

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Daniella Moreira Leal

**Avaliação Farmacológica de LASSBio-1410 no
Planejamento de Novos Candidatos a Fármacos
para o Tratamento da Dor**

Rio de Janeiro

Julho/2014



Avaliação Farmacológica de LASSBio-1410 no Planejamento de Novos Candidatos a Fármacos para o Tratamento da Dor

Daniella Moreira Leal



Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

Orientadores: Prof.^a Dra. Gisele Zapata Sudo
Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo

Rio de Janeiro

Julho/2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Leal, Daniella Moreira.

Avaliação Farmacológica de LASSBio-1410 no Planejamento de Novos Candidatos a Fármacos para o Tratamento da Dor/Daniella Moreira Leal – 2014.

xiii-91 fl.: il

Dissertação (Mestrado em Farmacologia e Química Medicinal) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Rio de Janeiro, 2014.

Referências Bibliográficas: f. 84-90

Orientadores: Gisele Zapata Sudo e Roberto Takashi Sudo.

1. Dor 2. Opióides 3. Inflamação 4. Neuropatia

I. Zapata-Sudo, Gisele (Orient.). II. Sudo, Roberto Takashi (Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal. IV. Título.

“Avaliação Farmacológica de LASSBio-1410 no Planejamento de Novos Candidatos a Fármacos para o Tratamento da Dor “

Daniella Moreira Leal

Orientadores:

Prof.^a Dr.^a Gisele Zapata Sudo

Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia).

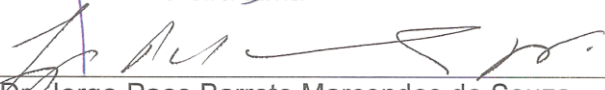
Aprovada por:



Prof. Dr. Nivaldo Ribeiro Villela



Prof.^a Dr.^a Lidia Moreira Lima



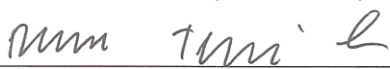
Prof. Dr. Jorge Paes Barreto Marcondes de Souza



Prof.^a Dr.^a Margarete Manhães Trachez (Revisora)



Prof.^a Dr.^a Gisele Zapata Sudo (orientadora)



Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo (orientador)

Rio de Janeiro
31 de julho de 2014

À Deus, que dá sentido à minha vida e me deu força
durante todos esses anos.

Aos meus pais, Marlete e Cesar,
minhas irmãs Carla e Luciana,
e meu namorado, Gabriel
por todo amor e apoio incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Gisele Zapata-Sudo e Roberto Takashi Sudo pela oportunidade, pelos ensinamentos científicos, pela amizade e carinho recebidos durante todos esses anos.

A Profa. Margarete pela amizade, sabedoria, e dedicação em diversos momentos.

Ao Prof. Carlos Alberto Manssour Fraga e Nailton Moreira Nascimento jr, e também ao Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas por terem cedido gentilmente a substância para este estudo.

A todos os amigos do laboratório, pela ajuda e por enfrentarmos as dificuldades juntos, união, companheirismo e risadas.

Agradecimentos especiais às amigas Prof.^{as} Sharlene e Thaiana pela ajuda com os experimentos e pelos ensinamentos da vida, e em particular minha irmã Carla, por todos os momentos.

À técnica Marli de Souza pela amizade e ajuda técnica.

Aos membros da banca examinadora

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

RESUMO

Avaliação Farmacológica de LASSBio-1410 no Planejamento de Novos Candidatos a Fármacos para o Tratamento da Dor

Daniella Moreira Leal

Orientadores: Prof.^a Dra. Gisele Zapata Sudo
Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo

Resumo da Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

Derivados Pirazol[3,4-B]Pirrol[3,4-D]Piridina foram planejados a partir do zolpidem e apresentaram atividade hipnótico-sedativa e analgésica. Para este estudo, LASSBio-1410, p-nitro fenilmaleimida, foi avaliado em protocolos para avaliação da dor aguda e inflamatória, apresentando efeito antinociceptivo na dose de 4 mg/kg no teste da formalina, tanto na fase nociceptiva ($30,8 \pm 3,4$ s) quanto na fase inflamatória ($15,8 \pm 7,5$ s), preveniu o edema de pata induzido pela carragenina após 24 horas ($1,58 \pm 0,13$ ml), reverteu a hiperalgesia mecânica no teste de Randall-Selitto ($39,10 \pm 4,43$ %), reduziu o número total de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético ($15,50 \pm 2,54$). Na avaliação da dor crônica, LASSBio-1410 4 mg/kg i.p preveniu o estabelecimento da hiperalgesia térmica no 7º dia de tratamento nos modelos de injúria constritiva crônica (ICC) $7,9 \pm 0,74$ s e ligadura do nervo espinhal (LNE) $11,26 \pm 0,70$ s, assim como na dose de 10 mg/kg p.o reverteu a hiperalgesia térmica no protocolo terapêutico no 14º dia após a cirurgia de ICC ($10,38 \pm 0,71$ s) e LNE ($11,80 \pm 0,41$ s). LASSBio-1410 também foi avaliado no protocolo do campo aberto em rato, e não provocou efeito sedativo na dose de 4 mg/kg i.p, com $187,70 \pm 11,89$ movimentos/min, assim como na dose de 10 mg/kg p.o, $201,20 \pm 13,39$ movimentos/min. Em camundongos, LASSBio-1410 4 mg/ i.p reduziu os movimentos para $54,6 \pm 6,5$ movimentos/min. No teste do *Plus Maze*, LASSBio-1410 3 mg/kg aumentou o tempo dos animais nos braços abertos, $58,3 \pm 11,2$ s, assim como a porcentagem de entrada nos braços abertos, $81,6 \pm 7,9$ s. No teste do Rota Rod, LASSBio-1410 não alterou o tempo de permanência dos animais na barra giratória. O derivado promoveu antinocicepção nos protocolos avaliados, provavelmente mediada pela ativação de receptores delta opióides e GABAérgicos.

Palavras-chave: Dor, inflamação, LASSBio-1410, antinocicepção, analgesia.

Rio de Janeiro
Julho/2014

ABSTRACT

Pharmacological Evaluation of LASSBio-1410 in Planning New Drug Candidates for the Treatment of Pain

Daniella Moreira Leal

Orientadores: Prof.^a Dra. Gisele Zapata Sudo
Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo

Abstract da Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

Derivatives Pyrazole[3,4-b] pyrrole[3,4-D] pyridine were planned from zolpidem and presented hypnotic -sedative and analgesic activity. For this study, LASSBio-1410, *p* nitro phenylmaleimide, was evaluated in protocols for assessment of acute and inflammatory pain, with analgesic effect at a dose of 4 mg / kg in the formalin test, both nociceptive phase (30.8 ± 3.4 s) as in the inflammatory phase (15.8 ± 7.5 s), prevented paw edema induced by carrageenan after 24 hours (1.58 ± 0.13 ml) reversed mechanical hyperalgesia in the Randall-Selitto ($39.10 \pm 4.43\%$) test, reduced the total number of abdominal contractions induced by acetic acid (15.50 ± 2.54). The assessment of chronic pain, LASSBio-1410 4 mg / kg i.p. prevented the establishment of thermal hyperalgesia on day 7 of treatment in chronic constrictive injury models (CCI) 7.9 ± 0.74 s and spinal nerve ligation (SNL) 11.26 ± 0.70 s. At a dose of 10 mg / kg p.o. LASSBio-1410 reversed the thermal hyperalgesia in the treatment protocol on day 14 after CCI surgery (10.38 ± 0.71 s) and SNL (11.80 ± 0.41 s). LASSBio-1410 was also evaluated in the rat open field protocol, and did not cause sedation at a dose of 4 mg/kg i.p., 187.70 ± 11.89 mov/min, and also in the dose of 10 mg/kg p.o., 201.20 ± 13.39 mov/min. In mice, LASSBio-1410 4 mg/kg i.p. reduced the movements to 54.6 ± 6.5 mov/min. In the Plus Maze test, LASSBio-1410 3 mg/kg increased the time on the open arms, 58.3 ± 11.2 s, as well as the percentage of entry into open arms, 81.6 ± 7.9 s. In the Rota Rod test, LASSBio-1410 did not alter the time of animals in the rotatory bar. The derived promoted antinociception in the protocols evaluated, probably mediated by activation of delta opioid receptors and GABA.

Keywords: pain, inflammation, LASSBio-1410, antinociception, analgesia.

Rio de Janeiro
Julho/2014

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 1.1. Definição da dor | 14 |
| 1.2. Fisiologia da dor | 14 |
| 1.2.1. Nociceptores e fibras nervosas | 14 |
| 1.3. Mediadores químicos na transmissão da dor | 17 |
| 1.4 Classificação da dor | 19 |
| 1.4.1 Classificação temporal | 19 |
| 1.4.2 Classificação fisiológica | 19 |
| 1.5. Mecanismos da dor neuropática | 25 |
| 1.6. Tratamento da dor | 29 |
| 1.7 Planejamento de novos candidatos a fármaco | 32 |
| 2. OBJETIVOS | 35 |
| 2.1 Objetivo geral | 35 |
| 2.2 Objetivos específicos | 34 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 37 |
| 3.1. Avaliação da atividade analgésica – Teste da formalina | 37 |
| 3.2. Avaliação da atividade analgésica central – Placa quente | 38 |
| 3.3. Avaliação da atividade anti-inflamatória – Edema de pata induzido pela carragenina | 38 |
| 3.4 Avaliação da analgesia mecânica - Método Randall & Selitto | 39 |
| 3.5 Avaliação da atividade antinociceptiva - contorções abdominais | 40 |
| 3.6 Modelo animal de dor neuropática | 41 |
| 3.6.1. Modelo por Injúria Constrictiva Crônica (ICC) | 41 |
| 3.6.2. Modelo por Ligadura de Nervo Espinhal (LNE) | 41 |
| 3.7. Avaliação da Dor Neuropática após Tratamento com LASSBio-1410 | 42 |
| 3.7.1 Alodínia Mecânica | 42 |
| 3.7.2 Hiperalgisia Térmica | 42 |
| 3.7.3 Protocolos Experimentais | 43 |
| 3.8. Avaliação da atividade ansiolítica – teste do <i>Plus Maze</i> | 43 |
| 3.9. Avaliação da atividade sedativa em ratos Wistar - Campo aberto | 45 |
| 3.10. Avaliação da atividade sedativa em camundongos - Campo aberto | 45 |
| 3.11. Avaliação da coordenação motora – Rota-rod | 46 |

| | |
|---|----|
| 3.12. Análise estatística | 47 |
| 4. RESULTADOS | 49 |
| 4.1. LASSBio-1410 e efeito antinociceptivo | 49 |
| 4.1.1. Efeito de LASSBio-1410 na fase neurogênica | 49 |
| 4.1.2. Efeito do LASSBio-1410 na fase inflamatória | 49 |
| 4.1.3. Identificação dos prováveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do LASSBio-1410 | 50 |
| 4.2. LASSBio-1410 e efeito antinociceptivo central | 53 |
| 4.3. LASSBio-1410 e efeito anti-inflamatório | 54 |
| 4.4. LASSBio-1410 e analgesia mecânica | 55 |
| 4.5. LASSBio-1410 e dor de origem inflamatória - contorções abdominais | 57 |
| 4.6. LASSBio-1410 em modelo animal de dor neuropática | 58 |
| 4.6.1. Avaliação da hiperalgesia térmica em ratos ICC - protocolo preventivo | 58 |
| 4.6.2. Avaliação da hiperalgesia térmica em ratos ICC – protocolo terapêutico | 59 |
| 4.6.3. Avaliação da alodinia mecânica em ratos ICC – protocolo terapêutico | 60 |
| 4.6.4. Avaliação da hiperalgesia térmica em ratos LNE - protocolo preventivo | 61 |
| 4.6.5. Avaliação da alodinia mecânica em ratos LNE - protocolo preventivo | 62 |
| 4.6.6. Avaliação da hiperalgesia térmica em ratos LNE - protocolo terapêutico | 63 |
| 4.6.7. Avaliação da alodinia mecânica em ratos LNE - protocolo terapêutico | 64 |
| 4.7. LASSBio-1410 e atividade ansiolítica | 65 |
| 4.8. LASSBio-1410 e efeito sedativo | 67 |
| 4.8.1. Efeito sedativo em Ratos Wistar | 67 |
| 4.8.2. Efeito sedativo em Camundongos <i>Swiss</i> | 68 |
| 4.9. LASSBio-1410 e avaliação da coordenação motora | 72 |
| 5. DISCUSSÃO | 75 |
| 6. CONCLUSÃO | 83 |

7. REFERÊNCIAS

84

8. APÊNDICE

91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT - 5-hidroxi triptamina (serotonina)
5-HT₃ - receptor de 5-hidroxi triptamina do tipo 3
5-HT_{1A} - receptor de 5-hidroxi triptamina do tipo 1A
5-HT_{1B}, - receptor de 5-hidroxi triptamina do tipo 1B
5-HT_{1D} - receptor de 5-hidroxi triptamina do tipo 1D
A₁ - receptor de adenosina do tipo 1
ACh - acetilcolina
AChE - acetilcolinesterase
AINES - antiinflamatórios não esteroidais
AMPc - monofosfato cíclico de adenosina
GMPc - monofosfato cíclico de guanosina
ATC - antidepressivos tricíclicos
ATP - adenosina trifosfato
BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro
Cl⁻ - cloreto
Ca²⁺ - cálcio
Ca_vα₂δ - canal de cálcio dependente de voltagem alfa2-delta
CB1 - receptor canabinoide do tipo 1
CB2 - receptor canabinoide do tipo 2
Cox - enzima ciclooxigenase
DA - dopamina
DMSO - dimetilsulfóxido
GABA - ácido γ-aminobutírico
GABA_A - receptores de GABA tipo A
GABA_B - receptores de GABA tipo B
CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
GMPc - monofosfato cíclico de guanosina
GC - guanilato ciclase
GRD – gânglio da raiz dorsal
ICC - injúria crônica constrictiva
MAO - monoamina oxidase
NO – óxido nítrico
iNOS - inibidores da óxido nítrico sintase
IASP - Associação Internacional do Estudo da Dor
IP₃ - inositol trifosfato
i.p. - intraperitoneal
K⁺ - potássio
LASSBio - Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas
LNE - ligadura do nervo espinhal
LC - *locus ceruleus*
LRP - limiar retirada da pata
M₁ - receptor muscarínico do subtipo 1
M₂ - receptor muscarínico do subtipo 2
M₃ - receptor muscarínico do subtipo 3
M₄ - receptor muscarínico do subtipo 4

M₅ - receptor muscarínico do subtipo 5
Na⁺ - sódio
NaV – Canal de sódio dependente de voltagem
NMDA - N-metil-D-aspartato
NMR - núcleo magno da rafe
NO - óxido nítrico
NT - neurotransmissores
OMS - Organização Mundial da Saúde
P2X₂ - receptor purinérgico X₂
PAG - substância cinzenta periaquedutal
PKC - proteína kinase C
PPAR_γ - receptor nuclear ativado por proliferação peroxissimal do tipo gama
RVM - bulbo rostroventromedial
SG – substancia gelatinosa
SP - substância P
SNC - sistema nervoso central
SNS – sistema nervoso simpático
TNF - fator de necrose tumoral
TRP - receptores de potencial transiente
WDR - neurônios de variação dinâmica ampla

1 Introdução

1.1 Definição da dor

A dor foi conceituada pela Associação Internacional para Estudos da Dor (IASP) como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano real ou potencial dos tecidos, ou descrita em termos de tais lesões”. É descrita como uma experiência subjetiva e pessoal, a qual envolve aspectos sensitivos e culturais que podem ser alterados pelas variáveis socioculturais e psíquicas do indivíduo e do meio.

A dor é um dos principais motivos para consultas médicas, resultando em um número estimado de 100 milhões de visitas por ano e um custo estimado em US\$ 600 bilhões por ano em cuidados de saúde e perda de produtividade (PRISINZANO, 2013). Há evidências de aumento da incidência de dor crônica e de que ela atinja proporções epidêmicas no mundo, o que a torna um dos grandes males que afligem a humanidade contemporânea, sendo um problema de saúde pública que acarreta prejuízos pessoais e sociais.

