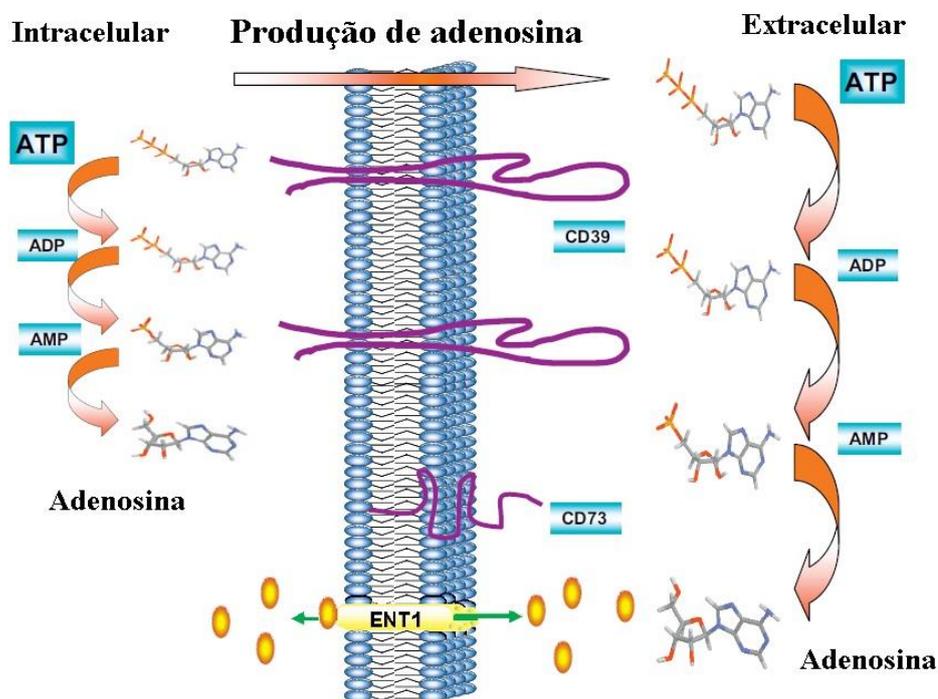
A expressão da isoenzima PDE4 está presente quase exclusivamente nas células inflamatórias (ESSAYAN, 1999), e sua inibição leva ao aumento dos níveis intracelulares de AMPc, e diminui níveis de citocinas e quimiocinas oriundas de linfócitos T e monócitos, incluindo o factor de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (GIEMBYCZ et al., 1996; BRIDEAU et al., 1999; MANNING et al., 1999; HIDI et al., 2000; GALE et al., 2004; KUMAR et al., 2013). LASSBio-1359 no ensaio *in vitro* inibiu cerca de 91% a liberação de TNF- $\alpha$  induzido por células mononucleares do sangue periférico ativadas por lipopolissacarídeo (LPS) quando testado na concentração de 1,75  $\mu$ M sugerindo que o acúmulo de de AMPc na célula é um mecanismo importante para diminuir secreção de TNF- $\alpha$  (KÜMMERLE et al.,2012). Além disso, em ensaio de hiper-reatividade pulmonar *in vivo*, que consiste em desencadear uma inflamação aguda através da administração intranasal de LPS, LASSBio-1359 proporcionou efeito protetor nos animais, por inibir a liberação TNF- $\alpha$  e interleucina 6 (IL-6) quando testados por via oral na dose de 30 mg/kg (KÜMMERLE et al., 2012).

Mudança estrutural e funcional no coração e na artéria pulmonar pode ser observada em ratos que desenvolvem hipertensão arterial pulmonar (HAP) induzida por monocrotalina. Após tratamento oral com LASSBio-1359, na dose de 50 mg/kg esse quadro foi revertido, muito provavelmente pela ativação de receptores A<sub>2A</sub> de adenosina (ALENCAR et al., 2013). A HAP é uma doença caracterizada por um aumento do crescimento das células vasculares e por um processo inflamatório com envolvimento de citocinas inflamatórias. Há um aumento dos níveis circulantes de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 nos pulmões de pacientes com HAP (SOON et al., 2010; SCHERMULY et al., 2011). Logo, um composto com propriedades agonistas dos receptores de adenosina A<sub>2A</sub> poderia apresentar efeito benéfico, revertendo as características de remodelamento vascular e cardíaca da HAP.

#### 1.6. Adenosina na homeostasia

Em 1929, DRURY e SZENT-GYÖRGYI descreveram pela primeira vez a atuação da adenosina como uma molécula sinalizadora extracelular. Ela é formada tanto a nível intracelular e extracelular a partir de nucleotídeos de adenina (Figura 10), os quais são sequencialmente desfosforilados para formar a adenosina. Adenosina intracelular pode ser transportado para o espaço extracelular através de transporte facilitado, e adenosina extracelular também é captada pelas células por meio do mesmo

transportador, transportador de nucleósido equilibrativo 1 (ENT1). Duas moléculas de superfície celular, CD39 e CD73 (trifosfato de nucleosídeo fosfohidrolase e ecto-50-nucleotidase, respectivamente), catalisam a desfosforilação de nucleotídeos de adenina para adenosina no espaço extracelular (CRONSTEIN, 2011). Após a descoberta inicial dos efeitos da adenosina sobre a função cardíaca, tem sido encontrado outras atividades regulatórias dessa molécula em praticamente todos os órgãos avaliados. A adenosina se acumula no espaço extracelular geralmente em condições de isquemia, hipóxia, inflamação e trauma. A rápida liberação de adenosina em resposta a injúria tecidual tem um papel duplo na modulação da homeostase. Em primeiro lugar, a adenosina extracelular representa uma molécula de alarme proeminente que responde a lesão tecidual de forma autócrina e parácrina para o tecido circundante. Em segundo lugar, a adenosina extracelular gera uma variedade de respostas do tecido que pode ser geralmente considerada como protetora para o órgão mediando homeostase tecidual (HASKÓ et al., 2008). A adenosina induz as respostas fisiológicas quando se liga e ativa um ou mais dos quatro subtipos de receptores de adenosina transmembranares, A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> acoplados a diferentes tipos de proteína G (CRONSTEIN, 2011).



**Figura 10.** Representação da formação de adenosina no meio intracelular e no meio extracelular. Ela é formada no espaço extracelular por desfosforilação de nucleotídeos de adenina liberados pelas células como resultado de fatores metabólicos, lesões, processo inflamatório e hipóxia tecidual. A adenosina medeia os seus efeitos sobre a

os tecidos por meio da ligação e ativação de uma família de receptores acoplados à proteína G. Modificado de CRONSTEIN, 2011.

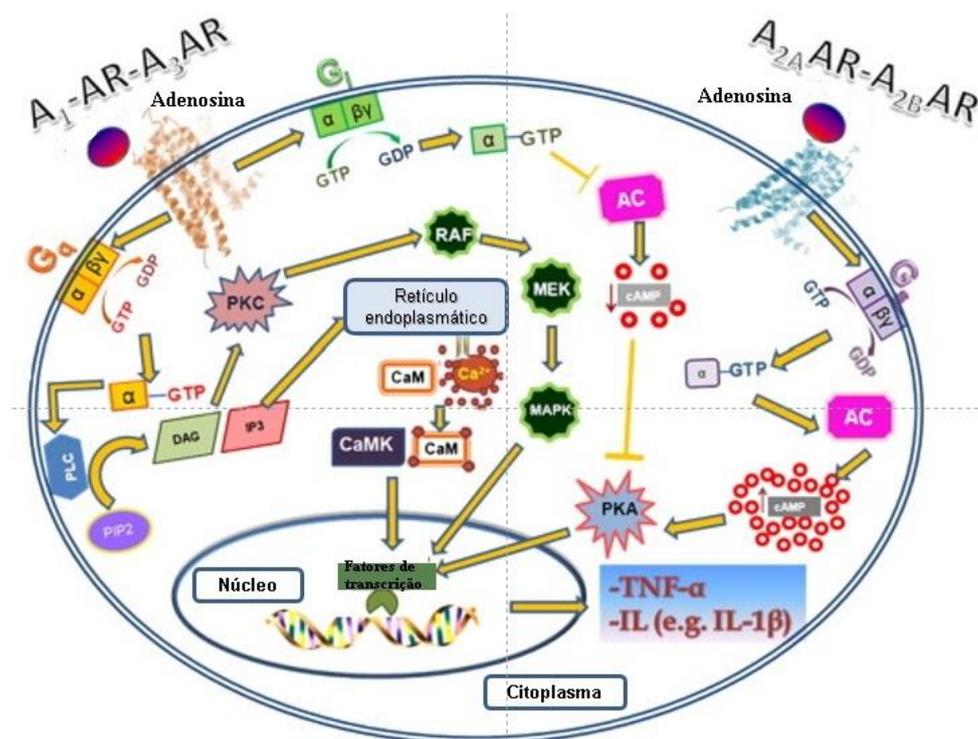
### 1.7. Receptores de adenosina

Os receptores de adenosina são acoplados à proteína G para realizar suas principais funções celulares, entretanto alguns efeitos independentes da proteína G têm também sido descritos (FREDHOLM et al., 2007). Tradicionalmente, a sinalização do receptor de adenosina ocorre por meio da inibição ou estimulação da produção de AMPc intracelular (HASKÓ et al., 2008). Inicialmente, baseado na diminuição ou aumento desse segundo mensageiro, os receptores de adenosina foram classificados como receptor A<sub>1</sub> ou A<sub>2</sub> respectivamente (VAN CALKER et al., 1979; HASKÓ et al., 2008). Estudos posteriores reclassificaram os receptores de adenosina, o receptor A<sub>2</sub> foi dividido em dois subgrupos: receptor A<sub>2A</sub> de alta afinidade e receptor A<sub>2B</sub> de baixa afinidade pelo ligante natural (BRUNS et al., 1986; HASKÓ et al., 2008). A mais recente descoberta e caracterização do receptor A<sub>3</sub> deixa claro que, este efetua certas respostas celulares tais como degranulação dos mastócitos, em parte, pela diminuição das concentrações intracelulares de AMPc (JIN et al., 1997; HASKÓ et al., 2008).

Os receptores de adenosina A<sub>1</sub> estão amplamente distribuídas tanto no sistema nervoso central (SNC), como também em tecidos periféricos (BARALDI et al., 2008). Ativação do receptor de adenosina A<sub>1</sub> pode levar a modulação de inúmeros sistemas efetores incluindo adenilato ciclase (AC), fosfolipase C (PLC), canais de potássio, canais de cálcio e guanilato ciclase (Figura 11) (BURNSTOCK, 2007; VARANI et al., 2010). As primeiras mudanças nos segundos mensageiros associados com ativação de A<sub>1</sub> são diminuição da produção do AMPc ou aumento dos níveis de cálcio, dependendo do sistema efetor.

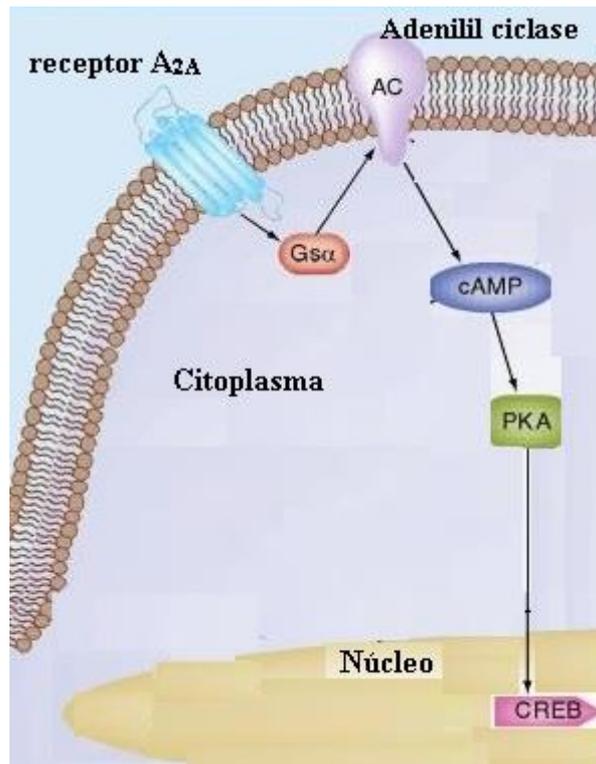
Ativação do receptor de adenosina A<sub>1</sub> pode produzir uma inibição da liberação de neurotransmissores e induzir hiperpolarização neuronal mediando efeito sedativo, anticonvulsivante, ansiolítico e depressão locomotora (GESSI et al., 2008). Na literatura evidências apontam para o envolvimento de receptor de adenosina A<sub>1</sub> no controle da transmissão dolorosa, produzindo efeitos antinociceptivos em vários modelos animais. (ROMAGNOLI et al., 2008; KIESMAN et al., 2009; SCHMIDT et al., 2009; SOWA et al., 2010; PADOVAN et al., 2013). No sistema cardiovascular, o receptor de adenosina

A<sub>1</sub> medeia efeitos cronotrópicos, ionotrópicos e dromotrópicos negativos, sugerindo a utilização de agonistas para esse receptor como agentes cardioprotetores e para o tratamento de arritmias e fibrilação atrial (ELZEIN & ZABLOCKI, 2008). Tais efeitos cardíacos resultam do fato do receptor de adenosina A<sub>1</sub> se acoplar à proteína G inibitória (G<sub>i</sub>). No rim, ativação de receptor A<sub>1</sub> medeia a vasoconstrição, diminui a taxa de filtração glomerular, inibe a secreção de renina e a sua inibição poderia representar uma nova estratégia para o tratamento de hipertensão e edema (VALLON & OSSWALD). O papel da adenosina na regulação do sistema respiratório é bem conhecido e níveis elevados de adenosina foram encontrados em lavados broncoalveolar (LBA), sangue e exalado respiratório condensado de pacientes com asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Antagonistas de receptor A<sub>1</sub> também poderiam ser usados na asma e DPOC, uma vez que a adenosina induz broncoconstrição aguda via estimulação de receptor A<sub>1</sub> (CARUSO et al., 2009; WILSON et al., 2009)



**Figura 11.** Representação esquemática de segundos mensageiros e algumas das mais relevantes vias de sinalização intracelular mediado pelos receptores de adenosina A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> no processo inflamatório. Adaptado de VARANI et al., 2010

Os receptores de adenosina A<sub>2A</sub> são encontrados ubiquamente no corpo, e a sua expressão é alta no sistema imune e no sistema estriato-palidal no cérebro (FREDHOLM et al., 2001; JENNER et al., 2009). Alguns estudos têm sugerido o possível envolvimento dos receptores de adenosina A<sub>2A</sub> na patogênese de doenças neuronais, incluindo a doença de Huntington e doença de Parkinson e foi demonstrado um aumento da densidade de receptores de adenosina A<sub>2A</sub> em células sanguíneas periféricas de pacientes com essas doenças em comparação com indivíduos saudáveis da mesma idade (VARANI et al., 2007; VARANI et al., 2010; PADOVAN et al., 2013). Há trabalhos que descrevem uma alta expressão de receptores A<sub>2A</sub> em paciente com artrite reumatóide (AR) (VINCENZI et al., 2013). A adenosina tem efeitos protetores sobre o sistema cardiovascular e efeito anti-inflamatório em alguns tecidos. A ativação dos receptores A<sub>2A</sub> em células do músculo liso da coronária, células endoteliais e monócitos/macrófagos resulta em vasodilatação, neo-angiogênese e inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (BELARDINELLI et al., 1998; GESSI et al., 2000). Esses receptores são acoplados a proteína G estimulatória (Gs) que ao ser ativada, irá estimular a atividade da AC, mediando o aumento de AMPc intracelular; como consequência este segundo mensageiro irá ativar a proteína cinase A (PKA) a qual participa da fosforilação de determinadas proteínas, por exemplo a proteína do elemento de ligação em resposta ao AMP (CREB) (Figura 12) (NEMETH et al., 2003; VARANI et al., 2003; HASKÓ et al., 2008 VARANI et al., 2010).

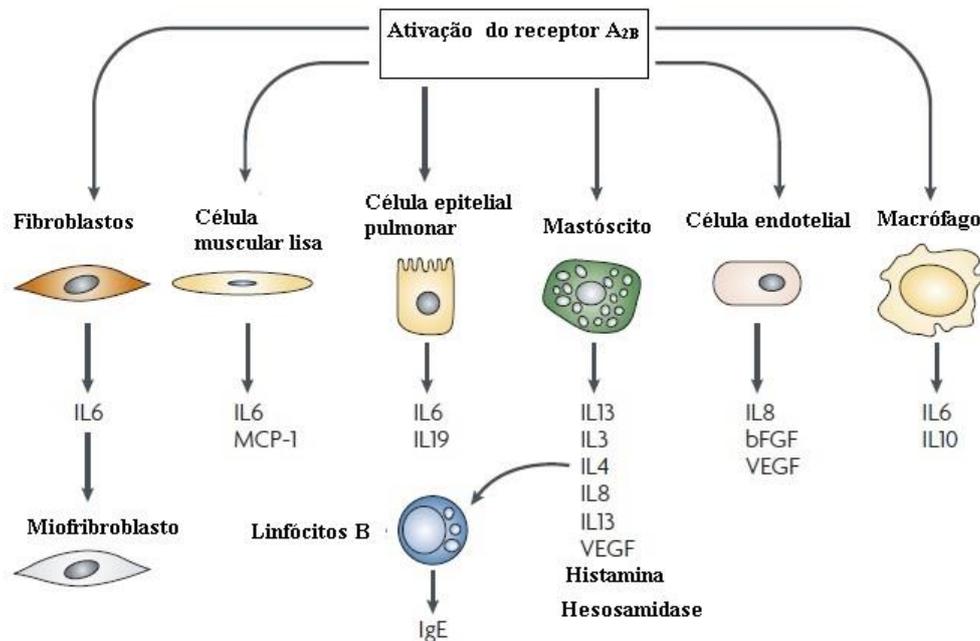


**Figura 12.** Esquema representativo do receptor A<sub>2A</sub> acoplado à proteína Gs, que ativa a adenilato ciclase, aumentando os níveis do AMPc intracelular, que ativa a proteína quinase A, responsável pela fosforilação de proteínas alvos (Modificado de PADOVAN et al., 2013).

Os receptores A<sub>2B</sub> são expressos no cérebro, baço, pulmão, cólon, rim e coração (GRENZ et al., 2008). A expressão também foi detectada no endotélio vascular e nas células do músculo liso onde têm sido implicado na regulação do tônus vascular através dos efeitos vasodilatadores mediados por estes receptores (FEOKTISTOV & BIAGGIONI, 2011).

Os receptores A<sub>2B</sub>, quando ativados, se acoplam com a proteína Gs que estimulam a atividade da adenilato ciclase, mediando o aumento e acúmulo de AMPc (VARANI et al., 2003). Entretanto na literatura alguns autores descrevem que os receptores A<sub>2B</sub> tem sido mostrado se acoplar com proteínas Gq regulando desse modo os níveis de cálcio intracelular. Logo, os receptores A<sub>2B</sub> são reconhecidos por modular a liberação de alguns mediadores inflamatórios (VARANI et al., 2010). É importante ressaltar que a investigação de receptores de adenosina em mastócitos implica na via de sinalização A<sub>2B</sub> na degranulação e liberação de diferentes mediadores (SUN et al., 2006). Tem se identificado (Figura 13) que a via de sinalização do receptor A<sub>2B</sub> como

uma via em potencial na patogênese da asma (ZHOU et al., 2009). Uma variedade de células do sistema imune modula a asma. Uma ativação dos receptores  $A_{2B}$  aumenta a produção de interleucina 6 (IL-6) por fibroblastos pulmonares, a qual por sua vez leva a um aumento da formação de miofibroblastos, que são capazes de depositar matriz extracelular. Ativação do receptor  $A_{2B}$  promove a produção de fatores pró-inflamatórios pelos mastócitos e estimula a degranulação mastocitária. O aumento da produção de interleucina 4 (IL-4) seguida da ativação do receptor  $A_{2B}$  de mastócitos leva a um aumento da produção de imunoglobulina E (IgE) em linfócitos B. Células endoteliais liberam fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); células musculares lisas liberam proteínas quimioatrativas para monócitos (MCP1).



**Figura 13.** Representação esquemática da ativação do receptor  $A_{2B}$  que tem ações pró-inflamatórias gerais por estimular as funções pró-inflamatórias de vários tipos de células do sistema imune que modulam o processo da asma (Modificado de HASKÓ et al., 2008).

O receptor de adenosina  $A_3$  bastante expresso em células cancerígenas e células inflamatórias. Esse receptor está presente em baixa expressão em outros tecidos como o pulmão, fígado, cérebro, aorta, testículos e coração (FISHMAN et al., 2012). O receptor  $A_3$  de adenosina, quando estimulado, se acopla a proteína G inibitória (Gi) ou proteína

Gq/11 (Figura 12) que quando ativada resulta na inibição da adenilato ciclase (AC) ou na estimulação de fosfolipase do tipo C e D respectivamente (GESSI et al., 2004; VARANI et al., 2010). É descrito na literatura que ativação desse receptor por agonistas causa efeitos anti-inflamatórios por inibição da biosíntese de citocinas pró-inflamatórias, previne efeitos mielotóxicos de quimioterapia; tem efeito cardioprotetor em pré-condicionamento isquêmico e na proteção direta durante as isquemias; atenua a lesão do músculo esquelético causada por isquemia e reperfusão ou exercício excêntrico; promove efeito protetor da isquemia/reperfusão do pulmão; e efeito neuroprotetor (FISHMAN et al., 2012).

### 1.6.1 Receptores de adenosina na regulação da inflamação

A expressão dos receptores de adenosina pode ser influenciada por condições fisiopatológicas como a inflamação.

No caso dos receptores  $A_1$ , a expressão é regulada positivamente em condições de stress que envolvem a regulação do fator de transcrição nuclear  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) (NAKAMACHI et al., 2003).

Evidências sugerem que receptores  $A_{2A}$  são capazes de mediar a maior parte dos efeitos anti-inflamatórios da adenosina endógena (BLACKBURN et al., 2009; OHTA & SITKOVSKY, 2009). Em particular, a ativação do receptor  $A_{2A}$  leva a supressão da expressão de citocinas e de quimiocinas por células imunitárias, sendo provavelmente o mecanismo dominante relacionado ao efeito anti-inflamatório mediado pela adenosina. A expressão de receptores  $A_{2A}$  foi encontrada na maioria das células inflamatórias, e sua ativação produz várias ações anti-inflamatórias (BLACKBURN et al., 2009; PADOVAN et al., 2013). A adenosina, atuando em receptores  $A_{2A}$  regula a produção de uma ampla variedade de citocinas, tais como TNF- $\alpha$ , e quimiocinas incluindo proteína inflamatória de macrófagos (MIP) -1 $\alpha$  (também conhecido como CCL3), MIP-1b (CCL4), MIP-2 $\alpha$  (CXCL2) e MIP -3 $\alpha$  (CCL20). Neutrófilos são células recrutadas para os locais da inflamação pelo endotélio venular pós-capilares, que altera a expressão de moléculas de adesão sobre a sua superfície para capturar os neutrófilos a partir da circulação. A adenosina, por meio dos receptores  $A_{2A}$ , inibe a adesão de neutrófilos ao endotélio através da diminuição da aderência e expressão das moléculas de adesão expressas em neutrófilos (HASKÓ et al., 2008).

Estudos utilizando modelos  $A_{2A}$ -knockout têm demonstrado que a ativação de receptores  $A_{2A}$  inibe a secreção de interleucina 2 (IL-2) por células T  $CD4^+$  naive reduzindo assim a sua proliferação, confirmando os efeitos imunossupressores da estimulação de  $A_{2A}$  (NAGANUMA et al., 2006; SEVIGNY et al., 2007). Ativação do receptor  $A_{2A}$  também suprime a produção de ambos IFN- $\gamma$  e interleucina 4 (IL-4) por células T  $CD4^+$  e polariza células  $T_{H1}$  e  $T_{H2}$  (HASKÓ et al., 2008).

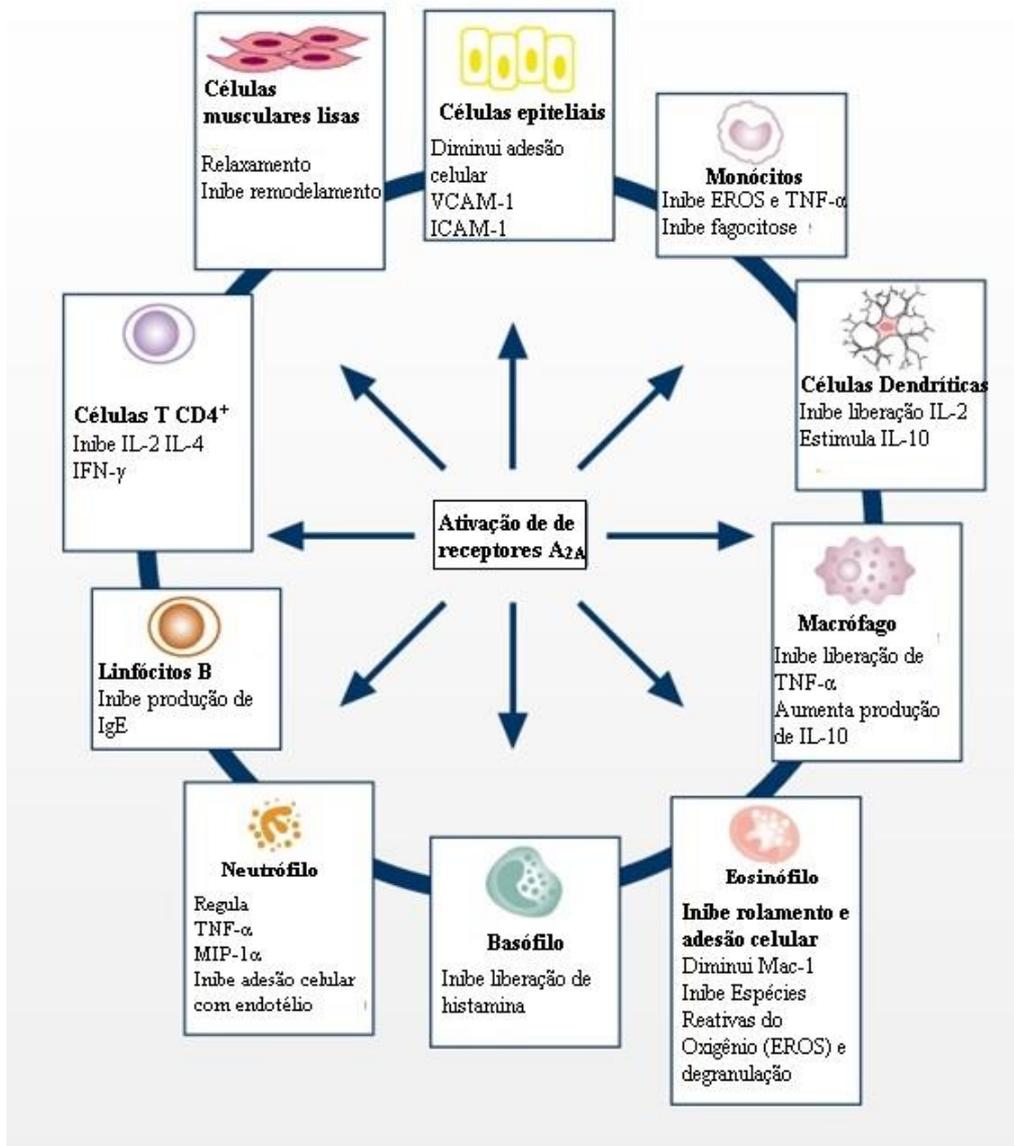
Alguns estudos sugerem que em macrófagos a ativação dos receptores  $A_{2A}$  modula a inibição de TNF- $\alpha$  e aumenta a produção de interleucina-10 (IL-10) levando a um efeito anti-inflamatório (HASKÓ et al., 2008).

Os neutrófilos são células que migram para o local do processo inflamatório para defesa do organismo, sendo sempre as primeiras a chegarem nas áreas de inflamação. Eles precisam atravessar a camada de células epiteliais para chegar no local da injúria. As células endoteliais, em um processo inflamatório, super-expressam moléculas de adesão de células vascular 1 (VCAM-1) e molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1). A interação de E-selectinas, proteína expressa na superfície dos neutrófilos com VCAM-1, expressa em células epiteliais, inicia o processo de rolagem ao longo da superfície epitelial. Os neutrófilos expressam antígeno macrofágicos-1 (Mac-1), sendo responsável para uma adesão mais firme da célula através de ICAM-1. O aumento de adenosina leva preferencialmente a ativação de receptores  $A_{2A}$ , que medeiam aumento de AMPc nos neutrófilos, o qual leva a uma baixa regulação de Mac-1. Nas células endoteliais, ativação de receptores  $A_{2A}$  por elevados níveis de adenosina leva a supressão da adesão celular por reduzir os níveis da expressão de VCAM-1 (KOEPPEN et al., 2011). Além disso, pesquisadores da GlaxoSmithKline desenvolveram um composto com dupla ação como agonista  $A_{2A}$  e antagonista  $A_3$  que foi capaz de inibir tanto a produção de espécies reativas de oxigênio e degranulação de eosinófilos humanos e neutrófilos *in vitro* (BEVAN et al., 2007; RIMMER et al., 2007).

Monócitos e macrófagos são um grupo heterogêneo de células mononucleares que são a primeira linha de defesa do organismo. São células presentes na defesa da imunidade inata. Eles fornecem uma fonte primária de moduladores inflamatórios e são altamente adaptáveis com um fenótipo que pode alterar rapidamente em resposta ao ambiente local do tecido inflamado. Possuem receptores do tipo  $A_1$  e  $A_{2A}$ . A ativação de  $A_1$  produz um efeito pró-inflamatório enquanto que a ativação  $A_{2A}$  produz um efeito anti-inflamatório (HASKO et al., 2007).

Os monócitos e macrófagos são uma fonte importante de TNF- $\alpha$ , uma citocina pró-inflamatória envolvida na fisiopatologia de uma série de doenças inflamatórias crônicas. Estudos sugerem que a ativação do A<sub>2A</sub> suprime a produção de TNF- $\alpha$  em monócitos humanos ativados por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (LE VRAUX et al. 1993). Em cultura primária de monócitos humanos ativados por LPS (ZHANG et al. 2005) e de macrófagos de camundongos estimuladas por LPS (EZEAMUZIE E KHAN, 2007), ativação da A<sub>2A</sub> atenuou a liberação de TNF- $\alpha$  de células do sistema imune, ao passo que a ativação dos receptores de adenosina A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub> não obtiveram qualquer efeito sobre a formação e liberação do TNF- $\alpha$  nas células sistema imune (ZHANG et al. 2005).

As células dendríticas (CDs) são células apresentadoras de antígenos altamente especializadas, que desempenham um papel importante na iniciação e regulação da resposta imunológica. Elas migram para os locais de lesões e infecções, processam os antígenos e ativam a células T “*naives*” (BANCHEREAU & STEINMAN 1998; MACAGNO et al., 2007). CDs imaturas (CDsi) sofrem um processo de maturação após a exposição a sinais pró-inflamatórios (exemplos: TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) e agentes patogênicos como LPS (BANCHEREAU & STEINMAN 1998). Os receptores de adenosina são diferencialmente expressos em CDs humanas. O tratamento com LPS induz a diferenciação e maturação de CDs humanas que passam a expressar principalmente receptores A<sub>2A</sub> (PANTHER et al. 2001; FOSSETTA et al. 2003). A ativação de A<sub>2A</sub> aumenta a atividade da adenilato ciclase e inibe a produção de citocina pró-inflamatória, IL-12, reduzindo assim a capacidade das CDs para promover a diferenciação de células T para o fenótipo T<sub>H1</sub>, e estimula a produção de citocina anti-inflamatória, IL-10 (BANCHEREAU & STEINMAN 1998; PANTHER et al. 2001, 2003). A Figura 14 resume a atividade anti-inflamatória que os receptores A<sub>2A</sub> desencadeiam nas células.