1.2 Fisiologia da dor

1.2.1 Nociceptores e fibras nervosas

Um sinal doloroso é iniciado com a ativação de nociceptores, encontrados em estruturas internas como as vísceras, e principalmente na pele. Os nociceptores podem ser classificados como terminações nervosas livres das fibras A-delta e C. As fibras nociceptivas podem ser mielínica, representadas pela fibra A-delta, que possuem uma fina camada de bainha de mielina (diâmetro de 1-5 μm), e velocidade de condução do impulso nervoso de 30-40 m/s, e a fibra amielínica C, que possui diâmetro de 0,3 – 1,5 μm , e condução lenta (0,4 – 2 m/s). Acredita-se que a ativação de fibras A-delta esteja relacionada com a dor aguda e rápida, representando um mecanismo de

alerta e defesa para o organismo. Em contrapartida, a ativação de fibras C está relacionada com a dor difusa e crônica (BASBAUM et al, 2009).

Os nociceptores de fibras A-delta podem ser divididos em: a. nociceptores tipo I – respondem à estímulos mecânicos e químicos, e possui o limiar para ativação térmica alto (> 50°C), porém podem ser sensibilizados por estímulos persistentes, e conseqüentemente ter o limiar de ativação reduzido; e b. nociceptores tipo II, apresentam limiar térmico reduzido, e mecânico elevado.

Os nociceptores das fibras C podem ser classificados de acordo com os mecanismos de ativação. Há fibras que são ativadas de modo polimodal, isto é, podem responder à estímulos mecânicos, térmicos e químicos. Existem também as fibras denominadas de mecano-insensíveis que ativadas pela histamina, seriam responsáveis pela sensação de queimação. E finalmente, outra classe de fibras foi descrita por possuir receptores que não respondem a estímulos noxios, chamados de receptores silenciosos, e são ativados apenas quando há inflamação no tecido (WILLIS e WESTLUND, 1997)

As fibras nervosas aferentes primárias tem o corpo celular localizado nos gânglios sensitivos, e os axônios dos neurônios conduzem a informação das terminações periféricas para a medula espinhal e posteriormente ao cérebro. As fibras aferentes nociceptivas realizam sinapse no corno dorsal da medula espinhal. Os neurônios nociceptivos do corno dorsal estão localizados nas lâminas mais superficiais: a lâmina marginal (lâmina I) e a substância gelatinosa (lâmina II). Muitos dos neurônios da lâmina I respondem exclusivamente a estímulos nociceptivos e projetam-se para centros superiores. Na substância gelatinosa (lâmina II) podem ser encontrados interneurônios, tanto inibitórios quanto excitatórios (PISERA, 2005; DREWES, 2006). As lâminas III e IV possuem neurônios que se conectam diretamente com fibras A β , que respondem predominantemente a estímulos inócuos. A lâmina V possui neurônios que se projetam ao tronco encefálico e certas regiões do tálamo, recebem contatos monossinápticos de fibras A δ e A β , assim como de fibras C. Os neurônios presentes na lâmina VI estão conectados de forma monossináptica com fibras aferentes A β de músculos e articulações e respondem a estímulos inócuos. Finalmente os neurônios das lâminas VII e VIII do corno ventral podem responder a estímulos nociceptivos, mesmo que de forma mais complexa, através de conexões polissinápticas (PISERA, 2005).

Vias de transmissão da dor

A informação da dor é transmitida por vias diretas e indiretas através de neurônios de projeção para o tálamo, mesencéfalo, sistema límbico e formação reticular, sendo responsáveis pela localização da dor, intensidade, aspectos afetivos e cognitivos. As vias de transmissão da dor podem ser divididas em:

1. Trato espinotalâmico. Composto por neurônios nociceptivos específicos e axônios de neurônios de variação dinâmica ampla (WDR) das lâminas I e V – VII da medula espinhal. Esses neurônios projetam-se no sentido contralateral até o tálamo.
2. Trato espinorreticular. Compreende axônios de neurônios das lâminas VII e VIII que terminam na formação reticular (bulbo e ponte), para logo ascender até o tálamo. Muitos dos axônios do trato espinorreticular ascendem sem cruzar a linha média.
3. Trato espinomesencefálico. É formado por axônios de neurônios de projeção das lâminas I e IV que se projetam contralateralmente até a formação reticular mesencefálica e a substância cinzenta periaquedutal até os núcleos parabraquiais da formação reticular. Os neurônios parabraquiais projetam-se até a amígdala, um dos principais componentes do sistema límbico, o que sugere que o trato espinomesencefálico contribui com os componentes afetivos da dor.
4. Trato espinocervical. Origina-se principalmente nas lâminas III e IV. Suas fibras fazem uma conexão sináptica no núcleo cervical lateral e no primeiro e segundo segmentos cervicais, para logo chegar ao tálamo através do trato cervicotalâmico.

5. Trato espinohipotalâmico. Compreende em axônios provenientes das lâminas I, V e VIII, que se projetam diretamente no hipotálamo. Essas conexões participam nas respostas neuroendócrinas e autonômicas induzidas pela dor

1.3 Mediadores químicos na transmissão da dor

A dor é a consequência perceptual final do processamento neural de determinada informação sensorial. O estímulo inicial surge na periferia e é transferido, sob múltiplos controles, através de transmissores sensoriais no sistema nervoso central (SNC) até o córtex.

Os potenciais de ação gerados são conduzidos até o SNC pelos axônios dos neurônios sensoriais aferentes primários, seguindo o seu trajeto inicialmente nos nervos periféricos e fazem sinapse em neurônios no corno dorsal da medula espinhal. Os neurônios de projeção secundários transmitem a informação ao tronco encefálico e ao tálamo que, a seguir, transmitem sinais ao córtex, hipotálamo e sistema límbico. A transmissão é modulada em todos os níveis do sistema nervoso por interneurônios inibitórios e excitatórios remotos e de circuito local.

Mediadores químicos na transmissão do sinal

No corno dorsal da medula espinhal ocorre a sinapse do neurônio aferente primário com um neurônio de segunda ordem. Esta etapa envolve a participação de vários mediadores químicos, como neurotransmissores, aminoácidos e neuropeptídeos. As principais substâncias excitatórias liberadas no corno dorsal são os aminoácidos glutamato e aspartato, a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Enquanto que as inibitórias são a adenosina, o ácido gama-amino-butírico (GABA), as encefalinas e as endorfinas. (WIDGEROW e KALARIA, 2012)

A transmissão sináptica no corno dorsal, entre os aferentes primários das fibras C e os neurônios de projeção secundários, possui componentes rápidos e lentos. O glutamato medeia a transmissão excitatória rápida entre os neurônios sensoriais primários e secundários. Os neuropeptídeos, como o gene da calcitonina e outros moduladores sinápticos, incluindo a neurotrofina, o fator

neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), são co-liberados com o glutamato. Estes produzem efeitos sinápticos mais lentos através de sua ação sobre os receptores metabotrópicos acoplados à proteína G e receptores de tirosinocinases.

Mediadores da via descendente inibitória da dor

A transmissão sináptica na medula espinhal é regulada pelas ações de interneurônios inibitórios locais e projeções que descem do tronco encefálico para o corno dorsal, sendo este um importante local de intervenção farmacológica. No corno dorsal da medula espinhal há a presença de interneurônios, que regulam a transmissão do sinal doloroso, oriundos do córtex cerebral, estruturas subcorticais e tronco encefálico, envolvendo ativação de receptores noradrenérgicos, serotoninérgicos e opióides.

As principais estruturas envolvidas no sistema inibitório descendente da dor são: a substância cinzenta periaquedutal (PAG), o *locus ceruleus* (LC) e o bulbo rostroventromedial (RVM), que inclui o núcleo magno da rafe (NMR).

A substância cinzenta periaquedutal, quando ativada, faz sinapse no RVM ou LC. Os axônios do RVM estabelecem sinapses inibitórias, através da liberação de serotonina que atua principalmente em receptores 5-HT_{1A}, com neurônios nociceptivos de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal, causando inibição da transmissão nociceptiva, por promover hiperpolarização da membrana neuronal e diminuição de neurotransmissores excitatórios. As fibras provenientes do LC, quando ativadas, liberam noradrenalina no CDME, levando à analgesia, resultante da ativação de receptores α 2-adrenérgicos, inibindo a liberação de neurotransmissores. (MENESCAL-DE-OLIVEIRA e SILVA, 2009). A analgesia promovida pelos peptídeos opióides endógenos é decorrente da ativação do sistema rostrocaudal, levando a uma inibição neuronal. A ativação dos neurônios do PAG ocorre pela desinibição dos neurônios efetores. Os peptídeos opióides liberados, ligam-se a seus receptores localizados em interneurônios GABAérgicos, tonicamente ativos, levando a ativação da via descendente inibitória. Esse circuito opióide/GABA também é encontrado no bulbo RVM.

1.4 Classificação da dor

1.4.1 Classificação temporal

A dor pode ser classificada segundo critérios temporais e fisiológicos. A classificação temporal da dor é dividida em transitória, aguda e crônica.

Na dor transitória ocorre ativação dos nociceptores, sendo este tipo de dor responsável pela proteção do organismo frente a possíveis danos físico e químico. (LOESER e MELZACK, 1999)

A dor aguda apresenta início recente e duração provavelmente limitada, estando relacionada à estimulação nociceptiva excessiva, resultando em dor intensa, podendo estar relacionada à um dano tecidual. (BASIC-KES et al, 2009)

Já a dor crônica é descrita como dor contínua ou recorrente, de duração mínima de três meses, e muitas vezes de etiologia incerta. Esta não desaparece com o emprego dos procedimentos terapêuticos convencionais e é causa de incapacidades e inabilidades prolongadas. Para fins de pesquisa, a IASP descreve a dor crônica como aquela com duração maior que seis meses, de caráter contínuo ou recorrente (três episódios em três meses). Devido a sua longa duração, a dor crônica perde a função de manter a homeostase e de ser sinal de alerta, promovendo comprometimento funcional, sofrimento, incapacidade progressiva e alto custo socioeconômico.

1.4.2 Classificação fisiológica

A dor pode ser classificada por critérios fisiológicos em: nociceptiva, inflamatória e neuropática.

Dor nociceptiva

A dor nociceptiva está relacionada com a sobrevivência do indivíduo, alertando para o perigo, injúria e dano tecidual, sendo uma resposta fisiológica ao funcionamento normal do sistema nervoso central e periférico. Esta é iniciada pela ativação dos nociceptores, que são terminações nervosas livres, presentes principalmente na pele, e podem ser ativados por estímulos mecânicos, térmicos e químicos.(Figura 1)

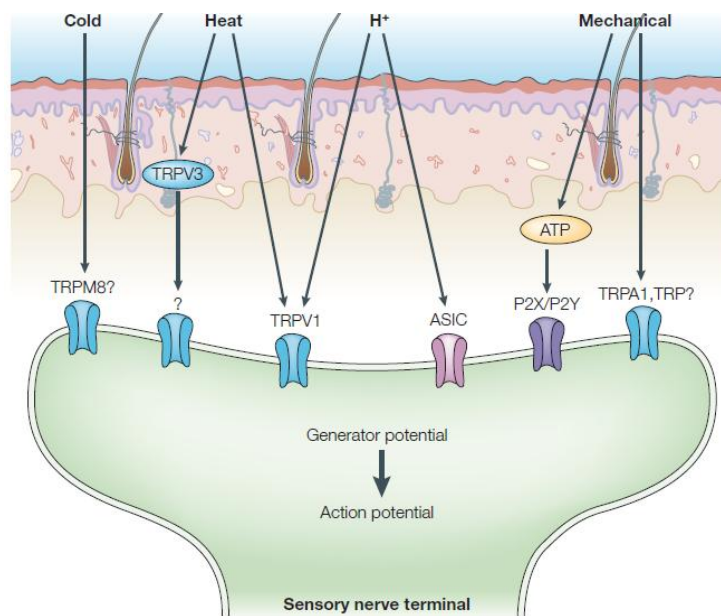


Figura 1. Dor nociceptiva - Os nociceptores respondem a estímulos prejudiciais aos tecidos, como o aquecimento da pele, frio, estímulos mecânicos e químicos. As células do sistema imune parecem ter pouco, ou nenhum, efeito neste processo. (MARCHAND, PERRETTI e MCMAHON, 2005)

Com a ativação dos nociceptores é gerado um sinal elétrico que é conduzido pelo neurônio aferente primário, através das fibras A-delta e C, até o corno dorsal da medula espinhal, sendo realizada a primeira sinapse com um neurônio de segunda ordem, que segue em direção ao tronco cerebral, tálamo e posteriormente ao córtex cerebral, (Figura 2) onde o sinal é decodificado e interpretado. (BASIC-KES et al, 2009)

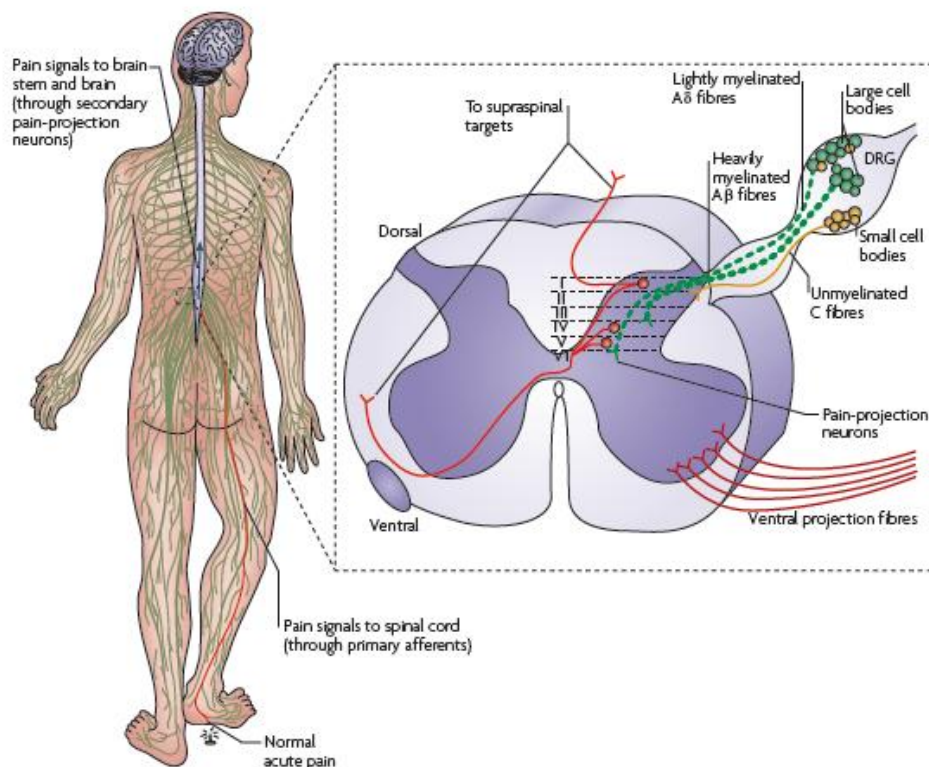


Figura 2. Sinalização via de transmissão da dor. Em destaque, a medula espinhal evidenciando o local de sinapse do neurônio aferente primário com o neurônio de segunda ordem. (MILLIGAN e WATKINS, 2009)

Dor inflamatória

A inflamação (ou processo inflamatório) é decorrente de uma reação do organismo frente à uma infecção ou lesão de um tecido. A capacidade de gerar uma resposta inflamatória é essencial à manutenção da vida, porém em algumas situações, a inflamação pode ser exagerada e sustentada sem benefício. A resposta inflamatória é caracterizada por uma vasodilatação local transitória, aumento da permeabilidade capilar, infiltração de leucócitos e células fagocíticas, degeneração tecidual e fibrose.

Após a injúria de um tecido, diversos mediadores químicos são liberados de células inflamatórias tais como: citocinas, fatores de crescimento, cininas, purinas, aminas, prostanóides e íons, incluindo prótons (BODDEKE, 2001). A inflamação envolve a ativação da resposta imune inata, incluindo os receptores do tipo *Toll-Like*, que reconhecem e se ligam a patógenos ou moléculas liberadas das células danificadas. Os receptores Toll-Like são moléculas de

superfície, presentes nas células de defesa do hospedeiro, responsáveis pelo reconhecimento de patógenos e moléculas e na geração de sinais, que levam à produção de citocinas pró-inflamatórias essenciais para a ativação das respostas imunes inatas. Células residentes do sistema imune, macrófagos e mastócitos também são ativados e liberam citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, vasodilatadores (incluindo aminas vasoativas e bradicinina). Neutrófilos, monócitos e linfócitos T, recrutados, acumulam-se no local da lesão e contribuem para a sensibilização nociceptiva periférica através da liberação de mediadores inflamatórios (REN e DUBNER, 2010)

Alguns dos mediadores inflamatórios ativam diretamente os nociceptores, estimulando a dor (Figura 3). Outros mediadores agem em conjunto para gerar a sensibilização do sistema nervoso somatosensorial, que é característico da dor inflamatória, estimulando facilmente as vias da dor até que o tecido injuriado se regenere (SCHOLZ e WOOLF, 2002). Alguns dos principais componentes envolvidos na resposta inflamatória são: bradicinina, H⁺, neurotransmissores como serotonina e ATP, citocinas e prostaglandinas.

O processo inflamatório agudo normalmente tem seu término após o reparo do tecido lesionado e substituição por tecido conjuntivo, finalizando desta forma todos os eventos inerentes à reação inflamatória. (GILROY LAWRENCE e PERRETTI, 2004). No entanto, a infiltração de células mononucleares, entre elas macrófagos, linfócitos e plasmócitos, além da presença de processo inflamatório ativo, tentativas de reparo e formação de fibrose tecidual resultam na progressão do quadro agudo para crônico (GILROY LAWRENCE e PERRETTI, 2004). Neste caso a inflamação deixa de desempenhar sua tarefa de proteção fisiológica tornando-se um processo patológico o qual torna susceptível a instalação de um quadro de dor inflamatória crônica, contribuindo para o estabelecimento da dor neuropática (MENDELL e SAHENK, 2003).

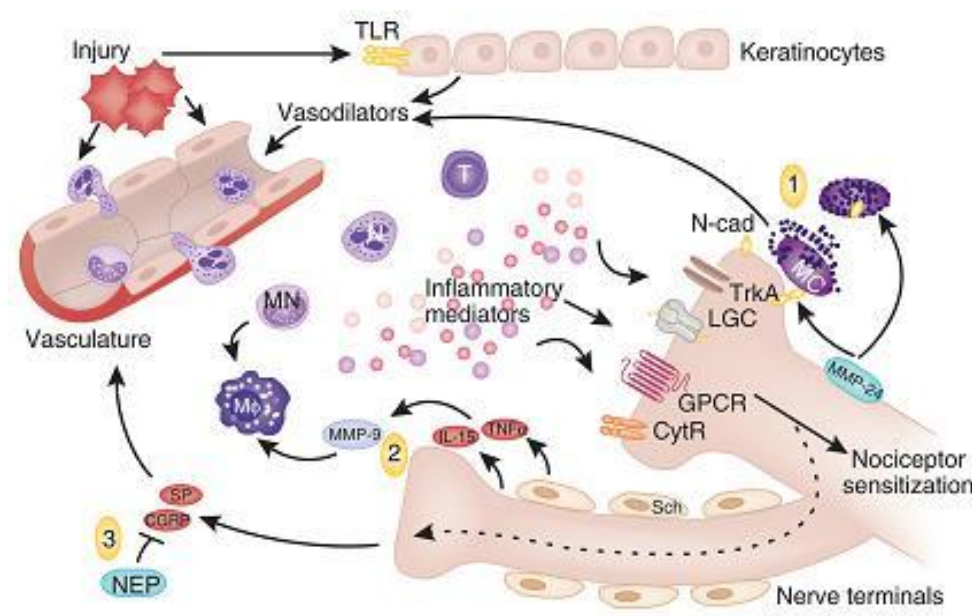


Figura 3. Ativação resposta imune e sensibilização do nociceptor após a injúria. A Lesão inicia a liberação de mediadores que ativam TLRs em queratinócitos e mastócitos (MC) próximos à terminação nervosa. Vasodilatadores também são liberados, promovendo a adesão e migração das células imunológicas, incluindo as células T (T), neutrófilos (N) e monócitos (MN) e recrutamento de macrófagos (MO). Estas células, uma vez ativadas, liberam uma bateria de mediadores inflamatórios que atuam sobre os receptores nos terminais nervosos, levando a sensibilização periférica do nociceptor. Terminações nervosas podem secretar substância P (SP) e CGRP através da ativação antidrômica dos ramos terminais do nervo vizinho. A substância P e CGRP promovem vasodilatação e extravasamento de células imunitárias, contribuindo para a manutenção da inflamação. Por ação de uma endopeptidase (NEP) a neuroinflamação pode ser contida, por degradação da substância P e de CGRP. (REN e DUBNER, 2010)

Dor neuropática

A dor neuropática é definida como dor causada por lesão ou disfunção do sistema nervoso, como resultado da ativação da via nociceptiva (fibras de pequeno calibre e trato espinotalâmico) (LIAO et al, 2005)

A dor neuropática pode ser classificada quanto a localização da geração da dor, em periférica e central, e pode ser gerada por diferentes causas (Tabela 1) como a amputação de membros (periférica) e lesão medular (central) (WOOLF e MANNION, 1999).

Tabela 1. Causas de dor neuropática periférica e central.

| CAUSAS DE DOR NEUROPÁTICA | |
|----------------------------------|--|
| Periférica | Lesões neurais de origem traumática, isquêmica, compressiva, hereditária, metabólica, tóxica, inflamatória, infecciosa, paraneoplásica, carencial, amiloidótica, e vasculítica |
| | Lesão de plexo |
| | Compressão de raízes |
| | Amputação (membro-fantasma) |
| | Quimioterapia (vincristina, cisplatina e taxol) |
| Central | Infarto |
| | Esclerose múltipla |
| | Lesão medular |
| | Siringomielia/siringobulbia |

Os pacientes com dor neuropática apresentam diferenças na qualidade e no padrão de alteração da sensibilidade dolorosa (Tabela 2), podendo apresentar na maioria dos casos estado de alodinia (dor devido a um estímulo que normalmente não provoca dor) e hiperalgesia (resposta aumentada a um estímulo doloroso) que ocorre devido a uma reorganização da transmissão sensorial dentro do sistema nervoso após lesão do nervo. Tais mudanças incluem alterações na expressão de neurotransmissores, neuromoduladores, receptores, canais de íons e proteínas estruturais (PAN et al, 2008), e apresentam queixas múltiplas e complexas, que se dividem em dores espontâneas (aquelas que aparecem sem nenhum estímulo detectável) e dores evocadas (respostas anormais ao estímulo), (SCHESTATSKY, 2008) estando relacionados a sintomas lancinantes, pruriginosos, queimação e dormência.

Tabela 2. Alterações da sensibilidade dolorosa na dor neuropática

| ALTERAÇÕES DA SENSIBILIDADE DOLOROSA | |
|---|---|
| Alodinia | Dor devida a um estímulo que normalmente não provoca dor |
| Disestesia | Alteração da sensibilidade, desagradável, espontânea ou evocada |
| Hiperalgisia | Resposta aumentada a um estímulo normalmente doloroso |
| Neuralgia | Dor associada a lesão de nervo |
| Parestesia | Sensação anormal, espontânea ou evocada |

1.5 Mecanismos da Dor Neuropática

O mecanismo subjacente à dor neuropática é complexo e envolve lesões do sistema somatossensorial periféricamente (diminuição do limiar de ativação dos nociceptores) e no sistema nervoso central (aumento da responsividade dos neurônios). (HADDAD, 2007).

Mecanismos periféricos

Os mecanismos periféricos da dor neuropática podem ocorrer por descargas ectópicas (neuroma e brotamento colateral), acoplamento simpático-sensitivo e sensibilização periférica.

Inicialmente, a lesão de nervos periféricos induz descargas rápidas e intensas de potenciais de ação. Após o trauma, as extremidades do nervo lesado aderem-se na tentativa de regeneração, formando uma estrutura de crescimento irregular, denominado neuroma.

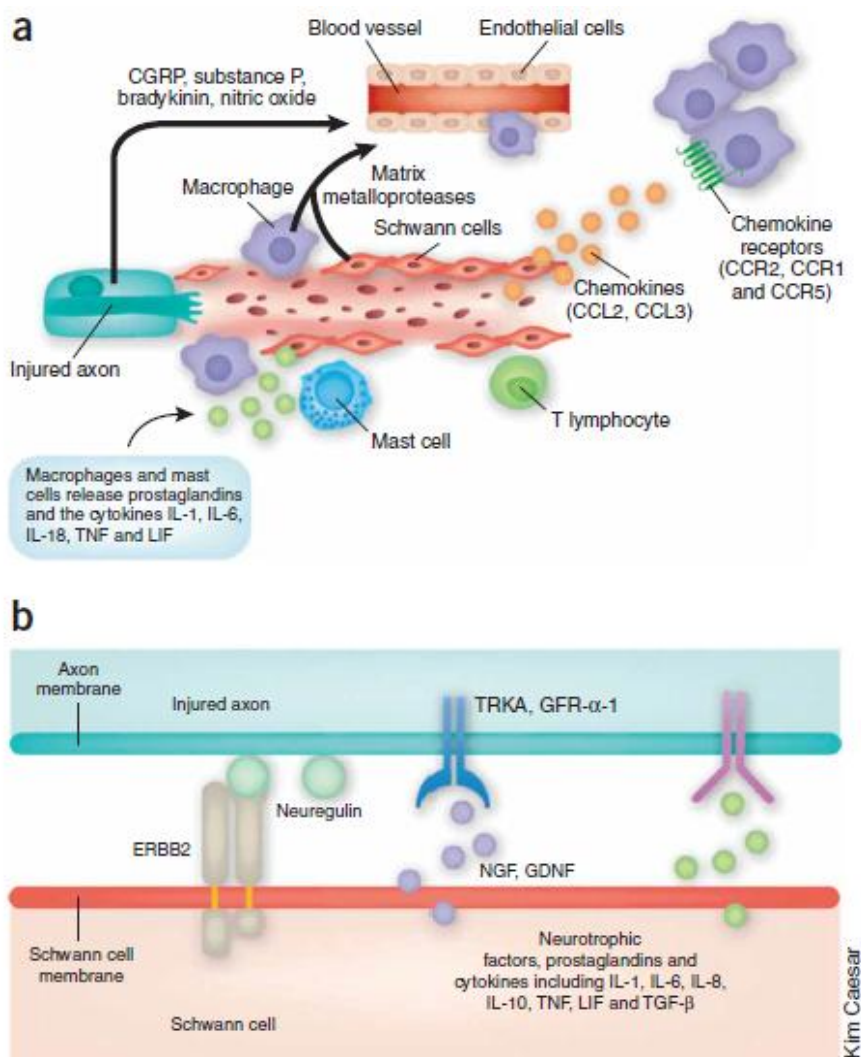


Figura 4. Alterações inflamatórias - (a) as células de Schwann e macrófagos produzem metaloproteases que interrompem a barreira sangue – nervo.(b) Minutos após a injúria, a neuregulina, um fator de crescimento constitutivamente expresso na membrana axonal , liga-se a um receptor heteromérico nas células de Schwann, levando a processos de desmielinização e proliferação das células de Schwann. Em contra partida, as estas células liberam fatores neurotróficos, GDNF, prostaglandinas e citocinas, que sensibilizam os nociceptores e modulam a expressão gênica. (SCHOLZ e WOOLF, 2007).

No sistema nervoso periférico, após uma injúria, ocorre a resposta inflamatória, resultando na ativação e migração de macrófagos e células de Schwann para o nervo e gânglio da raiz dorsal. O recrutamento e ativação destes macrófagos fazem com que as metaloproteases sejam ativadas interrompendo a barreira sanguínea, o que facilita o recrutamento de células para o local da lesão (Figura 4a). Na seqüência, mediadores vasoativos como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (*calcitonin gene-related peptide* - CGRP), substância P, bradicininas e óxido nítrico são liberados no local da lesão favorecendo a hiperemia e edema. Os monócitos são atraídos para o

local da lesão pelas quimiocinas. Os macrófagos e mastócitos liberam prostaglandinas e citocinas IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF (fator de necrose tumoral), induzindo a ativação das fibras nociceptivas (SCHOLZ e WOOLF, 2007).

Em consequência à estímulos persistentes e ao quadro inflamatório, pode ocorrer a ativação de células da glia, a micróglia, que apresenta um elevado poder fagocitário, e atuam na defesa do sistema nervoso; e astrócitos que possuem função de preenchimento e regulação dos neurotransmissores. (ELLIS e BENNETT, 2013)

Neuropatia Central

Os mecanismos centrais da dor neuropática estão presentes quando estímulos inócuos táteis são capazes de ativar na medula espinhal sinais dolorosos a partir de neurônios de baixo limiar como as fibras A δ e A β , levando a alodinia e hiperalgesia secundária na área adjacente ao local da inervação lesionada (Figura 5).

A sensibilização central pode se desenvolver como consequência da atividade ectópica em fibras nociceptivas aferentes primárias. Descargas contínuas em neurônios periféricos liberam aminoácidos excitatórios e neuropeptídeos no interior do corno dorsal da medula espinhal o que leva a mudanças pós-sinápticas nos neurônios de segunda ordem, tal como a fosforilação dos receptores NMDA e AMPA, ou expressão de canais de sódio voltagem-dependentes. Essas mudanças induzem hiperexcitabilidade neuronal, o que permite baixo limiar de disparo das fibras nervosas (BARON, BINDE e WASNER, 2010).

Em casos em que o estímulo nocivo persiste como durante a inflamação ou lesão nervosa crônica, a sensibilização sustentada leva a mudanças nos neurônios do corno dorsal que alteram a função destes neurônios por períodos prolongados. Os astrócitos respondem a esta atividade sináptica em curso através da mobilização intracelular de Ca²⁺, levando à liberação de glutamato (Glu), de ATP, que liga-se a receptor P2X4, de fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucinas, óxido nítrico (NO) e prostaglandina E2 (PGE2). A microglia ativada também é fonte de todos esses fatores pró-inflamatórios, contribuindo para a manutenção do estado de dor neuropática (Figura 5).

Os mecanismos que levam ao estado de dor neuropática estão sujeitos a modulação por neuromediadores como a bradicinina, ATP, adenosina, serotonina, eicosanóides, citocinas e neurotrofinas.

A bradicinina age em receptores B1 e B2, sensibilizando nociceptores periféricos, potencializa a transmissão por glutamato na medula espinhal, induz a liberação de citocinas por macrófagos, fatores quimiotáticos por neutrófilos e monócitos e histamina por mastócitos. Há evidências de que a ativação de receptores purinérgicos esteja relacionada com estado de alodinia e hiperalgesia, além disso, em casos de lesão de nervo periférico, há aumento da expressão de receptor P2X3 e P2X4 em microglia. Na periferia, a serotonina é liberada pelas plaquetas e induz hiperalgesia por ação direta no receptor 5HT_{2A}. Já os eicosanóides podem agir em receptor acoplado a proteína G, induzindo a hiperalgesia, por ativar nociceptores periféricos e centrais. (GRACE et al, 2014)

As citocinas são pequenas estruturas que auxiliam na interação entre células, e facilitam o estabelecimento da dor neuropática por mediar uma série de eventos intracelulares, ativando fatores transcricionais e induzindo a expressão de COX-2. As neurotrofinas são proteínas diméricas sintetizadas e liberadas por células imunes (mastócitos e linfócitos), incluindo o fator de crescimento nervoso (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) que se ligam a receptores de tirosina cinase. A lesão do nervo induz mudanças na expressão de receptores e fatores de crescimento, o que leva a alterações de canais iônicos, responsáveis pela transdução de estímulos nociceptivos (Figura 5b). (BEGGS, TRANG e SALTER, 2012)

1.6 Tratamento da dor

Terapia farmacológica

As técnicas farmacológicas mais conservadoras para o tratamento da dor envolvem, fundamentalmente, a utilização de fármacos analgésicos e adjuvantes. Os analgésicos podem ser opióides (morfina, por exemplo, e

codeína) e não opióides (os anti-inflamatórios não esteróides e os antipiréticos, como o paracetamol).

Fisiologicamente, os peptídeos opióides endógenos promovem analgesia, e são descritas 3 famílias, as encefalinas, originárias da pró-encefalinas; as endorfinas, originárias da pró-opiomelanocortina, e a dinorfina, originária da pró-dinorfina.

Os receptores opióides são divididos em três classes: μ , δ , κ , podendo ser subdividido em μ -1, μ -2, δ -1, δ -2, κ -1a, κ -2, κ -3 e κ -4. Os receptores estão localizados em todo SNC e sistema nervoso periférico (SNP), porém a concentração é maior em algumas áreas associadas com a transmissão da dor: substância cinzenta periaquedutal, núcleo magno da rafe e tálamo medial. Os receptores são encontrados nas terminações nervosas aferentes pré-sinápticas, e também no neurônio pós-sináptico medular. Na medula espinal, a concentração de receptores é maior na substância gelatinosa (lâmina II de Rexed).