**Figura 14.** Esquema representativo da ativação dos receptores A<sub>2A</sub> nas células do sistema imune, células musculares e células epiteliais <http://www.thinkcopdifferently.com/en/Think-COPDifferently/PDE4-inhibition-in-COPD> Acesso em janeiro de 2015

Em suma, a ativação de receptores A<sub>2A</sub> aumenta o nível de AMPc, que apresenta ação anti-inflamatória devido a inibição de liberação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  para o tecido injuriado (Figura 15) (MOROVIC-VERGLES et al., 2008).

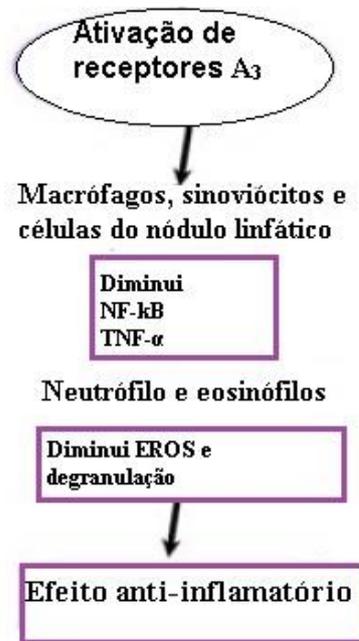
Por outro lado, a ativação de receptores A<sub>2B</sub>, no pulmão, por exemplo, tem ação pró-inflamatória, pois aumenta a produção de IL-6 pelos fibroblastos pulmonares levando ao aumento da formação de miofibroblastos, os quais vão depositar matriz

extracelular. Também promove a produção de fatores pró-inflamatórios pelos mastócitos, estimula a degranulação mastocitária e a produção de IL-4 o que leva a produção de imunoglobulina E (IgE) (HASKÓ et al., 2008).

Os receptores A<sub>3</sub> foram identificados como alvo para desenho de novo agentes anti-inflamatórios, pois ao serem ativados desregulam a via de sinalização de NF-κB, levando a inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-6, IL-12); inibe ativação de macrófagos e inibe o receptor ativador de NF-κB (RANKL), causando apoptose das células inflamatórias (FISHMAN et al., 2012). Também é capaz de inibir a degranulação de eosinófilos, liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS) promovendo um efeito anti-inflamatório (Figura 16) (BOREA, et al., 2009).

	Efeito	Ação na célula
A <sub>1</sub>	Pró -inflamatório	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ Citocinas inflamatórias, liberação de histamina, radicais livres</li> <li>• ↑ Quimiotaxia, degranulação, fagocitose, adesão endotelial</li> </ul>
A <sub>2B</sub>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ Liberação de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-8)</li> <li>• ↑ Degranulação</li> </ul>
A <sub>2A</sub>	Anti-inflamatório	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ Citocinas inflamatórias (TNF-α, IL-6, IL-8, IL-9)</li> <li>• ↓ Proliferação de linfócitos e quimiotaxia</li> </ul>
A <sub>3</sub>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ Citocinas inflamatórias (TNF-α, IL-6, IL-8)</li> <li>• ↓ Linfócitos e radicais livres</li> <li>• ↓ Neutrofilia, produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, degranulação e quimiotaxia</li> </ul>

**Figura 15.** Efeitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios dos receptores de adenosina A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub> (VARANI et al., 2010)



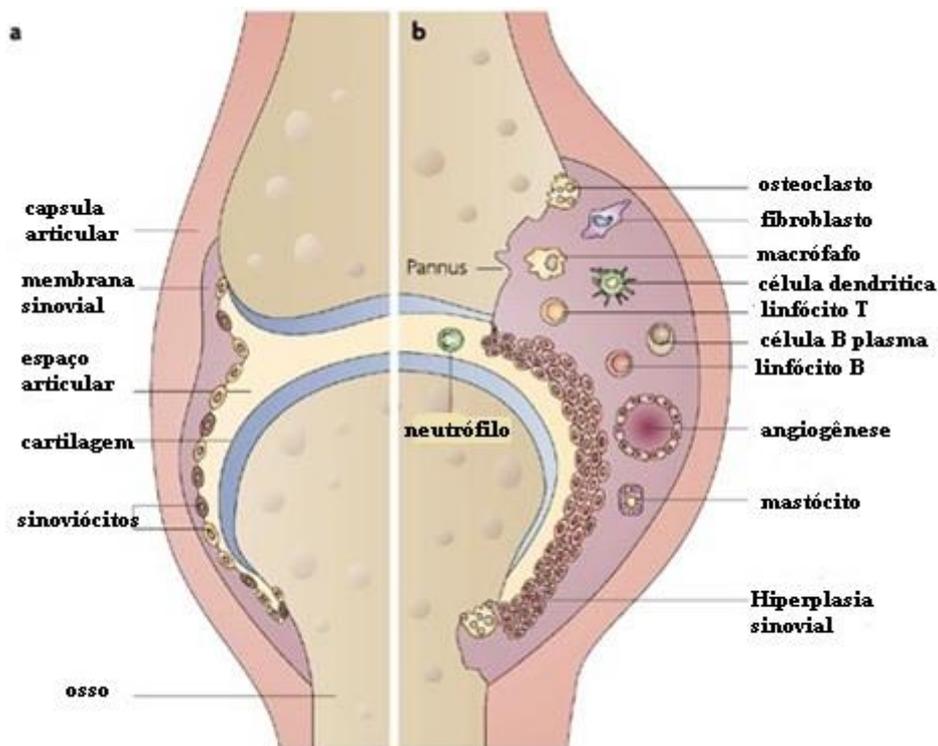
**Figura 16.** Esquema representativo da ativação de receptores A3 para o efeito anti-inflamatório.

Pelo exposto sugere-se que a via da adenosina parece estar envolvida no controle da inflamação, incluindo as doenças articulares (artrite reumatóide, lúpus, etc) sugerindo que esses receptores possam ser considerados como alvos terapêuticos interessante no tratamento de algumas enfermidades inflamatórias crônicas tal como a artrite reumatoide (AR) (COHEN et al., 2004; TESCH et al., 2004; COHEN et al., 2005).

#### 1.6.2. Receptores de adenosina como alvos terapêutico para tratamento da artrite reumatóide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica de etiologia desconhecida que afeta aproximadamente 1% da população mundial. As mulheres são cerca de três vezes mais afetadas que os homens. Infecções, toxinas e medicamentos têm sido relacionados ao desenvolvimento da AR, bem como influencia genética e hormonal, fatores ambientais, e imunológicos (LEE E WEINBLATT, 2001; WEISSMANN, 2006). É caracterizada pela destruição da arquitetura das articulações mediada por células do sistema imune (FIRESTEIN 2003).

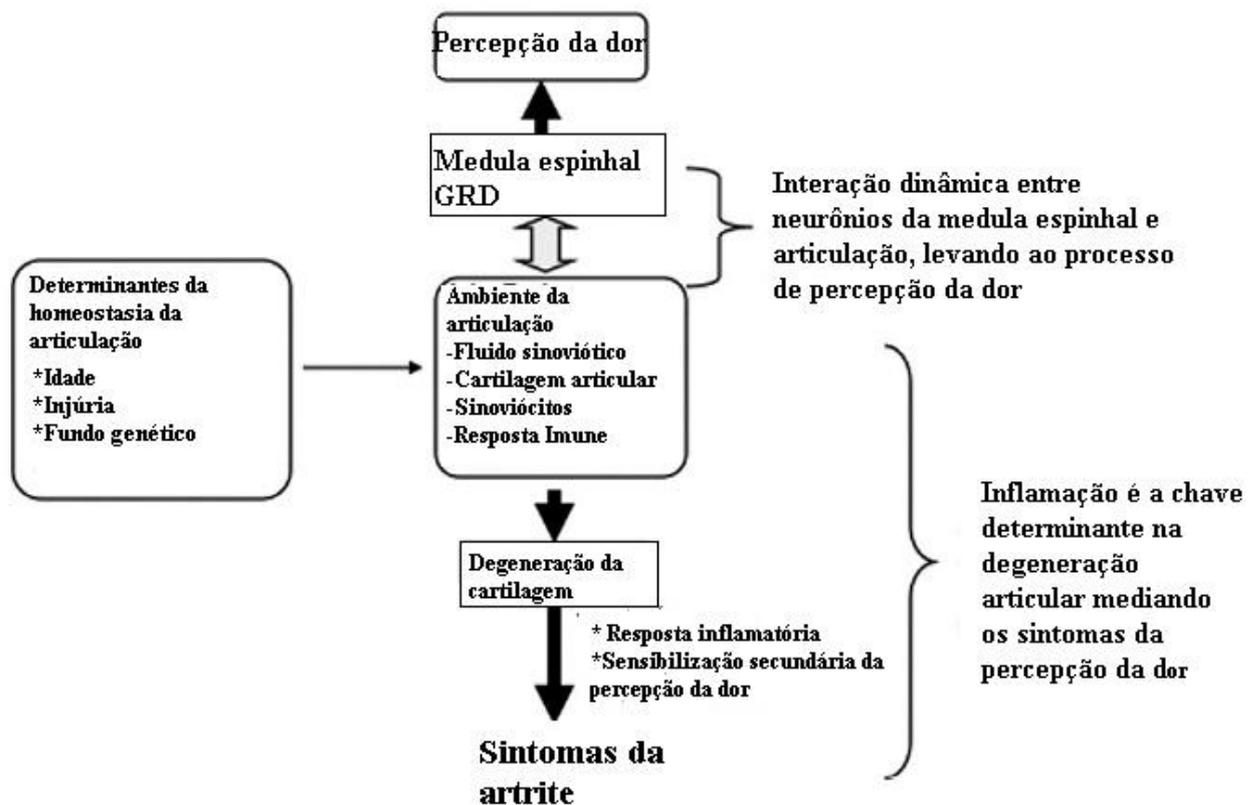
Numa articulação saudável, existem dois tipos de células: os macrófagos residentes e os sinoviócitos, os quais revestem a superfície das articulações e são responsáveis pela produção do líquido sinovial que nutre e lubrifica as articulações. Na AR, existe uma hiperplasia sinovial e secreção de altos níveis de mediadores pró-inflamatórios incluindo citocinas, metaloproteinases e fatores de crescimento. Tudo isso pode levar a destruição da articulação que é a principal característica dessa doença (GOLDRING, 2007; JOSEPH et al., 2010). Os mediadores pró-inflamatórios liberados atuam em diferentes populações celulares, incluindo os linfócitos, neutrófilos, células endoteliais, sinoviócitos, osteoclastos e condrócitos, os quais são responsáveis pela manutenção da inflamação, angiogênese e quimiotaxia (Figura 17) (WEISSMANN, 2006; GOLDRING, 2007).



**Figura 17.** Representação esquemática de uma articulação saudável em **a** com uma camada fina de células sinoviais formando uma linha. Em **b** observa-se um joelho com AR. Há hiperplasia da camada sinovial e infiltrado de células inflamatórias. Em última análise, desenvolve-se o "pannus", que é destruição (erosão) do tecido articular localizado entre a membrana sinovial e da cartilagem. Células do sistema imune podem migrar da matriz para cartilagem articular e para dentro da matriz óssea subjacente formando o "pannus" (STRAND et al., 2007)

A membrana sinovial é invadida por linfócitos T e B, os quais ficam dispersos ou às vezes se organizam em folículos linfóides. Com a progressão da doença, os sinoviócitos proliferam e, a hiperplasia sinovial torna-se invasiva destruindo a cartilagem articular e a camada óssea. Os mediadores inflamatórios liberados, tais como a interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), TNF- $\alpha$  e IL-6 são fundamentais na fisiopatologia da AR, pois ativam vários tipos de células incluindo linfócitos, células endoteliais, neutrófilos, osteoclastos, condrócitos, sinoviócitos e regulam positivamente um número de vias ligadas à inflamação (GOLDRING, 2007; JOSEPH et al., 2010)

A dor é o sintoma mais comum de pacientes com artrite reumatóide (LEE, 2013). Os nociceptores periféricos presentes nas articulações respondem a estímulos ambientais (calor doloroso, frio e estimulação mecânica). A homeostase local da articulação ao ser perturbada pelas moléculas endógenas liberadas na inflamação pode tornar os nociceptores mais sensíveis frente a um estímulo (Figura 18). Isso gera um quadro de dor crônica que é acompanhada pelo aumento das respostas comportamentais para estímulos inócua (alodinia) e nociceptivos (hiperalgesia). Tal hipersensibilidade é clinicamente relevante e está associada a alterações funcionais. A inflamação das fibras nervosas provoca sensibilização periférica levando a alterações na condução destas fibras ou nas propriedades de neurotransmissores liberados podendo ocasionar, em alguns casos, a sensibilização central (PINTO & TAVARES 2007; MCMAHON et al., 2008).



**Figura 18.** Esquema do status fisiopatológico de cada componente na articulação em que estão ligados a degeneração articular e percepção da dor (Adaptado de LEE et al., 2013)

A dor crônica gerada pela AR causa grandes problemas médicos e socioeconômicos em países industrializados, devido aos custos diretos e indiretos, sendo a causa mais comum de incapacidade em pessoas de meia-idade (VAN TULDER, et al.,1995). O custo para os Estados Unidos, por conta da perda de produtividade e com tratamento, excede 635.000 bilhões de dólares por ano (LEE, 2013).

O maior esclarecimento da patogênese da AR levou à criação de medicamentos mais eficazes. Nos últimos 15 anos, a abordagem terapêutica passou por uma série de modificações inovadora voltadas para um tratamento mais precoce e agressivo. Depois de um longo período de uso de drogas anti-reumáticas, os chamados fármacos modificadores da doença isoladamente ou em combinação com agentes biológicos (bloqueadores de TNF- $\alpha$ ). Esses agentes biológicos são bastante úteis e revolucionou o tratamento da AR, pois é uma nova alternativa de tratamento e é usado como estratégia para combater a AR, com o objetivo de alcançar o mais rápido possível a remissão

clínica e para retardar ou parar a progressão da doença articular (CAPORALI et al., 2009; SENOLT et al., 2009). O mecanismo de ação é impedir a ligação da citocina com seu receptor. Porém estudos demonstram respostas adversas *in vivo* com base em testes *in vitro* ou *ex vivo*. Houve o aumento da incidência de tuberculose e outras infecções intracelulares quando se faz o uso de bloqueadores de receptores de TNF- $\alpha$  (terapia biológica) refletindo assim a importância crucial dessa citocina para o organismo (KEANE et al., 2001; GARDAM et al., 2003; WOLFE et al., 2004; STRAND et al., 2007).

Como já foi descrito, a adenosina poderia restabelecer a homeostasia em um processo inflamatório. Análogos da adenosina inibem a destruição da articulação quando usados no tratamento da artrite induzida por adjuvante e da artrite séptica (BOYLE et al., 2002; FISHMAN et al., 2006). O receptor de adenosina A<sub>2A</sub> tem um papel crucial na fisiopatologia da AR, pois camundongos deficientes de receptor de adenosina A<sub>2A</sub> apresentam intenso aumento da inflamação e injúria no tecido (induzida por concanavalina A) (OHTA & SITKOVSKY 2001; NEUMAN et al., 2014). Esse receptor é altamente expresso em paciente com AR, podendo ser útil como possível biomarcador e uma nova estratégia farmacológica para seu tratamento. O uso de fármaco agonista seletivo poderia induzir marcado efeito anti-inflamatório mediado através de inibição de citocinas pró-inflamatórias como por exemplo TNF- $\alpha$  (VARANI et al., 2010).

Este projeto tem como meta a avaliação farmacológica do LASSBio-1359 descrito como inibidor de PDE 4 e agonista do receptor de adenosina A<sub>2A</sub> em modelo murino de artrite. A demonstração de uma nova classe de fármaco que reduza as alterações consequentes da inflamação crônica é de extrema importância para contribuir com o desenvolvimento de um novo medicamento para o tratamento da AR.

### 1.7. Modelo de monoartrite

A monoartrite induzida em animais (camundongos, ratos) mimetiza a artrite reumatóide de humanos em apenas uma das patas do animal, e é induzida através de uma injeção intradérmica ou subcutânea do Adjuvante Completo de *Freund* (CFA), que é composto de uma micobactéria inativada (pelo aumento da temperatura), *Mycobacterium butyricum* ou *Mycobacterium tuberculosis*, juntamente com óleo de parafina ou mineral, com tween 80 (agente emulsificante) e salina. Essa solução

óleo/água resulta na liberação lenta do antígeno, o qual aumenta sua potência para estimular a imunidade via celular. Essa emulsão imunogênica é utilizada para desencadear poliartrite em ratos, camundongos e cobaias introduzido nos EUA pelo imunologista Jules Freund (1891-1960). A forma incompleta do adjuvante de *Freund* (IFA) não inclui a micobactéria. O componente ativo no CFA é o peptidoglicano da parede celular bacteriana, tipicamente composto de quatro a cinco aminoácidos iniciando com L-alanina e D-glutamina. Produtos menores como dipeptídeos também podem ser imunoreativos (OGAWA et al., 2011). Originalmente o CFA foi injetado intradermicamente na base da cauda, resultando em artrite crônica envolvendo múltiplas articulações (PEARSON & WOOD, 1959; RAINSFORD, 1982). A poliartrite induzida pelo adjuvante tem muitas desvantagens, como um modelo experimental, em particular a doença sistêmica generalizada que é resultada após a injeção, e tem sido criticada devido ao severo desconforto e estresse resultante sobre os animais. A poliartrite em ratos foi modificada por muitos grupos de pesquisa na tentativa de diminuir artrite severa, removendo fatores complicantes no modelo. Uma das modificações envolveu a injeção local de CFA dentro ou ao redor da articulação tíbia/tarsal (STEIN et al., 1988; GRUBB et al., 1991; BUTLER et al., 1992; DONALDSON et al., 1993). Essas modificações resultaram em uma monoartrite localizada permitindo um estudo da artrite sem os fatores complicantes como pouca mobilidade do animal, peso alterado e doenças sistêmicas. Estudos histológicos mostraram que a artrite nesse modelo pareceu ser menos severa do que o modelo clássico de poliartrite, mas ainda mostra muitas características da AR tais como formação de *pannus* sem características de doenças severas como anquilose articular. (DONALDSON et al., 1993). No modelo de monoartrite, o CFA geralmente é injetado diretamente na articulação do tornozelo e as vezes ao redor dos tendões. Essa injeção local dentro do tecido é um modelo padrão de pesquisa de estudos da dor por muito anos. Esse modelo em camundongos é, por conseguinte, na maior parte dos aspectos semelhantes a dos ratos. Em camundongo, a injeção subdermicamente de CFA ao redor da articulação tíbia/tarsal mimetizou o modelo de artrite inflamatória crônica demonstrando que 100% dos camundongos injetados com CFA mostraram uma artrite unilateral da pata traseira no local da injeção de CFA, sem envolvimento de outras articulações, em particular, a articulação contralateral tíbia/tarsal. Histologicamente, essas articulações de camundongos que foram injetadas com CFA mostraram que a artrite fica presente 20 dias após a injeção

(CHILLINGWORTH & DONALDSON, 2003). Foi verificado que a inflamação crônica desencadeia uma hiperalgesia (estímulo nocivo no local da inflamação) que é desenvolvida dentro de um dia, alcançando um pico dentro de 3 dias, e persiste por algumas semanas (GRUBB et al., 1993). O tempo de curso da progressão e o estudo da eficácia de vários agentes analgésicos e anti-inflamatórios são usados para avaliação no tratamento de dor crônica inflamatória, visto esse modelo de artrite crônica localizada consistente, associada com inflamação induz mudanças nociceptivas comportamentais nos animais.

## **2 Objetivos**

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as ações do derivado *N*-acilidrazônico LASSBio-1359 em animais com monoartrite.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Demonstrar o possível efeito antinociceptivo de LASSBio-1359, em modelo murino de dor aguda;
- Determinar os mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva do LASSBio-1359;
- Avaliar o possível efeito antinociceptivo do derivado em modelo de monoartrite;
- Avaliar a expressão de TNF- $\alpha$  através da técnica de “western blot”;
- Avaliar as alterações histopatológicas nos grupos com monoartrite tratados ou não com LASSBio-1359;
- Investigar outros efeitos ao nível de SNC, através da avaliação de atividade sedativa, ansiolítica e coordenação motora dos animais.

# **3 Material e Métodos**

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Animais**

Em todos os experimentos foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos, da linhagem *Swiss*, pesando entre 16-25 g, provenientes do biotério do PPGFQM do Instituto Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno com dimensões aproximadas de 41 cm de comprimento x 34 cm de largura x 16 cm de altura, onde permaneceram sob condições constantes de temperatura equivalente a  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , com livre acesso a água e a uma dieta controlada a base de ração tipo pellets. Os camundongos foram submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 h, sendo a fase clara compreendida entre 6 h e 18 h.

#### **3.2. Condições experimentais**

Os animais foram aclimatados na sala de experimentação, pelo menos 30 min antes da execução dos testes. Esse procedimento foi realizado no intuito de proporcionar a adaptação dos animais ao novo ambiente e, dessa forma, minimizar possíveis alterações comportamentais. Os experimentos foram executados no período compreendido entre 8 h e 17 h, sendo os animais utilizados uma única vez, em seguida, eutanasiados na câmara com dióxido de carbono. Animais usado em testes de avaliação crônica foram sacrificados usando a guilhotina para que houvesse a retirada de alguns tecidos para posterior análise. Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de animais em Experimentação Científica do CCS (CEUA) / UFRJ, sob a certidão nº DFBCICB069.

#### **3.3. Substâncias utilizadas**

- Ácido acetilsalicílico (Sigma, EUA);
- Ácido etilenodiamino tetra-acético – EDTA (Vetec, Brasil);
- BRL 44408 (Tocris Bioscience, EUA);

- Carragenina (Sigma, EUA);
- Cloridrato de Ioimbina (Tocris Bioscience, EUA);
- Diazepam (Cristália, Brasil);
- Dimetil-Sufóxido-DMSO (Cristália, Brasil);
- Flumazenil (Cristália, Brasil);
- Formaldeído P.A. 35% (Isifar, Brasil);
- Indometacina (Sigma, EUA);
- LASSBio-1359 (LASSBio / UFRJ, Brasil);
- Midazolam (Cristália, Brasil);
- *Mycobacterium butyricum* (Becton, Dickinson e cia, EUA),
- Sulfato de atropina (Sigma-Aldrich, Brasil);
- Sulfato de morfina (Cristália, Brasil);
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, EUA);
- Tween 80 (Sigma-Aldrich, EUA);
- ZM 241385 (Tocris, EUA)

#### **3.4. Derivado *N*-Acilidrazônico LASSBio-1359**

A substância sintética LASSBio-1359 (E)-*N'*-(3,4-Dimetoxibenzilideno)-*N*-metilbenzoidrazida) foi cordialmente cedida pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio<sup>®</sup>) sob a coordenação do professor Dr. Eliezer J. Barreiro. A substância obtida a partir do grupamento *N*-acilidrazônico, substituído por anéis aromáticos na posição imina e acila apresenta um grau de pureza de  $\geq 98.0\%$  em cromatografia líquida de alta eficiência e possui fórmula  $C_{17}H_{18}O_3N_2$  e peso molecular de 298 g/mol.

### **3.5. Preparação da solução de LASSBio-1359 e demais substâncias**

O derivado *N*-Acilhidrazônico foi dissolvido em DMSO imediatamente antes de sua utilização. Foram utilizadas as doses de 1, 2, 5, 10, 20 e 50 mg/kg do LASSBio-1359, para a administração pela via intraperitoneal (i.p.). Enquanto que, a administração via oral (v.o) foi realizada com as doses de 10, 25, 50 mg/kg. Todos os experimentos controle foram realizados com a administração do veículo, ou seja com DMSO.

O diazepam e midazolam foram utilizados como substâncias de referência nas doses de 2 mg/kg ou 4 mg/kg, i.p. dissolvidas em DMSO. A morfina dissolvida em solução salina também foi usada como controle positivo na dose de 10 mg/kg. A preparação das demais substâncias, em suas respectivas doses, foi realizada alguns minutos antes de sua utilização, sendo dissolvidas em água destilada ou solução salina 0,9%.

Todas as doses das substâncias, que foram administradas por via i.p., foram calculadas de forma a possibilitar a injeção de no máximo 40 µL nos camundongos. Já o volume utilizado para a administração por v.o através de gavagem foi de 60 µL. A única exceção foi na administração da formalina e carragenina que foram injetadas em 20 µL, por via intraplantar.

### **3.6. Avaliação da ação antinociceptiva em resposta a formalina**

O teste da formalina foi baseado no método de Dubuisson e Dennis (1977 apud AZEVEDO et al., 2007) e adaptado para camundongos por HUNSKAAR et al. 1985. Neste experimento, foram utilizados grupos de dez camundongos tratados com o veículo (DMSO) ou LASSBio-1359 nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg, i.p. A morfina (10 mg/kg, i.p) e ácido acetilsalicílico (150 mg/kg i.p) foram utilizados como substâncias de referência. Trinta minutos após o tratamento com veículo ou LASSBio-1359, os camundongos receberam 20 µL de uma solução de formalina (solução de formaldeído 2,5% em salina), através de injeção intraplantar na pata traseira direita. O tempo gasto pelos animais em lambar e ou morder a pata injetada, indicativo de resposta nociceptiva, (SOUZA et al., 2000) foi cronometrado por um período de 30 min.

O tempo (em segundos) gasto pelo animal lambendo ou mordendo a pata (Figura 19) durante os primeiros cinco minutos, primeira fase, após a injeção da formalina é resultante da estimulação direta dos nociceptores, levando a uma resposta neurogênica. A inibição dessa fase é indicativa de fármacos analgésicos que atuam a nível central. Em seguida, há uma interfase de aproximadamente 10 minutos caracterizada por mecanismos inibitórios da dor e posteriormente vem a segunda fase. O tempo de lambida da pata durante o intervalo entre 15 e 30 min é um indicador de fase inflamatória gerada tanto pela estimulação de nociceptores como pela liberação de mediadores inflamatórios (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

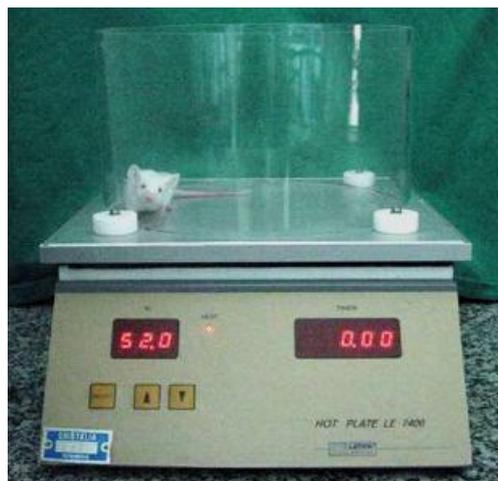
As duas fases foram registradas separadamente, para investigar o tipo de efeito do derivado sobre a resposta nociceptiva induzida pela formalina (AZEVEDO et al., 2007; HEIDARI et al., 2009). O comportamento nociceptivo foi quantificado pela reatividade, em segundos, de lambar ou morder a pata que recebeu a injeção. Uma redução significativa na duração de lambida da pata, pelos animais tratados com determinada substância em comparação a um grupo controle, na primeira fase é considerada como uma resposta antinociceptiva neurogênica (BHANDARE et al., 2010). Os animais que apresentam a resposta comportamental reduzida na segunda fase pode-se aferir uma resposta antinociceptiva inflamatória periférica (KAYSER et al., 2007).



**Figura 19.** Resposta do animal de lambar a pata após ser submetido a injeção intraplantar de formalina.

### 3.7. Avaliação da ação antinociceptiva em placa quente

A placa quente (modelo 7406 – LE) permite avaliar a atividade de substâncias antinociceptivas através de um aparelho cuja temperatura de sua placa, localizada na superfície superior, pode ser controlada. Neste aparelho, um cronômetro acoplado é ativado por um pedal externo, permitindo a medida precisa do tempo do início da reação do animal ao estímulo térmico (Figura 20).



**Figura 20.** Aparelho placa quente usado na avaliação nociceptiva central

Este teste, descrito por Eddy e Leimback (1953), representa uma modificação do modelo original de Woolfe e MacDonald (1944). Consiste em quantificar a latência para o primeiro sinal de lamber a pata ou saltar para evitar o calor. As reações do animal ao estímulo térmico quando é colocado sobre a placa quente ( $52 \pm 0.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) são respostas indicativas de nocicepção (ALMEIDA; OLIVEIRA, 2006a). O estímulo térmico da placa quente é utilizado para avaliar a atividade analgésica mediada por mecanismos centrais (AL-GHAMDI, 2001). A triagem inicial teve como finalidade se avaliar a sensibilidade dos animais ao estímulo térmico. Somente os animais com latência entre 8 e 15s foram usados. Para esta abordagem experimental, cada grupo experimental (n=10) recebeu os seguintes tratamentos via i.p.: LASSBio-1359 10 ou 20 mg/kg; veículo (DMSO) e morfina (10 mg/kg). As medidas no aparelho foram feitas nos tempos 5, 15, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 minutos após administração das substâncias.

Os resultados foram expressos em porcentagem de analgesia sendo o cálculo da resposta antinociceptiva, ou seja, da atividade analgésica (% AA) feito através da seguinte forma:

$$\%AA = \frac{(\text{Latência observada} - \text{Latência controle})}{(\text{Cutt-off} - \text{Latência controle})} \times 100 \%$$

O tempo máximo de permanência na placa (cut-off) foi de 35 s para se evitar qualquer dano à pata do animal.

### **3.8. Modelos de Inflamação para avaliação da hiperalgesia térmica e mecânica**

Inflamação aguda foi induzida por administração intraplantar de 20 µL de solução de carragenina 1 % na pata direita do camundongo (MENDES et al, 2009; NECAS E BARTOSIKOVA, 2013). A carragenina é amplamente usada para induzir inflamação e edema na pata dos animais e que constitui um modelo animal para avaliação da nocicepção no local da inflamação, sem qualquer dano ou prejuízo para a pata inflamada (SUGISHITA et al. 1981; HENRIQUES et al. 1987; JAIN et al. 2001; PETERSSON et al. 2001; PASCHAPUR et al. 2009; SINI et al. 2010; NECAS & BARTOSIKOVA, 2013). Após 2 h e 30 min da administração da carragenina, os animais foram avaliados nos testes comportamentais com as substâncias testes.

A inflamação crônica (monoartrite) foi induzida em camundongos sob anestesia com sevoflurano 2% através da administração de duas injeções subcutâneas de 15 µL do adjuvante completo de Freund (CFA) ao redor da articulação tibio-tarsal da pata direita (Figura 21). CFA continha 5 mg / mL do *Mycobacterium butyricum* (morta/atenuada) (CHILLINGWORTH & DONALDSON, 2003) enquanto, a solução de CFA incompleto (IFA) continha 1,66 mL de tween 80 + 10 mL de óleo de parafina + 6,66 mL de NaCl. Essa solução de IFA foi considerada controle da solução de CFA completo. No 3º dia após a injeção, é perceptível o quadro de inflamação aguda. No 7º dia foi observado quadro de inflamação crônica e iniciou-se a administração oral com a substância teste seguida de avaliação comportamental.



**Figura 21.** Injeção de CFA na pata traseira direita do camundongo anestesiado para desencadear um processo inflamatório crônico – monoartrite.

### 3.8.1. Avaliação da hiperalgesia mecânica

A avaliação da hiperalgesia mecânica pode ser medida através do analgesímetro (Ugo Basil – Itália) (Figura 22).



**Figura 22.** Analgesímetro utilizado para avaliar a hiperalgesia mecânica.

Esse instrumento aplica uma força na superfície dorsal da pata traseira que aumenta em uma razão constante (certo número de gramas por segundos). Essa força é continuamente monitorada por um indicador movido ao longo da escala. Neste experimento observa-se o momento em que o camundongo retira a pata, indicando dor. Ao observar a resposta nociceptiva do animal, o experimentador interrompe a pressão imposta à pata, sendo que o valor indicado na escala do aparelho expresso em gramas, correspondente ao limiar nociceptivo (Figura 23).