Os opióides reduzem a entrada do íon cálcio, causando diminuição da liberação pré-sináptica de neurotransmissor (substância P), aumentam o efluxo de potássio causando hiperpolarização dos neurônios pós-sinápticos e, com isso, diminuem a transmissão sináptica. Os agonistas dos receptores opióides constituem a principal classe de fármacos utilizada no controle agudo da dor moderada a intensa. A morfina, o agonista do receptor μ opióide continua sendo amplamente utilizada; entretanto opióides sintéticos e semi-sintéticos contribuem para a versatilidade farmacocinética.

Outra classe utilizada são os analgésicos não-opióides anti-inflamatórios não-esteróides (AINE), que atuam inibindo a atividade das enzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), que são necessárias para a produção de prostanóides. Os AINEs afetam as vias da dor através de pelo menos três mecanismos distintos:

1. Redução da síntese de prostanóides e, portanto, reduzem a hiperalgesia inflamatória.
2. Diminuem o recrutamento dos leucócitos (consequentemente diminuem a produção de mediadores inflamatórios)
3. Impedem a geração de prostaglandinas que atuam como neuromoduladores produtores de dor no corno dorsal da medula espinal.

Fármacos adjuvantes

Os fármacos adjuvantes, de enorme importância no controle da dor crônica, são medicamentos que, não sendo verdadeiros analgésicos, contribuem para o alívio da dor por mecanismos distintos.

Dentre os tratamentos farmacológicos disponíveis para o tratamento da dor neuropática estão incluídos os antidepressivos, os anticonvulsivantes, os anestésicos locais e os antiarrítmicos (GALER, 1995; ATTAL, 2000; SAH et al, 2003; GUSTAFSSON et al, 2003).

Os fármacos originalmente desenvolvidos para o tratamento da depressão são amplamente utilizados como tratamento adjuvante no manejo da dor, sobretudo para o tratamento de condições de dor crônica. Acredita-se que os antidepressivos tricíclicos produzem analgesia através do bloqueio dos canais de sódio e do aumento da atividade das projeções noradrenérgicas e serotoninérgicas antinociceptivas que descem do cérebro para a medula espinal.

Os fármacos anticonvulsivantes e antiarrítmicos são utilizados em algumas condições de dor crônica, através do controle da excitabilidade celular excessiva. Os anticonvulsivantes com maior valor clínico no controle da dor crônica são gabapentina, pregabalina, lamotrigina e carbamazepina.

Porém, além do alívio limitado da dor neuropática, obtido com estes fármacos, o tratamento se torna ainda mais difícil em função dos efeitos colaterais não tolerados pelo paciente (RODRIGUES FILHO, 2003). Há, portanto, a necessidade de se investigar novas substâncias capazes de atuarem no tratamento da dor neuropática.

Existem também métodos farmacológicos invasivos, que envolvem a utilização de anestésicos locais e agentes neurolíticos para a execução de bloqueios nervosos, com a intenção de provocar interrupção da transmissão dolorosa.

1.7 Planejamento de novos candidatos a fármaco

Atualmente, o tratamento da dor neuropática é limitado pela modesta eficácia e efeitos colaterais desfavoráveis, podendo estar associada a desordens do SNC como depressão e ansiedade.

A partir da necessidade clínica de novos fármacos mais eficazes para o tratamento de distúrbios do SNC e da dor, o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio) planejou uma série de substâncias para tratar essas enfermidades.

O zolpidem (tartarato de zolpidem ou bi-tartarato de zolpidem) é um fármaco hipnótico (indutor do sono), do grupo das imidazopiridinas, não-benzodiazepínico. A partir deste composto o LASSBio sintetizou uma série de derivados, dentre eles o LASSBio-873, protótipo que apresentou importante atividade sedativa e antinociceptiva (MENDES et al, 2009)

Com o objetivo de avaliar a contribuição farmacofórica do LASSBio-873 (Figura 6) para o efeito antinociceptivo foi realizada uma estratégia de simplificação molecular sintetizando-se o *p*-nitro fenilmaleimida, designado LASSBio-1410, que foi testado para distúrbios do SNC, atividade ansiolítica e sedativa, analgésica e antinociceptiva.

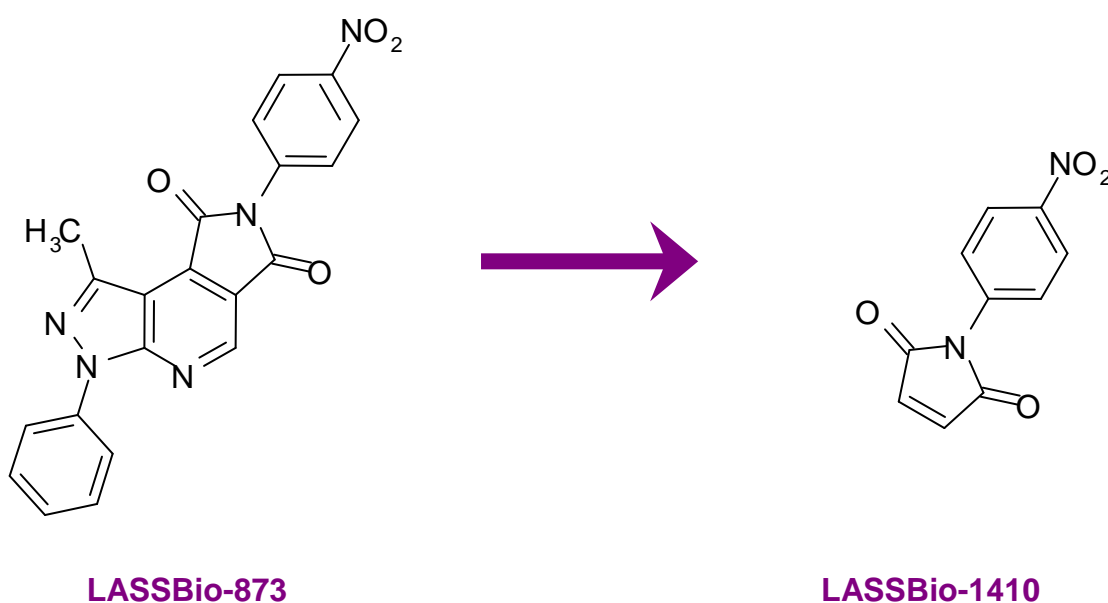


Figura 6. Estrutura química do derivado LASSBio-873 e LASSBio-1410.

Inicialmente, a fenila ligada a R1 do anel pirazólico de LASSBio-873 foi substituída por uma metila gerando o LASSBio-1450, em seguida, a metila em R2 do anel pirazólico foi substituída por um hidrogênio resultando na gênese de LASSBio-1435. Com a retirada sucessiva dos anéis pirazólico e piridínico foram gerados LASSBio-1451 e LASSBio-1410, respectivamente, conforme Figura 7 (NASCIMENTO et al, 2010)

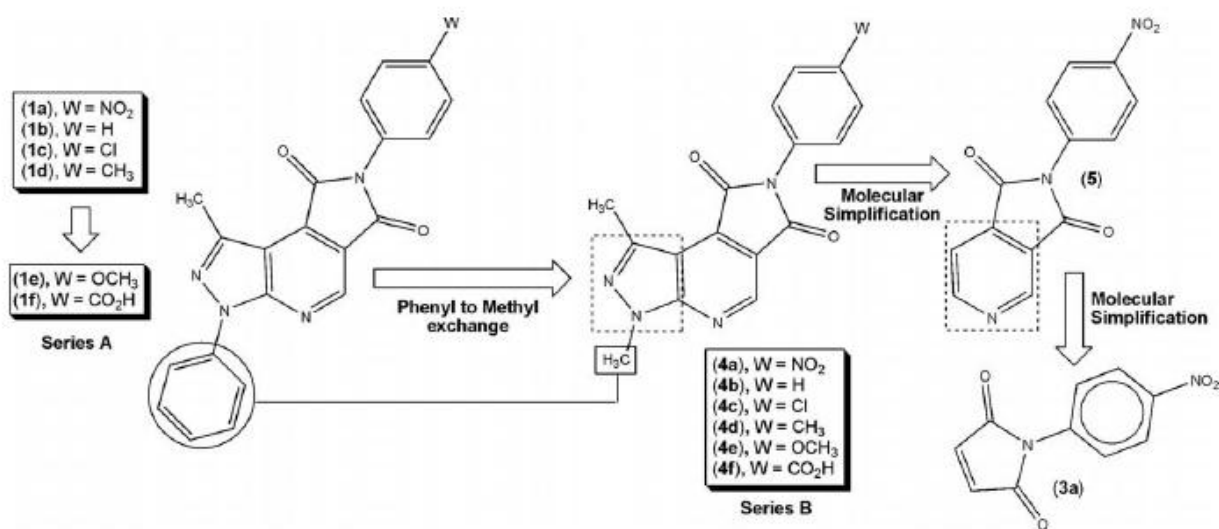


Figura 7. Derivados pirazolo[3,4-b]pirrolo[3,4-d]piridínicos funcionalizados (Adaptado de NASCIMENTO et al, 2010)

A avaliação comparativa da atividade sedativa apresentada pelos derivados heterocíclicos no protocolo da atividade motora possibilitou melhor conhecimento sobre a estrutura-atividade destes compostos no SNC (NASCIMENTO et al, 2010).

Devido a necessidade clínica de fármacos mais potentes e eficazes para o tratamento da dor aguda e crônica, LASSBio-1410 foi selecionado para avaliação em modelo de dor aguda e crônica.

Objetivos

2 Objetivos

O derivado p-nitro-fenilmaleimida (LASSBio-1410), através de técnicas de simplificação molecular foi sintetizado pelo LASSBio com o objetivo de desenvolver novo protótipo para o tratamento da dor e distúrbios do sistema nervoso central.

2.1 Objetivo geral

- Avaliação farmacológica do LASSBio-1410 visando o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de distúrbios do sistema nervoso central, da dor aguda e crônica.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atuação do LASSBio-1410 em modelos de antinocicepção (teste da formalina) e a provável via relacionada com o efeito;
- Avaliar o efeito analgésico central de LASSBio-1410, através do modelo do placa quente;
- Avaliar o possível efeito anti-inflamatório em protocolos de inflamação: (1) edema de pata induzido pela carragenina e método Randall-Selitto; (2) contorções abdominais induzido pelo ácido acético;
- Analisar a contribuição farmacológica do derivado no tratamento da dor neuropática, em modelo de injúria constritiva crônica (ICC) e ligadura do nervo espinhal (LNE).
- Investigar atividade ansiolítica utilizando o labirinto em cruz elevado (*Plus Maze*), assim como os receptores envolvidos.
- Investigar provável ação sedativa e o possível mecanismo de ação.

Materiais e Métodos

3 Materiais e Métodos

3.1 Avaliação da atividade antinociceptiva – Teste da formalina

A avaliação da atividade antinociceptiva foi realizada usando o protocolo do teste da formalina, que é um modelo experimental para medir a resposta a dor contínua causada pelo dano tecidual gerado pela mesma. A resposta a formalina é tipicamente bifásica. A primeira fase, neurogênica, começa imediatamente após a injeção da formalina (dura cerca de 5 min) e é caracterizada por dor intensa. A segunda fase, inflamatória, ocorre 15 minutos após a injeção e é de dor moderada (GRANADOS-SOTO e ARGUELLES, 2005).

Camundongos suíços machos pesando entre 20 - 25g foram colocados em um recipiente transparente, e um espelho foi posicionado abaixo da caixa para que fosse possível observar as reações do animal. Após o tempo de aclimação, o animal recebeu uma injeção subcutânea de 20 μ l de formalina 2,5% na região plantar da pata direita e uma injeção intraperitoneal do veículo ou da substância a ser testada. O comportamento do animal começou a ser observado imediatamente após a administração cujo comportamento nociceptivo foi quantificado pelo número de lambidas na pata nas duas fases neurogênica e inflamatória.

Neste protocolo, foram utilizadas as doses de 2, 3 e 4 mg/kg do derivado LASSBio-1410. Para se avaliar o possível mecanismo de ação e vias envolvidas com o efeito antinociceptivo promovido por LASSBio-1410, foram utilizados os seguintes antagonistas:

- Atropina 2 mg/kg – antagonista muscarínico não seletivo.
- Naloxona 2 mg/kg – antagonista opióide não seletivo
- Flumazenil 20 mg/kg - antagonista dos receptores benzodiazepínicos
- binaltorfimina 10 mg/kg – antagonista κ opióide
- CTOP 1 mg/kg – antagonista μ opióide

- Naltrindol 1 mg/kg – antagonista δ opióide

3.2 Avaliação da atividade analgésica central – Placa quente

O teste da placa quente teve como objetivo determinar a atividade analgésica central do derivado. Este teste, proposto por WOOLFE e MACDONALD (1944) consiste em expor os animais à uma placa quente ($52\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Harvard apparatus, LE7406, Estados Unidos, Figura 8) e observar quanto tempo levam para manifestar uma resposta dolorosa (lamber, morder, saltar ou levantar as patas). Camundongos “Swiss” machos foram divididos em dois grupos (10 animais cada): 1. grupo I (controle) – tratados com veículo (DMSO i.p.); 2. grupo II - tratados com LASSBio-1410 (4 mg/kg, i.p.). Os dados foram expressos como porcentagem de atividade analgésica.

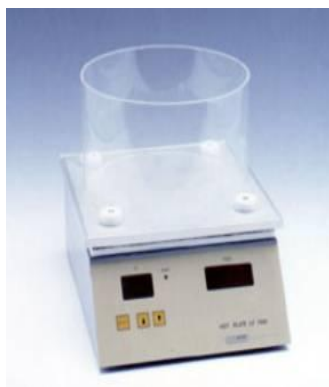


Figura 8. Aparelho da placa quente para avaliar a analgesia central (Harvard apparatus, LE7406)

3.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória – Edema de pata induzido pela carragenina

Para avaliar o efeito anti-inflamatório do derivado, foi utilizado o método de inflamação aguda descrito por WINTER (1962). Ratos Wistar machos pesando entre 150-200 g foram aleatoriamente divididos em dois grupos de seis ratos cada. Grupo I (controle) recebeu DMSO, que foi o veículo utilizado, e o grupo II foi tratado com LASSBio-1410 (4 mg/kg). Após trinta minutos da administração intraperitoneal do DMSO ou derivado, os animais receberam 0,1 mL de uma

suspensão de carragenina 1% peso/volume na região subplantar da pata traseira, levando a formação do edema e de inflamação localizada. O volume da pata foi medido por pletismômetro (Insight, EFF 304, Brasil, Figura 9) antes e após 1, 2, 3, 4, 5 e 24 horas da injeção de carragenina.

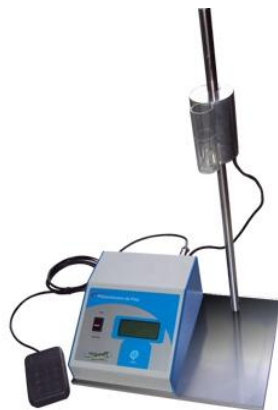


Figura 9. Pletismômetro para avaliar o volume da pata do animal (Insight, EFF 304, Brasil).

3.4 Avaliação da analgesia mecânica – Método Randall & Selitto

O teste comportamental de Randall & Selitto (1957) é um método para avaliação da hipernocicepção. Ratos Wistar machos pesando entre 150-200 g foram aleatoriamente divididos em dois grupos de seis ratos cada. Grupo I (controle) recebeu DMSO, que foi o veículo utilizado, e o grupo II foi tratado com LASSBio-1410 (4 mg/kg). Após trinta minutos da administração intraperitoneal do DMSO ou derivado, os animais receberam 0,1 mL de uma suspensão de carragenina 1% peso/volume na região subplantar da pata traseira, levando a formação do edema e de inflamação localizada. Para avaliar a hiperalgesia mecânica, foi utilizado o equipamento analgesímetro (Ugo-Basile, 37215, Varese, Italy, Figura 10), que gera aumento linear da força (em gramas) sobre a superfície dorsal da pata do animal, até que o mesmo produza uma resposta de retirada da pata. O reflexo de retirada da pata é considerado representativo do limiar hipernociceptivo, ou seja, a força necessária aplicada à pata para que induza uma resposta aversiva a um estímulo nocivo (limiar retirada da pata - LRP). A força necessária para que esse animal exiba tal resposta é registrada em gramas. O LRP é avaliado antes e após a administração dos estímulos hiperalgênicos ou inflamatórios, que variam de acordo com o experimento, sendo os resultados expressos em LRP e porcentagem da reversão da hiperalgesia.