**Figura 23.** Avaliação da hiperalgesia mecânica usando analgesímetro

Na avaliação da hiperalgesia mecânica na inflamação aguda, os animais foram divididos em 4 grupos com 10 camundongos cada. Primeiramente foram adaptados ao experimento, depois foi determinado o valor basal da latência, logo em seguida receberam injeção intraplantar de carragenina 1% e aguardou-se por 2 h e 30 min e avaliou-se a latência de retirada da pata ou vocalização do animal. Após isso, iniciou-se o tratamento, por via i.p., com LASSBio-1359 nas doses de 10, 20 mg/kg; um grupo recebeu o veículo e outro foi tratado com indometacina 4 (mg/kg). As medidas foram feitas após 15, 30, 45, 60, 90, 120 min após o tratamento com as substâncias. Uma última avaliação foi feita 24 h após o tratamento.

Para avaliação da hiperalgesia mecânica no modelo de inflamação crônica 5 grupos de 10 animais receberam injeção de CFA e 1 grupo de 10 camundongos recebeu injeção de IFA. A latência de retirada da pata ou vocalização de cada animal ao estímulo foi medida no 3º e 7º dia após a injeção de CFA completo e incompleto. Após a avaliação do sétimo dia, iniciou-se o tratamento por via oral com LASSBio-1359 nas doses de 10, 25 e 50 mg/kg; um grupo recebeu veículo (DMSO) e outro grupo recebeu o ácido acetilsalicílico (AAS) 300 mg/kg. As avaliações foram feitas ao longo dos dias sendo a última realizada no 21º dia após a injeção de CFA.

### 3.8.2. Avaliação da hiperalgesia térmica (teste da imersão da pata)

A hiperalgesia térmica foi avaliada utilizando-se o método da imersão da pata dos camundongos em um banho aquecido a 46 ° C até ser observada a retirada da mesma da água (Figura 24).



**Figura 24.** Avaliação da hiperalgesia térmica usando de um banho aquecido à 46° C

Para esse experimento, o parâmetro observado foi o tempo (s) de retirada da pata da água sendo designado como o limiar nociceptivo térmico. Um “cutoff” de 15 s foi estabelecido para evitar lesões na pata. (LOLIGNIE et al., 2011).

Na avaliação da hiperalgesia térmica na inflamação aguda, os animais foram divididos em 4 grupos com 10 camundongos cada. Primeiramente foram adaptados ao experimento, depois foi feita uma linha de base para avaliação da latência, logo em seguida receberam injeção intraplantar de carragenina 1% e aguardou-se por 2 h e 30 min e avaliou-se a latência de retirada da pata. Feito isso, iniciou-se o tratamento, por via i.p., com veículo ou LASSBio-1359 nas doses de 10, 20 mg/kg ou indometacina. As medidas foram feitas 15, 30, 45, 60, 90, 120 min e 24 h após o tratamento com as substâncias.

No modelo de inflamação crônica 5 grupos de 10 animais receberam injeção de CFA e 1 grupo de 10 camundongos recebeu injeção de IFA. A latência de retirada da pata de cada animal ao estímulo térmico foi medida no 3º e 7º dia após a injeção de

CFA completo e incompleto. Após a avaliação do sétimo dia, iniciou-se o tratamento por via oral com veículo ou LASSBio-1359 nas doses de 10, 25 e 50 mg/kg ou ácido acetil salicílico (300 mg/kg). As avaliações da hiperalgesia térmica foram feitas ao longo dos dias sendo a última realizada no 21º dia após a injeção de CFA.

### 3.9. Avaliação da ação sedativa em campo aberto

A medida da atividade motora pode ser utilizada para avaliar o efeito sedativo de uma substância (HOLLAND e WELDON, 1968). Os animais foram colocados em uma câmara aberta (LE 8811 IR Motor activity monitor, Leticia<sup>®</sup>) medindo 45 x 45 cm, que emite raios infravermelhos a cada 2,5 cm (Figura 25). De acordo com o movimento dos animais neste campo (ambulação, salto, movimentos respiratórios e outros), os feixes são interrompidos e cada interrupção é computada como um movimento.



**Figura 25.** Câmara aberta (LE 8811 IR Motor activity monitor, Leticia<sup>®</sup>) utilizada para o teste de atividade sedativa

O teste do campo aberto é um método para avaliar a atividade exploratória do animal, como também o comportamento de ansiedade e sedação da substância pesquisada (ARCHER, 1973; PRUT; BELZUNG, 2003). A sedação causada por substâncias sedativas torna o animal mais calmo, menos agitado, conferindo assim atividade motora reduzida. Nesse protocolo experimental foi avaliado o número de

movimentos contabilizado em 10 intervalos de 5 min cada, totalizando 50 min de avaliação, sendo os resultados expressos em número de movimentos/minuto.

A substância testada foi utilizada nos grupos experimentais contendo dez animais por dose. Foram avaliados os animais tratados com o LASSBio-1359 nas doses de 1, 2 e 5 e 10 mg/kg (i.p.). O DMSO foi utilizado como grupo controle.

### **3.10. Avaliação da coordenação motora em barra giratória**

O aparelho de rota-rod utilizado foi o modelo EFF 412 (Insight<sup>®</sup>, Brasil) que consiste em um equipamento confeccionado em acrílico resistente (450 mm de altura x 540 mm de largura x 350 mm de profundidade), que possui uma barra giratória não escorregadia, de sistema motorizado, com aceleração progressiva e invariável de 5 a 37 rotações por minuto (rpm). A barra fica suspensa, é dividida em quatro compartimentos por iguais, por paredes plásticas 48 cm cada (Figura 26). Cada compartimento possui em seu piso uma prancha acoplada a um sistema de detecção de queda do animal, que pelo impacto, interrompe automaticamente o contador digital de tempo. Dispositivos de controle automático, presentes no aparelho, permitem que a velocidade de giros da barra seja programada, em rpm, além da contagem automática do número de quedas e do tempo de permanência dos animais na barra.

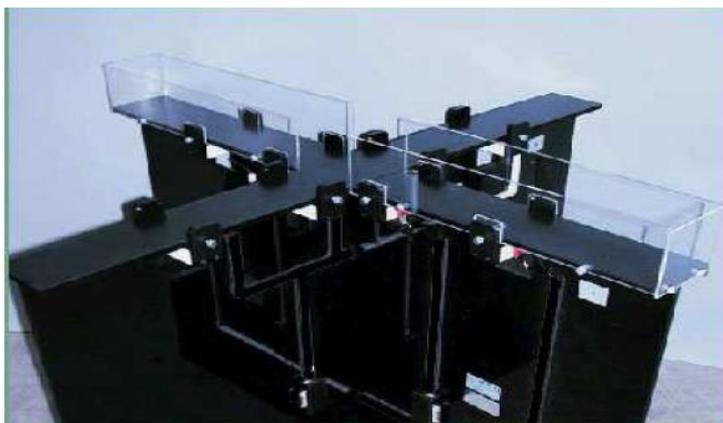


**Figura 26.** Aparelho da barra giratória (rota-rod) utilizado para avaliação da coordenação motora dos camundongos.

O procedimento foi descrito por Dunham e Miya (1957) avalia a coordenação motora dos animais pelo tempo de permanência dos camundongos na barra giratória do aparelho (CAPASSO, 1996). Foi realizada uma pré-seleção dos animais no dia anterior do experimento (n=10), sem administração de substâncias, cujo critério foi a permanência na barra giratória (2,5 cm diâmetro, 8 r.p.m., 45 cm acima do solo) por pelo menos três minutos. Vinte e quatro horas após a pré-seleção, foram administrados nos camundongos por via i.p DMSO (veículo); LASSBio-1359 (1, 2, 5 mg/kg) e após 15, 30, 60 e 120 minutos da administração das substâncias, os animais foram colocados no aparelho, em uma velocidade de 8 rpm. O diazepam (4 mg/kg, i.p.) foi usado como referência (GONÇALVES, et al., 2008). Para cada animal foi registrado o tempo de permanência total na barra, em um período de até 3 minutos sendo o limite máximo de três quedas para cada animal (LIMA, 2009).

### **3.11. Avaliação da ação ansiolítica em labirinto elevado**

O labirinto em cruz elevado, também conhecido como Plus Maze, foi primeiramente desenvolvido para ratos (PELLOW et al., 1985) e adaptado, posteriormente para camundongos (LISTER, 1987). O labirinto em forma de cruz (LE 846, PanLab) é elevado a uma altura de 50 cm do chão e contém dois braços abertos e dois braços fechados que irradiam a partir de uma plataforma central (Figura 27). O número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados são automaticamente contabilizados através do programa Mazesoft-4<sup>®</sup> e os dados armazenados no computador para posterior análise.



**Figura 27.** Labirinto em cruz elevado utilizado para avaliação da ação ansiolítica.

Este teste tem como finalidade verificar os possíveis efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos das substâncias, uma vez que substâncias ansiolíticas levam o animal ao aumento do número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos, enquanto que substâncias ansiogênicas induzem ao aumento dos mesmos parâmetros nos braços fechados (LISTER, 1987). Para esse protocolo experimental, foram utilizados grupos com 10 camundongos tratados com 1, 2, 5 e 10 mg/kg de LASSBio-1359. O DMSO foi usado como controle e midazolam (2 mg/kg, i.p.) foi utilizado como referência. Dez minutos após administração i.p. das substâncias, os animais foram posicionados individualmente, na plataforma central de frente para um dos braços fechados do labirinto e o número de entradas nos braços abertos e fechados e o tempo de permanência nos braços abertos e fechados foram contabilizados por um período de 5 minutos. Considerou-se entrada nos braços quando o animal encontrava-se com as quatro patas dentro dos limites dos mesmos (PELLOW et al., 1985; SONAVANE et al., 2002; MORA et al, 2005a; GRUNDMANN et al., 2007).

Nesse experimento foi avaliado também a interferência do pré-tratamento dos animais com os seguintes antagonistas: flumazenil 10 mg/kg, antagonista do sistema gabaérgico (ARAGÃO et al., 2006); cloridrato de ioimbina 2.5 mg/kg, antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico (SCHANK et al., 2007).

### **3.12. Avaliação histológica da inflamação**

Os animais foram sacrificados 21 dias após a indução da inflamação e ambas as patas traseiras foram removidas. Os tecidos foram fixados em formol tamponado 10% (pH 7) por até 48 horas e as patas foram descalcificadas em solução de EDTA 10 % (pH 7) por mais 14 dias. Todas as amostras foram processadas para parafinização através da passagem por álcool 70% durante a noite seguida de três banhos em álcool etílico absoluto, três em xileno e dois em parafina a 60°C.

Para avaliação histopatológica das patas, lâminas com cortes a 3 µm foram coradas por hematoxilina e eosina (HE), para avaliação qualitativa da inflamação; safranina *O-fast green* FCF.

### **3.13. Expressão de proteínas – “Western blot”**

Os animais utilizados para medida da expressão de TNF- $\alpha$  (LAEMMLI et al., 1970) foram os do tratamento crônico os quais foram anestesiados, sacrificados por decaptação e as patas direitas e esquerdas foram retiradas e imediatamente armazenadas em freezer -80° C para processamento posterior.

Tecidos moles foram homogeneizados em 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 1mM de PMSF, 1mM de Benzamidina, 1 mM de DTT, 1µg de coquetel de inibidores e 1 % de trinton-X 100 e 1% de SDS (OKOROKOV L A, LEHLE L. 1998 com modificações; DAULHAC et al., 2006; ALMELA et al., 2009; DAULHAC et al., 2011)

Para a quantificação das proteínas utilizou-se método de Lowry (1951) empregando-se como padrão solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL. As leituras foram feitas em espectrofotômetro no comprimento de 750 nm. Em seguida, foi feita a separação das proteínas por eletroforese em gel SDS-PAGE (poliacrilamida com sulfato dodecil de sódio). O homogenizado foi colocado em cada caneta com tampão de carga no gel à 10 % e então foi realizada a corrida (LAEMMLI et al 1970). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose usando sistema de transferência (Bio-Rad) a 380 mA por 1 hora. As membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado 8% em PBST por 1 hora com objetivo de bloquear ligações inespecíficas. Após 5 lavagens com PBST, a membrana foi incubada por 24 horas, a 4 ° C, com anticorpo primário para TNF-  $\alpha$  (abcam®). Este anticorpo foi

do tipo monoclonal (desenvolvido em camundongo e o TNF- $\alpha$  é normalmente secretada como um homotrímero com uma massa molecular de 52 kDa ) na concentração 1:1000 diluído em PBST. A incubação do anticorpo secundário inicia após 5 lavagens com PBST e tem duração de 1 h em temperatura ambiente. Todas as incubações foram feitas sob agitação. Após 5 lavagens com PBST e uma lavagem com PBS, realizou-se a revelação através do sistema de detecção baseado em substratos luminescentes, com exposição das membranas ao filme radiográfico Kodak T-MAT G/RA film. O tempo de exposição foi de no mínimo 30 minutos. A autoradiografia gerada foi analisada por meio do analisador de imagens e quantificador (Image J).

### **3.14. Análise estatística**

A análise estatística dos dados foi realizada através do programa GraphPad Prism<sup>®</sup>, versão 5.0 (GraphPad Software Incorporated, San Diego, USA). Os resultados que obedeciam a uma distribuição paramétrica foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de "Dunnett" (post hoc) ou teste  $t$  –"Student" não pareado. Os dados obtidos no teste da barra giratória foram tratados para significância estatística pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn's. Os grupos experimentais foram comparados com seus respectivos grupos controle. Os valores foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.), sendo considerados estatisticamente significativos os valores de  $p$  inferiores a 0,05. Os símbolos (\*) caracterizam o grau de significância, sendo que \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  é em relação ao respectivo grupo controle.

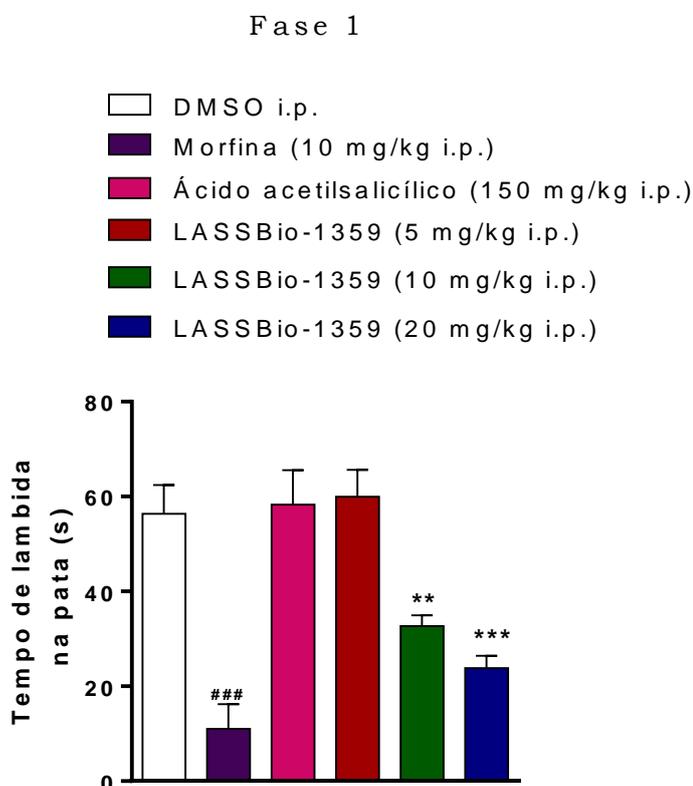
# **4 Resultados**

## 4 Resultados

### 4.1. Avaliação da atividade antinociceptiva

#### 4.1.1. Teste da Formalina

As respostas neurogênica e inflamatória resultantes da injeção de formalina foram observadas após administração intraperitoneal (i.p.) de DMSO, morfina, ácido acetilsalicílico e LASSBio-1359 (Figuras 28 e 29). O tempo de resposta na fase neurogênica do grupo tratado com morfina foi reduzido significativamente para  $11,0 \pm 5,1$  s quando comparado com o tempo de  $56,3 \pm 6,0$  s observado no grupo DMSO. LASSBio-1359 reduziu de forma dependente da dose a resposta neurogênica.

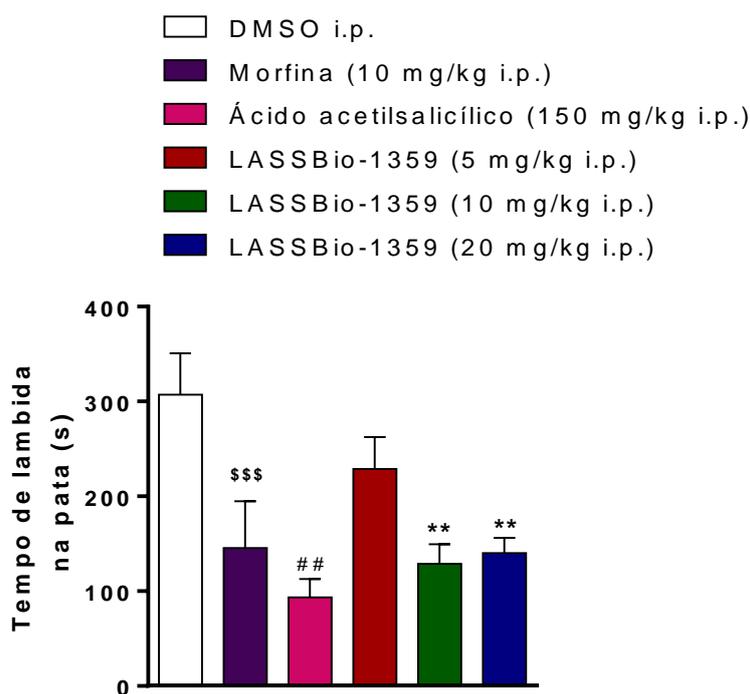


**Figura 28.** Efeito da administração intraperitoneal de LASSBio-1359 (5, 10 e 20 mg/kg), morfina (10 mg/kg) e AAS (150 mg/kg) durante a primeira fase do teste da formalina. Dados são expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=10). ANOVA foi realizado seguido pelo teste de Dunnett's, \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 e ###p<0,001 quando comparado ao grupo controle (DMSO)

Os camundongos tratados com LASSBio-1359 nas doses de 10 e 20 mg/kg apresentaram significativa diminuição do tempo de lambida da pata para  $32,7 \pm 2,2$  e  $23,8 \pm 2,6$  s, respectivamente. Por outro lado, LASSBio-1359 na dose de 5 mg/kg e o ácido acetilsalicílico (150 mg/kg) não reduziram a resposta neurogênica.

Os resultados obtidos durante a segunda fase do teste da formalina podem ser observados na Figura 29. Os animais tratados com LASSBio-1359 nas doses de 10 e 20 mg/kg apresentaram diminuição do tempo de lambida das patas de  $307,3 \pm 43,6$  s (DMSO) para  $128,9 \pm 20,5$  e  $140,0 \pm 16,0$  s, respectivamente. A morfina e o ácido acetilsalicílico diminuíram o tempo de lambida da pata nessa fase para  $145,6 \pm 49,2$  e  $93,5 \pm 19,2$  s, respectivamente. De forma semelhante a fase neurogênica, 5 mg/kg de LASSBio-1359 não reduziu significativamente a resposta inflamatória após injeção de formalina.

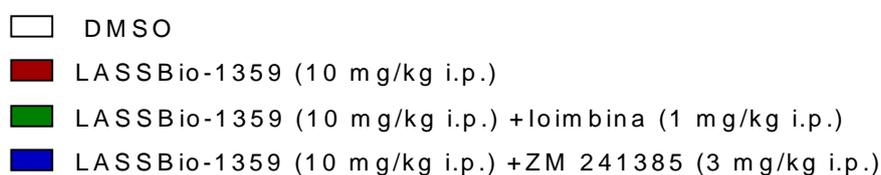
#### Fase 2



**Figura 29.** Efeito da administração intraperitoneal de LASSBio-1359 (5, 10 e 20 mg/kg), morfina (10 mg/kg) e AAS (150 mg/kg) durante a segunda fase do teste da formalina. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m (n=10). ANOVA foi realizado seguido pelo teste de Dunnett's, \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 e ###p<0,001 quando comparado ao grupo controle (DMSO)

Numa etapa seguinte foi avaliado quais vias estariam envolvidas na ação antinociceptiva observada com LASSBio-1359. Inicialmente, foi investigada a via adrenérgica através do pré-tratamento com ioimbina (1 mg/kg, i.p.) (Figura 30). Ocorreu um aumento da reatividade dos animais de  $32,7 \pm 2,2$  para  $42,8 \pm 3,8$  s quando grupo tratado com LASSBio-1359 foi previamente submetido a injeção do antagonista não seletivo alfa-adrenérgico. No entanto, não houve alteração significativa da ação antinociceptiva de LASSBio-1359 quando os animais foram pré-tratados com ZM 241385 (3 mg/kg i.p.), um antagonista de receptor de adenosina  $A_{2A}$ .

#### Fase 1

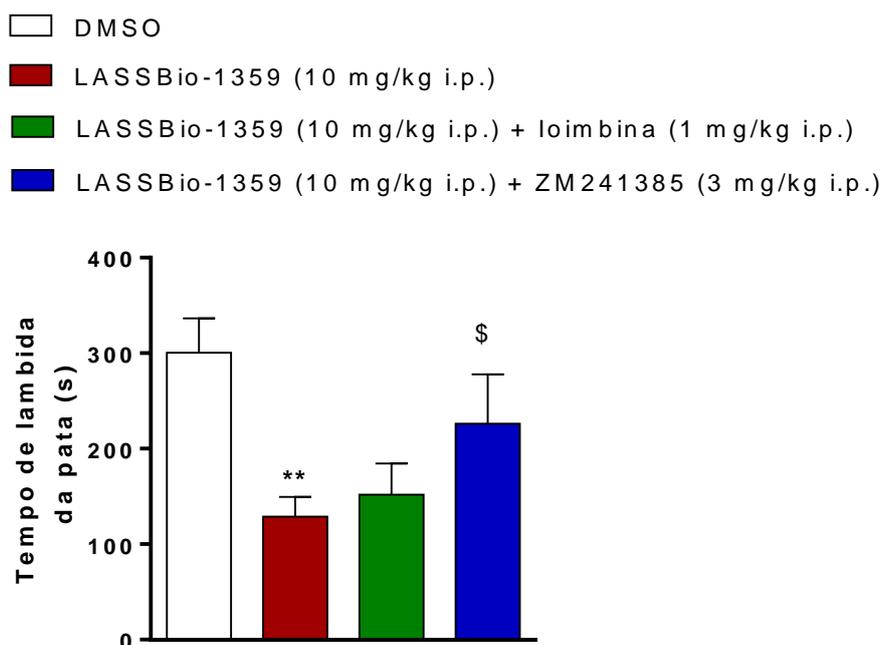


**Figura 30.** Influência da via adrenérgica e adenosinérgica no efeito antinociceptivo do LASSBio-1359 (10 mg/kg i.p.) na primeira fase do teste da formalina. Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m (n=8). \* $p < 0,05$  comparado ao controle; # $p < 0,05$  comparado ao LASSBio-1359 (10 mg/kg i.p.) - teste t-“Student” não pareado.

A avaliação dos prováveis mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva de LASSBio-1359 na fase inflamatória também foi investigada através do pré-tratamento com ioimbina e ZM 241385. A Figura 31 mostra que o grupo pré-tratado com ZM 241385 (3 mg/kg i.p.) proporcionou um aumento da reatividade de  $128,8 \pm 20,5$  para

226,1 ± 51,8 s indicando a redução do efeito antinociceptivo de LASSBio-1359. Não houve alteração significativa quando os animais foram pré-tratados com ioimbina (1 mg/kg i.p.) sugerindo a interferência dos receptores de adenosina e não dos receptores adrenérgicos para a ação de LASSBio-1359 na 2ª fase do modelo de formalina.

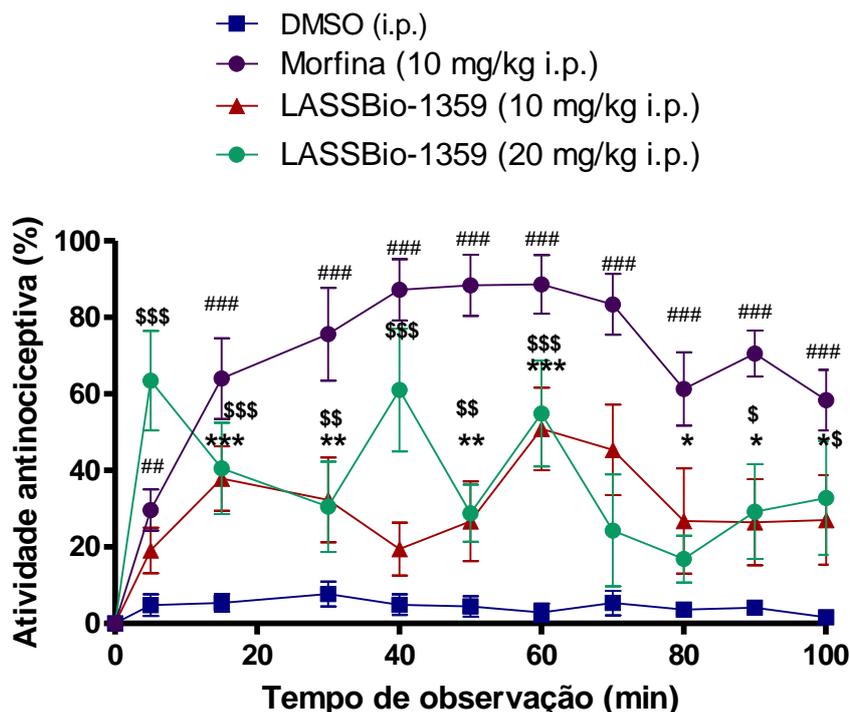
#### Fase 2



**Figura 31.** Influência da via adrenérgica e adenosinérgica no efeito antinociceptivo do LASSBio-1359 (10 mg/kg i.p.) na segunda fase do teste da formalina. Valores expressos em média ± e.p.m. (n=8). \*\*p<0,01 vs controle; \$p<0,05 vs LASSBio-1359 (10 mg/kg i.p.) - teste t-“Student” não pareado

#### 4.1.2. Teste da placa quente

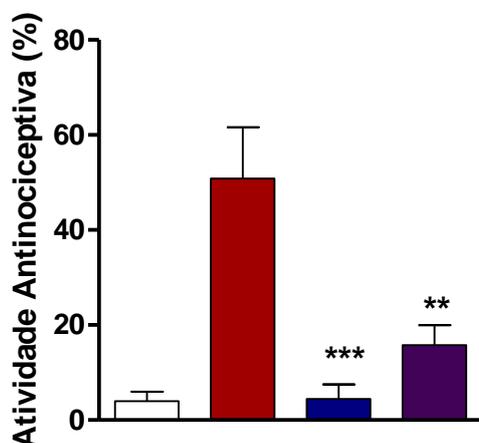
O tempo para início da reação do animal ao estímulo térmico quando é colocado sobre a placa quente foi avaliado após administração i.p. de morfina ou LASSBio-1359 (10 e 20 mg/kg). A atividade antinociceptiva após tratamento com as substâncias ao longo do tempo pode ser observado na Figura 32. A atividade antinociceptiva chegou em torno de 50% após 60 minutos e 60% após 5 min após administração de LASSBio-1359 nas doses de 10 e 20 mg/kg respectivamente. Enquanto que, a morfina (10 mg/kg i.p.) apresentou atividade antinociceptiva significativa em todos os tempos observados.



**Figura 32.** Efeito da administração intraperitoneal de DMSO, LASSBio-1359 (10 e 20 mg/kg i.p.) e morfina (10 mg/kg i.p.) no teste da placa quente. Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). \*p<0,05; \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001; \$p<0,05; \$\$p<0,01 e \$\$\$p<0,001 vs DMSO; ##p<0,01 e ###p<0,001 vs DMSO - teste t-“Student” não pareado

O papel da via  $\alpha_2$  adrenérgica para a atividade antinociceptiva do LASSBio-1359 foi investigado através do pré-tratamento com os antagonistas não seletivo e seletivo ioimbina e BRL 44408 respectivamente (Figura 33). Houve a reversão da atividade antinociceptiva quando os animais foram pré-tratados com antagonista não seletivo da via  $\alpha_2$  adrenérgica, ioimbina. A atividade antinociceptiva diminuiu de  $50,8 \pm 10,7$  para  $4,4 \pm 10,7$  % quando comparados com animais tratados apenas com LASSBio-1359. Os animais pré-tratados com o antagonista seletivo para o receptor  $\alpha_{2A}$  adrenérgico, BRL 44408, apresentaram diminuição da atividade antinociceptiva de  $50,8 \pm 10,7$  para  $15,7 \pm 4,2$  % quando comparados aos tratados apenas com LASSBio-1359.

- Controle (i.p.)
- LASSBio-1359 (10 mg/kg i.p.)
- LASSBio-1359 (10 mg/kg i.p.) + loimbina (5 mg/kg i.p.)
- LASSBio-1359 (10 mg/kg i.p.) + BRL 44408 (1 mg/kg i.p.)

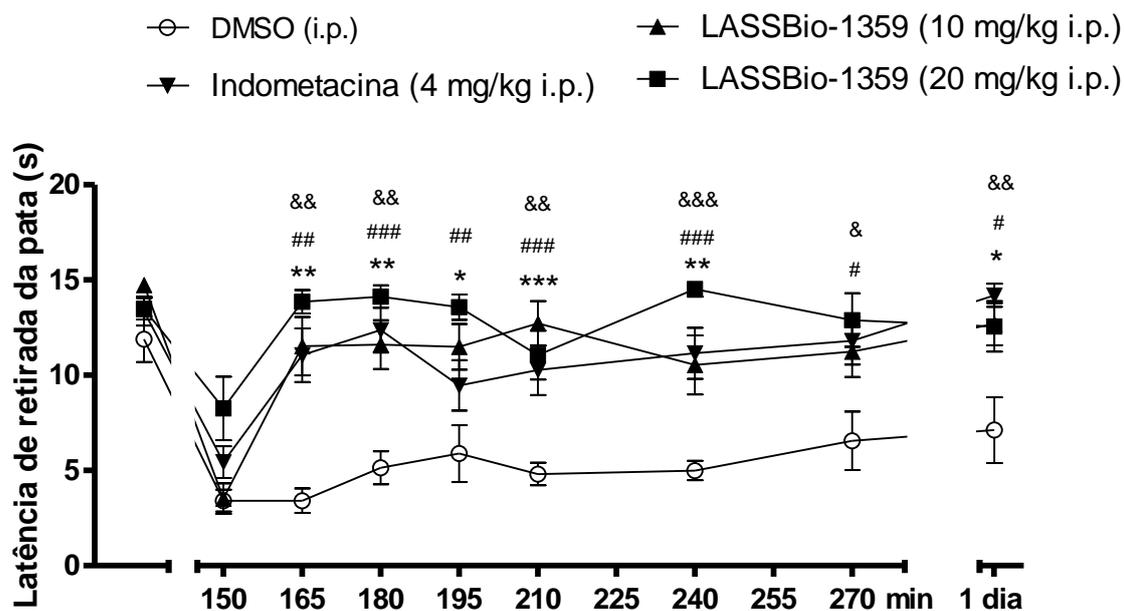


**Figura 33.** Influência da via adrenérgica no efeito antinociceptivo central de LASSBio-1359 (10 mg/kg i.p.) no teste da placa quente após 60 min da administração do derivado. Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs LASSBio-1359 - teste t-“Student” não pareado

#### 4.1.3. Teste da carragenina

##### 4.1.3.1. Hiperalgisia térmica

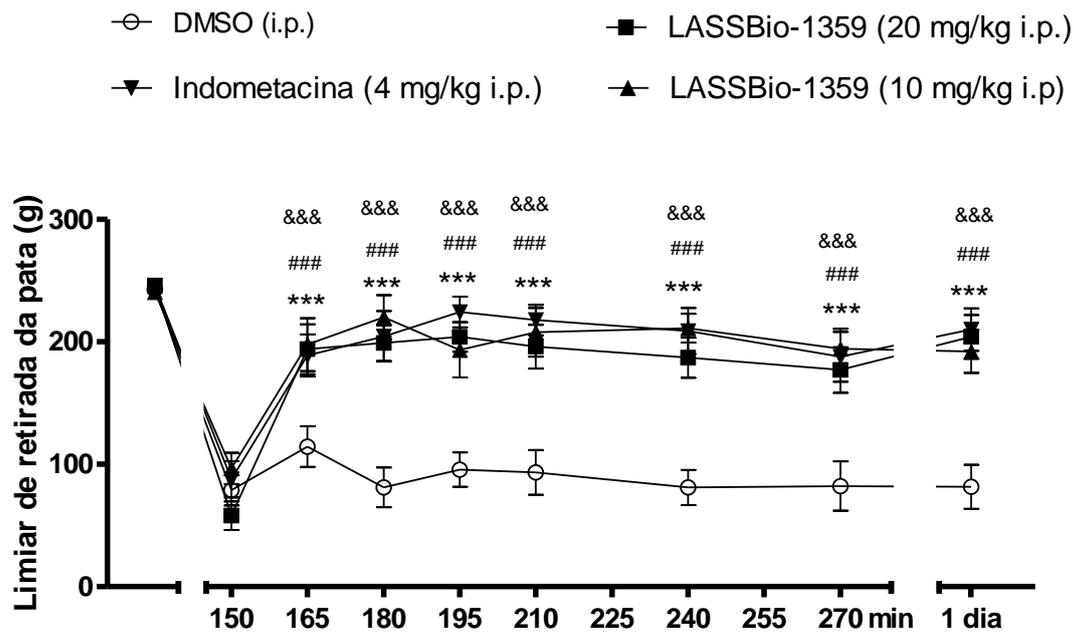
A hiperalgisia térmica é evidenciada após 150 minutos da injeção intraplantar de carragenina (1%) medida através da determinação da latência de retirada da pata após a imersão em um banho a 46°C. A latência reduz de  $13,5 \pm 0,3$  para  $5,6 \pm 0,6$  s após a injeção de carragenina. No entanto, o tratamento com LASSBio-1359 (10 e 20 mg/kg) reduziu a hiperalgisia térmica induzida por carragenina aumentando a latência para  $11,5 \pm 1,5$  e  $13,8 \pm 0,6$  s respectivamente (Figura 34). O efeito antinociceptivo de LASSBio-1359 foi observado durante as 24 h de observação. Indometacina usada como referência também inibiu a hiperalgisia térmica dos animais com reação inflamatória induzida pela carragenina.



**Figura 34.** Efeito da administração intraperitoneal de LASSBio-1359 (10 e 20 mg/kg i.p.) e indometacina (4 mg/kg i.p.) na hiperalgesia térmica induzida pela carragenina na pata ipsilateral após 150 min. Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; ##p<0,01; ###p<0,001; &&p<0,01 e &&&p<0,001 vs DMSO - teste t-“Student” não pareado.

#### 4.1.3.2. Hiperalgesia mecânica

A carragenina também induziu hiperalgesia mecânica nos camundongos que foi avaliada através da medida da latência de retirada da pata com a aplicação de pressão sobre a mesma. O tratamento com LASSBio-1359 (10 e 20 mg/kg i.p.) reduziu a hiperalgesia mecânica porque a latência aumentou de  $79,7 \pm 6,6$  para  $206,7 \pm 17,7$  e  $197,8 \pm 21,6$  g respectivamente (Figura 35). A indometacina também inibiu a hiperalgesia mecânica.

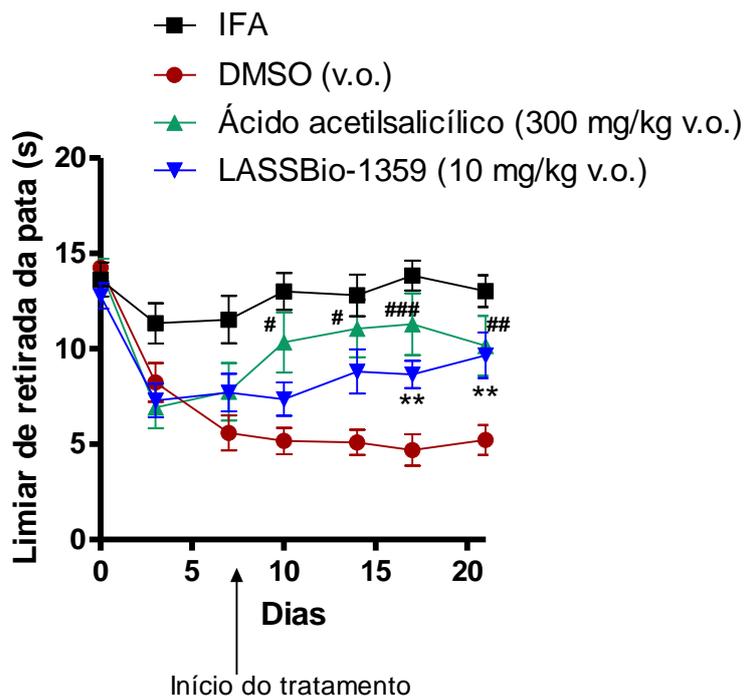


**Figura 35.** Efeito da administração intraperitoneal de LASSBio-1359 (10 e 20 mg/kg) e indometacina (4 mg/kg i.p) na hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina na pata epsilateral após 150 min. Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=8).\*\*\*p<0,001; ###p<0,001 e &&&p<0,001 vs DMSO - teste t-“Student” não pareado.

## 4.2. Modelo de monoartrite

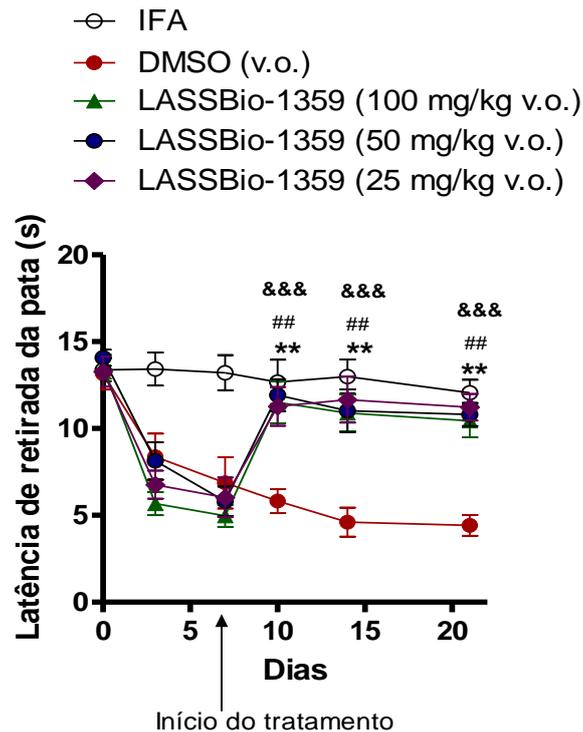
### 4.2.1. Hiperalgésia térmica

O adjuvante completo de Freund (CFA) foi utilizado para indução da monoartrite em camundongos que é caracterizada por uma inflamação aguda inicial (após o 3º dia) seguida de inflamação crônica (após 7º dia) (Figura 36). Já o adjuvante incompleto de Freund (IFA) não provocou reação inflamatória, o que não alterou a latência de retirada da pata dos animais, ou seja, não levou a hiperalgésia térmica nem mecânica. A figura 36 mostra a hiperalgésia térmica induzida pelo CFA que consistiu na redução da latência de retirada da pata de  $13,6 \pm 0,3$  para  $6,9 \pm 0,6$  e para  $4,9 \pm 0,7$  s após 7 e 21 dias da indução da monoartrite respectivamente. LASSBio-1359 (10 mg/kg, v.o) reduziu a hiperalgésia térmica a partir do 17º dia de tratamento, tornando a latência de retirada da pata semelhante ao observada no grupo tratado por via oral com ácido acetilsalicílico (300 mg/kg).



**Figura 36.** Efeito da administração oral de LASSBio-1359 (10 mg/kg) e ácido acetilsalicílico (300 mg/kg) na hiperalgesia térmica induzida pelo CFA no modelo de monoartrite após 3º dia de indução. Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=10) \*\*p<0,01; #p<0,05; ##p<0,01 e ###p<0,001 vs DMSO - teste *t-student* não pareado.

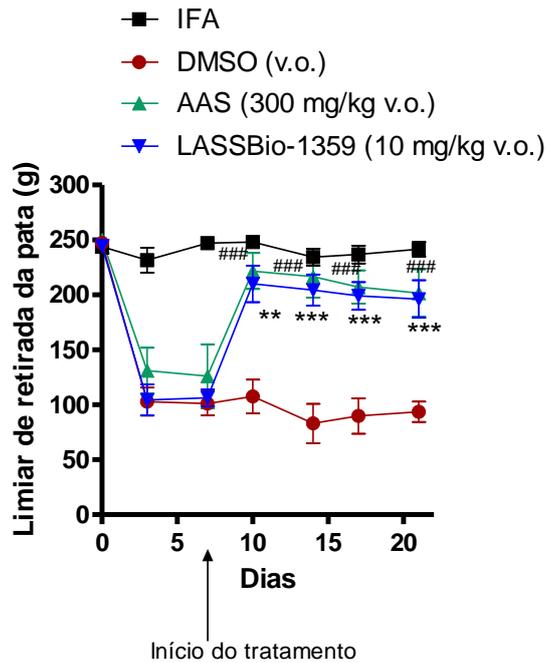
Numa etapa seguinte, doses maiores de LASSBio-1359 foram utilizadas nos camundongos com monoartrite pelo fato do tratamento com dose de 10 mg/kg não proporcionar reversão completa da hiperalgesia térmica e apresentar efeito antinociceptivo apenas após 15 dias. A Figura 37 representa a avaliação da hiperalgesia térmica induzida nos animais com monoartrite após o tratamento por vial oral com LASSBio-1359 nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg. Note que ocorreu uma melhora significativa da latência de retirada da pata do banho aquecido a 46° C. A latência de 6,9  $\pm$  0,6 foi recuperada para 11,2  $\pm$  0,7; 10,8  $\pm$  0,6 e 10,44  $\pm$  0,9 após tratamento com 25, 50 e 100 mg/kg de LASSBio-1359, respectivamente indicando a reversão da hiperalgesia térmica no 21º dia.



**Figura 37.** Efeito da administração oral de LASSBio-1359 (25 50 e 100 mg/kg) na hiperalgesia térmica induzida pelo CFA no modelo de monoartrite. Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=10) \*\*p<0,01; ##p<0,01 e &&&p<0,001 vs DMSO - teste *t-student* não pareado.

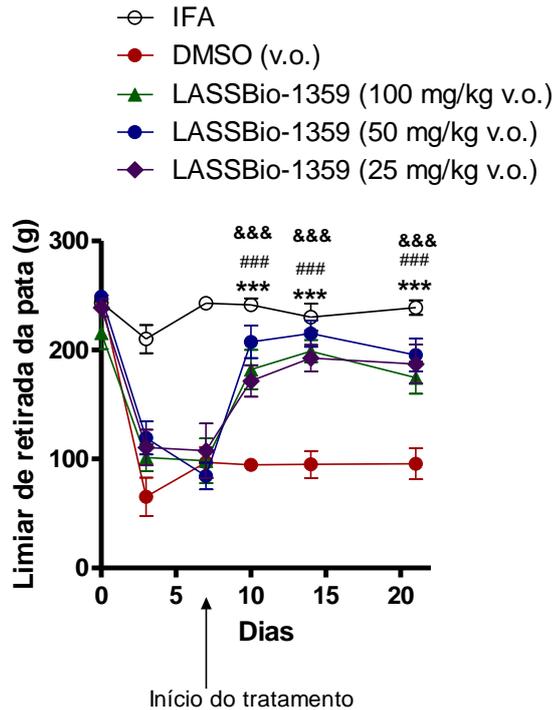
#### 4.2.2. Hiperalgesia mecânica

A monoartrite induzida pelo CFA também provocou a hiperalgesia mecânica caracterizada pelo menor limiar de pressão até a retirada da pata pelo animal. A latência de retirada da pata (g) diminuiu de  $245,7 \pm 1,9$  para  $109,9 \pm 8,7$  e para  $107,8 \pm 16,4$  após 7 e 21 dias da indução da monoartrite respectivamente. Figura 38 representa a hiperalgesia mecânica revertida com tratamento por via oral com ácido acetilsalicílico (AAS) 300 mg/kg a partir do 10 ° dia o limiar aumentou para  $221,7 \pm 16,3$  continuando até o final do tratamento. O limiar de retirada melhorou para  $210,0 \pm 16,5$  a partir do 10 ° dia de tratamento com LASSBio-1359 (10 mg/kg v.o.) e esse efeito se prolongou até o final do tratamento.



**Figura 38.** Efeito da administração oral de LASSBio-1359 (10 mg/kg) e ácido acetilsalicílico (300 mg/kg) na hiperalgesia mecânica induzida pelo CFA no modelo de monorrite. Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=10) \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 e ###p<0,001 vs DMSO - teste *t-student* não pareado.

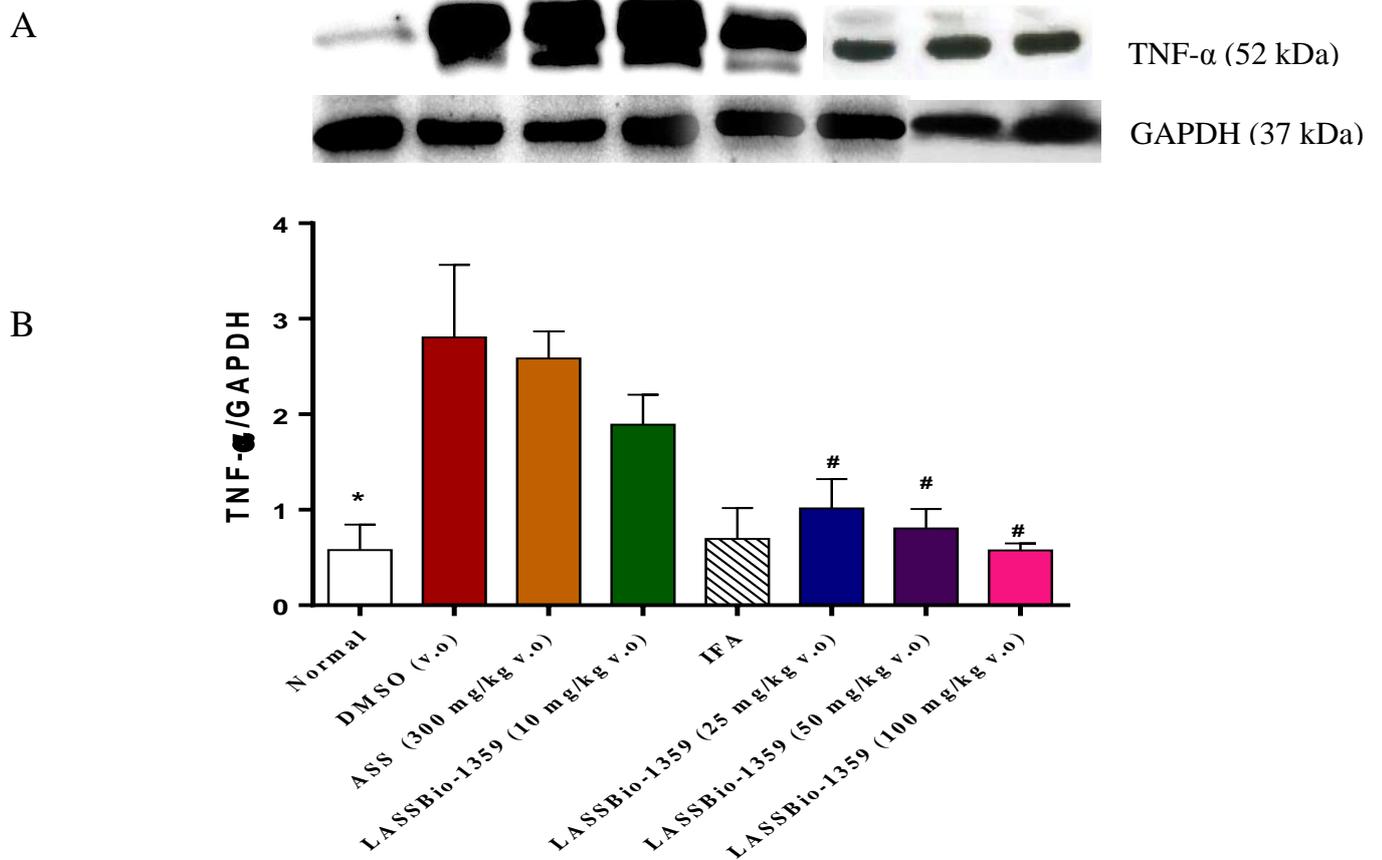
A Figura 39 representa a avaliação da hiperalgesia mecânica induzida nos animais com monoartrite após o tratamento por via oral com LASSBio-1359 nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg. Observa-se que ocorreu uma melhora significativa da latência de retirada da pata (g) do analgesímetro. A latência de  $109,9 \pm 8,7$  foi aumentada para  $187,2 \pm 17,7$ ;  $195,4 \pm 14,8$  e  $174,2 \pm 14,7$  após tratamento com 25, 50 e 100 mg/kg de LASSBio-1359, respectivamente indicando a reversão da hiperalgesia mecânica no 21 ° dia.



**Figura 39.** Efeito da administração oral de LASSBio-1359 (25 50 e 100 mg/kg) na hiperalgesia mecânica induzida pelo CFA no modelo de monoartrite. Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=10) \*\*\*p<0,001; ###p<0,001 e &&&p<0,001 vs DMSO - teste *t-student* não pareado.

### 4.3. Expressão de proteínas – “Western Blot”

Inicialmente, a expressão de TNF- $\alpha$  foi investigada através da técnica de “western blot”. Conforme demonstrado na Figura 40, pode-se identificar uma banda de 52 kDa referente ao TNF- $\alpha$  presente em todos os grupos experimentais. As bandas referentes aos grupos de animais normais e IFA apresentaram intensidade de coloração, no entanto, observou-se um aumento significativo na expressão de TNF- $\alpha$  nas patas de camundongos com monoartrite. A expressão de TNF- $\alpha$  foi reduzida nos animais tratados com LASSBio-1359 de forma dependente da dose. Não há diferença significativa na expressão de TNF- $\alpha$  dos animais tratados com DMSO (v.o) quando comparado o grupo dos animais tratados com LASSBio-1359 (10 mg/kg v.o.) indicando que apenas doses maiores que 25 mg/kg proporcionem a inibição da expressão de TNF- $\alpha$  *in vivo*.



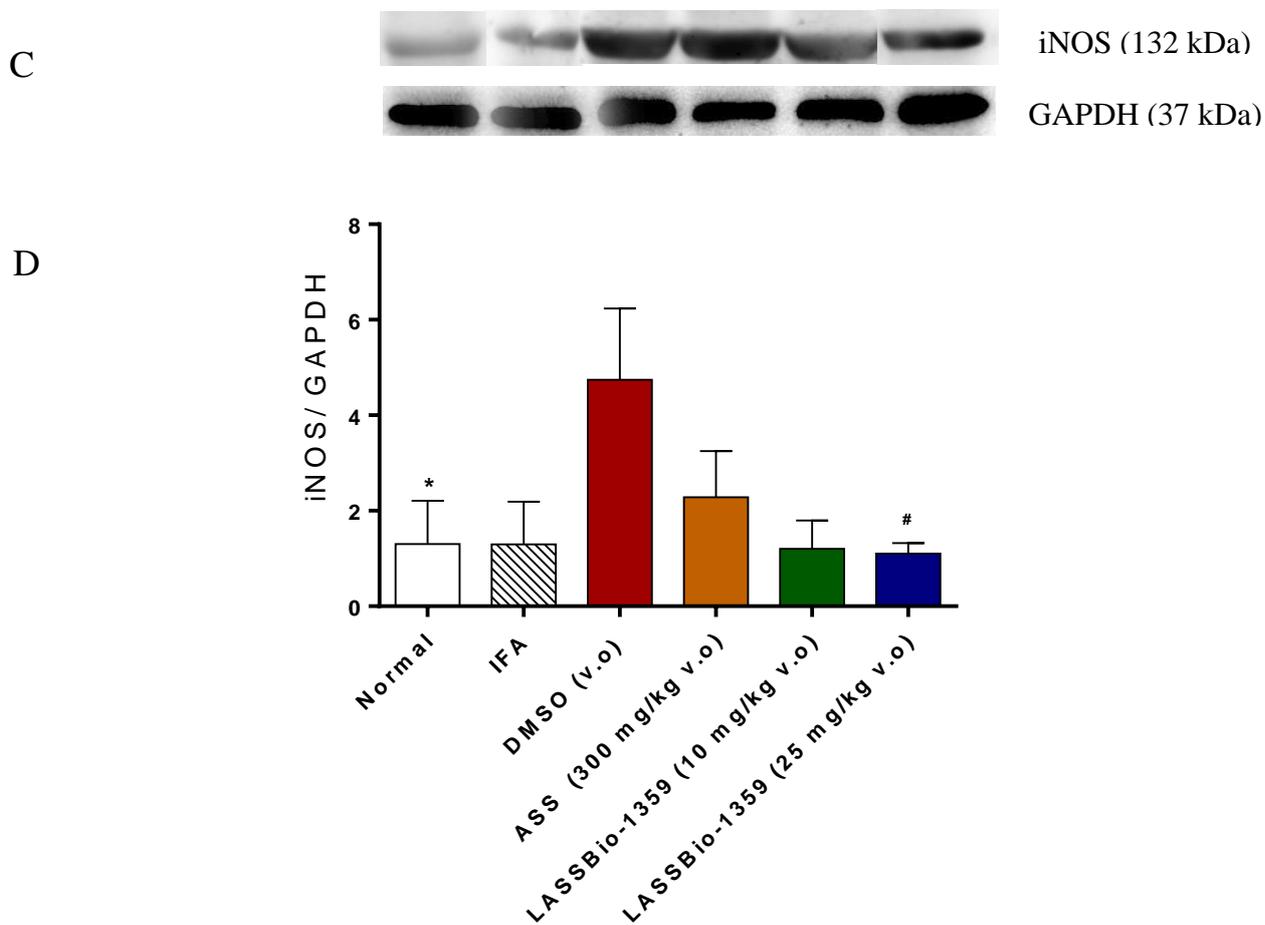
**Figura 40.** Expressão da citocina TNF- $\alpha$  em patas ipsilaterais de camundongos normais e camundongos com monoartrite. Todos os grupos foram tratados pela via oral a partir do 7<sup>o</sup> dia da doença sendo que um grupo foi tratado com veículo(DMSO), AAS, LASSBio-1359 nas doses de 10, 25, 50 e 100 mg/kg. Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=3) ANOVA seguido pelo teste de Dunnett's, \*p<0,05 e #p<0,05 vs grupo controle (DMSO).

A) Representação Qualitativa da expressão do TNF- $\alpha$ .

B) Representação Quantitativa da expressão do TNF- $\alpha$ .

Em continuidade a avaliação da expressão de proteínas relacionadas ao efeito antinociceptivo de LASSBio-1359, investigou-se a expressão da proteína iNOS nos diferentes grupos experimentais. Na Figura 41 observa-se uma banda de 132 kDa referente a iNOS presente em todos os grupos experimentais mas, que apresentaram intensidade de coloração similar nos grupos de animais normais e sem monoartrite. A monoartrite induzida pelo CFA provocou um aumento significativo na expressão de

iNOS no grupo tratado com DMSO. Por outro lado, observou-se uma diminuição de expressão de iNOS nos animais tratados com LASSBio-1359.



**Figura 41.** Expressão da proteína iNOS em patas ipsilaterais de camundongos normais e camundongos que desencadearam a monoartrite. Todos os grupos foram tratados pela via oral a partir do 7º dia da doença sendo que um grupo foi tratado com veículo(DMSO), AAS, LASSBio-1359 (10 e 25 mg/kg) Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=3) ANOVA seguido pelo teste Dunnett's, \* $p < 0,05$  e # $p < 0,05$  vs grupo controle (DMSO).

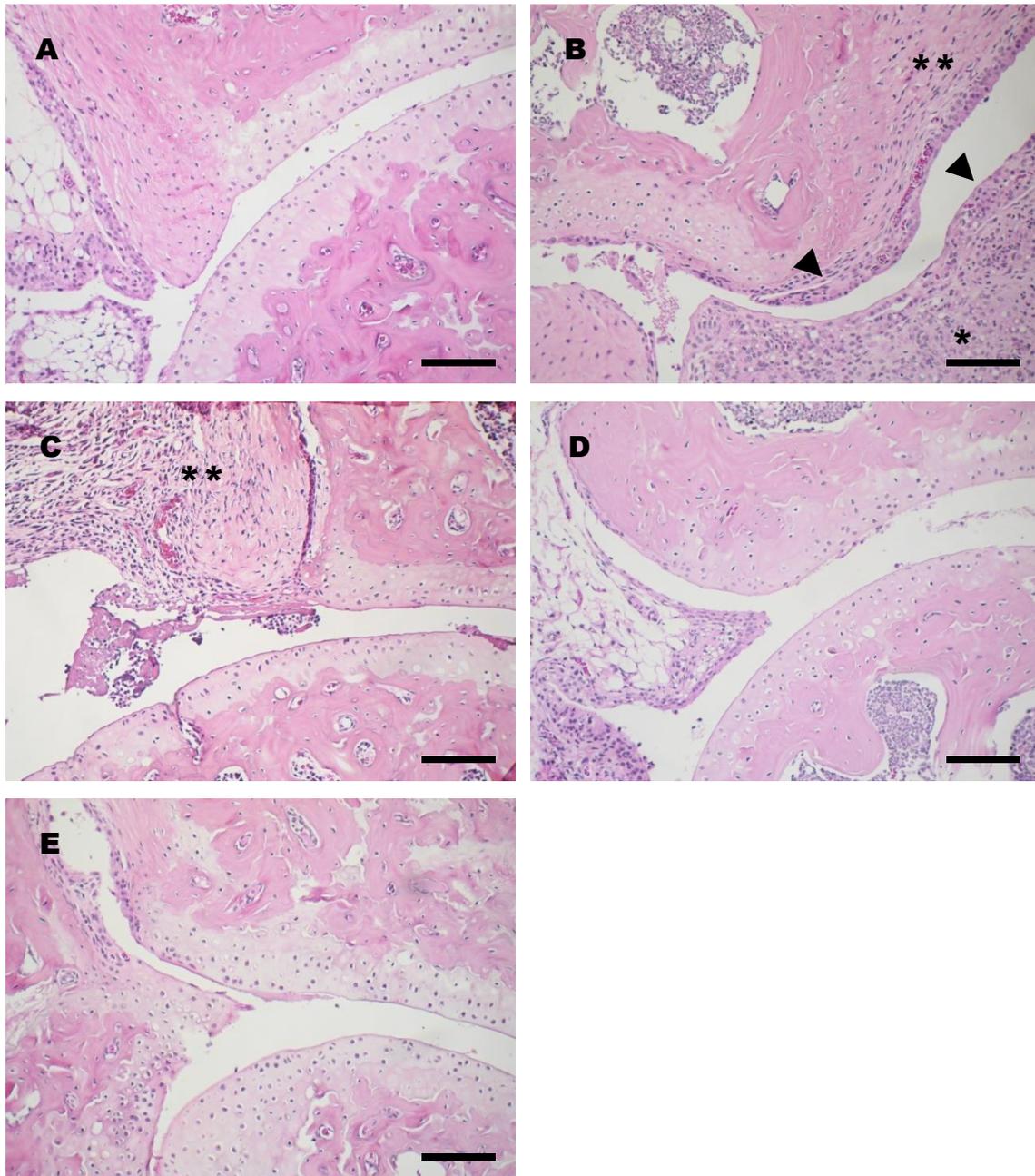
C) Representação Qualitativa da expressão de iNOS.

D) Representação Quantitativa da expressão de iNOS.

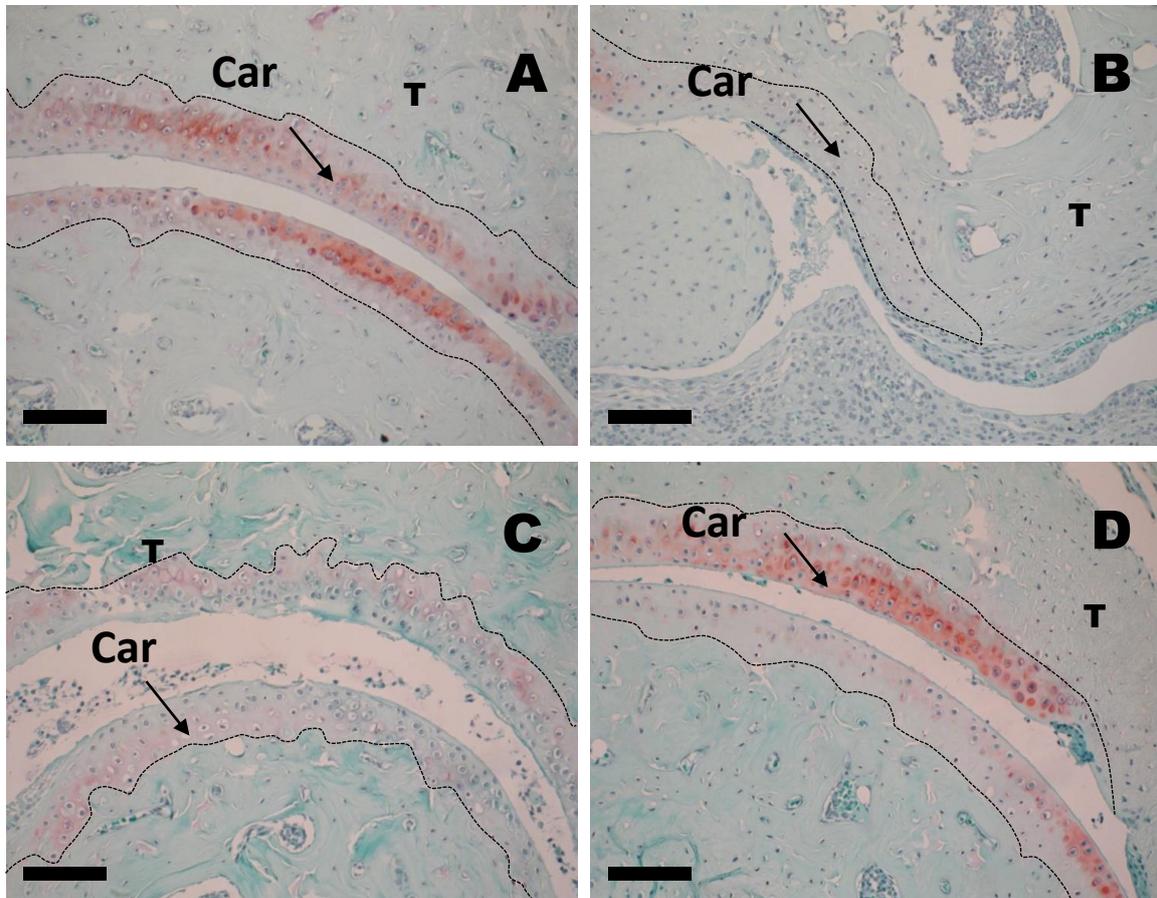
#### 4.4 Avaliação histopatológica

A avaliação histológica das lâminas coradas com hematoxilina eosina dos animais tratados com IFA na Figura 42 (A), pode-se observar uma pata ipsilateral sem sinais de resposta inflamatória ao redor da cartilagem e osso, a membrana sinovial apresentou uma camada normal. Na Figura 42 (B) tem-se os animais com monoartrite tratado com veículo. A artrite nesses animais é caracterizada por uma reação inflamatória severa que inclui a hiperplasia das células sinoviais, fibrose de moderada a grave, formação de pannus, e extensa destruição da cartilagem e de lise óssea. O processo inflamatório pode incluir também um infiltrado de células inflamatórias que podem conter linfócitos e eosinófilos. Nas pranchas D e E, observa-se que tratamento oral com LASSBio-1359 nas doses de 25 e 50 mg/kg resultou numa supressão significativa destas alterações histopatológicas, com cartilagem e osso bem preservados e sem presença de fibrose ou *pannus*; células inflamatórias mínimas foram encontradas em animais tratados com essas doses. No entanto, na Figura 42 (C) nota-se que o tratamento oral de LASSBio-1359 10 mg/kg apresentou um infiltrado de células inflamatórias, o que sugere que uma resposta inflamatória transiente se fez presente nesse grupo tratado.