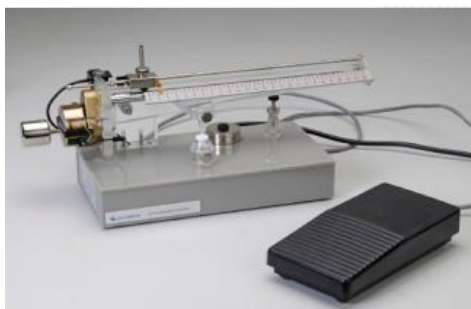


Figura 10. Analgesímetro utilizado na investigação da hiperalgesia mecânica (Ugo-Basile,37215, Varese, Italy)

3.5 Avaliação da atividade antinociceptiva - contorções abdominais

O modelo de contorções abdominais induzido pelo ácido acético é utilizado para avaliar a nocicepção inflamatória visceral (KOSTER et al., 1959; VINEGAR et al.,1979; TJØLSEN et al, 1997). Para este teste, camundongos “Swiss” machos, (18 – 25 g) receberam injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6% em solução salina (NaCl 0,9%) para indução da dor inflamatória. As contorções abdominais consistem na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma pata posterior. Neste método, foram utilizados os seguintes grupos (10 animais cada): 1. controle (DMSO), 2. LASSBio-1410 (2, 3 e 4 mg/kg), 3. pré-tratamento com os antagonistas associado à LASSBio-1410 (4 mg/kg):

- Atropina 2 mg/kg – antagonista muscarínico não seletivo.
- Naloxona 2 mg/kg – antagonista opióide não seletivo
- Flumazenil 20 mg/kg - antagonista dos receptores benzodiazepínicos
- Binaltorfimina 10 mg/kg – antagonista κ opióide
- CTOP 1 mg/kg – antagonista μ opióide
- Naltrindol 1 mg/kg – antagonista δ opióide

Após 10 minutos da administração do ácido acético, foi contabilizado o número de contorções abdominais totais em um período de 20 minutos.

3.6 Modelo Animal de Dor Neuropática

3.6.1. Modelo por Injúria Constrictiva Crônica (ICC)

A dor neuropática foi induzida em ratos utilizando-se o modelo de injúria constrictiva crônica (ICC), como descrito previamente por Bennet e Xie (1988). Ratos Wistar machos (220 – 260 g) foram anestesiados com a combinação de 100 mg/kg de ketamina e 5 mg/kg de xilazina por via i.p. O nervo ciático esquerdo foi exposto através da dissecação do bíceps femural, próximo à trifurcação do nervo ciático. Foram feitas quatro ligaduras não isquemiantes no nervo ciático, com espaço de 1 mm entre uma e outra, utilizando-se fio de seda 3.0. Após o procedimento, foi realizada a sutura da pele e aplicado um antiséptico tópico. Nos animais falso-operados, o nervo foi exposto sem proceder a ligadura. Foram utilizados 6 animais por grupo experimental.

3.6.2. Modelo por Ligadura de Nervos Espinhal (LNE)

Um segundo método utilizado foi o modelo de ligadura de nervos espinhal (LNE) descrito por Kim e Chung (1992). Para este modelo foram utilizados ratos Wistar machos (180 - 220 g) que foram anestesiados com 100 mg/kg de ketamina e 5 mg/kg de xilazina i.p. Os animais (n= 6) foram posicionados em decúbito dorsal e seus músculos paraespinhas cuidadosamente separados na região das vértebras L5 a S1. O processo transversal de L6 foi retirado para a visualização dos nervos espinhais L4 e L5, os quais foram cuidadosamente separados para que fosse feita a ligadura firme de L5 com fio de seda 6.0, interrompendo assim todo o fluxo do nervo. Após o procedimento, os músculos paraespinhais e a pele foram suturados. Um antiséptico foi então aplicado topicamente, seguido da administração intramuscular de 60 mg de oxitetraciclina. Nos animais falso-operados (n= 6) foi realizado o mesmo procedimento, no entanto, sem a ligadura do nervo L5.

Em ambos os modelos, os animais que após a cirurgia, apresentavam a pata operada virada pra trás, ausência de movimento, ou qualquer outra

característica que impossibilitasse a avaliação dos mesmos, foram descartados e sacrificados imediatamente.

3.7 Avaliação da Dor Neuropática após Tratamento com LASSBio-1410

3.7.1 Alodínia Mecânica

Para avaliar modificações na sensação e no desenvolvimento da alodínia mecânica, foi utilizado o aparelho analgesímetro digital (EFF-301, Insight equipamentos), versão digitalizada dos filamentos de Von Frey. Este teste tem como objetivo avaliar mudanças na sensibilidade tátil em resposta a um estímulo mecânico resultantes de um dano neural. Este aparelho possui um braço transdutor de força ligado a um pino sensor, através do qual é realizada uma força de intensidade crescente contra a superfície da pata traseira do animal para que seja determinado o limiar de retirada da pata. O analgesímetro digital registra automaticamente o limiar de retirada (g) na qual o animal responde ao estímulo.

Os animais foram colocados em caixas acrílicas individuais para aclimatização por 20-30 minutos antes do início do teste. Após este período, foram determinados os limiares de retirada das duas patas traseiras. Foram feitas 5 medidas controle para cada pata e a média de cada uma foi definida como a força máxima controle. Os limiares após a administração das substâncias foram determinados conforme os protocolos experimentais descritos abaixo.

3.7.2 Hiperalgisia Térmica

A hiperalgisia térmica foi avaliada através do teste de retirada da pata, que consistiu no posicionamento de uma fonte de calor radiante na superfície das patas traseiras do animal para a avaliação da latência de retirada da pata.

O estímulo por calor radiante é vantajoso em relação a outros modelos de estímulo térmico porque não há estimulação tátil direta (LE BARS ET al, 2001). Para realização deste experimento foi usado o aparelho Plantar Analgesia Meter (IITC -336- Life Science Inc-USA).

Os animais foram acondicionados em caixas de acrílico transparentes por 40 minutos para aclimação. Após este período, o calor radiante foi aplicado na parte plantar das patas traseiras do animal até o mesmo realizasse movimento de retirada da pata. O tempo medido entre o início do estímulo e a retirada da pata foi considerado a latência para retirada da pata. Foram feitas 3 medidas para cada pata e a média de cada pata foi definida como a latência controle. As latências após a administração das substâncias foram medidas conforme os protocolos experimentais descritos abaixo. O tempo máximo que o animal foi exposto à fonte de calor foi definido como 3 vezes o tempo controle a fim de evitar danos teciduais. Durante todo o experimento a temperatura da sala foi mantida em aproximadamente 24 °C.

3.7.3. Protocolos Experimentais

Todas as medidas controle foram realizadas antes dos procedimentos cirúrgicos.

O tratamento com LASSBio-1410 foi realizado de 2 formas: 1. antes do desenvolvimento do quadro de dor neuropática (protocolo preventivo); 2. após o estabelecimento da doença (protocolo terapêutico). No primeiro protocolo, o tratamento com LASSBio-1410 (4 mg/kg i.p) foi iniciado 4 horas após a cirurgia, com duração de 7 dias. A alodínia mecânica e a hiperalgesia térmica foram avaliadas no terceiro e no sétimo dia após a cirurgia. No segundo protocolo, o tratamento com LASSBio-1410 (10 mg/kg p.o), por gavagem, foi iniciado 7 dias após a cirurgia e a avaliação realizada após 3 e 7 dias do início do tratamento.

3.8 Avaliação da atividade ansiolítica – teste do *Plus Maze*

A observação de ansiedade em animais é comumente baseada na exposição dos mesmos a um ambiente não familiar e aversivo, uma vez que o comportamento que reflete a ansiedade é a alteração da resposta motora (fuga, congelamento e evasão) (SAVIC e OBRADOVIC, 2004). Para este modelo experimental foram utilizados camundongos “Swiss” machos (18 - 25 g) divididos nos seguintes grupos experimentais (10 animais cada): 1. grupo I (controle) - administrado DMSO; 2. grupo II (controle positivo) - administrado

midazolam 2mg/kg; 3. grupo III e IV - tratados com LASSBio-1410 nas doses de 2 e 3 mg/kg, respectivamente; 4. grupo V - pré-tratamento com a naloxona (2 mg/kg) seguido de LASSBio-1410 (3 mg/kg). Os animais foram posicionados no centro de um labirinto em forma de cruz (Harvard apparatus, Massachusetts, Estados Unidos) que contém dois braços abertos e dois braços fechados ambos com abertura superior, e elevado a uma altura de 50 cm da superfície (Figura 11).



Figura 11. Labirinto em forma de cruz elevado para avaliar a atividade ansiolítica.

Os animais foram observados durante 5 minutos, sendo quantificado o tempo gasto em ambos os braços abertos ou fechados, além do número de entradas em cada braço (uma entrada é definida quando as quatro patas do animal atravessam o braço). O tempo gasto em cada braço é quantificado em porcentagem sobre o tempo total de atividade nos braços e o número total de entradas em cada braço quantificado em porcentagem sobre o número total de entradas. O aumento do número de entradas e do tempo gasto nos braços abertos é um indicativo da diminuição do estado de ansiedade.

3.9 Avaliação da atividade sedativa em ratos Wistar - Campo aberto

Para avaliar um possível efeito sedativo em ratos *Wistar*, foi utilizado o protocolo do campo aberto, em que foram utilizados ratos *Wistar* machos pesando entre 180 - 220 g, distribuídos em grupos experimentais de 6 animais cada para a avaliação da substância testada e do veículo (DMSO). A atividade motora foi determinada em uma câmara aberta (LE 8811, Leticia) medindo 45 x 45 cm que emite raios infravermelhos a cada 2,5 cm (Figura 12). O número de interrupções dos feixes devido ao movimento do animal foi contabilizado em um período de 40 minutos, após a injeção intraperitoneal do veículo DMSO (grupo controle) e do LASSBio-1410 4 mg/kg (i.p) ou 10 mg/kg (p.o) solubilizado em DMSO. Os resultados foram expressos em movimentos por minuto (mov/min), calculados pela soma do número total de movimentos nos 40 minutos de teste dividido pelo tempo total de observação.

3.10 Avaliação da atividade sedativa em camundongos - Campo aberto

A medida da atividade motora pode ser utilizada para avaliar o efeito sedativo de uma substância. Neste protocolo, foram utilizados camundongos suíços machos pesando entre 20 e 25 g, distribuídos em grupos experimentais de 10 animais cada para a avaliação da substância testada e do veículo (DMSO). A atividade motora foi determinada da mesma forma como descrito para as avaliações com os ratos.

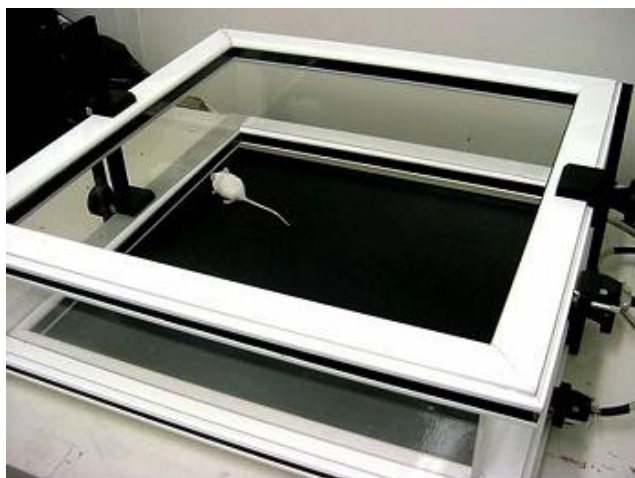


Figura 12. Aparelho (LE8811, Leticia) utilizado para medida da atividade motora

Neste protocolo, foram utilizadas as doses de 2, 3 e 4 mg/kg do derivado LASSBio-1410. Para se avaliar o possível mecanismo de ação e vias envolvidas com o efeito sedativo promovido por LASSBio-1410, foram utilizados os seguintes antagonistas:

- Atropina 2 mg/kg – antagonista muscarínico não seletivo.
- Naloxona 2 mg/kg – antagonista opióide não seletivo
- Flumazenil 20 mg/kg - antagonista dos receptores benzodiazepínicos
- binaltorfimina 10 mg/kg – antagonista κ opióide
- CTOP 1 mg/kg – antagonista μ opióide
- Naltrindol 1 mg/kg – antagonista δ opióide

3.11 Avaliação da coordenação motora – Rota-rod

O teste do rota-rod foi proposto por DUNHAM e MIYA, em 1957, como um importante método para avaliar o efeito de agentes farmacológicos tais como, relaxantes musculares e ansiolíticos na coordenação motora.

Vinte e quatro horas antes do teste, os camundongos foram pré-selecionados, no qual foram considerados aptos ao teste os animais que permaneceram na barra giratória durante 3 minutos em 3 tentativas (Figura 13).



Figura 13. Aparelho com a barra giratória (Rota Rod) utilizado no teste de coordenação motora. (Insight, EFF 411).

Os camundongos foram divididos em 3 grupos experimentais: 1. grupo I (controle) - foi administrado DMSO i.p.; 2. grupo II (controle positivo) - recebeu administração de diazepam 10 mg/kg i.p; 3. grupo III - foi tratado com LASSBio-1410, 4 mg/kg i.p. Os animais foram posicionados na barra giratória (Insight, EFF 411, Brasil), sendo contabilizado o tempo total de permanência 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração de LASSBio-1410.

3.12 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média \pm EPM. Para comparação entre os grupos experimentais foi utilizada a análise de variância *Two-Way* seguida pelo teste de Bonferroni. Para a comparação entre o grupo tratado e o controle foi usado análise de variância *One-Way* seguida pelo teste Dunnett ou teste t-student não pareado

Os gráficos foram plotados utilizando o programa SigmaPlot 8.0 e as análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism 5, sendo consideradas diferenças significativas quando o valor de P foi inferior a 0,05 ($P < 0,05$).

Resultados

4 Resultados

4.1 LASSBio-1410 e efeito antinociceptivo

Para avaliar a atividade antinociceptiva em um modelo de dor inflamatória, gerado pela formalina, LASSBio-1410 foi injetado i.p. 15 minutos antes da injeção intraplantar da formalina, e a reatividade dos animais em lambar, coçar e morder a pata foi avaliada durante as duas fases de ação da substância.

O derivado LASSBio-1410 apresentou atividade antinociceptiva de forma dose dependente avaliada através do teste da formalina (Figura 14).

4.1.1 Efeito de LASSBio-1410 na fase neurogênica

A reatividade dos animais após injeção de formalina foi de $51,5 \pm 5,5$ s no grupo do DMSO (veículo), utilizado como controle, na fase neurogênica. O ácido acetil salicílico (150 mg/kg), um anti-inflamatório não esteroide, utilizado como controle positivo, não interferiu com o tempo de reatividade dos animais mantendo-se semelhante ao controle em $53,8 \pm 6,4$ s. O LASSBio-1410 nas menores doses testadas de 2 mg/kg e 3 mg/kg não apresentaram efeito na fase neurogênica significativo com tempo de reatividade de $49,0 \pm 3,5$ s e $38,4 \pm 5,5$ s, respectivamente. Entretanto, LASSBio-1410 (4 mg/kg) reduziu significativamente a reatividade para $30,8 \pm 3,4$ s ($p < 0,05$, Figura 14).

4.1.2 Efeito do LASSBio-1410 na fase inflamatória

Na fase inflamatória, a reatividade dos animais tratados com DMSO foi de $197,5 \pm 14,5$ s enquanto que, após administração do ácido acetil salicílico foi reduzida para $71,2 \pm 7,3$ s ($p < 0,05$) confirmando seu efeito antinociceptivo na fase inflamatória. O derivado LASSBio-1410 nas doses de 2, 3 e 4 mg/kg apresentou efeito na fase inflamatória com reatividade reduzida para $123,7 \pm 16,3$; $24,5 \pm 10,6$ ($p < 0,05$) e $15,8 \pm 7,5$ s, ($p < 0,05$) respectivamente (Figura 14).

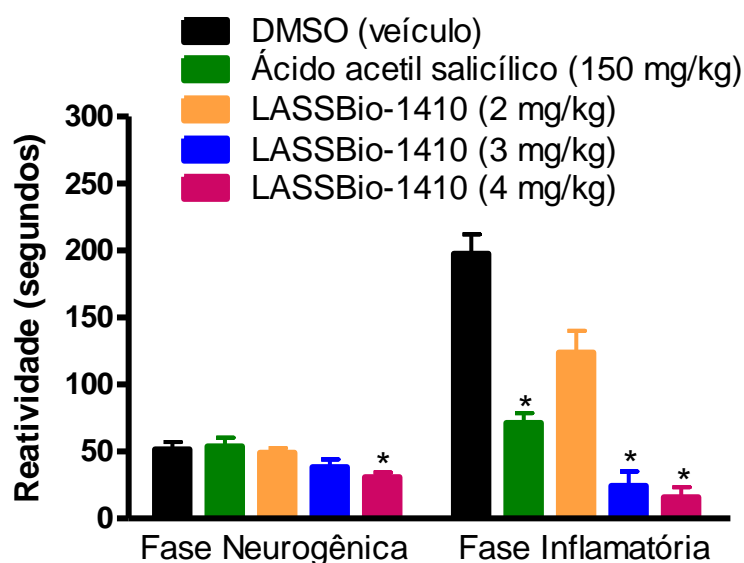


Figura 14. Reatividade a formalina após tratamento com LASSBio-1410 em camundongos. * $P < 0,05$ comparado ao controle DMSO (veículo). As substâncias foram administradas i.p, $n = 10$.