Na análise da cartilagem (Figura 43), revelou uma diminuição da espessura cartilaginosa no grupo de monoartrite tratado com DMSO (v.o.) quando comparada com grupo controle (IFA). O tratamento dos animais com LASSBio-1359 (50 mg/kg v.o.) resultou em uma aparente diminuição da espessura cartilaginosa, observado pela coloração, em vermelho, das proteoglicanas presente no tecido cartilaginoso, evitando a degradação da cartilagem nos animais tratados com derivado. Essa análise qualitativa foi comum as patas dos três animais avaliados de cada grupo



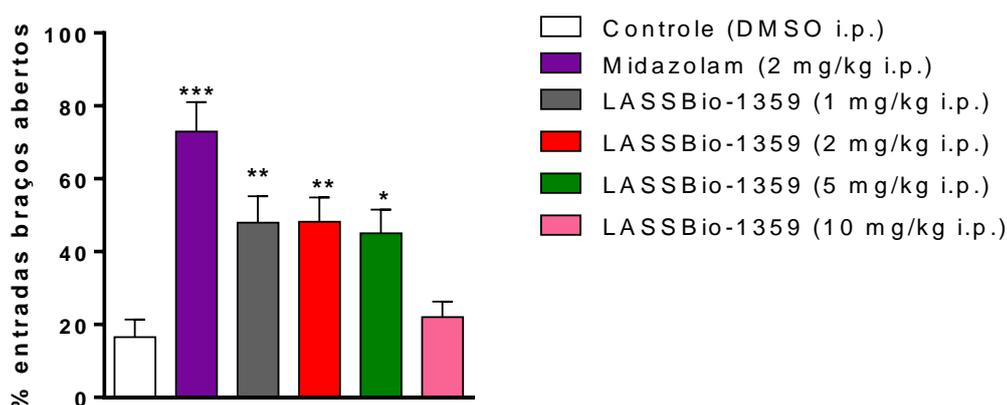
**Figura 42.** A avaliação histológica dos efeitos de LASSBio-1359 nas patas com artrite (n=3). Hiperplasia sinovial (setas pretas) e (\*) indica a destruição de cartilagem e osso (pannus) em lâminas de articulações de camundongos com monorrite tratados com DMSO. (\*\*) indica presença de infiltrado de células inflamatórias. Barra = 100 µm **A** = IFA; **B** = CFA + DMSO (v.o.); **C** = CFA + LASSBio-1359 (10 mg/kg v.o.); **D** = CFA + LASSBio-1359 (25 mg/kg v.o.); **E** = CFA + LASSBio-1359 (50 mg/kg v.o.)



**Figura 43.** Cortes histológicos da cartilagem corados com Safranina O/*Fast green*- (A, B, C e D) indicam a presença de proteoglicanas (em vermelho). Notar menor expressão de proteoglicanas em camundongos (n=3) com monoartrite tratados com DMSO (v.o.) em relação aos animais controle (IFA). Os animais com monoartrite tratados com LASSBio-1359 (50 mg/kg v.o) apresentaram a cartilagem corada em vermelho, semelhante aos animais normais evitando a degradação da cartilagem. Barra = 100 µm; Car = Cartilagem; A= Animais normais (IFA); B= animais com monoartrite tratados com DMSO (v.o); C= animais com monoartrite tratados com LASSBio-1359 (25 mg/kg v.o.) e D = animais com monoartrite tratados com LASSBio-1359 (50 mg/kg v.o.).

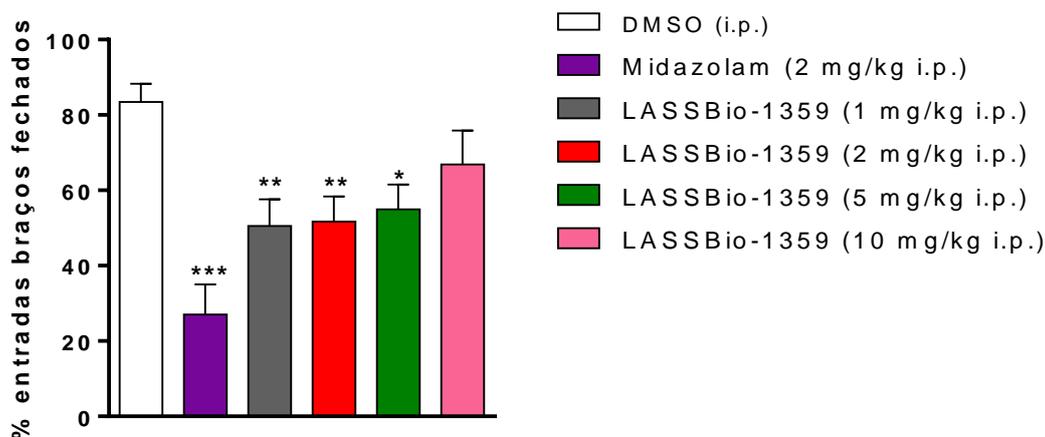
#### 4.5 Investigação da atividade ansiolítica

Como a ação antinociceptiva de LASSBio-1359 apresenta envolvimento parcial da via do sistema adrenérgico, esta etapa investigou-se possível ação ansiolítica deste derivado. A administração intraperitoneal de LASSBio-1359 (1, 2 e 5 mg/kg) induziu ação ansiolítica quando avaliada no labirinto elevado (Figuras 44). Os animais tratados com LASSBio-1359 tiveram alteração do comportamento com aumento significativo do número de entradas nos braços abertos de  $16,5 \pm 4,8$  para  $47,9 \pm 7,2$ ;  $48,2 \pm 6,6$  e  $45,4 \pm 6,5$  % nas doses de 1, 2 e 5 mg/kg, respectivamente. A dose de 10 mg/kg não apresentou efeito ansiolítico nesse experimento; o midazolam (2 mg/kg), usado como substância referência aumentou o número de entradas nos braços abertos para  $72,9 \pm 8,0$  %.



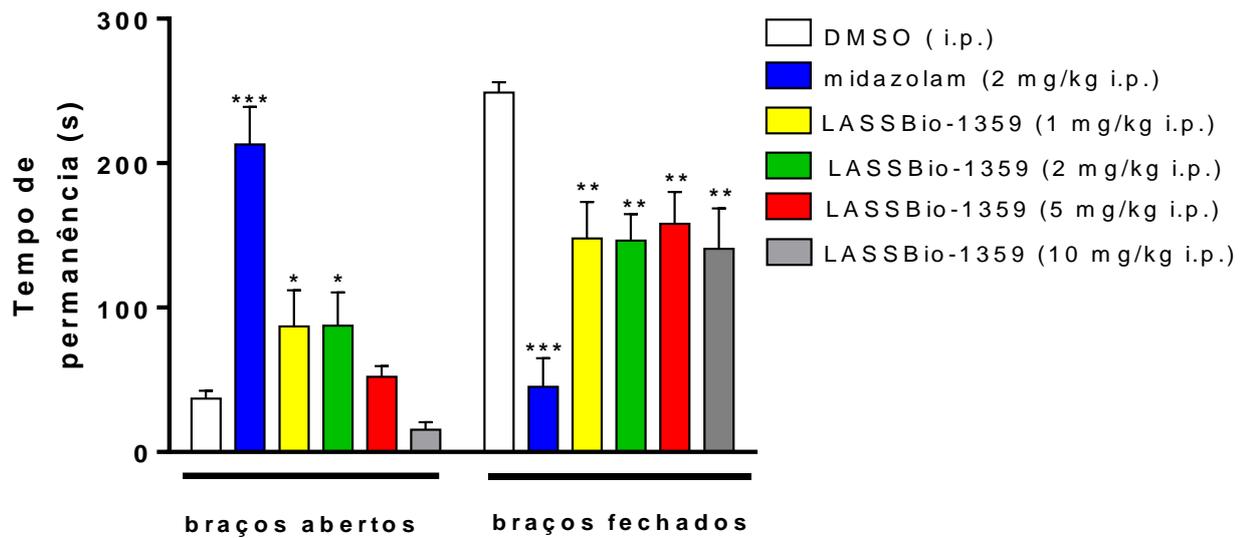
**Figura 44.** Efeito da administração intraperitoneal de LASSBio-1359 (1, 2, 5 e 10 mg/kg) e midazolam (2 mg/kg) nos camundongos sobre a porcentagem do número de entradas nos braços abertos no labirinto em cruz elevado. Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=10), ANOVA seguido pelo teste de *Dunnett's*, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  vs DMSO.

Por outro lado, conforme pode ser observado na Figura 45, os grupos tratados com LASSBio-1359 apresentaram diminuição significativa do número de entradas nos braços fechados. A redução foi de  $83,4 \pm 4,8$  para  $50,5 \pm 7,1$ ;  $51,7 \pm 6,6$  e  $54,9 \pm 6,5$  %, para as doses de 1, 2 e 5 mg/kg, respectivamente. O midazolam (2 mg/kg i.p) também diminuiu para  $27,0 \pm 8,0$  % este parâmetro. Já LASSBio-1359 na dose de 10 mg/kg não apresentou resultado significativo.



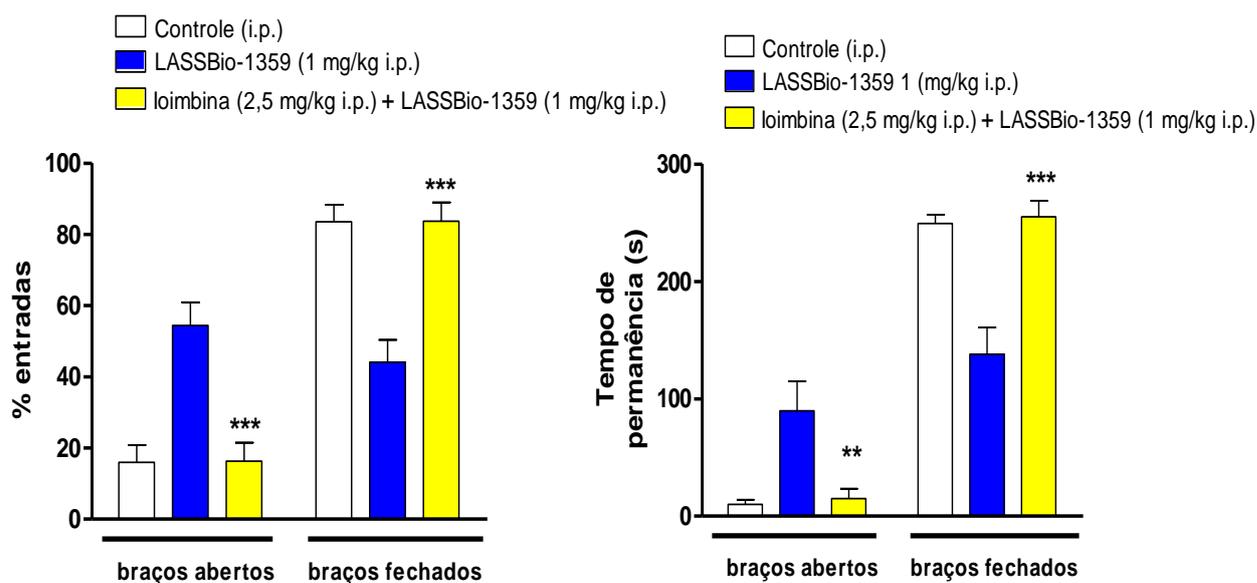
**Figura 45.** Efeito da administração intraperitoneal de LASSBio-1359 (1, 2, 5 e 10 mg/kg) e midazolam (2 mg/kg) nos camundongos sobre a porcentagem do número de entradas nos braços fechados no labirinto em cruz elevado. Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=10), ANOVA seguido pelo teste de *Dunnnett's*, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs DMSO.

Confirmando o efeito ansiolítico de LASSBio-1359, o grupo tratado apresentou aumento significativo do tempo de permanência nos braços abertos de  $37,0 \pm 5,4$  para  $87,3 \pm 25,0$  e  $87,4 \pm 23,0$  s. Ainda, proporcionou a diminuição do tempo nos braços fechados de  $249,0 \pm 7,0$  para  $148,3 \pm 25,3$  e  $146,3 \pm 18,3$  s quando comparados também ao grupo controle. A dose de LASSBio-1359 (10 mg/kg i.p.) proporcionou uma diminuição também no tempo de permanência nos braços fechado para  $140,7 \pm 28,04$ . O midazolam (2 mg/kg i.p) aumentou o tempo nos braços abertos para  $213,0 \pm 26,0$  s e diminuiu o tempo nos braços fechados para  $45,2 \pm 19,8$  s (Figura 46).



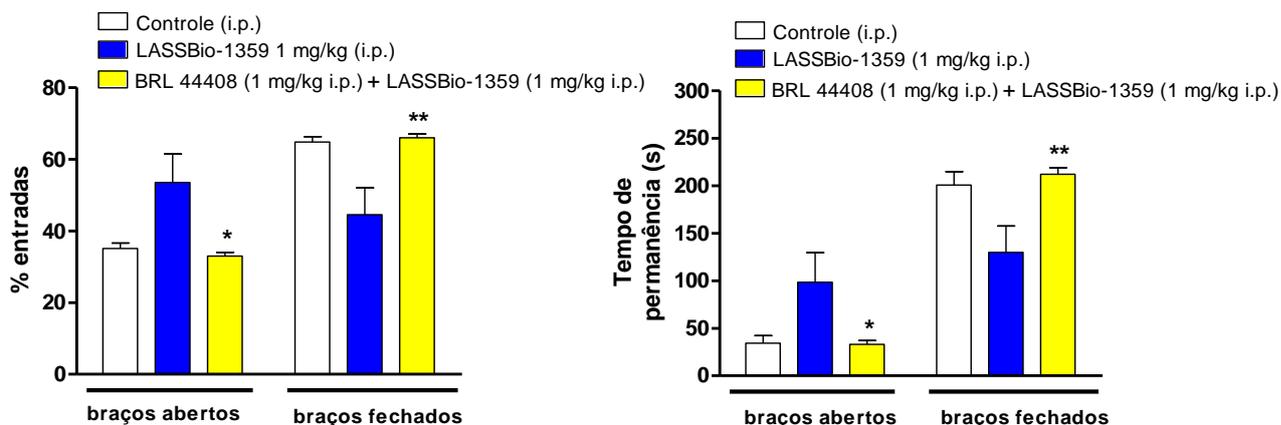
**Figura 46.** Efeito da administração intraperitoneal de LASSBio-1359 (1, 2, 5 e 10 mg/kg) e midazolam (2 mg/kg) nos camundongos sobre o tempo de permanência (s) nos braços abertos e fechados no labirinto em cruz elevado. Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=10), ANOVA seguido pelo teste de Dunnett's, \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  vs DMSO.

Para se determinar o envolvimento da via adrenérgica na ação ansiolítica de LASSBio-1359, os animais foram pré-tratados com um antagonista não seletivo, ioimbina ou com um antagonista seletivo para receptores alfa2-adrenérgicos, BRL 44408. Os animais pré-tratados com ioimbina (2,5 mg/kg, i.p.) apresentaram reversão do efeito ansiolítico porque o número de entradas nos braços abertos foi reduzido de  $54,4 \pm 6,5$  para  $16,3 \pm 5,2$  % e o número de entradas nos braços fechados foi aumentado de  $44,0 \pm 6,2$  para  $83,7 \pm 5,2$  %. Houve também reversão do efeito no tempo de permanência dos animais nos braços abertos de  $89,7 \pm 25,9$  para  $15,9 \pm 8,2$  s assim como também nos braços fechados de  $138,0 \pm 22,7$  para  $255,1 \pm 13,4$  s (Figura 47).



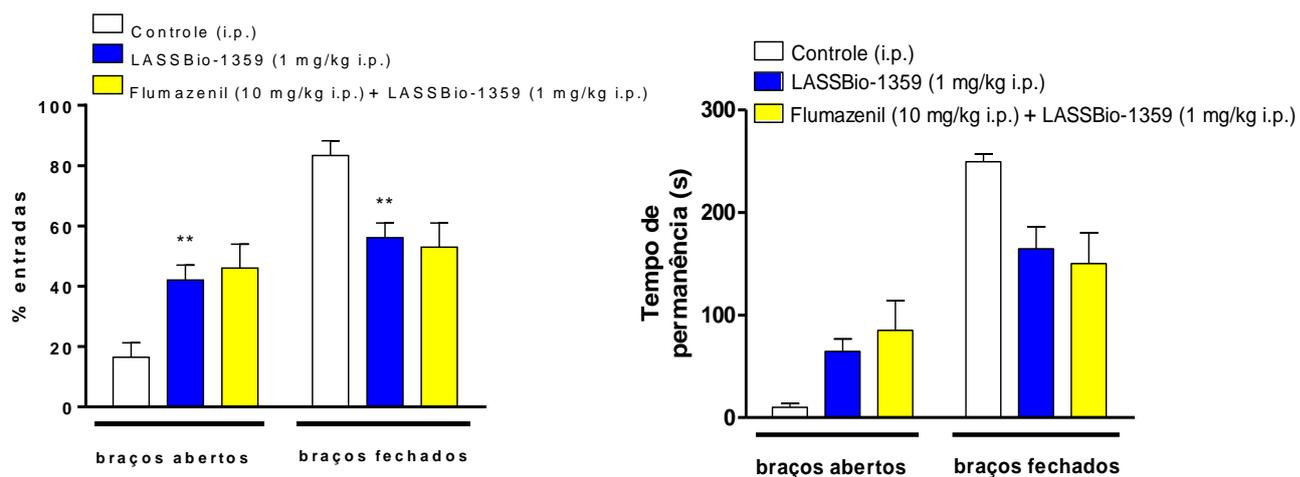
**Figura 47.** Influência da via adrenérgica no efeito ansiolítico do LASSBio-1359 (1 mg/kg i.p.). Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=10), teste t *student* não pareado, \*\* p< 0,01 e \*\*\* p< 0,001 vs LASSBio-1359 1 mg/kg i.p.

Em uma avaliação mais específica da via  $\alpha_2$ -adrenérgica no teste do labirinto em cruz elevado, foi avaliado um antagonista específico para o subtipo receptor adrenérgico  $\alpha_{2A}$ . Assim, os animais foram pré-tratados com BRL 44408 (1 mg/kg i.p) e verificou-se uma diminuição significativa nas entradas nos braços abertos de  $53,5 \pm 7,9$  para  $33,0 \pm 1,0$  % e também no tempo de permanência nos mesmos braços de  $98,5 \pm 31,2$  s. Obteve-se aumento no número de entradas nos braços fechados de  $44,5 \pm 1,0$  para  $66,0 \pm 1,0$  % e no tempo gasto nos mesmo de  $129,9 \pm 27.6$  para  $212,0 \pm 7.0$  s (Figura 48).



**Figura 48.** Influência da via adrenérgica no efeito ansiolítico do LASSBio-1359 (1 mg/kg i.p.). Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=10),\*  $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  vs LASSBio-1359 1 mg/kg teste *t student* não pareado.

O papel de outras vias a via gabaérgica também foi investigada para a atividade ansiolítica de LASSBio-1359. Desta forma, os animais foram pré-tratados com flumazenil (10 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes do tratamento com LASSBio-1359 (1 mg/kg). Não houve alteração significativa nas entradas nos braços abertos e fechados e também no tempo de permanência nos braços abertos e fechados (Figura 49). Estes resultados sugerem que a via benzodiazepínica não está envolvida para a ação ansiolítica do LASSBio-1359.



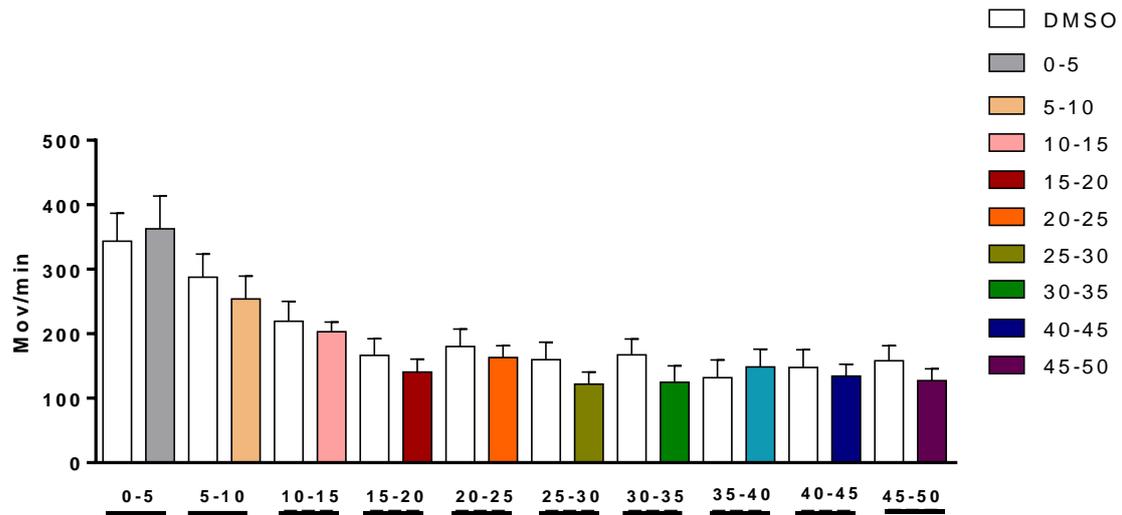
**Figura 49.** Influência da via benzodiazepínica no efeito ansiolítico do LASSBio-1359 (1 mg/kg i.p.). Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=10), \*\*p < 0,01 vs controle - teste *t student* não pareado

## 4.6 Toxicidade

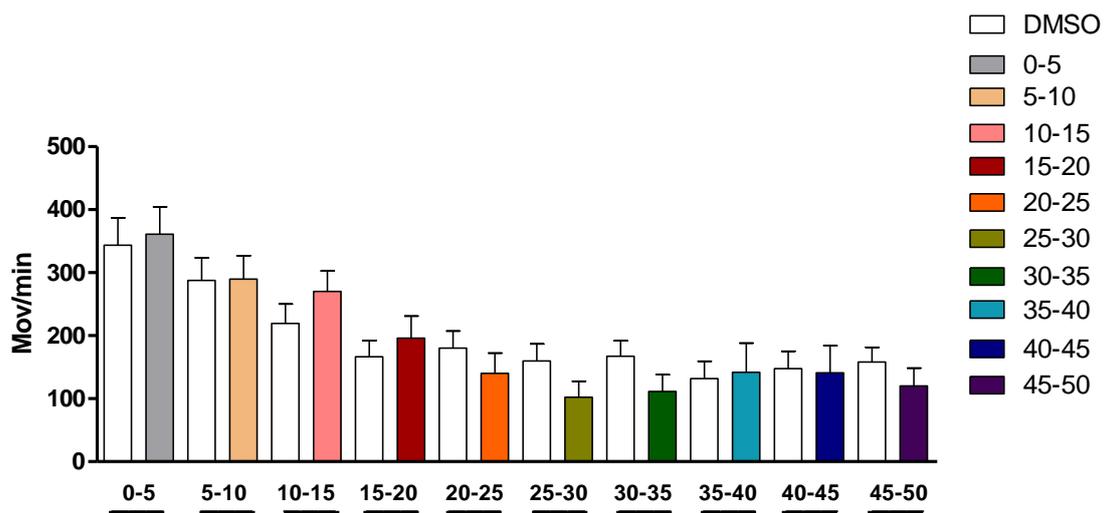
LASSBio-1359 foi avaliado quanto a possibilidade de provocar toxicidade no sistema nervoso central. Para tanto, foi investigado a ação na atividade motora e coordenação motora através da utilização do campo aberto e rota rod.

### 4.6.1 Atividade motora

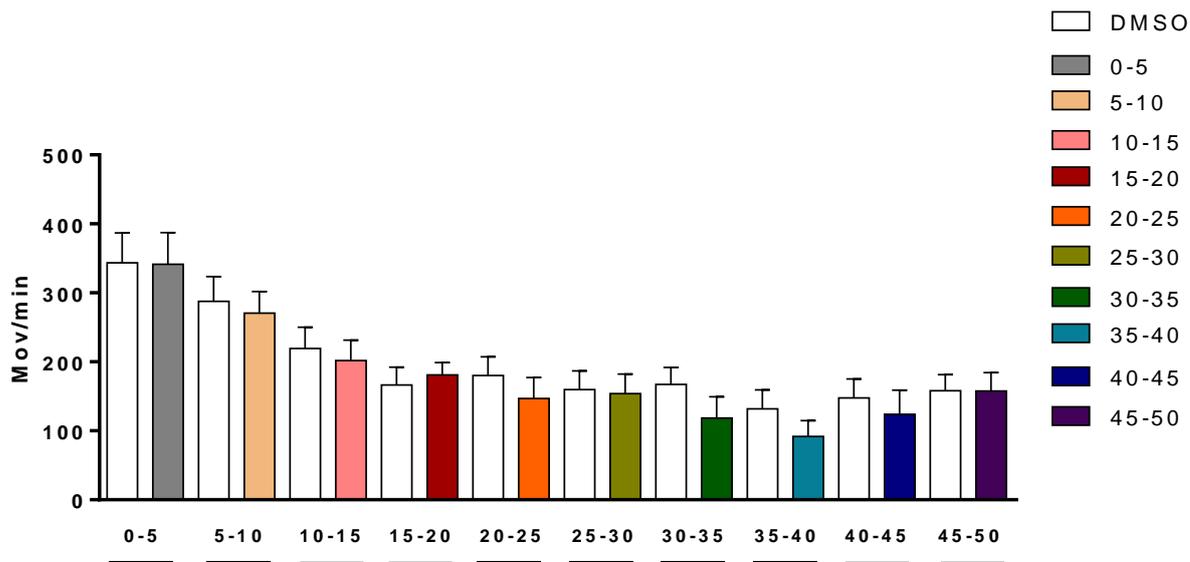
As Figuras 50, 51, 52 e 53 mostram o curso temporal do efeito de LASSBio-1359 nas doses de 1, 2, 5 e 10 mg/kg respectivamente em relação à atividade motora. O número de movimentos dos animais num campo aberto observados a intervalos de 5 minutos não foi alterado significativamente após tratamento com LASSBio-1359.



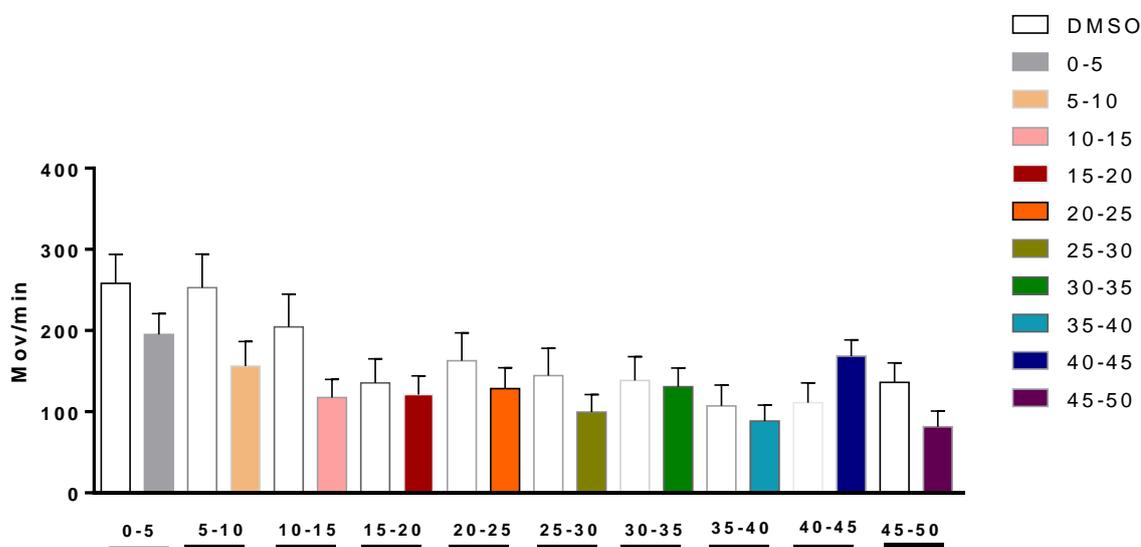
**Figura 50.** Curso temporal do número mov/min avaliados em dez intervalos de cinco minutos, resultante da administração de LASSBio-1359 na dose de 1 mg/kg (i.p.). Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m.(n=10) - Teste t de *student* não-pareado



**Figura 51.** Curso temporal do número mov/min avaliados em dez intervalos de cinco minutos, resultante da administração de LASSBio-1359 na dose de 2 mg/kg (i.p.). Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=10) Teste t de *student*



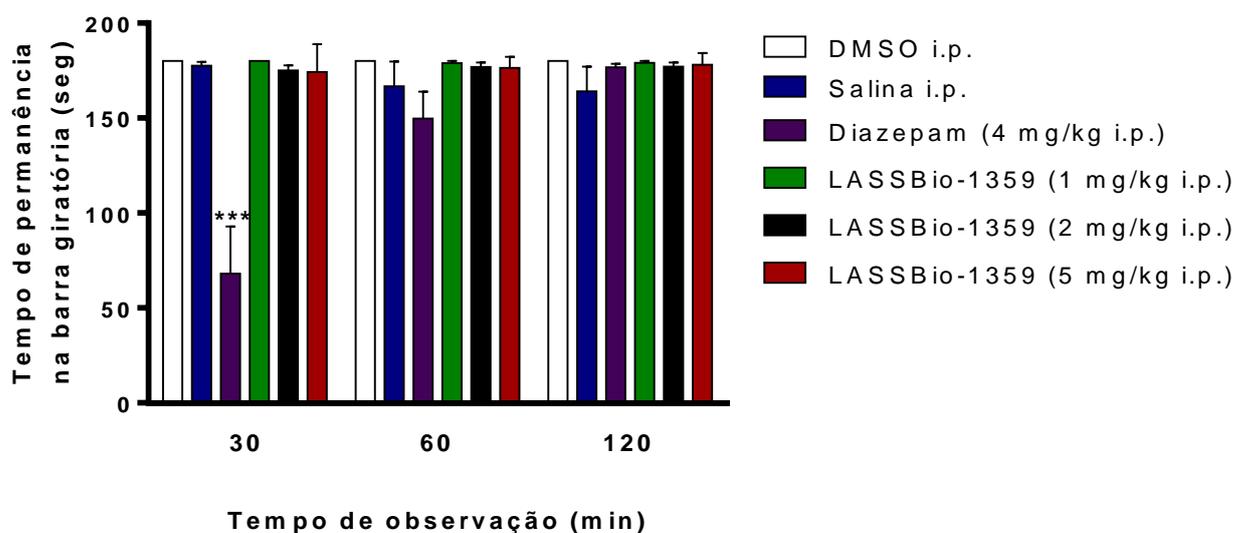
**Figura 52.** Curso temporal do número mov/min avaliados em dez intervalos de cinco minutos, resultante da administração de LASSBio-1359 na dose de 5 mg/kg (i.p.). Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=10) Teste t de *student*



**Figura 53.** Curso temporal do número mov/min avaliados em dez intervalos de cinco minutos, resultante da administração de LASSBio-1359 na dose de 10 mg/kg (i.p.). Os valores estão expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=10), Teste t de *student* pareado

#### 4.6.2 Coordenação motora

Não houve alteração significativa no tempo de permanência na barra giratória dos animais tratados com LASSBio-1359 (1, 2 e 5 mg/kg, i.p.) (Figura 53). Entretanto, o benzodiazepínico utilizado como referência, diazepam, diminuiu o tempo de permanência na barra, de  $177,5 \pm 2,5$  observado no grupo controle para  $68,0 \pm 24,8$  s.



**Figura 54.** Efeito de LASSBio-1359 (1, 2 e 5 mg/kg i.p.) e diazepam (4 mg/kg i.p.) sobre a coordenação motora dos animais nos tempos 30 min, 60 min e 120 min após administração das substâncias. Valores expressos em média  $\pm$  e.p.m. (n=10), Teste *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste de Dunn's, \*\*\*  $p < 0.001$  vs salina

# **5 Discussão**

## 5 Discussão

A substância testada neste trabalho, como citado anteriormente, foi sintetizada pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio-UFRJ), e tendo em vista que em resultados prévios a substância apresentou como mecanismos de ação a inibição de PDE4, suprimindo a liberação de TNF- $\alpha$ , e sendo agonista de receptor de adenosina A<sub>2A</sub>, houve o interesse do nosso laboratório em estudar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório em modelo de monoartrite.

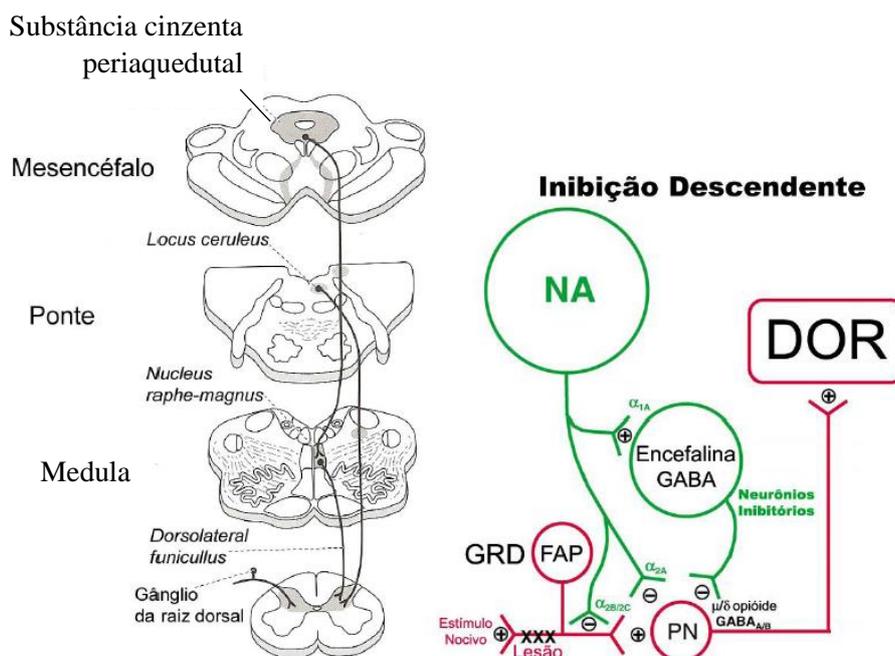
LASSBio-1359, já descrito com atividade anti-inflamatória foi avaliado no teste de formalina que é um modelo para verificar a nocicepção inflamatória. Esse teste consiste na intensa atividade do animal lambar ou morder a pata que recebeu o estímulo nocivo (injeção de formalina) em dois períodos distintos. A primeira fase, com duração de 5 minutos e iniciada logo após a administração da formalina, e uma fase tardia (segunda fase), dos 15 aos 30 minutos após a administração do estímulo químico. A primeira caracteriza-se pela ação direta da formalina sobre os nociceptores (resposta neurogênica ou aguda), e a segunda fase envolve respostas inflamatórias (HUNSKAAR S.; BERGE O. G.; HOLE K., 1986; HUNSKAAR; HOLE, 1987).

O mecanismo de ação nociceptiva na primeira fase do teste tem início quando as fibras nociceptivas aferentes são estimuladas, gerando a liberação de substâncias como glutamato, substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e GABA (KANEKO; HAMMOND, 1997; SEVOSTIANOVA et al., 2003; SHIELDS et al., 2010). Há também a excitação direta das fibras C sensitivas pela formalina, ativando os receptores TRPA1 (MCNAMARA, et al., 2007) e ainda a participação da bradicinina na fase neurogênica (LE BARS; PARADA et al., 2001). Substâncias que atuam a nível central tais como opióides são os principais agentes a atuarem nesta fase neurogênica da nocicepção (FERREIRA et al., 2006).

Na segunda fase do teste da formalina, observa-se a liberação de mediadores inflamatórios, entre os quais, prostaglandinas, serotonina, bradicinina, histamina, aminas simpaticomiméticas, TNF- $\alpha$  e interleucinas (MURRAY; PORRECA; COWAN, 1988; TORNOS et al., 1999; RUJJANAWATE; KANJANAPOTHI; PANTHONG, 2003; FERREIRA et al., 2006). Anti-inflamatórios não-esteroidais como o ácido acetilsalicílico (AAS) e indometacina, bem como os corticosteróides, a exemplo da

dexametasona, agem na segunda fase do teste da formalina inibindo apenas essa fase (RUJJANAWATE; KANJANAPOTHI; PANTHONG, 2003).

Os resultados obtidos com LASSBio-1359 demonstram que, a reatividade dos animais em ambas as fases, nas 2 doses utilizadas (10 e 20 mg/kg) foi reduzida significativamente. Na determinação dos mecanismos envolvidos para ação na fase neurogênica, o efeito antinociceptivo de LASSBio-1359 foi revertido com o pré-tratamento do antagonista  $\alpha_2$ -adrenérgico, ioimbina. Diversas evidências apontam para a participação do sistema noradrenérgico na modulação da dor (LEVINE et al., 1986; HAWS et al, 1990; DAVIS et al., 1991; PENG et al., 1996; CUI et al., 1999). Os receptores adrenérgicos são divididos em diversos tipos e subtipos. Os subtipos de adrenoceptores envolvidos na dor dependem da espécie e de sua localização. O receptor adrenérgico do subtipo  $\alpha_2$ , que está acoplado à proteína G inibitória (Gi), ao ser ativada inibe a atividade da adenilato ciclase a qual não formará o AMPc a partir do ATP. Outros efeitos promovidos por sinais provenientes da ativação dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos são a inibição dos canais de cálcio e ativação de canais de potássio, causando hiperpolarização celular. Agonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos apresentam propriedades analgésicas no cérebro ou medula espinhal e podem atuar nos três subtipos destes receptores ( $\alpha_{2A}$ ;  $\alpha_{2B}$  e  $\alpha_{2C}$ ) sendo que o subtipo do receptor  $\alpha_{2A}$ -adrenérgico é o responsável pelo efeito de analgesia (CALASANS-MAIA, 2010).

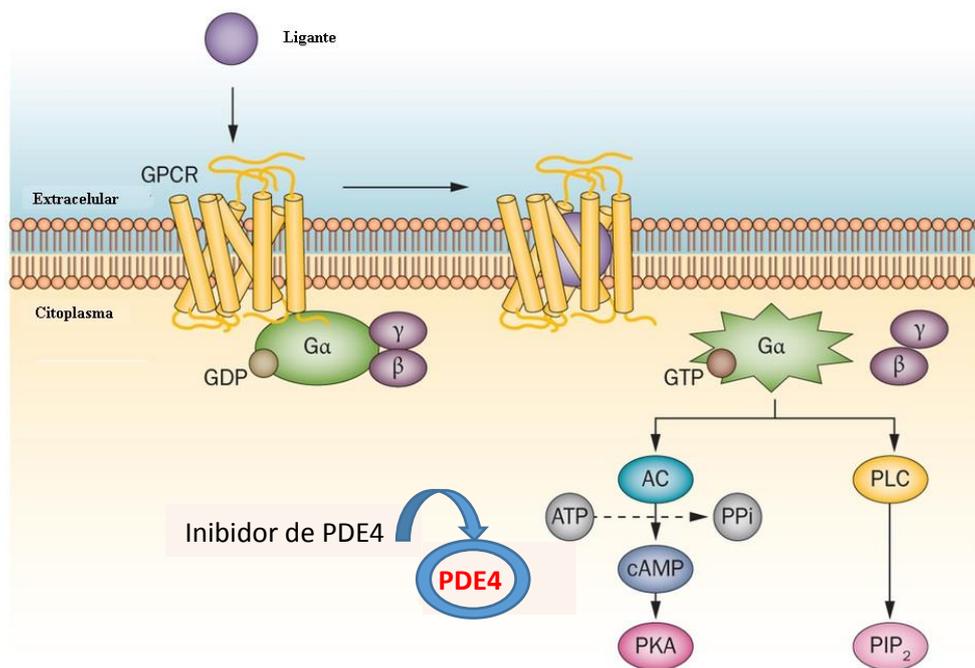


**Figur**

**a 55.** Vias descendentes da modulação da dor e via descendente noradrenérgica. NA: noradrenalina; GRD: gânglio da raiz dorsal; FAP: fibras aferentes primárias; PN: projeções de neurônios (CALASANS-MAIA, 2010)

O sistema noradrenérgico é considerado como o principal sistema de controle descendente da dor originado do tronco cerebral, sendo que a noradrenalina endógena é liberada através da ativação das vias inibitórias descendentes originadas na substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo, do *locus ceruleus* da ponte e do núcleo dorsal da rafe. Essas vias descendentes controla a atividade dos neurônios nociceptivos no corno dorsal (SMITH et al., 1995) (Figura 55). A ativação de  $\alpha_2$ -adrenoceptores no SNC produz antinocicepção descendente em numerosos modelos comportamentais de dor (CELEDONIO, 2008) Administração de agonista adrenoceptor  $\alpha_2$  causa antinocicepção devido a ativação direta deste receptor, a qual promove uma inibição pré-sináptica da liberação de neurotransmissores das fibras C e/ou a hiperpolarização pós-sináptica de neurônios de alta variação dinâmica na medula espinhal (FLEETWOOD-WALKER et al., 1985; GO e YAKSH, 1987). Tem sido sugerido que esta habilidade de bloquear a liberação de neurotransmissores de fibra C pode prevenir, especialmente, o desenvolvimento do aumento no processamento espinhal que ocorre na segunda fase do teste da formalina (MALMBERG & YAKSH,1993). Pode ser que esse efeito antinociceptivo na fase 2 do teste da formalina também venha da contribuição da ligação de LASSBio-1359 sobre receptores  $\alpha_2$  adrenérgico.

Na avaliação dos mecanismos associados ação antinociceptiva na fase 2 do teste da formalina, verificou-se que o efeito antinociceptivo de LASSBio-1359 apresentou reversão após o pré-tratamento com antagonista específico para receptor de adenosina  $A_{2A}$ , ZM 241385. Alencar e cols. (2013), descreveram que LASSBio-1359 por ser um novo agonista de receptor de adenosina  $A_{2A}$  poderia estimular via proteína Gs a atividade da enzima adenilato ciclase, que transforma o ATP em AMPc, o que levaria o acúmulo desse segundo mensageiro no meio intracelular (Figura 56). Conseqüentemente há ativação da proteína quinase PKA, a qual inibe a formação e liberação de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (VARANI et al., 2010); e inibe ativação do fator NF  $\kappa$ B (MONTESINOS et al., 2003). Logo a via de sinalização associada a ativação de receptores  $A_{2A}$  poderia resultar em um efeito anti-inflamatório como demonstrado pelo LASSBio-1359.



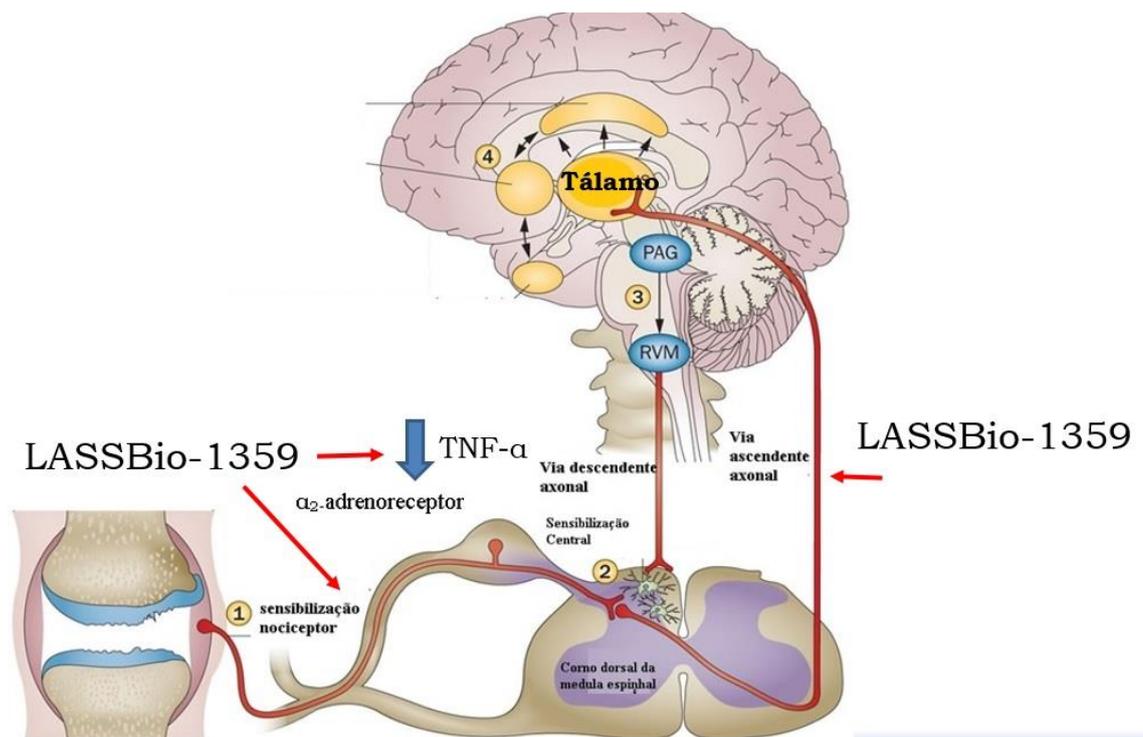
**Figura 56.** Diagrama esquemático da via de sinalização da proteína Gs ativada pelo ligante. A subunidade  $\alpha$  da proteína G modula a ativação da enzima adenilato ciclase, havendo a formação do AMPc a partir do ATP intracelular. Há formação da proteína quinase A, a qual vai mediar o efeito anti-inflamatório, com inibição da transcrição de citocinas pró-inflamatórias (Modificado de NEUMANN et al., 2014).

BORGHI e cols.(2002) demonstraram que o agonista do receptor  $A_{2A}$ , CGS21680, apresentou efeito antinociceptivo na fase 1 do teste de formalina. E que há uma possível interação entre ativação do receptor de adenosina  $A_{2A}$  e o sistema  $\mu$  opioide na atividade antinociceptiva, visto que a injeção de formalina modificou a densidade de receptor  $\mu$  opioide nas lâminas superficiais da medula espinhal e no núcleo talâmico paracentral. Animais tratados com CGS21680 apresentaram neutralização destes efeitos induzidos pela formalina. Embora, como descrito por Borghi, a ativação dos receptores  $A_{2A}$  possam participar do efeito antinociceptivo na fase 1 da formalina o efeito antinociceptivo de LASSBio-1359 nesta fase não foi revertida pelo uso do antagonista  $A_{2A}$  ZM 241385.

O teste da placa quente é uma metodologia sensível e específica usada para mostrar o envolvimento de mecanismos antinociceptivos centrais para ação de agentes analgésicos (NEMIROVSKY et al., 2001; SULAIMAN et al., 2009). Neste teste, a temperatura é utilizada como estímulo nociceptivo, sendo seletivo para detecção de substâncias analgésicas com efeito central (ANKIER, 1974). Descrito inicialmente por WOOLFE e MCDONALD (1944), o mesmo produz uma rápida resposta ao estímulo algico, diante da ativação das fibras C e  $A\delta$ , fazendo com que o estímulo seja conduzido à região medular, mais especificamente, corno dorsal, e posteriormente aos centros corticais (DICKENSON & BESSON, 1997). Há a estimulação dos nociceptores após a ativação dos receptores, entre eles, os receptores vanilóides, especificamente, os do tipo VR-1 e VRL-1 (limiar de ativação = 43°C e 52°C, respectivamente). Em relação à medição da resposta a estímulos térmicos nocivos, os receptores vanilóides do tipo VRL-1 são considerados mais importantes (JULIUS & BASBAUM, 2001). LASSBio-1359 apresentou efeito antinociceptivo 40 % de atividade analgésica quando comparada a morfina. LASSBio-1359 parece atuar pela via  $\alpha_2$ -adrenérgica, pois ao usar antagonistas dessa via, a porcentagem antinociceptiva diminui significativamente. Isso corrobora com os dados obtidos na fase neurogênica do teste da formalina reforçando que LASSB-1359 é um possível agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico.

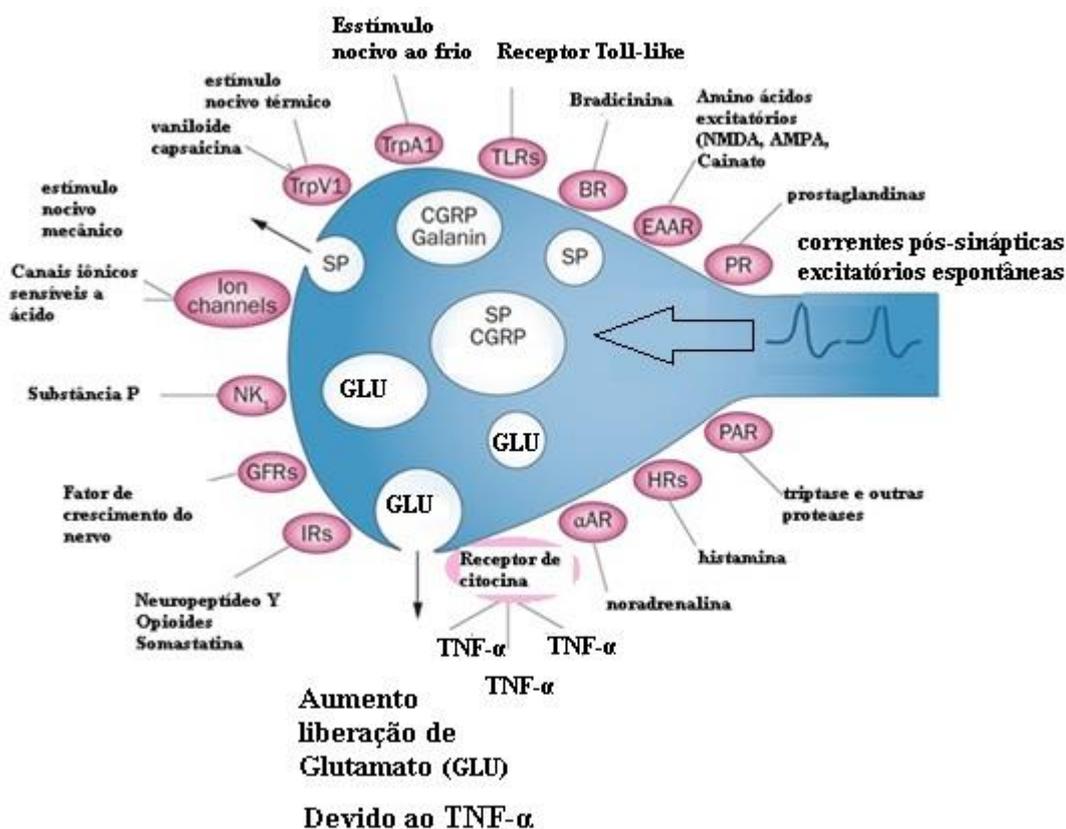
O modelo de inflamação aguda induzida por carragenina é muito usado como modelo experimental *in vivo* para a avaliação do potencial efeito anti-inflamatório (NECAS & BARTOSIKOVA, 2013). Além disto, este modelo é muito sensível a ação de fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais (MORRIS, 2003). Esse modelo é

descrito na literatura sendo como padrão para a avaliação de inflamação (CELEDONIO, 2006). É dividido em duas fases. A fase inicial (1-2 h) que é principalmente mediada pela histamina, serotonina, e o aumento da síntese de prostaglandinas ao redor dos tecidos que foi injetado a carragenina. A fase tardia consiste na liberação de prostaglandinas mediada por bradicinina, leucotrienos, células polimorfonucleares, e as prostaglandinas produzidas por macrófagos. (GUPTA et al., 2006). A inflamação causada pela carragenina pode originar um estado sensibilizado da medula espinal a qual um estímulo nocivo produz uma resposta exagerada (hiperalgesia), ou seja um aumento da resposta a estímulos nocivos térmicos e mecânico. (HARGREAVES et al., 1988). Verificou-se que LASSBio-1359 diminuiu a hiperalgesia térmica e mecânica desencadeado pela carragenina. Provavelmente a substância pode atuar via sistema  $\alpha_2$  adrenérgico, assim como também apresenta adicionalmente uma ação anti-hiperalgésica por atuar indiretamente inibindo a liberação de TNF- $\alpha$  (Figura 57).



**Figura 57.** Provável mecanismo de ação de LASSBio-1359 no modelo de dor inflamatória. LASSBio-1359 por ser um agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico modula a inibição de liberação de neurotransmissores das fibras C e a hiperpolarização de neurônios pós-sinápticos da medula. O derivado também pode diminuir a liberação do TNF- $\alpha$ , diminuindo a sensibilidade dos nociceptores à essa citocina (Modificado de LA HAUSSE DE LALOUVIÈRE et al., 2014).

De acordo com ZHANG e cols., 2011, TNF- $\alpha$  tem um papel importante na dor do tipo inflamatória através da sensibilização central, especificamente da plasticidade sináptica que há um aumento da frequência de correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas, (Figura 58) que tem como resultado o aumento de liberação de glutamato, e plasticidade neuronal (hiperatividade dos receptores NMDA nos neurônios da medula espinhal). O TNF- $\alpha$  por apresentar um papel na regulação sináptica e plasticidade neuronal, poderia ser considerado um importante alvo no sistema nervoso central, para aumentar a eficácia analgésica com tratamento de agentes anti-TNF- $\alpha$ .

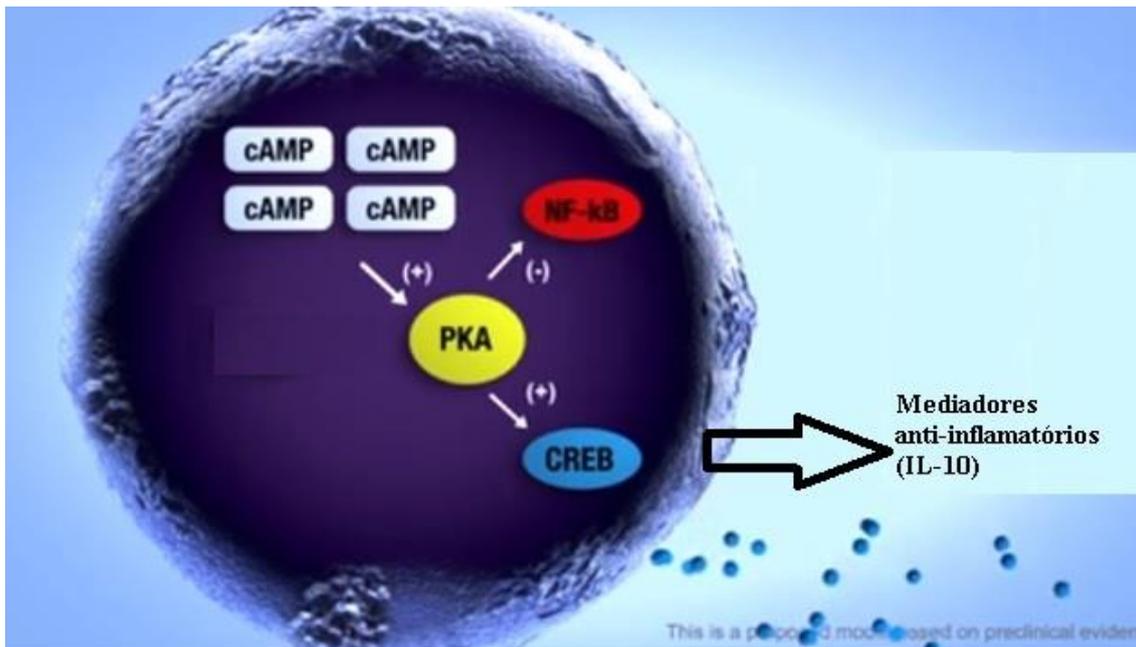


**Figura 58.** Representação de uma sensibilização mediante a resposta para diferentes substâncias ou citocinas, tais como TNF- $\alpha$ , o qual aumenta frequência de correntes pós-sinápticas excitatórias espontâneas (Modificado de PONGRATZ & STRAUB, 2013)

O TNF- $\alpha$  é produzido por macrófagos, monócitos e células T; e evidências apontam um papel importante dessa citocina na indução e perpetuação da artrite e suas manifestações sistêmicas (CHOY & PANAYI, 2001; LEE & WEINBLATT, 2001;

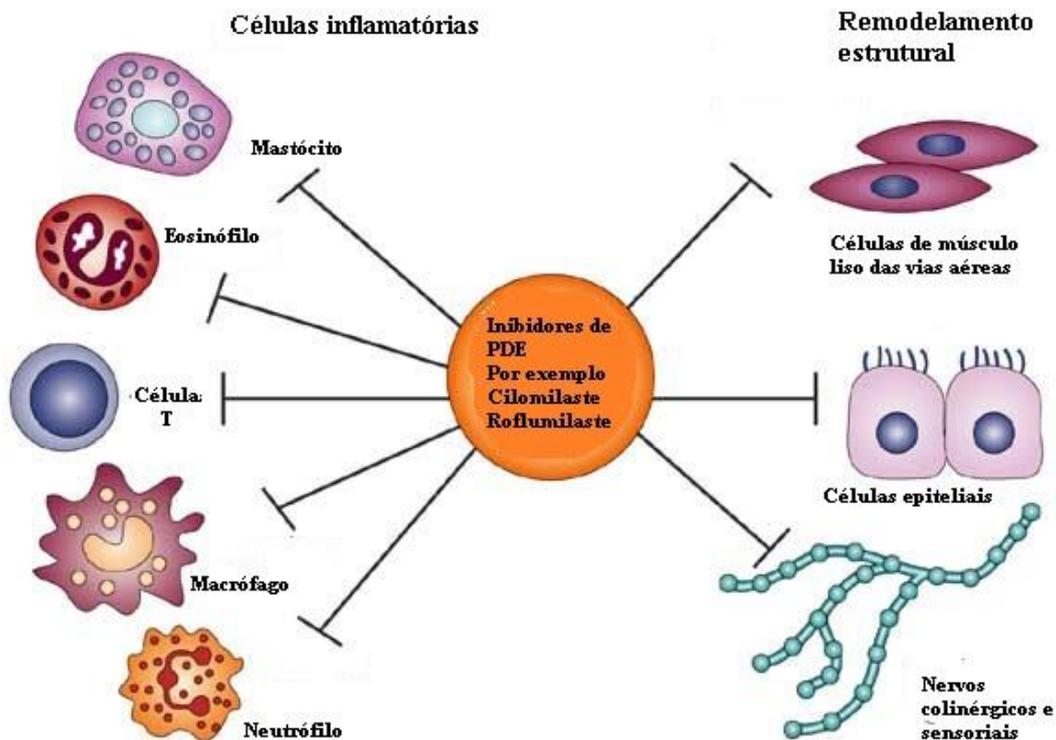
SCOTT & KINGSLEY, 2006; SILVERMAN et al., 2008). LASSBio-1359 inibiu a liberação de TNF- $\alpha$  de células mononucleares de sangue periférico doadas por indivíduos saudáveis, as quais foram ativadas por lipopolissacarídeo (LPS). Essa inibição foi cerca de 91% com EC<sub>50</sub> 1.72  $\pm$  0,82  $\mu$ M (KÜMMERLE, 2009). Além disso foi demonstrado a importância do grupamento metila na molécula, visto que esse ensaio foi feito com derivados *N*-acilidrazônicos não metilados e metilados. Apenas 11 substâncias inibiram significativamente a produção de TNF- $\alpha$  e deste total 9 apresentavam a *N*-metilação. Logo há uma grande importância deste grupamento na modificação estrutural de *N*-acilidrazonas para a atividade anti-TNF- $\alpha$  (KÜMMERLE et al., 2009).

É importante ressaltar que LASSBio-1359 apresenta o grupo 3,4-dimetoxifenila que é descrito como farmacofórico para a atividade inibidora de PDE 4, devido à sua interação com a glutamina-369 do sítio de reconhecimento molecular (ALENCAR, 2011). Com o resultado da inibição da enzima PDE4, é o acúmulo intracelular do segundo mensageiro AMPc, que promove a ativação da proteína quinase A (PKA) e fosforilação da proteína ligante de elemento em resposta ao AMPc (CREB) (Figura 59). A ativação desta via, modula a transcrição de vários genes de citocinas que resulta na supressão da produção de TNF- $\alpha$  e eventual inibição de suas propriedades pró-inflamatórias e destrutivas (SPINA, 2008; KUMAR et al.2013). Como resultado final ocorreria a liberação de mediadores anti-inflamatórios (por exemplo, IL-10) por células do sistema imunológico (OGER et al., 2005).



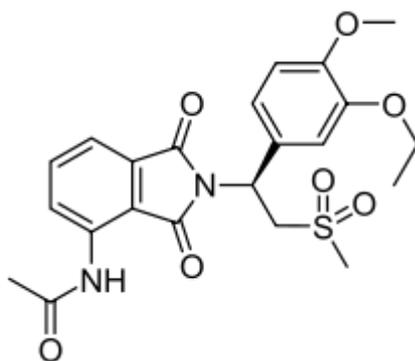
**Figura 59.** Representação de acúmulo de AMPc no meio intracelular, ativando PKA que fosforila CREB, havendo a transcrição e liberação de mediadores anti-inflamatórios como citocina IL-10 (Modificado de <http://discoverpde4.com/intracellular-mechanisms.html>)

Inibidores de (PDE4), roflumilaste e cilomilaste (Figura 60), inibem o recrutamento e ativação de células inflamatórias tais como mastócito, eosinófilo, linfócito T, macrófago e neutrófilo, assim como inibem a hiperplasia e hipertrofia das células, incluindo células do músculo liso das vias aéreas, células epiteliais e células sensoriais e os nervos colinérgicos. Foi avaliado a inibição de PDE 4, de acordo com o protocolo descrito por Lugnier, que utiliza a PDE 4 purificada a partir de aorta bovina (LUGNIER et al., 1986). LASSBio-1359 apresentou atividade inibitória da enzima PDE4 cerca de 97.1% com uma  $IC_{50}$  de  $140 \text{ nM} \pm 0,15$  (KÜMMERLE, 2009). Ao aumentar os níveis de AMPc, os inibidores de PDE4 mostram efeitos anti-inflamatórios em quase todas as células inflamatórias. Diversos inibidores seletivos de PDE4 foram patenteados nas últimas duas décadas, e alguns deles têm sido avaliados em ensaios clínicos em diversas condições inflamatórias incluindo asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), dermatite atópica e artrite reumatóide (WITTMANN & HELLIWELL, 2013).