4.1.3 Identificação dos prováveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do LASSBio-1410

Para se investigar se o efeito do derivado estaria envolvido com a via muscarínica, foi realizado o pré-tratamento com o antagonista atropina (2 mg/kg) (Figura 15). No entanto, a atropina não reverteu o efeito do derivado tanto na fase neurogênica quanto na fase inflamatória com reatividade de $22,8 \pm 1,9$ s e $2,9 \pm 1,2$ s, respectivamente.

Com o objetivo de se avaliar o possível envolvimento da via opióide na ação antinociceptiva do derivado, foi realizado o pré-tratamento com a naloxona (2 mg/kg) (Figura 15). A naloxona reverteu totalmente o efeito do LASSBio-1410 (4 mg/kg) na fase neurogênica, aumentando a reatividade para $55,2 \pm 4,4$ s e na fase inflamatória reverteu parcialmente com reatividade de $45,3 \pm 10,4$ s ($p < 0,05$ comparado ao LASSBio-1410 4 mg/kg).

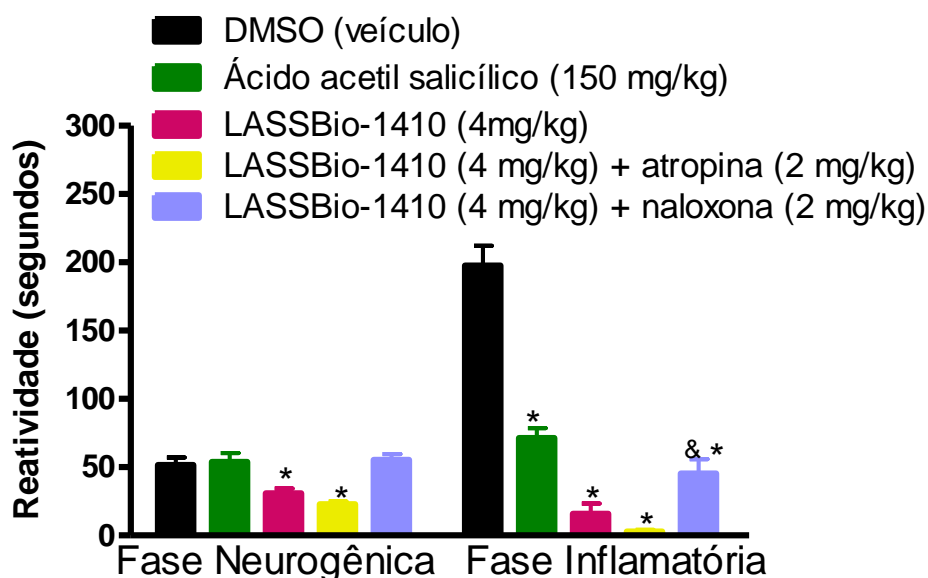


Figura 15. Avaliação da influência das vias opióide e muscarínica no efeito antinociceptivo do LASSBio-1410. * $P < 0,05$ comparado ao DMSO, & $P < 0,05$ comparado ao LASSBio-1410. As substâncias foram administradas i.p, $n=10$.

Na identificação do subtipo de receptor opióide que poderia estar envolvido com o efeito antinociceptivo na fase neurogênica promovido pelo LASSBio-1410 foi utilizado os antagonistas seletivos para os receptores mu, delta e kappa (Figura 16). Não foi observado reversão na presença dos antagonistas CTOP (1 mg/kg) e binaltorfimina (10 mg/kg) mantendo reduzida a reatividade em $36,1 \pm 6,7$ s e $27,4 \pm 5,9$ s, respectivamente. Entretanto, o efeito foi revertido pelo naltrindol (1 mg/kg) com aumento para $55,9 \pm 5,8$ s ($p < 0,05$).

De forma semelhante, na fase inflamatória, o pré-tratamento com CTOP e binaltorfimina não revertem a atividade antinociceptiva de LASSBio-1410, apresentando tempo de reatividade de $36,1 \pm 6,7$ s e $27,3 \pm 5,8$ s, respectivamente. Mas o pré-tratamento com naltrindol reverteu parcialmente o efeito do LASSBio-1410 com $28,8 \pm 6,2$ s ($p < 0,05$ comparado ao LASSBio-1410 4 mg/kg) (Figura 16).

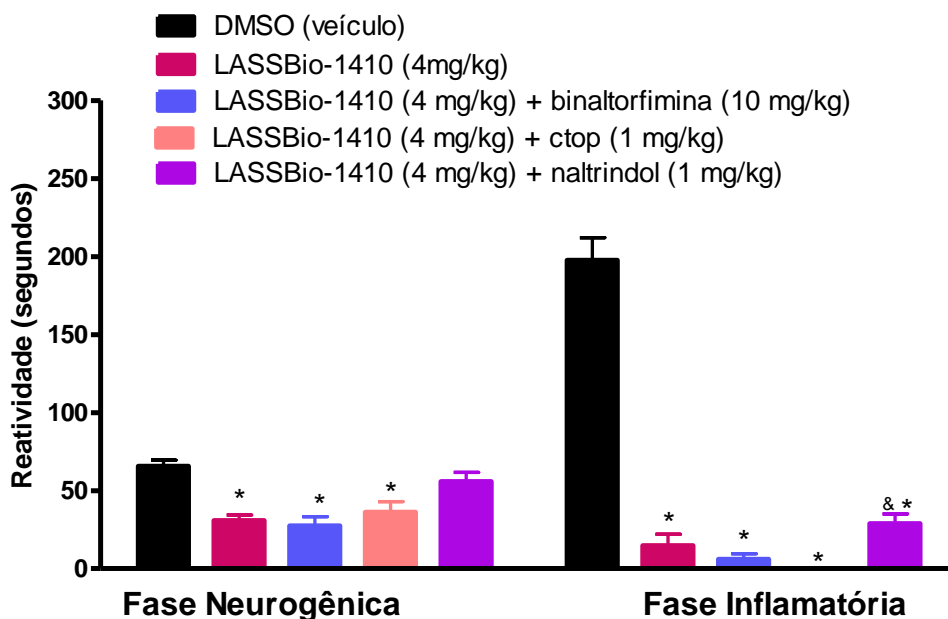


Figura 16: Avaliação da influência dos subtipos de receptores opióides no efeito antinociceptivo do LASSBio-1410 em camundongos. Binaltorfimina (antagonista κ opióide), ctop (antagonista μ opióide) e naltrindol (antagonista δ opióide). * $P < 0,05$ comparado ao DMSO. & $P < 0,05$ comparado ao LASSBio-1410. As substâncias foram administradas i.p, n=10.

Na tentativa de investigar se a ativação de receptores benzodiazepínicos estaria relacionada com o efeito antinociceptivo, foi utilizado o flumazenil (20 mg/kg), antagonista dos receptores benzodiazepínicos (Figura 17).

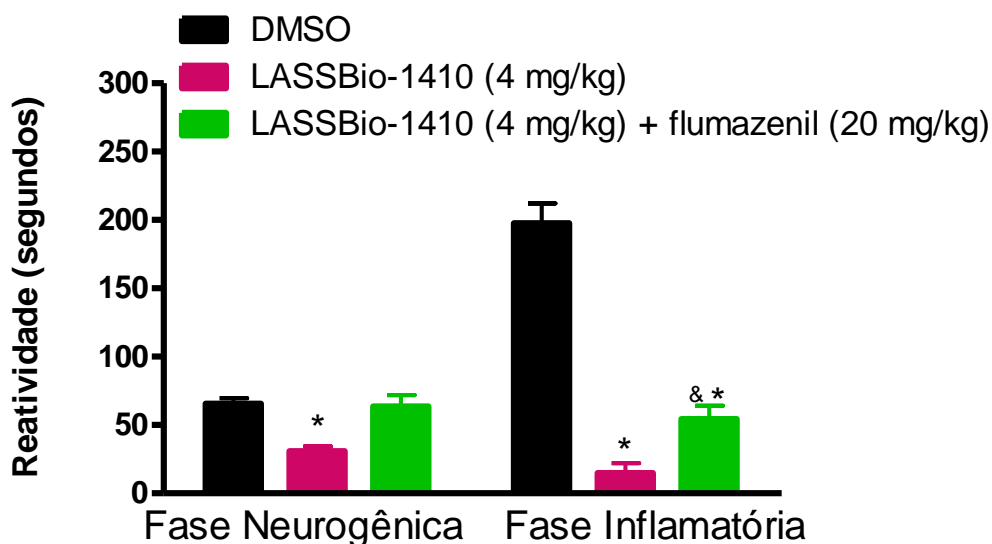


Figura 17: Avaliação da influência gabaérgica no efeito antinociceptivo do LASSBio-1410 em camundongos. * $P < 0,05$ comparado ao DMSO. & $P < 0,05$ comparado ao LASSBio-1410. As substâncias foram administradas i.p, n= 10.

O pré-tratamento com o flumazenil reverteu totalmente o efeito do derivado na fase neurogênica ($63,7 \pm 8,2$ s; $P < 0,05$ comparado ao LASSBio-1410 4 mg/kg) e parcialmente na fase inflamatória ($54,4 \pm 9,8$ s; $P < 0,05$ comparado ao LASSBio-1410 4 mg/kg) (Figura 17).

Para se investigar um possível efeito dual de LASSBio-1410, foi realizada a associação de naltrindol (1 mg/kg) e flumazenil (20 mg/kg). O pré-tratamento com o antagonista δ opióide e benzodiazepínico reverteu totalmente o efeito antinociceptivo de LASSBio-1410 4 mg/kg tanto na fase neurogênica ($92,8 \pm 6,3$ s, $P < 0,05$ comparado ao LASSBio-1410 4 mg/kg) quanto na fase inflamatória ($103,3 \pm 26,0$ s, $P < 0,05$ comparado ao LASSBio-1410 4 mg/kg) (Figura 18).

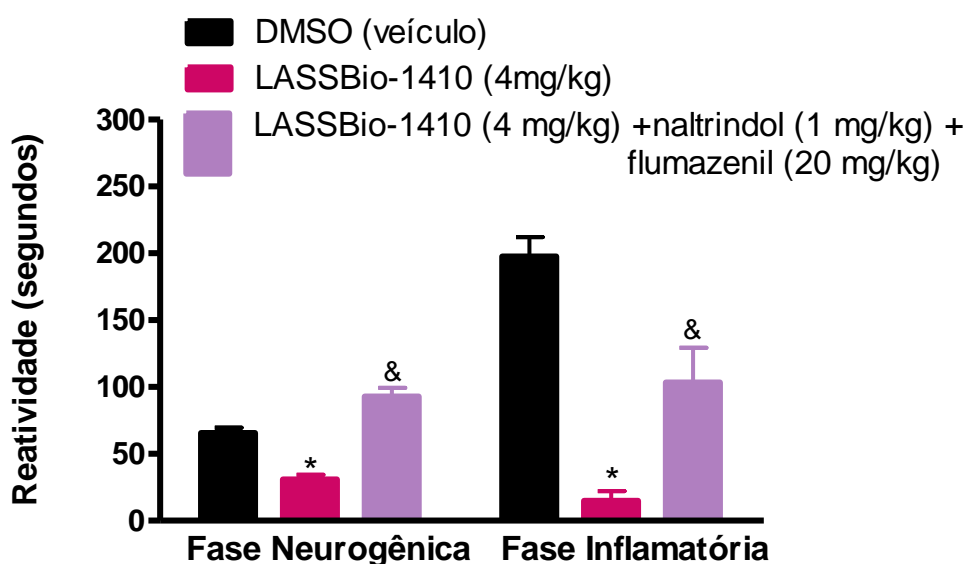


Figura 18. Avaliação da influência da associação do antagonista δ opióide e gabaérgico no efeito antinociceptivo do LASSBio-1410 em camundongos. * $P < 0,05$ comparado ao DMSO, & $P < 0,05$ comparado ao LASSBio-1410. As substâncias foram administradas i.p, n= 10.

4.2 LASSBio-1410 e efeito antinociceptivo central

O modelo da placa quente foi utilizado para avaliar um possível efeito analgésico central do derivado LASSBio-1410.

O tratamento com LASSBio-1410 (4 mg/kg) não aumentou significamente o tempo de permanência do animal na placa quente (Figura 19). Após 50 min da administração i.p. de LASSBio-1410 (4 mg/kg) a atividade analgésica máxima foi apenas de $11,0 \pm 3,9$ %. Ao contrário, a morfina, por apresentar efeito analgésico de ação central, foi utilizada como controle positivo e promoveu

95,5 ± 1,1 % (p<0,05) de atividade analgésica 10 minutos após sua administração (Figura 19)

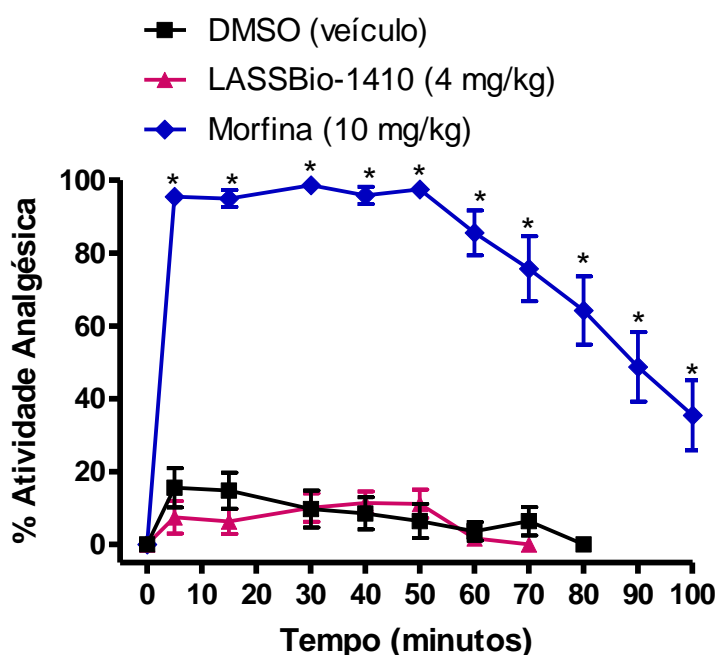


Figura 19. Avaliação da ação analgésica central de LASSBio-1410 em camundongos. * P< 0,05 comparado ao DMSO. As substâncias foram administradas i.p, n=10.

4.3 LASSBio-1410 e efeito anti-inflamatório

A carragenina é um agente químico que causa reação inflamatória local mensurável e reproduzível. Após a injeção de 0,1 ml de uma suspensão de carragenina 1%, observa-se formação de edema e aumento do volume da pata, medidos pelo pletismômetro.

O volume normal da pata do animal medido antes da administração da carragenina foi de 1,56 ± 0,06 ml. No entanto, após a injeção intraplantar da carragenina, no grupo tratado com DMSO, o volume foi aumentado para 2,82 ± 0,25 ml e permaneceu por todo período avaliado. A administração prévia do derivado LASSBio-1410 (4 mg/kg) preveniu a formação do edema indicando redução da inflamação mediada pela carragenina, com volume da pata semelhante ao valor normal por todo período avaliado (24 h) (Figura 20).

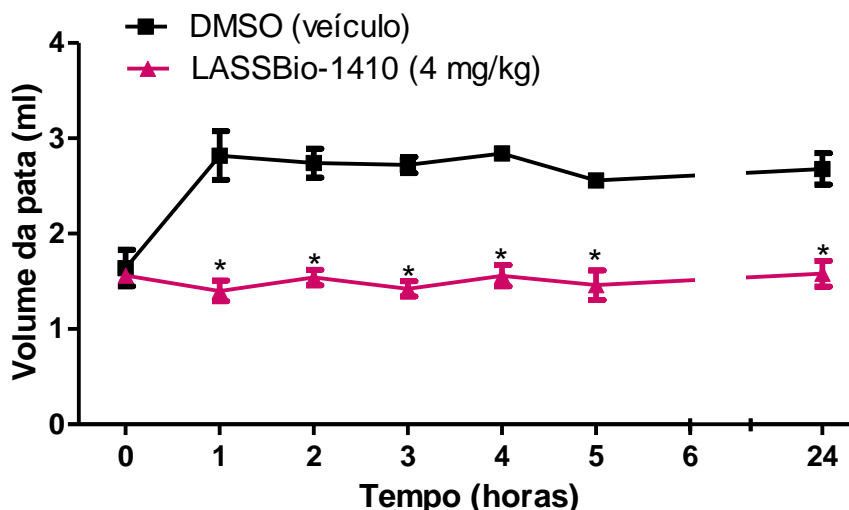


Figura 20. Avaliação da ação anti-inflamatória de LASSBio-1410 em ratos. * $P < 0,05$ comparado ao controle (antes da injeção de carragenina). As substâncias foram administradas i.p, $n = 6$.