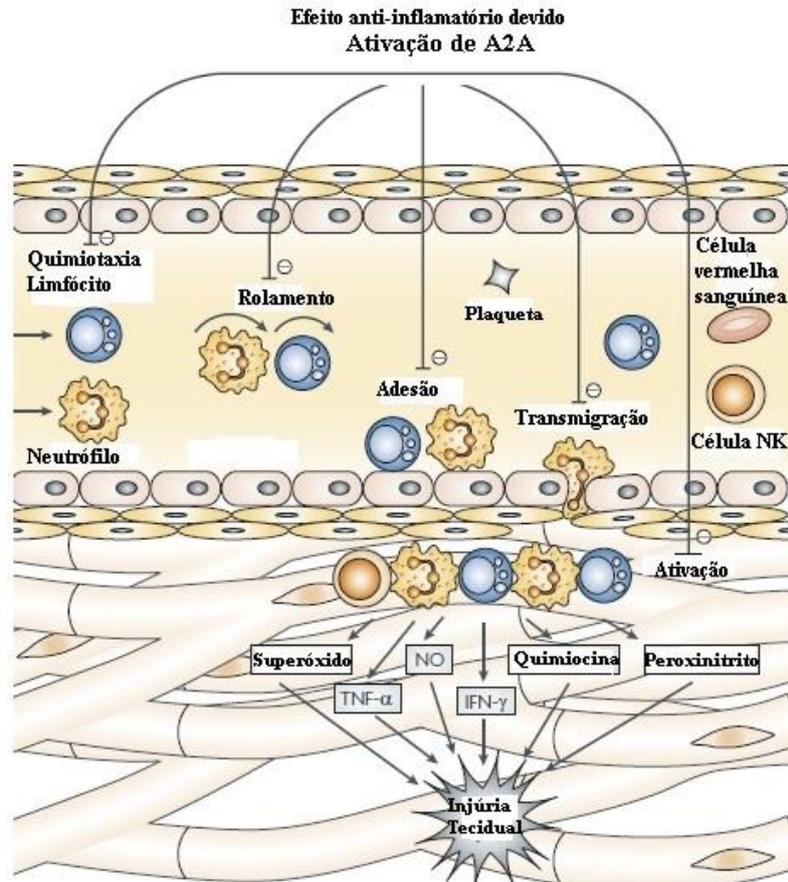
**Figura 60.** Inibidores de PDE4 e seus efeitos sobre células inflamatórias e remodelamento estrutural de alguns tipos de células (Modificado de BARNES, 2004)

A artrite reumatoide é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela destruição progressiva da articulação associada com a proliferação sinovial e secreção de elevados níveis de mediadores pró-inflamatórias, incluindo citocinas e fatores de crescimento. O TNF- $\alpha$  é a primeira citocina a ser liberada e inicia a cascata de reações inflamatórias via produção de IL-1, IL-6 e IL-8 (SOMMER, 2004; KOKKONEN et al., 2010; VARANI et al., 2011). Estudos demonstraram que o apremilaste (Figura 61), um novo inibidor de PDE4, levou a uma inibição dose dependente da produção espontânea de TNF- $\alpha$  a partir de culturas de membrana sinovial reumatoide humana. Além disso, em modelo murino demonstrou-se uma redução significativa da pontuação clínica de artrite durante um período de tratamento de dez dias com o apremilaste. Arquitetura de articulação saudável foi mantida de maneira dose dependente. O apremilaste não demonstrou quaisquer efeitos adversos em camundongos *naïves* de tratamento, possivelmente devido a uma maior seletividade da molécula (KUMAR et al., 2013).



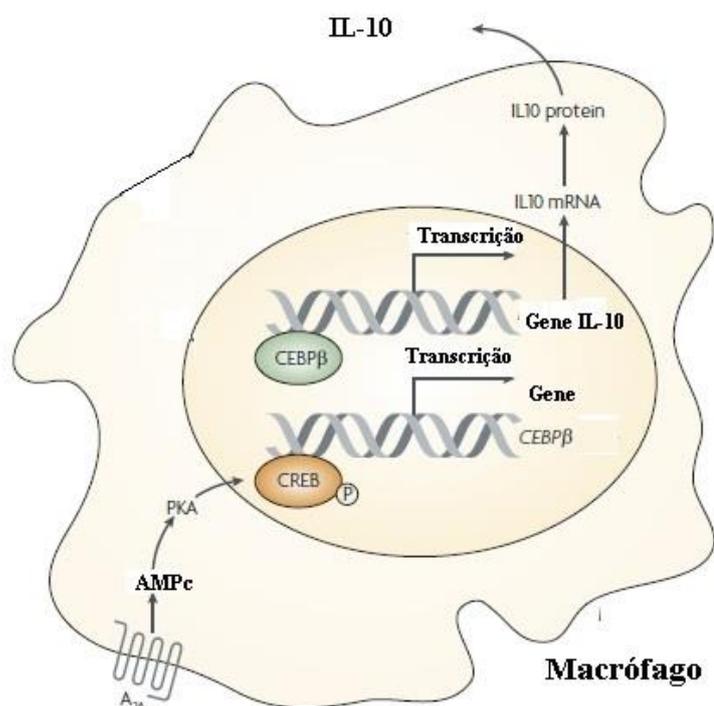
**Figura 61.** Figura do apremilaste [(*S*)-*N*-{2-[1-(3-etóxi-4-metoxifenil)-2-metanosulfoniletil]-1,3-dioxo-2,3-diidro-1*H*-isoindol-4-il}acetamida], um novo inibidor de PDE4 que é testado na pesquisa do tratamento da artrite reumatoide (SCHAFER et al., 2009)

Estudos apontaram uma alta regulação de receptores de adenosina  $A_{2A}$  e  $A_3$  em pacientes com diagnóstico de AR precoce e depois com tratamento com metotrexato, mas não em pacientes tratados com agentes anti-TNF- $\alpha$  (VARANI et al., 2011; VINCENZI et al., 2013). Ativação dos receptores de adenosina  $A_{2A}$  pelos agonistas proporciona efeito anti-inflamatório para o organismo (FORREST et al, 2005), pois inibe ativação de células inflamatórias nos tecidos e conseqüentemente suprime os níveis elevados de algumas citocinas; além disso inibe a produção de quimiocinas; liberação de superóxido e interferon-gama (IFN-g); inibe a liberação de óxido nítrico (NO) e TNF- $\alpha$  por células imunes ativadas (Figura 62) (HASKÓ et al., 2008).



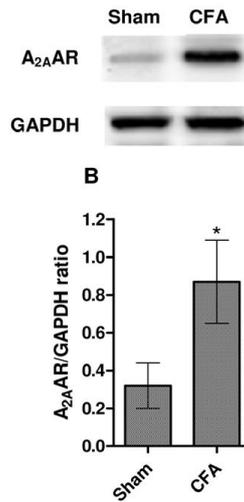
**Figura 62.** Representação de ativação de receptor de adenosina A<sub>2A</sub> inibindo recrutamento e ativação de células do sistema imune gerando um efeito anti-inflamatório para tecido. Há também supressão indireta de produção e liberação de citocinas, quimiocinas, óxido nítrico, para o tecido, não havendo injúria tecidual (Modificado de HASKÓ et al., 2008)

Estudos têm mostrado que agonistas de receptores de adenosina A<sub>2A</sub> são viáveis para aumentar a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 em diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* (MOORE, et al., 2008; NOWAK et al., 2010; VINCENZI et al., 2013). Ativação do receptor A<sub>2A</sub> aumenta os níveis intracelulares de AMPc os quais promovem a ativação da PKA. Essa proteína CREB, que causa um aumento na sua transativação potencial levando a transcrição do gene CEBPβ. Proteína CEBPβ liga-se ao promotor do gene IL-10, o qual desencadeia transcrição de IL-10 e posteriormente leva à liberação de IL-10 para meio extracelular (Figura 63) (HASKÓ et al., 2008).



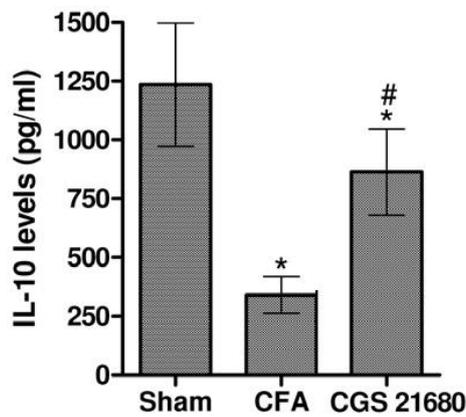
**Figura 63.** Representação de receptor de adenosina A<sub>2A</sub> ativado, desencadeando a ativação de CREB via PKA e transcrição de CEBPβ, a qual ativa a transcrição de IL-10 e essa citocina sendo liberada de um macrófago para meio extracelular (Modificado de HASKÓ et al., 2008)

Em células sinoviais humanas, a estimulação do receptor A<sub>2A</sub> diminuiu a produção de TNF-α, IL-6 e IL-8 e aumentou a liberação de IL-10 diminuindo a inflamação (VARANI et al., 2010; ONGARO et al., 2012; VINCENZI et al., 2013). Em ratos injetados com CFA houve uma regulação aumentada de receptores de adenosina A<sub>2A</sub> semelhante ao que foi encontrado em pacientes com artrite (Figura 64). Isso poderia confirmar a relevância deste modelo animal para estudar o envolvimento do receptor de adenosina A<sub>2A</sub> na doença (VINCENZE et al., 2013).



**Figura 64.** Expressão do receptor de adenosina A<sub>2A</sub> em linfócitos de ratos injetados com CFA e ratos sham (Adaptado de VINCENZE et al, 2013).

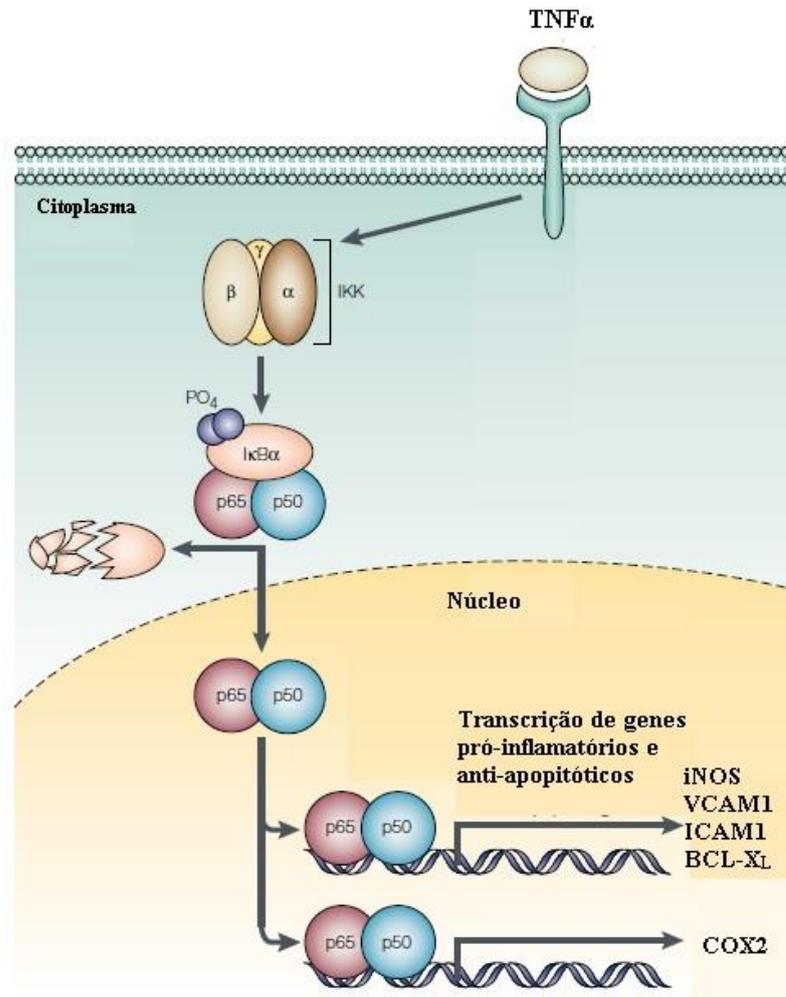
Além disso o agonista do receptor A<sub>2A</sub>, CGS 21680, aumentou os níveis de IL-10 em soro de ratos injetados com CFA (Figura 65), corroborando com eos dados já relatados na literatura do efeito da ativação de receptor de adenosina A<sub>2A</sub> em condrócitos humanos de pacientes com artrite aumentaria a liberação de IL-10 e (BITTO et al., 2011; VINCENZE et al., 2013).



**Figura 65.** Níveis de IL-10 no soro de ratos sham e injetados com CFA. Os animais que receberam tratamento com agonista do receptor A<sub>2A</sub>, tiveram níveis de IL-10 maior do que os animais CFA não tratados (Adaptado de VINCENZE et al., 2013).

Avaliação deste derivado *N*-acilidrazônico no modelo de monoartrite induzida por CFA foi realizada considerando-se não somente o fato de LASSBio-1359 ser descrito como inibidor de enzima PDE4 (KÜMMERLE et al., 2012), como também ser descrito como um novo agonista de receptor de adenosina de adenosina A<sub>2A</sub> (ALENCAR et al., 2013). Os animais injetados com Adjuvante Completo de Freund desencadearam um quadro de hiperalgesia térmica e mecânica que foi revertida após o tratamento com LASSBio-1359. Esse efeito pode ter sido devido a substância ter diminuído os níveis de TNF- $\alpha$ , visto que citocina pode ativar diretamente neurônios sensoriais e como também iniciar processo inflamatório causando a hiperalgesia (AOKI et al., 2004 SOMMER, 2004). Há a possibilidade da substância atuar nos receptores  $\alpha_2$  adrenérgico causando o efeito antinociceptivo.

Ao avaliar a expressão de TNF $\alpha$ , verifica-se um aumento da expressão dos animais como monoartrite e diminuição significativa expressão dessa citocina nos animais tratados com LASSBio-1359. LASSBio-1359 pode proporcionar a redução de TNF- $\alpha$  por ser inibidor de PDE4 e agonista de adenosina A<sub>2A</sub>. Há um aumento de expressão da proteína iNOS nos animais com monoartrite que é normalizada após tratamento com LASSBio-1359. Isso pode ser devido a diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$ , a qual leva conseqüentemente a diminuição dos níveis de expressão iNOS através de ação indireta mediada pela não ativação IKB quinase e conseqüentemente modulação de NF- $\kappa$ B (Figura 66).



**Figura 66.** Ativação de NF- $\kappa$ B em resposta ao estímulo pró-inflamatório do TNF- $\alpha$ , que estimula a ativação da IKK, a qual consiste em três subunidades IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  e IKK $\gamma$ . A IKK $\beta$  é responsável pela ativação de NF- $\kappa$ B através da fosforilação do inibidor do fator nuclear- $\kappa$ B,  $\alpha$  (I $\kappa$ B $\alpha$ ). Ao ser fosforilado, I $\kappa$ B $\alpha$  é degradado e isso permite que o heterodímero NF- $\kappa$ B p65-p50 migre para o núcleo e aumente a regulação da expressão de genes pró-inflamatórios e anti-apoptóticos tais como iNOS, VCAM1, COX 2 resultando em um processo inflamatório (Modificado de LAWRENCE et al., 2002).

Quanto aos efeitos referentes ao SNC, LASSBio-1359 não apresentou ação sedativa verificada no modelo de campo aberto; não apresentou alteração na coordenação motora dos animais; apresentou efeito ansiolítico na menor dose porém não na dose maior. O efeito ansiolítico foi revertido com uso de antagonista da via  $\alpha_2$ -adrenérgica. Sugerindo, mais uma vez, que o derivado é um agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico. Outros precedentes na literatura mostram que a clonidina, agonista  $\alpha_2$ -

adrenérgico, usada na clínica como fármaco analgésico é capaz de causar efeito ansiolítico em animais (MASSÉ et al., 2005). Não seria um grande efeito colateral visto que ansiedade pode ser sintoma adicional em paciente com artrite que ao progredir leva a incapacidade de realizar algumas atividades do seu dia a dia, podendo gerar um quadro de preocupação, ansiedade, angústia.

Um ótimo perfil anti-inflamatório de LASSBio-1359 foi identificado no modelo de monoartrite a partir de análise histopatológicas de cartilagem e membrana sinovial dos animais tratados com as doses de LASSBio-1359. Esse efeito anti-inflamatório benéfico nesse modelo pode ser mediado por inibição de PDE4 e ativação de receptor de adenosina  $A_{2A}$

Do ponto de vista farmacológico, os efeitos benéficos de LASSBio-1359 podem ser explicados pela inibição de PDE4 e também pela ativação de receptores metabotrópicos para a adenosina  $A_{2A}$ . É de extrema importância explorar a estimulação do receptor de adenosina  $A_{2A}$ , visto que estão altamente expressos em pacientes com artrite reumatoide e animais com artrite induzida por CFA. Não menos importante seria a investigação da atividade inibitória de PDE4 no tratamento de AR, pois ambas as vias conduzem à inibição do processo inflamatório. Logo LASSBio-1359 surge como nova alternativa de substância com triplo mecanismo para oferecer um tratamento farmacológico em potencial para terapia clássica de doenças humanas caracterizadas por um componente inflamatório crônico como na artrite reumatoide.

# **6 Conclusão**

## 6 Conclusões

LASSBio-1359 já havia apresentado um perfil anti-inflamatório mediado pela inibição da PDE4. Nesse trabalho o derivado apresentou uma melhora da nocicepção inflamatória aguda e crônica que parece ser mediada também pela ativação de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgico e de receptores de adenosina  $A_{2A}$ . Na avaliação da expressão de TNF- $\alpha$  em animais com a monoartrite induzido por CFA, houve um aumento desta citocina na pata injetada e o tratamento dos animais com LASSBio-1359 nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg (v.o.) induziu a diminuição da expressão do TNF- $\alpha$  e da expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) sugerindo indícios de uma atividade anti-inflamatória. LASSBio-1359 não apresentou efeito sedativo e na coordenação motora de camundongos, porém apresentou efeito ansiolítico mediado pela via  $\alpha_{2A}$ - adrenérgica na menor dose, porém esse efeito pode ser benéfico, visto que alguns paciente com artrite reumatoide podem apresentar quadro clinico de ansiedade. Portanto LASSBio-1359 mostrou-se ser um candidato a fármaco para o tratamento da artrite, pois é uma molécula multi-alvo.

# **7 Referências**

## 7. Referências

- ALENCAR, A. K. N. Desenvolvimento de novas substâncias para a redução da disfunção ventricular decorrente da hipertensão arterial **Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.**
- ALENCAR, A. K.; PEREIRA, S. L.; MONTAGNOLI, T. L.; MAIA, R. C.; KÜMMERLE, A. E.; LANDGRAF, S. S et al., Beneficial effects of a novel agonist of the adenosine A2A receptor on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, p. 953-62, 2013.
- AL-GHAMDI, M. S. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 45-48, 2001.
- ALMEIDA FILHO, N.; MARI, J. J.; COUTINHO, E.; FRANÇA, J. F.; FERNANDES, J. G.; ANDREOLI, S. B.; BUSNELLO, E. A. Estudo multicêntrico de morbidade psiquiátrica em áreas urbanas brasileiras (Brasília, São Paulo, Porto Alegre). **Revista Associação Brasileira de Psiquiatria - Asociación Psiquiátrica de América Latina (ABP-APAL)**, v.14, p. 93-104, 1992.
- ALMEIDA, F. R. C.; OLIVEIRA, F. S. Avaliação de drogas analgésicas de ação central. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 17, p. 179-188, 2006a.
- ALMELA, P.; GARCÍA-NOGALES, P.; ROMERO, A.; MILANÉS, M. V.; LAORDEN, M. L.; PUIG, M. M. Effects of chronic inflammation and morphine tolerance on the expression of phospho-ERK 1/2 and phospho-P38 in the injured tissue. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. v. 379, p. 315 – 323, 2009.
- ANDLIN-SOBOCKI, P.; JONSSON, B.; WITTCHEN, H. U.; OLESEN, J. Cost of disorders of the brain in Europe. **The European Journal of Neurology**, v. 12 (Suppl 1), p.1–27, 2005.

- ANKIER, S. I. New hot plate test to quantify antinociceptive and narcotic-antagonist activities. **European Journal Pharmacology**, v. 27, p. 1-4, 1974.
- AOKI, Y.; OHTORI, S.; INO, H.; DOUYA, H.; OZAWA, T.; SAITO, T. et al., Disc inflammation potentially promotes axonal regeneration of dorsal root ganglion neurons innervating lumbar intervertebral disc in rats. **Spine (Phila Pa 1976)**. v. 29, p. 2621-2626, 2004.
- ARAGÃO, G. F.; CARNEIRO, L. M. V.; JUNIOR, A. P. F.; VIEIRA, L. C.; BANDEIRA, P. N. ; LEMOS, T. L. G.; VIANA, G. S. DE B. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 85 827–834, 2006.
- ARCHER, J.; Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**. v.21; p. 205-35, 1973.
- AZEVEDO, A. O.; CAMPO, J. J.; GALDINO, G. S.; BRAGA, F. C.; DUARTE, I. D. G.; PEREZ, A. C. Antinociceptive effect from *Davilla elliptica* hydroalcoholic extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 354–356, 2007.
- BARALDI, P. G.; TABRIZI, M. A.; GESSI, S.; BOREA, P. A. Adenosine receptor antagonists: translating medicinal chemistry and pharmacology into clinical utility. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 238–263, 2008.
- BARNES, P. J. New drugs for asthma. **Nature Reviews Drug Discovery** v. 3, p. 831-844, 2004
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos, **Art Med Editora Ltda**, nº 3, p. 83-122, Porto Alegre 2001
- BARREIRO, E. J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo. **Química Nova**, v. 25, p. 1172-1180, 2002.

- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. A questão da Inovação em fármacos no Brasil: Proposta de criação do Programa Nacional de fármacos (PRONFAR). **Química Nova**, v. 58, p.57-63, 2005.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal - As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. 2a ed., p.536. Artmed, 2008.
- BARREIRO, E. J. A Química Medicinal e o paradigma do composto-protótipo. **Revista Virtual Química**, v. 1 (1), p. 26-34, 2009.
- BELARDINELLI, L.; SHRYOCK, J. C.; SNOWDY, S. et al. The A2A adenosine receptor mediates coronary vasodilation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 284, p.1066–1073, 1998.
- BHANDARE, A. M.; KSHIRSAGAR, A. D.; VYAWAHARE, N. S.; HADAMBAR, A. A.; THORVE, V. S. Potential analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities of hydroalcoholic extract of *Areca catechu* L. nut. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3412–3417, 2010.
- BITTO, A.; POLITO, F.; IRRERA, N.; D'ASCOLA, A.; AVENOSO, A.; et al. Polydeoxyribonucleotide reduces cytokine production and the severity of collagen-induced arthritis by stimulation of adenosine A2A receptor. **Arthritis & Rheumatology**, v. 63, p. 3364–3371, 2011.
- BLACKBURN, M. R.; VANCE, C. O.; MORSCHL, E.; WILSON, C. N. Adenosine receptors and inflammation. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 193, p. 215–269, 2009.
- BORGHI, V.; PRZEWLOCKA, B.; LABUZ, D.; MAJ, M.; ILONA, O.; PAVONE, F. Formalin-induced pain and mu-opioid receptor density in brain and spinal cord are modulated by A1 and A2a adenosine agonists in mice. **Brain Research**, v. 956, p. 339-348, 2002.
- BOYLE, D. L.; MOORE, J.; YANG, L.; SORKIN, L. S.; FIRESTEIN, G. S. Spinal of adenosine receptor activation inhibits inflammation and joint destruction in rat adjuvant induced arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 46, p. 3076–3082, 2002.

- BRIDEAU, C.; VAN STADEN, C.; STYHLER, A.; RODGER, I. W.; CHAN, C. C. The effects of phosphodiesterase type 4 inhibitors on tumour necrosis factor-alpha; and leukotriene B4 in a novel human whole blood assay. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, p. 979–988, 1999.
- BRUNS, R. F.; LU, G. H.; PUGSLEY, T. A. Characterization of the A2 adenosine receptor labeled by [3H] NECA in rat striatal membranes. **Molecular Pharmacology**, v. 29, p. 331–346, 1986.
- BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 1471–83, 2007.
- BUTLER, S. H.; GODEFROY, F.; BESSON, J. M.; WEIL-FUGAZZA, J. A limited arthritic model for chronic pain studies in the rat. **Pain**, v. 48, p. 73 – 81, 1992.
- BUTLER, M. S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2141-2153, 2004.
- CALASANS-MAIA, J. A .Novo agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico derivado imidazolínico e sua atividade antinociceptiva **Tese de doutorado apresentado no Programa de Pós-graduação em Educação em Medicina, Cirurgia Geral, Faculdade de medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.**
- CALIXTO, J. B.; JUNIOR, J. M. S. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios, **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, p. 98-106, 2008.
- CAPASSO, A.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; SORRENTINO, L. Pharmacological effect of the aqueous extract from *Valeriana adscendeus*. **Phytotherapy Research**, v. 10, p. 309–312, 1996.
- CARUSO, M.; VARANI, K.; TRINGALI, G.; POLOSA, R. Adenosine and adenosine receptors: their contribution to airway inflammation and therapeutic potential in asthma. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 3875–3885, 2009.
- CELEDONIO, N. R. Estudo do mecanismo de ação antinociceptivo e antiedematogênico do óleo essencial de *Croton argyrophylloides* e seus

constituíntes: alfa-pineno e trans-cariofileno. **Dissertação de mestrado acadêmico em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.**

- CHILLINGWORTH, N. L.; DONALDSON, L. F. Characterization of a Freund's complete adjuvant-induced model of chronic arthritis in mice. **Journal of Neuroscience Methods** v. 128, p. 45-52, 2003
- CHOI, S. S.; LEE, J. K.; SUH, H. W. Antinociceptive profiles of aspirin and acetaminophen in formalin, substance P and glutamate pain models. **Brain Research**, v. 921(1-2), p. 233-239, 2001.
- CHOY, E. H.; PANAYI, G. S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 907-916, 2001.
- CHU, K. C. The quantitative analysis of structure–activity relationships. Em: **The Basis of Medicinal Chemistry/Burger's Medicinal Chemistry**. p.393-418. New York: John Wiley, 1980.
- CRONSTEIN, B. N. Adenosine receptors and fibrosis: a translational review; **F1000 Biology Reports**, v. 3, p. 21, 2011.
- COHEN, S. B.; GILL, S. S.; BAER, G. S.; LEO, B. M.; SCHELD, W. M.; DIDUCH, D. R. Reduction joint destruction due to septic arthrosis using an adenosine A2A receptor agonist. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 22, p. 427–35, 2004.
- COHEN, S. B.; LEO, B. M.; BAER, G. S.; TURNER, M. A.; BECK, G.; DIDUCH, D. R. An adenosine A2A receptor agonist reduces interleukin-8 expression and glycosaminoglycan loss following septic arthrosis. **Journal of Orthopaedics**, v. 23, p. 1172–8, 2005.
- CUI, M.; FENG, Y.; MCADOO, D. J.; WILLIS, W. D. Periaqueductal gray stimulation-induced inhibition of nociceptive dorsal horn neurons in rats is associated with the release of norepinephrine, serotonin and amino acids.

**Journal of Pharmacological Experimental Therapies**, v. 289, p. 868-876, 1999.

- DA COSTA, A. G.; LUDEMIR, A. B. Transtornos mentais comuns e apoio social: estudo em comunidade rural da Zona da Mata de Pernambuco, Brasil, **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, p.73-79, 2005.
- DA SILVA, G. A. P. Investigação da atividade depressora de derivados N-acilidrazônicos LASSBio- 785 e LASSBio-786 sobre o sistema nervoso central. **Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.**
- DAULHAC, L.; MALLET C.; COURTEIX C.; ETIENNE M.; DUROUX, E.; PRIVAT, A. M.; ESCHALIER, A.; FIALIP, J. Diabetes-induced mechanical hyperalgesia involves spinal mitogen-activated protein kinase activation in neurons and microglia via N-methyl-D-aspartate-dependent mechanisms. **Molecular Pharmacology**, v. 70, p.1246-1254, 2006.
- DAULHAC, L.; MAFFRE, V.; MALLET, C.; ETIENNE, M.; PRIVAT, A. M.; KOWALSKI-CHAUVEL, A., SEVA, C.; FIALIP, J.; ESCHALIER, A. Phosphorylation of spinal N-methyl-d-aspartate receptor NR1 subunits by extracellular signal-regulated kinase in dorsal horn neurons and microglia contributes to diabetes-induced painful neuropathy. **European Journal of Pain**, v. 15, p.169.e1-169.e12, 2011.
- DAVIS, K. D.; TREEDE, R. D.; RAJA, S. N.; MEYER, R. A.; CAMPBELL, J. N. Topical application of clonidine relieves hyperalgesia in patients with sympathetically maintained pain. **Pain**, v.47, p. 309-315, 1991.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2a ed., p.520. Wiley, 2002.
- DIAS, R. L. A.; CORRÊA, A. G. Aplicações da química combinatória no desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v. 24, p. 236-242, 2001.

- DICKENSON, A. Mechanisms of central hypersensitivity: excitatory amino acids mechanisms and their control. In: BESSON, M. J.; DICKENSON, A. **The Pharmacology of Pain**, Berlin: Springer-Verlag. p. 21-41, 1997.
- DONALDSON, L. F.; SECKL, J. R.; MCQUEEN, D. S. A discrete adjuvant-induced monoarthritis in the rat: effects of adjuvant dose. **The Journal of Neuroscience Methods** v. 49, p. 5 – 10, 1993.
- DREWS, J. Drug Discovery: A Historical Perspective. **Science**, v. 287, p. 1960-1964, 2000.
- DRURY, A. N.; SZENT-GYORGYI, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. **The Journal of Physiology**, v. 68, p. 213–237, 1929.
- DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmacists Association**, v. 46, p. 208-209, 1957.
- EDDY, N. B.; LEIMBACK, D. J. Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl and diethienylbutylamines. **Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 107, p. 385-393, 1953.
- ELZEIN, E.; ZABLOCKI, J. A1 adenosine receptor agonists and their potential therapeutic applications. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v.17, p. 1901–1910, 2008.
- ESSAWY, S. S.; ELBAZ, A. A. Role of adenosine receptors in the anti-nociceptive effects of allopurinol in mice. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 14, p. 1857-1863, 2013.
- ESSAYAN, D. M. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) inhibitors and immunomodulation. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, p. 965–973, 1999.
- FEOKTISTOV, I.; BIAGGIONI, I. Role of adenosine A2B receptors in inflammation. **Advances in Pharmacology**. v. 61, p. 115–144, 2011.
- FERREIRA, A. A.; AMARAL, F. A.; DUARTE, I. D. G.; OLIVEIRA, P. M.; ALVES, R. B.; SILVEIRA, D.; AZEVEDO, A. O.; RASLAN, D. S.; CASTRO,

M. S. A. Antinociceptive effect from *Ipomoea cairica* extract. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 105, p. 148-153, 2006.

- FERREIRA-JÚNIOR, J. C.; CONSERVA, L. M.; LYRA LEMOS, R. P.; DE OMENA-NETA, G. C.; CAVALCANTE-NETO, A.; BARRETO, E. Isolation of a dihydrobenzofuran lignan, icariside E4, with an antinociceptive effect from *Tabebuia roseo-alba* (Ridley) Sandwith (Bignoniaceae) bark. **Archives of Pharmacal Research**, 2014.
- FLEETWOOD-WALKER, S. M.; MITCHELL, R.; HOPE, P. J.; MOLONY, V.; IGGO, A. An  $\alpha$ -2 receptor mediates the selective inhibition by noradrenalina of nociceptive responses of identified dorsal horn neurons. **Brain Research**, v. 334, p. 243-254, 1985.
- FREDHOLM, B. B.; IJZERMAN, A. P.; JACOBSON, K. A.; KLOTZ, K. N.; LINDEN, J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 527–552, 2001.
- FISHMAN, P.; BAR-YEHUDA, S.; MADI, L.; RATH-WOLFSON, L.; OCHAION, A.; COHEN, S. et al. The PI3K-NF-kB signal transduction pathway is involved in mediating the anti-inflammatory effect of IB-MECA in adjuvant-induced arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 8, R33, 2006.
- FISHMAN, P.; BAR-YEHUDA, S.; LIANG, B. T.; JACOBSON, K. A. Pharmacological and therapeutic effects of A3 adenosine receptor agonists. **Drug Discovery Today**, v. 17, p. 359-66, 2012.
- FIRESTEIN, G.S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 423, p. 356–361, 2003.
- FORREST, C. M.; HARMAN, G.; MCMILLAN, R. B.; STOY, N.; STONE, T. W.; et al. Modulation of cytokine release by purine receptors in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 23, p. 89–92, 2005.

- FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Medicinal chemistry of N-acylhydrazones: New lead-compounds of analgesic, antiinflammatory and antithrombotic drugs. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 167-198, 2006.
- FREDHOLM, B. B.; CHERN, Y.; FRANCO, R.; SITKOVSKY, M. Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling. **Progress Neurobiology**, v. 83, p. 263–276, 2007.
- GALE, D. D.; LANDELLS, L. J.; SPINA, D.; MILLER, A. J.; SMITH, K.; NICHOLS, T.; ROTSHTEYN, Y.; TONELLI, A.; LACOUTURE, P.; BURCH, R. M.; PAGE, C. P.; O’CONNOR, B. J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile following oral administration of the phosphodiesterase (PDE) 4 inhibitor V11294A in healthy volunteers. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 54, p. 478–484, 2002.
- GARDAM, M. A.; KEYSTONE, E. C.; MENZIES, R.; MANNERS, S.; SKAMENE, E.; LONG, R.; VINH, D. C. Anti-tumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: mechanisms of action and clinical management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p.148-155, 2003.
- GESSI, S.; VARANI, K.; MERIGHI, S.; ONGINI, E.; BOREA, P. A. A2A adenosine receptors in human peripheral blood cells. **British Journal of Pharmacology**. v. 129, p. 2–11, 2000.
- GESSI, S.; MERIGHI, S.; VARANI, K.; BOREA, P. A. Adenosine receptors in health and disease. **Advances in Pharmacology**, v. 61, p. 41–75, 2001.
- GESSI, S.; VARANI, K.; MERIGHI, S.; CATTABRIGA, E.; AVITABILE, A.; GAVIOLI, R.; et al. Expression of A3 adenosine receptors in human lymphocytes: upregulation in T cell activation. **Molecular Pharmacology**, v. 65, p. 711–719, 2004.
- GIEMBYCZ, M. A.; CORRIGAN, C.; SEYBOLD, J.; NEWTON, R.; BARNES, P. Identification of cyclic AMP phosphodiesterases 3, 4 and 7 in human CD4+ and CD8+ T-lymphocytes: role in regulating proliferation and the

biosynthesis of interleukin-2. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, p. 1945-1958, 1996.

- GLOBAL.BREADCRUMB Disponível em:  
<<http://www.thinkcopdifferently.com/en/Think-COPDifferently/PDE4-inhibition-in-COPD>> Acessado em: janeiro de 2015.
- GONÇALVES, J. C. R.; OLIVEIRA, F. S.; BENEDITO, R. B.; DE SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N.; DE ARAÚJO, D. A. M. Antinociceptive Activity of (-)-Carvone: Evidence of Association with Decreased Peripheral Nerve Excitability. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 1017 – 1020, 2008.
- GREENBERG, P. E.; SISITSKY, T.; KESSLER, R. C.; FINKELSTEIN, S. N.; BERNDT, E. R.; DAVIDSON, J. R. The economic burden of anxiety disorders in the 1990s. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 60, p. 427–435, 1999.
- GRENZ, A.; OSSWALD, H.; ECKLE, T *et al.* The renovascular A<sub>2B</sub> adenosine receptor protects the kidney from ischemia. **PLoS Medicine**, 5(6),e137 (2008).
- GRUNDMANN, O.; NAKAJIMA, J. I.; SEO, S.; BUTTERWECK, V. Anti-anxiety effects of *Apocynum venetum L.* in the elevated plus-maze test. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 406-411, 2007.
- GRUBB, B. D.; BIRRELL, G. J.; MCQUEEN, D. S.; IGGO, A. The role of pge2 in the sensitization of mechanoreceptors in normal and inflamed ankle joints of the rat. **Experimental Brain Research** v. 84, p. 383 – 392, 1991.
- GRUBB, B. D.; STILLER, R. U.; SCHAIBLE, H. G. Dynamic changes in the receptive field properties of spinal cord neurons with ankle input in rats with chronic unilateral inflammation in the ankle region. **Experimental Brain Research** v. 92, p. 441 – 452, 1993.
- GOLDRING, M. B. Updates on high throughput molecular profiling for the study of rheumatoid arthritis. **Journal Cell Physiology** v.213, p. 626–634, 2007.
- GO, V. L. W.; YAKSH, T. L. Release of substance P from the cat spinal cord. **Journal of Physiology**, v. 391, p. 141-167, 1987.

- GUPTA, M.; MAZUMDER, U. K.; GOMATHI, P.; SELVAN, V. T. Antiinflammatory evaluation of leaves of *Plumeria acuminata*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, p. 36, 2006
- HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C.; JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**. v. 32, p.77–88, 1988.
- HARMSSEN, A. Role of alveolar macrophages in lipopolysaccharide-induced neutrophil accumulation. **Infection and Immunity**, v. 56, 1858–1863, 1988.
- HASKÓ, G.; LINDEN, J.; CRONSTEIN, B.; PACHER, P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. **Nature Reviews drug discovery**, v.7, p. 759 – 770, 2008.
- HAWS, C. M.; HEINRICHER, M. M.; FIELDS, H. I. Alpha-adrenergic receptor agonists, but not antagonists, alter the tail-flick latency when microinjected into the rostral ventromedial medulla of the lightly anesthetized rat. **Brain Research**, v. 533, p. 192-195, 1990.
- HEIDARI, M. R.; FOROUMADI, A.; NOROOZI, H.; SAMZADEH-KERMANI, A.; AZIMZADEH, B. S. Study of the anti-inflammatory and analgesic effects of novel rigid benzofuran-3, 4-dihydroxy chalcone by formalin, hot-plate and carrageenan tests in mice. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, p. 395-401, 2009.
- HENRIQUES, M. G. M. O.; SILVA, P. M. R.; MARTINS, M. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R. S. B. Mouse paw oedema. A new model for inflammation? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 20, p. 243–249, 1987.
- HIDI, R.; TIMMERMANS, S.; LIU, E.; SCHUDT, C.; DENT, G.; HOLGATE, S. T.; DJUKANOVIĆ, R. Phosphodiesterase and cyclic adenosine monophosphate-dependent inhibition of T-lymphocyte chemotaxis. **European Respiratory Journal**, v. 15, p. 342–349, 2000.

- HOFFMAN, E. P.; DRESSMAN, D. Molecular pathophysiology and targeted therapeutics for muscular dystrophy. **Trends Pharmacology Science**, v. 22, p. 465–70, 2001.
- HOLLAND, H. C.; WELDON, E. A note on a new technique of recording ambulation in the open field test and its validation. **Acta. Psychologica**, v. 28, p. 293-300, 1968.
- HORN, R. G.; COLLINS, R. D. Fragmentation of granulocytes in pulmonary capillaries during development of the generalized Shwartzman reaction. **Laboratory Investigation**, v. 19, p. 451–459, 1968.
- HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 69-76, 1985.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 25, p. 103-114, 1987.
- JAIN, N. K.; PATIL, C. S.; SINGH, A.; KULKARNI, S. K. A simple technique to evaluate inflammatory pain along with anti-inflammatory studies in carrageenan-induced paw edema. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 33, p. 114– 115, 2001.
- JENNER, P.; MORI, A.; HAUSER, R.; MORELLI, M.; FREDHOLM, B. B.; CHEN, J. F. Adenosine, adenosine A2A antagonists, and Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 15, p. 406–413, 2009.
- JIN, X.; SHEPHERD, R. K.; DULING, B. R.; LINDEN, J. Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, p. 2849–2857, 1997.
- JOSEPH, A.; BRASINGTON, R.; KAHL, L.; RANGANATHAN, P.; CHENG, T. P.; ATKINSON, J. Immunologic rheumatic disorders. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, p. 204–215, 2010.

- JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, 2001.
- KANEKO, M.; HAMMOND, D. L. Role of spinal gamma-aminobutyric acid A receptors in formalin-induced nociception in the rat. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 282, n. 2, p. 928-938, 1997.
- KAUR R.; CHOPRA, K.; SINGH, D.; Role of alpha2 receptors in quercetin-induced behavioral despair in mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, p. 165–168, 2007.
- KAYSER, V.; ELFASSI, I. E.; AUBEL, B.; MELFORT, M.; JULIUS, D.; GINGRICH, J. A.; HAMON, M.; BOURGOIN, S. Mechanical, Thermal and Formalin-induced Nociception is Differentially Altered in 5-HT<sub>1A</sub><sup>-/-</sup>, 5-HT<sub>1B</sub><sup>-/-</sup>, 5-HT<sub>2A</sub><sup>-/-</sup>, 5-HT<sub>3</sub><sup>-/-</sup> and 5-HT<sup>-/-</sup> Knock-out Male Mice. **Pain**, v. 130, p. 235- 248, 2007.
- KEANE, J.; GERSHON, S.; WISE, R. P.; MIRABILE-LEVENS, E.; KASZNICA, J.; SCHWIETERMAN, W. D. et al., Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, p. 1098–1104, 2001.
- KIESMAN, W. F.; ELZEIN, E.; ZABLOCKI, J. A1 adenosine receptor antagonists, agonists, and allosteric enhancers. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v.193, p. 25–58, 2009.
- KOEPPEN, M.; DI VIRGILIO, F.; CLAMBAY, E. T.; ELTZSCHIG, H. K. Purinergic Regulation of Airway Inflammation. **Subcellular Biochemistry**, v. 55, cap 7, 2011.
- KUMAR, N.; GOLDMINZ, A. M.; KIM, N.; GOTTLIEB, A. B. Phosphodiesterase 4-targeted treatments for autoimmune diseases. **BMC Medicine**, v. 11, 96, 2013.
- LA HAUSSE DE LALOUVIÈRE, L.; IOANNOU, Y.; FITZGERALD, M. Neural mechanisms underlying the pain of juvenile idiopathic arthritis. **Nature Review Rheumatology** v. 10, p. 205-211, 2014.

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature reviews Immunology** v. 2, p. 787-795, 2002
- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 597-652, 2001.
- LEE, D. M.; WEINBLATT, M. E. Rheumatoid arthritis. **Lancet** v. 358, p. 903–911, 2001.
- LEE, Y. C. Effect and Treatment of Chronic Pain in Inflammatory Arthritis. **Current Rheumatology Reports**. v. 15, 300, 2013.
- LEE, A.S.; ELLMAN, M. B.; YAN, D.; KROIN, J. S.; COLE, B. J.; VAN WIJNEN, A. J.; IM, H. J. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. **Gene**. v. 527, p. 440-447, 2013.
- LEITE, J. R.; SIQUEIRA, J. S. Métodos para avaliar drogas ansiolíticas. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cáp. 14, p. 154-160.
- LEVINE, J. D.; TAIWO, Y. O.; COLLINS, S. D.; TAM, K. J. Noradrenaline hyperalgesia is mediated through interaction with sympathetic postganglionic neurone terminals rather than activation of primary afferent nociceptors. **Nature**, v. 323, p. 158-161, 1986.
- LIMA, P. C.; et al. Synthesis and analgesic activity of novel *N*-acylarylhydrazones and isosters, derived from natural safrole. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 2, p. 187-203, 2000.
- LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J.; Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 23- 49, 2005.

- LIMA, L. M Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira; **Química Nova**, v. 30, p. 1456-1468, 2007.
- LIMA, N. G. P. B. Estudo da possível atividade psicofarmacológica do D-limoneno em modelo comportamental em camundongos. **Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica Prof. Delby Fernandes de Medeiros da Universidade Federal da Paraíba**, João Pessoa, 2009.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 180-185, 1987.
- LOLIGNIER, S.; AMSALEM, M.; MAINGRET, F.; PADILLA, F.; GABRIAC, M.; et al. Nav1.9 Channel Contributes to Mechanical and Heat Pain Hypersensitivity Induced by Subacute and Chronic Inflammation. **PLoS ONE** 6(8), 2011.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J., LEWIS, F. A., RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin Phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 109, p. 366-398, 2006.
- MASSÉ, F.; HASCOËT, M.; BOURIN, M. alpha2-Adrenergic agonists antagonise the anxiolytic-like effect of antidepressants in the four-plate test in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 164, p. 17-28, 2005.
- MALMBERG, A B.; YAKSH, T. L. Pharmacology of the spinal action of ketorolac, morphine, ST-91, U50488H and L-PIA on the formalin test and isobolographic analysis of the NSAID interaction. **Anesthesiology**, v. 79, p. 270-281, 1993.
- MANNING, C. D.; BURMAN, M.; CHRISTENSEN, S. B.; CIESLINSKI, L. B.; ESSAYAN, D. M.; GROUS, M.; TORPHY, T. J.; BARNETTE, M. S.

Suppression of human inflammatory cell function by subtype-selective PDE4 inhibitors correlates with inhibition of PDE4A and PDE4B. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, p. 1393–1398, 1999.

- MCNAUGHT, A. D.; WILKINSON, A. **Compendium of Chemical Terminology, 2<sup>a</sup> ed. (the "Gold Book")**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997.
- MCKENNA, D. J. Plant hallucinogens: springboards for psychotherapeutic drug discovery. **Behavioural Brain Research**, v. 73, p. 109-115, 1996.
- MENDES, T. C.; RAIMUNDO, J. M.; NASCIMENTO-JUNIOR, N. M.; FRAGA, C. A.; BARREIRO, E. J.; SUDO, R. T.; ZAPATA-SUDO, G. Sedation and antinociception induced by a new pyrazolo[3,4-b]pyrrolo[3,4-d]pyridine derivative (LASSBio-873) is modulated by activation of muscarinic receptors **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 94, p. 70-74, 2009.
- MONTESINOS, M. C. et al. Adenosine A<sub>2A</sub> or A<sub>3</sub> receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68. **Arthritis Rheumatology**, v. 48, p. 240-247, 2003
- MONTGOMERY, K. C.; The relationship between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v.48, p 254-260, 1955.
- MOORE, C. C.; MARTIN, E. N.; LEE, G. H.; OBRIG, T.; LINDEN, J.; et al. An A<sub>2A</sub> adenosine receptor agonist, ATL313, reduces inflammation and improves survival in murine sepsis models. **BMC Infectious Diseases**, v. 8, p. 141, 2008.
- MORA, S.; DIAZ-VELIZ, G.; MILLÁN, R.; LUNGENSTRASS, H.; QUIROS, S.; COTOMORALES, T.; HELLIÓN-IBARROLA, M. C.; Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**,v. 82, p. 373 – 378, 2005a.

- MOROVIC-VERGLES, J.; CULO, M. I.; GAMULIN, S.; CULO, F. Cyclic adenosine 5'-monophosphate in synovial fluid of rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. **Rheumatology International**, v. 29, p. 167–171, 2008.
- MURRAY, C. W.; PORRECA, F.; COWAN, A. Methodological refinements in the mouse paw formalin test an animal model of tonic pain. **Journal Pharmacological Methods**, v. 20, p. 175-186, 1988.
- NAGANUMA, M.; WIZNEROWICZ, E. B.; LAPPAS, C. M.; LINDEN, J.; WORTHINGTON, M. T.; ERNST, P. B.; Cutting edge: Critical role for A2A adenosine receptors in the T cell-mediated regulation of colitis. **The Journal of Immunology**, v. 177, p. 2765–2769, 2006.
- NAKAMACHI, Y.; KOSHIBA, M.; NAKAZAWA, T.; HATACHI, S.; SAURA, R.; KUROSAKA, M. et al. Specific increase in enzymatic activity of adenosine deaminase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts. **Arthritis Rheumatology**, v. 48, p. 668–74, 2003.
- NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L.; Carrageenan: a review. **Veterinarni Medicina** v. 58, p. 187–205, 2013
- NEHLIG, A.; DAVAL, J.; DEBRY, G. Caffeine and the central nervous system: Mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. **Brain Research Reviews**, v. 17, n. 2, p. 139-169, 1992.
- NEMETH, Z. H. et al. Adenosine stimulates CREB activation in macrophages via a p38 MAPK-mediated mechanism. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 312, p. 883–888, 2003.
- NEMIROVSKY, A.; CHEN, L.; ZELMAN, V.; JURNA, I. The antinociceptive effect of the combination of spinal morphine with systemic morphine or buprenorphine. **Anesthesia & Analgesia**, v. 93, p. 197–203, 2001.
- NEUMANN, E.; KHAWAJA, K.; MÜLLER-LADNER, U. G protein-coupled receptors in rheumatology. **Nature Review Rheumatology**, v. 10, p. 429-436, 2014.

- NOGUEIRA, E.; ROSA, G.; HARAGUCHI, M.; VASSILIEFF, V.; Anxiolytic effect of *Rubus brasiliensis* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 61, p. 111-117, 1998.
- NOWAK, M.; LYNCH, L.; YUE, S.; OHTA, A.; SITKOVSKY, M.; et al. The A2A adenosine receptor controls cytokine production in iNKT cells. **European Journal Immunology**. v .40, p. 682–687, 2010.
- OGAWA, C.; LIU, Y. J.; KOBAYASHI, K. S. Muramyl dipeptide and its derivatives: peptide adjuvant in immunological disorders and cancer therapy. **Current Bioactive Compounds** v.7, p. 180-197, 2011.
- OGER, S.; MEHATS, C.; DALLOT, E.; CABROL, D.; LEROY, M. J. Evidence for a role of phosphodiesterase 4 in lipopolysaccharide-stimulated prostaglandin E2 production and matrix metalloproteinase-9 activity in human amniochorionic membranes. **Journal Immunology**. v.174, p. 8082-8089, 2005.
- OHTA, A.; SITKOVSKY, M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. **Nature**, v. 414, p. 916–920, 2001.
- OHTA, A.; SITKOVSKY, M. The adenosinergic immunomodulatory drugs. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, p. 501–506, 2009.
- ONGARO, A.; VARANI, K.; MASIERI, F. F.; PELLATI, A.; MASSARI, L.; et al. Electromagnetic fields (EMFs) and adenosine receptors modulate prostaglandin E(2) and cytokine release in human osteoarthritic synovial fibroblasts regulating inflammatory responses in human synoviocytes. **Journal Cell Physiology**, v.227, p. 2461–2469, 2010.
- OKOROKOV, L. A.; LEHLE, L. Ca<sup>(2+)</sup>-ATPases of *Saccharomyces cerevisiae*: diversity and possible role in protein sorting. **FEMS Microbiology Letters**, v. 162, p. 83-91, 1998.
- PADOVAN, M.; VINCENZI, F.; GOVONI, M.; BORTOLUZZI, A.; BOREA, P. A.; VARANI, K. Adenosine and Adenosine Receptors in Rheumatoid

Arthritis. **International Journal of Clinical Rheumatology**, v.8, p. 13-25, 2013.

- PARADA, C. A.; TAMBELI, C. H.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, v. 102, p. 937–944, 2001.
- PASCHAPUR, M. S.; PATIL, M. B.; KUMAR R.; PATIL, S. R. Evaluation of anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Borassus flabellifer* L. male flowers (inflorescences) in experimental animals. **Journal of Medicinal Plants Research** v. 2, p. 49–54, 2009.
- PEARSON, C.; WOOD, F. D. Studies of polyarthritis and other lesions in rats by injection of mycobacterial adjuvant. I. General clinical and pathological characteristics and some modifying factors. **Arthritis Rheumatology**, v. 2, p. 440-459, 1959.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.
- PENG, Y. B.; LIN, Q.; WILLIS, W. D. Involvement of alpha-2-adrenoceptors in the periaqueductal gray-induced inhibition of dorsal horn cell activity in rats. **Journal of Pharmacological Experimental Therapies**, v. 278, p. 125-135, 1996.
- PERICIC, D.; VLAINIC, J.; STRAC, D. S.; Sedative and anticonvulsant effects of zolpidem in adult and aged mice. **Journal of Neural Transmission**, v. 115, p. 795-802, 2008.
- PERRY, M. J.; HIGGS, G .A. Chemotherapeutic potential of phosphodiesterase inhibitors. **Current Opinion in Chemical Biology**; v. 2(4), p. 472–81, 1998.
- PERSSON, C. Overview of effects of theophylline. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 78, n. 4, p. 780-787, 1986.

- PETERSSON, M.; WIBERG, U.; LUNDEBERG, T.; UVNAS-MOBERG, K. Oxytocin decreases carrageenan induced inflammation in rats. **Peptides** v. 22, p.1479–1484, 2001.
- PHARMA. **Pharmaceutical Research and Manufacturers of America**, 2008 Disponível <<http://www.phrma.org/innovation>> Acesso em set. 2014.
- PONGRATZ, G.; STRAUB, R. H. Role of peripheral nerve fibres in acute and chronic inflammation in arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 9, p. 117–126, 2013.
- PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 3-33, 2003.
- ROMAGNOLI, R.; BARALDI, P.G.; CARRION, M.D et al. Synthesis and biological evaluation of 2-amino-3-(4-chlorobenzoyl)-4-(N-[substituted] piperazin-1-yl) thiophenes as potent allosteric enhancers of the A1 adenosine receptor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 5875–5879, 2008.
- RUJJANAWATE, C.; KANJANAPOTHI, D.; PANTHONG, A. Pharmacological effect and toxicity of alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 91-95, 2003.
- SAVIĆ, M. M.; OBRADOVIĆ, D. I.; UGRESIĆ, N. D.; COOK, J.M.; YIN, W.; BOKONJIĆ, D. R. Bidirectional effects of benzodiazepine binding site ligands in the elevated plus-maze: differential antagonism by flumazenil and beta-CCt. **Pharmacology Biochemical Behavior**, v. 79, p. 279–290, 2004.
- SCHAFER, P. H.; PARTON, A.; GANDHI, A. K.; CAPONE, L.; ADAMS, M.; WU, L. et al., Apremilast, a cAMP phosphodiesterase-4 inhibitor, demonstrates anti-inflammatory activity in vitro and in a model of psoriasis, **British Journal of Pharmacology**, v. 159, p. 842–855, 2010.
- SCHANK, J. R.; LILES, C. L.; WEINSHENKER, D. Norepinephrine Signaling Through  $\beta$ -Adrenergic Receptors is Critical for Expression of Cocaine-Induced Anxiety. **Biology psychiatry**, v. 63, p.1007–1012, 2008.

- SCHERMULY, R. T.; GHOFrani, M. R. W.; GRIMMINGER, F. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. **Nature Review Cardiology**, v. 8, p. 443–455, 2011.
- SCOTT, D. L.; KINGSLEY, G. H. Tumor necrosis factor inhibitors for rheumatoid arthritis. **The New England Journal of Medicine**, v. 355, p. 704-712, 2006.
- SEVIGNY, C. P.; LI, L.; AWAD, A. S et al. Activation of adenosine A<sub>2A</sub> receptors attenuates allograft rejection and alloantigen recognition. **The Journal of Immunology**, v.178, p. 4240–4249, 2007.
- SEVOSTIANOVA, N.; ZVARTAU, E.; BESPALOV, A.; DANYSZ, W. Effects of morphine on formalin-induced nociception in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 462, p. 109-113, 2003.
- 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 nociceptors. **Pain**, v. 151, p. 422-429, 2010.
- SINI, J. M.; YARO, A. H.; AYANWUYI, L. O.; AIYELERO, O. M.; MALLUM, S. M.; GAMANIEL, K. S. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the aqueous extract of the root bark of *Combretumsericeum* in rodents. **African Journal of Biotechnology** v. 9, p. 8872–8876, 2010.
- SILVA, A. G., et al. Synthesis and vasodilatory activity of new N-acylhydrazone derivatives, designed as LASSBio-294 analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 3431-3437, 2005.
- SILVERMAN, M. H.; STRAND, V.; MARKOVITS, D.; NAHIR, M.; REITBLAT, T.; MOLAD, Y.; ROSNER, I. et al. Clinical evidence for utilization of the A<sub>3</sub> adenosine receptor as a target to treat rheumatoid arthritis: data from a phase II clinical trial. **The Journal of Rheumatology**, v. 35, p. 41-48, 2008.

- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 35-40, 2002.
- SMITH, M. S.; SCHAMBRA, U. B.; WILSON, K. H.; PAGE, S. O.; HULETTE, C.; LIGHT, A. R.; SCHWINN, D. A.  $\alpha_2$ -adrenergic receptors in human spinal cord: specific localized expression of mRNA encoding  $\alpha_2$ -adrenergic receptors subtypes at four distinct levels. **Molecular Brain Research**, v.34, p.109-117, 1995
- SCHMIDT, A. P.; BÖHMER, A. E.; ANTUNES, C et al. Antinociceptive properties of the xanthine oxidase inhibitor allopurinol in mice: role of A1 adenosine receptors. **British Journal of Pharmacology**,v. 156, p. 163–172, 2009.
- SNYDER, S. H.; et al. Adenosine receptors and behavioral actions of methylxanthines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 5, p. 3260-3264, 1981.
- SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neuroscience Letters**, v. 361(1-3):184-187, 2004.
- SOON, E.; HOLMES, A. M.; TREACY, C. M.; DOUGHTY, N. J.; SOUTHGATE, L.; MACHADO, R. D et al. Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. **Circulation**, v. 122, p. 920–927, 2010.
- SORDELING, S.H.; BEAVO, J.A. Regulation of cAMP and cGMP signalling: new phosphodiesterases and new functions. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 12, p. 174-179, 2000.
- SONAVANE, G. S.; SARVEIYA, V. P.; KASTURE, V. S.; KASTURE, S. B. Anxiogenic activity of *Myristica fragrans* seeds. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 71, p. 247– 252, 2002.

- SOUTO MAIOR, F. N. Atividade ansiolítica e antinociceptiva do óxido de linalol em modelos animais. **Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba** João Pessoa, 2011.
- SOWA, N. A.; VOSS, M. K.; ZYLKA, M. J. Recombinant ecto-5'-nucleotidase (CD73) has long lasting antinociceptive effects that are dependent on adenosine A<sub>1</sub> receptor activation. **Molecular Pain**, v. 14, p. 6–20, 2010.
- SOUZA, M. M.; MADEIRA, A.; BERTI, C.; KROGH, R.; YUNES, R. A.; CECHINELFILHO, V. Antinociceptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 85-90, 2000.
- SPINA, D. PDE4 inhibitors: current status. **British Journal of Pharmacology**, v. 55, p. 308–315, 2008.
- STEIN, C.; MILLAN, M. J.; HERZ, A. Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** v. 31, p. 451 – 455, 1988.
- SUDO, R. T.; CALASANS-MAIA, J. A.; GALDINO, S. L.; LIMA, M. C. A.; ZAPATA-SUDO, G.; HERNANDES, M. Z.; PITTA, I. R. Interaction of Morphine With a New  $\alpha_2$ -Adrenoceptor Agonist in Mice. **The Journal of Pain** , v. 11, p. 71-78, 2010.
- SUGISHITA, E., AMAGAYA, S., OGIHARA, Y. Antiinflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. **Journal of Pharmacobio-Dynamics** v. 8, p. 565–575, 1981.
- SULAIMAN, M. R.; PERIMAL, E. K.; ZAKARIA, Z. A.; MOKHTAR, F.; AKHTAR, M. N.; LAJIS, N. H.; ISRAF, D. A. Preliminary analysis of the antinociceptive activity of zerumbone. **Fitoterapia**, 2009.

- SUN, C. X.; ZHONG, H.; MOHSENIN, A. et al. Role of A2B adenosine receptor signaling in adenosine-dependent pulmonary inflammation and injury. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 2173–2182, 2006.
- STRAND, V.; KIMBERLY, R.; ISAACS, J. D.; Biologic therapies in rheumatology: lessons learned future directions. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, p. 75-92, 2007.
- TESCH, A. M.; MACDONALD, M. H.; KOLLIAS-BAKER, C.; BENTON, H. P. Endogenously produced adenosine regulates articular cartilage matrix homeostasis: enzymatic depletion of adenosine stimulates matrix degradation. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 12, p. 349–59, 2004.
- TORNOS, M. P.; SÁENZ, M. T.; GARCÍA, M. D.; FERNÁNDEZ, M. A. Antinociceptive effects of the tubercles of *Anredera leptostachys*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 229-234, 1999.
- VALLON, V.; OSSWALD, H. Adenosine receptors and the kidney. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 193, p. 443–470; 2009.
- VAN CALKER, D.; MULLER, M.; HAMPRECHT, B. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. **Journal Neurochemistry**, v. 33, p. 999–1005, 1979.
- VARANI, K.; LAGHI-PASINI, F.; CAMURRI, A.; CAPECCHI, P. L.; MACCHERINI, M.; DICIOLLA, F. et al. Changes of peripheral A2A adenosine receptors in chronic heart failure and cardiac transplantation. **The FASEB Journal**. v. 17, p. 280–2, 2003.
- VARANI, K.; GESSI, S.; MERIGHI, S.; VINCENZI, F.; CATTABRIGA, E.; BENINI, A.; et al. Pharmacological characterization of novel adenosine ligands in recombinant and native human A2B receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 70, p. 1601–12, 2005.
- VARANI, K.; BACHOUD-LÉVI, A. C.; MARIOTTI, C et al. Biological abnormalities of peripheral A(2A) receptors in a large representation of

polyglutamine disorders and Huntington's disease stages. **Neurobiology of Disease**, v.27, p. 36–43, 2007.

- VARANI, K.; VINCENZ, I. F.; TOSI, A et al. A2A adenosine receptor overexpression and functionality, as well as TNF-alpha levels, correlate with motor symptoms in Parkinson's disease. **The FASEB Journal**, v. 24, p. 587–598, 2010.
- VARANI, K.; PADOVAN M.; GOVONI M.; VINCENZI F.; TROTTA F.; BOREA A. P. The role of adenosine receptors in rheumatoid arthritis. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, p. 61–64, 2010.
- VARANI, K.; VINCENZI, F.; TOSI, A.; TARGA, M.; MASIERI, F. F.; et al. Expression and functional role of adenosine receptors in regulating inflammatory responses in human synoviocytes. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, p. 101–115, 2010.
- VARANI, K.; PADOVAN, M.; VINCENZI, F.; TARGA, M.; TROTTA, F.; GOVONI, M. A2A and A3 adenosine receptor expression in rheumatoid arthritis: upregulation, inverse correlation with disease activity score and suppression of inflammatory cytokine and metalloproteinase release. **Arthritis Research Therapy**, v. 13(6), R197, 2011.
- VINCENZI, F.; PADOVAN, M.; TARGA, M.; CORCIULO, C.; GIACUZZO, S.; et al. (2013) A2A Adenosine Receptors Are Differentially Modulated by Pharmacological Treatments in Rheumatoid Arthritis Patients and Their Stimulation Ameliorates Adjuvant-Induced Arthritis in Rats. **PLoS ONE** 8(1): e54195
- WEISSMANN, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases**, v. 64, p. 12–25, 2006.
- WERMUTH, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry, Second Edition**. 2a ed., p.624. Academic Press, 2003.

- WERMUTH, C. G. Molecular Variations in Homologous Series: Vinylogues and Benzologues. *The Practice of Medicinal Chemistry*, **Academic Press**, 3<sup>a</sup> ed., p. 275- 282, 2008.
- WILSON, C. N.; NADEEM, A.; SPINA, D.; BROWN, R.; PAGE, C. P.; MUSTAFA, S. J. Adenosine receptors and asthma. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 193, p. 329–362, 2009.
- WITTMANN, M.; HELLIWELL, P. S. Phosphodiesterase 4 Inhibition in the Treatment of Psoriasis, Psoriatic Arthritis and Other Chronic Inflammatory Disease. **Dermatol Ther (Heidelb): Dermatology and Therapy** v. 3, p. 1–15, 2013.
- WOLFE, F.; MICHAUD, K.; ANDERSON, J.; URBANSKY, K. Tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis and the effect of infliximab therapy. **Arthritis & Rheumatology**, v .50, p. 372–379, 2004.
- WOOLFE, G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 80, p. 300-307, 1944.
- YAMAGUCHI, T. et al. Hypersensitivity to pentylentetrazol-induced convulsion in mice lacking the PLC-related inactive protein-1. **Brain Research**, v. 1025, p. 237- 240, 2004.
- YIN L.L.; ZHU X. Z. The involvement of central cholinergic system in (+)-matrine-induced antinociception in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 80, p. 419 - 25, 2005.
- ZARRINDAST, M. R.; HOMAYOUN, H.; BABAIE, A.; ETMINANI A.; GHARIB, B. Involvement of adrenergic and cholinergic systems in nicotine-induced angiogenesis in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 407, p. 145–158, 2000.
- ZHAO, F.; LI, P.; CHEN, S. R.; LOUIS, C. F.; FRUEN, B. R. Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channels. Molecular mechanism

and isoform selectivity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 13810-138116, 2001.

- ZHANG, L.; BERTA, T.; XU, Z.; LIU T.; PARK, J. Y.; JI, R. TNF-alpha contributes to spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain: Distinct role of TNF receptor subtypes 1 and 2. **Pain** v. 152, p. 419-427, 2011.
- ZHOU, Y.; MOHSENIN, A.; MORSCHL, E et al. Enhanced airway inflammation and remodeling in adenosine deaminase-deficient mice lacking the A2B adenosine receptor. **The Journal of Immunology**, v. 182, p. 8037–8046, 2009.
- ZOMKOWSKI, A. D.; SANTOS, A. R.; RODRIGUES, A. L. Evidence for the involvement of the opioid system in the agmatine antidepressant-like effect in the forced swimming test. **Neuroscience Letters**, v. 381, p. 279-283, 2005.