4.4 LASSBio-1410 e analgesia mecânica

Para avaliar o efeito do derivado na hiperalgesia, foi utilizado o teste de compressão da pata de ratos desenvolvido por Randall e Selitto (1957). Neste teste, uma força em gramas (g), de magnitude crescente (16 g/s), foi continuamente aplicada sobre o dorso da pata posterior direita do animal e interrompida quando este retirava a pata ou apresentava reação de “retirada” do membro. A carragenina, por ser um agente químico indutor de resposta inflamatória, provocou redução do limiar de retirada da pata (LRP), de $278,0 \pm 8,0$ g (basal) para $116,0 \pm 11,2$ g (carragenina), uma vez que os mediadores da inflamação levam a sensibilização dos nociceptores (Figura 21). Após 15 min da administração de LASSBio-1410, o LRP passou a $236,00 \pm 17,20$ g ($p < 0,05$ comparado ao DMSO), valor semelhante ao basal, apresentando efeito anti-hiperalgésico por 24 h.

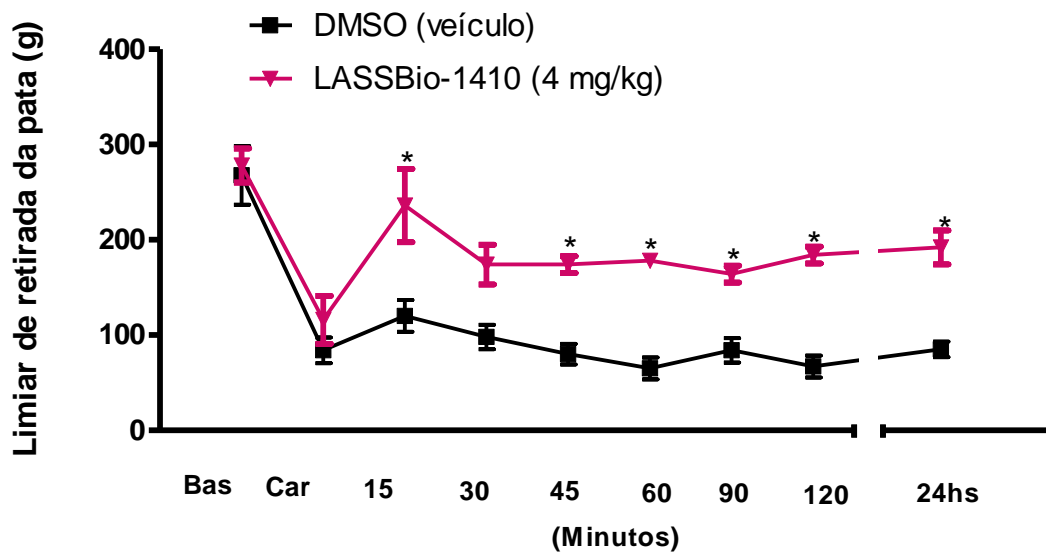


Figura 21. Efeito de LASSBio-1410 na hiperalgesia induzida pela carragenina em ratos. * $P < 0,05$ comparado ao DMSO. As substâncias foram administradas i.p, $n = 6$.

Os resultados também foram expressos em porcentagem de reversão da hiperalgesia para uma melhor observação do efeito de LASSBio-1410 em reverter a hiperalgesia mecânica.

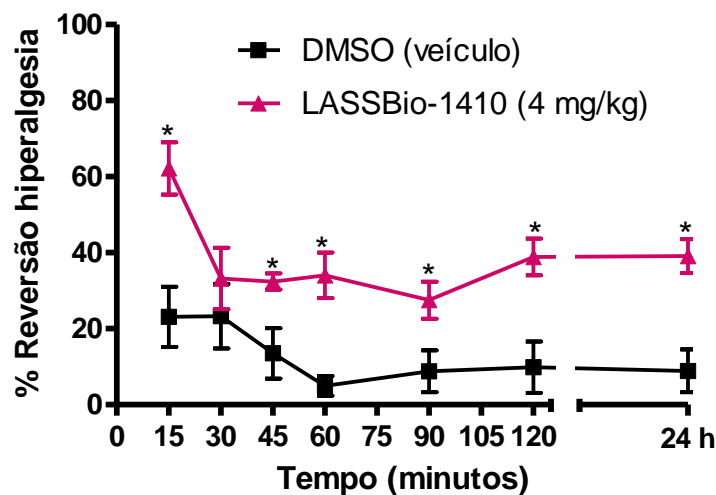


Figura 22. Reversão da hiperalgesia mecânica causada pela carragenina após tratamento com LASSBio-1410 em ratos. * $P < 0,05$ comparado ao DMSO. As substâncias foram administradas i.p, $n=6$.

A reversão da hiperalgesia mecânica pelo LASSBio-1410 foi confirmada com $62,2 \pm 6,9$ % ($p < 0,05$) 15 minutos após a administração (Figura 22) sendo este efeito ainda observado até 24 horas $39,10 \pm 4,43$ % ($p < 0,05$).

4.5 LASSBio-1410 e dor de origem inflamatória - contorções abdominais

O protocolo de contorções abdominais foi útil para se avaliar a atividade analgésica de LASSBio-1410 na dor de origem inflamatória visceral. Após a administração da solução de ácido acético i.p, foi observado aumento do número de contorções abdominais no grupo tratado com DMSO, $55,70 \pm 5,72$ contorções. (Figura 23)

Nos animais que foram tratados com LASSBio-1410 (4 mg/kg) i.p, houve redução do número de contorções abdominais para $15,50 \pm 2,54$ ($p < 0,05$), indicando um efeito na dor de origem inflamatória.

Na tentativa de se identificar qual via farmacológica estaria envolvida com esse efeito, foi realizado o pré-tratamento com o antagonista muscarínico atropina (2mg/kg), entretanto, este não alterou o efeito promovido por LASSBio-1410 (4 mg/kg), apresentando $18,50 \pm 2,57$ ($p < 0,05$) contorções abdominais (Figura 23).

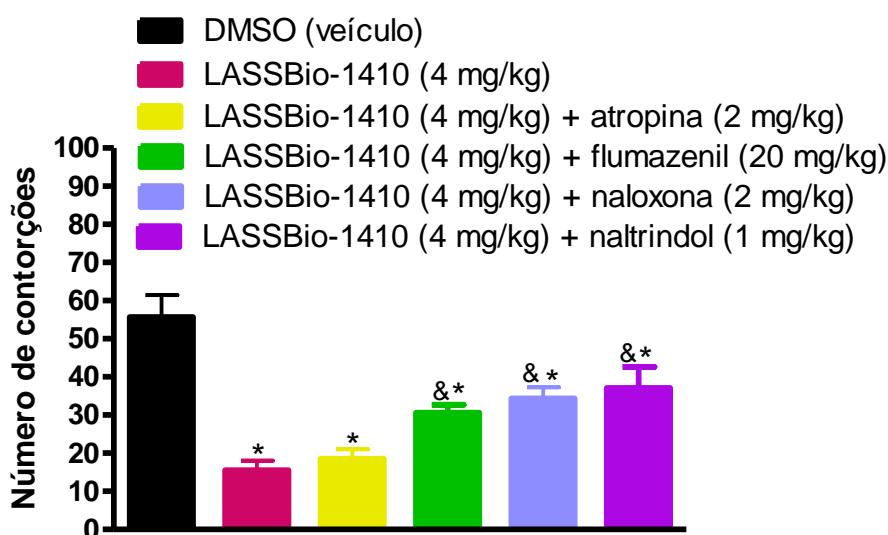


Figura 23 Avaliação da atividade analgésica de LASSBio-1410 no modelo de contorções abdominais em camundongos. * $P < 0,05$ comparado ao DMSO, & $P < 0,05$ comparado ao LASSBio-1410. As substâncias foram administradas i.p, $n=10$.

O flumazenil (20 mg/kg), antagonista dos receptores benzodiazepínicos, reverteu parcialmente o efeito de LASSBio-1410 (4 mg/kg) no número de contorções $30,60 \pm 2,10$ ($p < 0,05$). Assim como a naloxona (2 mg/kg),

antagonista opióide, também reverteu parcialmente o efeito do derivado, $34,40 \pm 2,91$ ($p < 0,05$) contorções abdominais e o naltrindol (1 mg/kg), $37,14 \pm 5,45$ ($p < 0,05$) contorções abdominais (Figura 23).

4.6 LASSBio-1410 em modelo animal de dor neuropática

4.6.1 Avaliação da hiperalgesia térmica em ratos ICC - protocolo preventivo

Ratos Wistar ao serem submetidos a cirurgia de injúria constritiva (ICC) apresentaram redução da latência de retirada da pata de $8,72 \pm 0,62 \text{ s}$ para $4,57 \pm 0,42 \text{ s}$ e para $5,17 \pm 0,57 \text{ s}$ após 3 e 7 dias do procedimento no grupo tratado com o veículo DMSO (ICC/DMSO). (Figura 24).

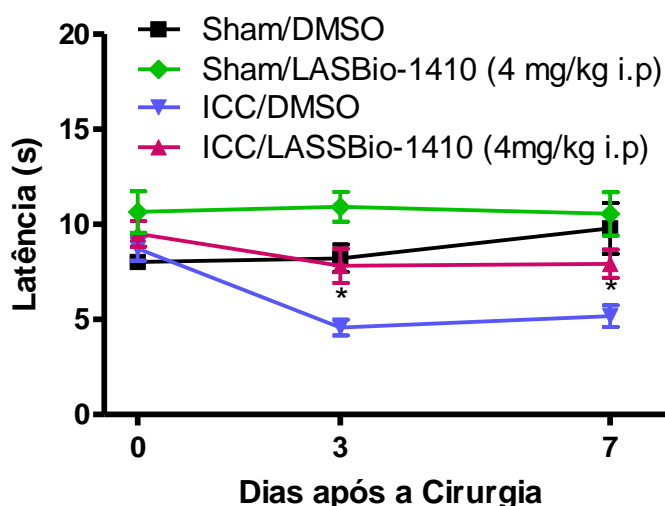


Figura 24: Efeito do tratamento com LASSBio-1410 (4 mg/kg i.p) no teste de retirada da pata, para avaliação da hiperalgesia térmica. LASSBio-1410 foi administrado diariamente aos ratos com ICC durante 7 dias **a partir do dia da cirurgia** (4 horas após o procedimento). * $P < 0,05$ comparado ao grupo tratado com ICC/DMSO no mesmo dia, $n = 6$.

O tratamento com o derivado LASSBio-1410 (4 mg/kg) impediu a redução da latência já no 3º dia de tratamento com $7,8 \pm 0,9 \text{ s}$ ($p < 0,05$) nos animais ICC quando comparado ao grupo ICC/DMSO no mesmo dia. Este efeito foi observado também no 7º dia de tratamento com latência de $7,9 \pm 0,7 \text{ s}$ ($p < 0,05$). Não foi observada alteração significativa nos animais falso-operados (Sham/DMSO) no 3º e 7º dia com latência de retirada da pata de $8,2 \pm 0,7 \text{ s}$ e $9,7 \pm 1,3 \text{ s}$, respectivamente, assim como no grupo tratado com LASSBio-1410

(4 mg/kg i.p) apresentando latência de $10,9 \pm 0,7$ s e $10,5 \pm 1,1$ s, respectivamente (Figura 24).

O efeito de LASSBio-1410 em ratos submetidos a ICC foi observado até 14 dias após a suspensão do tratamento. Observe na Figura 25 que a dor neuropática foi restabelecida no 14º dia de suspensão com redução da latência de retirada da pata para $6,6 \pm 0,1$ s. Este valor não foi significativamente diferente do grupo ICC/DMSO que apresentou latência de $4,2 \pm 0,2$ s.

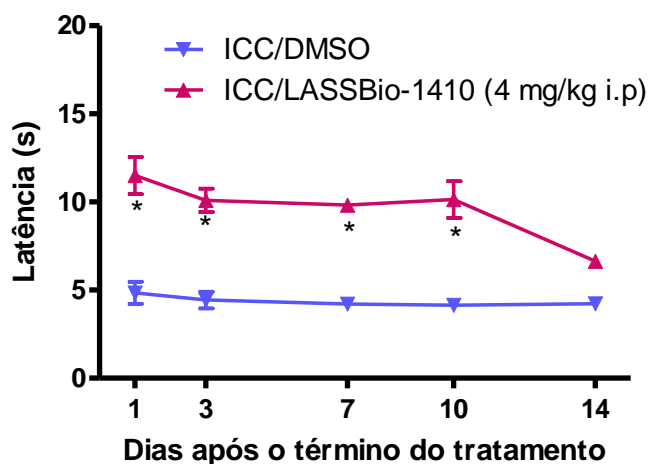


Figura 25: Latência observada após suspensão do tratamento com LASSBio-1410 (4 mg/kg i.p) em ratos submetidos a ICC. * $P < 0,05$ comparado ao grupo ICC/DMSO no mesmo dia, $n = 6$.

4.6.2 Avaliação da hiperalgesia térmica em ratos ICC - protocolo terapêutico

Assim como no protocolo preventivo, ratos Wistar com injúria constrictiva (ICC) e tratados com o veículo DMSO (ICC/DMSO) apresentaram redução da latência de retirada da pata de $9,85 \pm 0,61$ s para $4,56 \pm 0,49$ s e para $4,57 \pm 0,42$ s após 3 e 7 dias do procedimento. (Figura 26)

No tratamento terapêutico, iniciado após 7 dias da cirurgia, (Figura 26) LASSBio-1410 (10 mg/kg p.o) promoveu efeito anti-hiperalgésico no 10º dia $10,05 \pm 0,47$ s e no 14º dia $10,38 \pm 0,71$ s. Este efeito foi mantido até o 21º dia após a cirurgia $11,83 \pm 0,46$ s.

Nos animais falso-operados tratados com DMSO (Sham/DMSO), não foi observada alteração da latência no 3º dia após o procedimento $9,91 \pm 0,45$ s mantendo-se inalterado por 21 dias após a cirurgia, apresentando latência de $11,61 \pm 0,84$ s. No grupo falso-operado (Sham) tratado com LASSBio-1410 (10

mg/kg p.o) também não foi observada mudança na latência no 3º dia após o procedimento 9.96 ± 0.39 s, mantendo-se inalterada por 21 dias após a cirurgia, com latência de $10,46 \pm 0,49$ s (Figura 26).

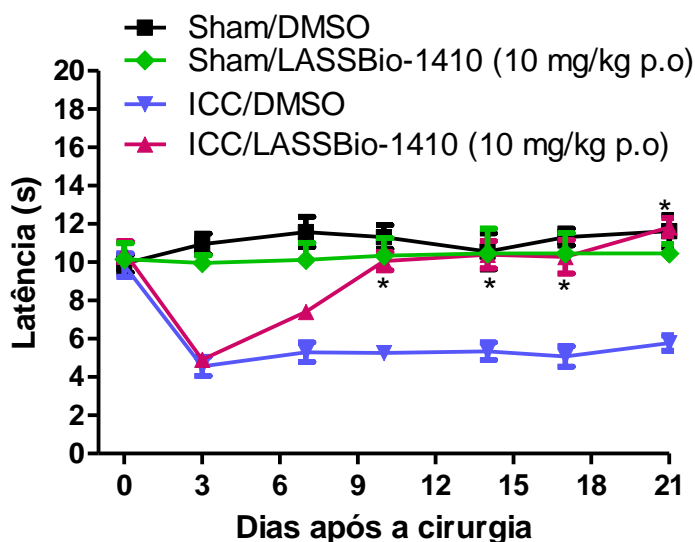


Figura 26: Efeito do tratamento com LASSBio-1410(10 mg/kg p.o) no teste de retirada da pata, para avaliação da hiperalgesia térmica. LASSBio-1410 foi administrado diariamente aos ratos sham e ICC durante 7 dias após desenvolvimento da hiperalgesia térmica (7 dias após o procedimento cirúrgico). *P<0,05 comparado ao grupo ICC/DMSO dia, n= 6.

4.6.3 Avaliação da alodinia mecânica em ratos ICC - protocolo terapêutico

Na avaliação da alodinia mecânica (Figura 27), 7 dias após a cirurgia, os animais com ICC, no grupo tratado com DMSO, apresentaram diminuição do limiar de retirada da pata (g) de $41,2 \pm 1,2$ g para $20,40 \pm 0,73$ g no 3º dia após a cirurgia, que se mantiveram reduzidos por 21 dias, com LRP de $22,66 \pm 2,09$ g.

Nos animais com ICC tratados com LASSBio-1410 (10 mg/kg p.o), foi observado o mesmo padrão de resposta do grupo DMSO, não sendo revertida a alodinia mecânica em nenhum dia avaliado, $18, 51 \pm 1,95$ g, no 7º dia, que se manteve nos 21 dias após a cirurgia $27,50 \pm 0,98$ g (Figura 27).

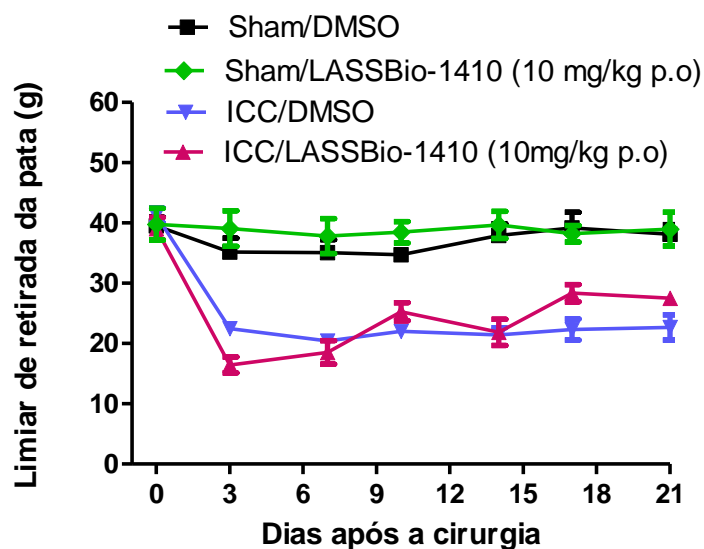


Figura 27. Efeito do tratamento com LASSBio-1410 (10 mg/kg p.o) ou DMSO na alodínia mecânica. LASSBio-1410 foi administrado por via oral diariamente aos ratos sham e ICC durante 7 dias após o desenvolvimento da alodínia mecânica (7 dias após o procedimento cirúrgico) n= 6.

Nos animais falso-operados tratados com DMSO (Sham/DMSO), não foi observada alteração do LRP no 7º dia após o procedimento, $35,0 \pm 2,1$ g, permanecendo assim por 21 dias após a cirurgia, apresentando LRP de $38,1 \pm 1,6$ g (Figura 27).

No grupo falso-operado (Sham) tratado com LASSBio-1410 (10 mg/kg p.o) também não foi observada mudança no LRP no 7º dia após o procedimento, com LRP de $37,8 \pm 2,9$ g, mantendo-se por 21 dias após a cirurgia, com LRP de $38,9 \pm 2,7$ g. (Figura 27)

4.6.4 Avaliação da hiperalgia térmica em ratos com LNE - protocolo preventivo

Na ligadura do nervo espinhal, os animais do grupo LNE/DMSO tiveram uma redução da latência de $9,93 \pm 0,63$ s antes da cirurgia para $5,40 \pm 0,27$ s no 3º dia e $3,95 \pm 0,27$ s após 7 dias da LNE (Figura 28). Nos animais tratados, desde o primeiro dia da LNE, com o LASSBio-1410 (4 mg/kg i.p) houve o

impedimento da hiperalgesia térmica (Figura 28), no 3º dia, $10,16 \pm 0,37$ s, e no 7º dia após a LNE $11,26 \pm 0,70$ s.

No grupo Sham/DMSO não houve alteração da latência após a LNE, mantendo a latência em $10,7 \pm 0,5$ s, no 3º dia após a LNE, e $10,1 \pm 1,1$ s, no 7º dia após a cirurgia. Nos animais falso-operados (Sham), tratados com LASSBio-1410 4 mg/kg i.p), não foi observada alteração da latência no 3º dia após a LNE, $10,50 \pm 0,53$ s e no 7º dia após a LNE $10,78 \pm 0,69$ s (Figura 28).

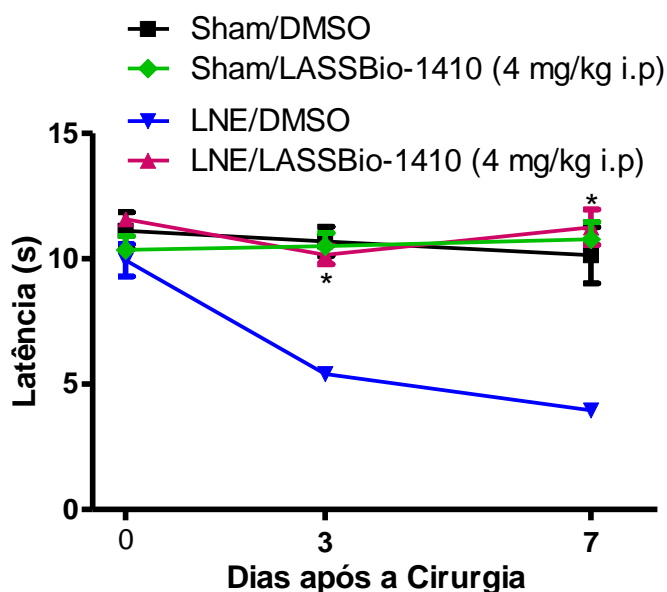


Figura 28. Efeito do tratamento com LASSBio-1410 (4 mg/kg i.p) no teste de retirada da pata, para avaliação da hiperalgesia térmica. LASSBio-1410 foi administrado diariamente aos ratos com LNE durante 7 dias a partir do dia da cirurgia (4 horas após o procedimento). * $P < 0,05$ comparado ao grupo LNE/DMSO no mesmo dia, $n = 6$.

4.6.5 Avaliação da alodinia mecânica em ratos com LNE - protocolo preventivo

Nos animais falso-operados tratados com DMSO (Sham/DMSO), não foi observada alteração do LRP no 3º dia após o procedimento, $41,9,0 \pm 2,4$ g, e no 7º dia após a cirurgia, apresentando LRP de $43,8 \pm 1,9$ g (Figura 29).

No grupo falso-operado (Sham) tratado com LASSBio-1410 (10 mg/kg p.o) também não foi observada mudança no LRP no 3º dia após o

procedimento, com LRP de $45,0 \pm 1,3$ g, e no 7º dia após a cirurgia, com LRP de $40,8 \pm 1,9$ g. (Figura 29)

Na avaliação da alodinia mecânica, após a LNE (Figura 29), o grupo que recebeu DMSO i.p. desenvolveu a alodinia 3 dias após a cirurgia $24,47 \pm 1,71$ g ($p < 0,05$) que se manteve por 7 dias $24,75 \pm 1,39$ g ($p < 0,05$). Nos animais com LNE e tratados com LASSBio-1410 (4 mg/kg i.p), não foi observada a prevenção da alodínia mecânica nos animais (Figura 29), reduzindo o LRP de $46,7 \pm 1,4$ g para $30,8 \pm 1,2$ g, no 3º dia e $31,9 \pm 3,4$ g, no 7º dia após a LNE.

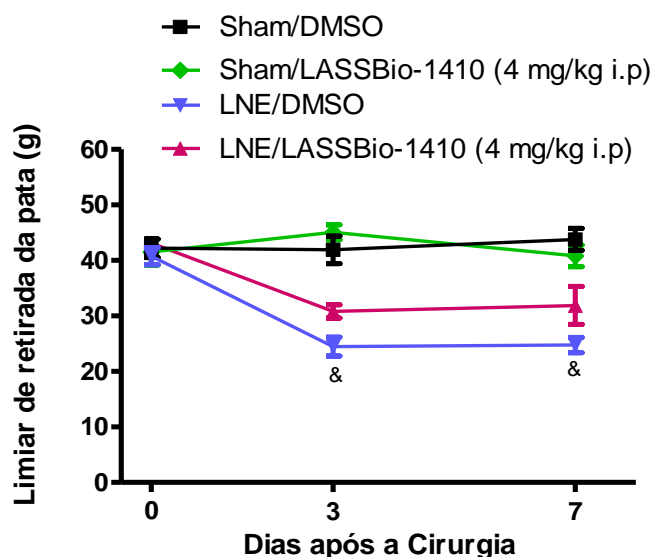


Figura 29. Efeito do tratamento com LASSBio-1410 (4 mg/kg i.p) na alodínia mecânica. LASSBio-1410 foi administrado diariamente aos ratos sham e LNE durante 7 dias a partir do dia da cirurgia (4 horas após o procedimento). & $P < 0,05$ comparado ao dia 0, antes da cirurgia. $n = 6$.

4.6.6 Avaliação da hiperalgesia térmica em ratos LNE - protocolo terapêutico

No grupo de animais com LNE tratados com DMSO, a latência controle foi reduzida de $10,1 \pm 0,5$ s para $5,9 \pm 0,3$ s no sétimo dia após a cirurgia que se manteve reduzida por 14 dias, com latência de $5,9 \pm 0,1$ s, confirmando a eficácia do protocolo (Figura 30)

No tratamento terapêutico, LASSBio-1410 (10 mg/kg p.o), reverteu a hiperalgesia térmica de $5,8 \pm 0,2$ s no 3º dia da cirurgia para $11,8 \pm 0,4$ s no 14º dia após o procedimento, não apresentando diferença estatística quando comparado ao dia 0, controle, antes da cirurgia $12,2 \pm 0,3$ s. (Figura 30)

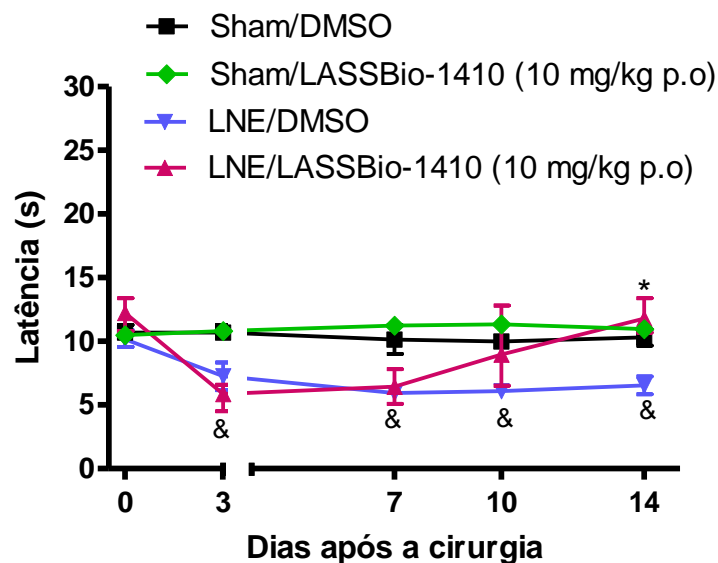


Figura 30. Efeito do tratamento com LASSBio-1410 (10 mg/kg p.o) no teste de retirada da pata, para avaliação da hiperalgesia térmica. LASSBio-1410 foi administrado diariamente aos ratos sham e LNE durante 7 dias após desenvolvimento da hiperalgesia térmica (7 dias após o procedimento cirúrgico). * $P < 0,05$ comparado ao grupo LNE/DMSO no mesmo dia. & $P < 0,05$ comparado ao dia 0, antes da cirurgia $n = 6$.

4.6.7 Avaliação da alodinia mecânica em ratos LNE - protocolo terapêutico

O grupo de animais submetidos a LNE e tratados com DMSO apresentou redução do limiar de retirada da pata de $43,8 \pm 2,2$ g para $24,4 \pm 1,7$ g no 7º dia que se manteve por 14 dias após a cirurgia $23,5 \pm 1,2$ g.

Assim como no tratamento preventivo, LASSBio-1410 (10mg/kg p.o), não reverteu a alodinia mecânica (Figura 31), em nenhum dia avaliado, $26,0 \pm 3,7$ g no 7º dia, assim como no 10º dia após a cirurgia $24,9 \pm 4,6$ g e no 14º dia $27,8 \pm 2,0$ g.

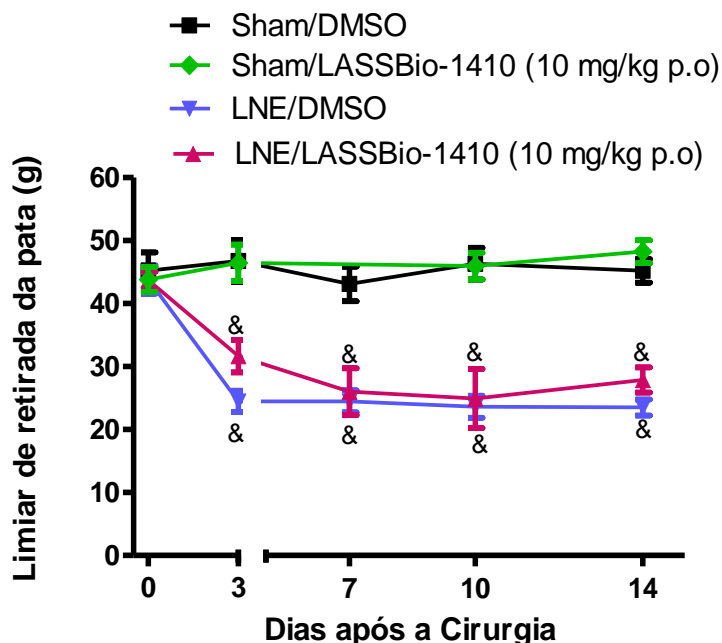


Figura 31. Efeito do tratamento com LASSBio-1410 10 mg/kg na alodínia mecânica. LASSBio-1410 foi administrado por via oral diariamente aos ratos sham e LNE durante 7 dias após o desenvolvimento da alodínia mecânica (7 dias após o procedimento cirúrgico). & $P < 0,05$ comparado ao dia 0, antes da cirurgia $n = 6$.

Como LASSBio-1410 promoveu efeito antinociceptivo e reduziu a dor neuropática em dois modelos experimentais, numa etapa seguinte foi importante avaliar se o tratamento com LASSBio-1410 teria algum efeito no sistema nervoso central, como ansiólise ou sedação.

4.7 LASSBio-1410 e atividade ansiolítica

As respostas comportamentais no teste do labirinto em cruz são ferramentas essenciais na avaliação da atividade ansiolítica de uma substância. Nos 5 minutos de permanência dos animais no labirinto, estes demonstram respostas comportamentais de ansiedade, como o tempo gasto e as entradas feitas nos braços abertos e fechados. A avaliação do comportamento do animal reflete a um conflito entre a preferência do roedor para as áreas protegidas (por exemplo, nos braços fechados) e sua motivação inata para explorar novos ambientes, demonstrando um comportamento ansiolítico quando há aumento do tempo de permanência nos braços abertos e/ou entradas nos braços abertos.

LASSBio-1410 (3 mg/kg) aumentou significativamente a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos de $16,8 \pm 3,9$ % (animais tratados com o veículo DMSO, utilizado como controle) para $58,3 \pm 11,2$ % assim como a porcentagem de entrada nos braços abertos de $48,70 \pm 5,80$ %, no grupo do DMSO (veículo) para $81,60 \pm 7,90$ %. (Tabela 3) Estes resultados são indicativos de que LASSBio-1410 apresenta efeito ansiolítico por alterar o comportamento exploratório do animal em comparação ao controle (Tabela 3 e Figura 32)

Tabela 3. Avaliação da atividade ansiolítica de LASSBio-1410 através do uso do labirinto em cruz elevado (*Plus Maze*)

| | % Tempo braços abertos | % Entradas braços abertos | % Entradas braços fechados | Nº. Entradas totais |
|--|------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------|
| DMSO (veículo) | $16,8 \pm 3,9$ | $48,7 \pm 5,8$ | $57,3 \pm 5,0$ | $10,4 \pm 1,4$ |
| Midazolam (2 mg/kg) | $63,3 \pm 10,5^*$ | $76,8 \pm 8,9^*$ | $23,0 \pm 8,0^*$ | $5,8 \pm 1,4^*$ |
| LASSBio-1410 (2 mg/kg) | $45,3 \pm 10,9^*$ | $72,1 \pm 7,9^*$ | $35,3 \pm 9,6$ | $7,4 \pm 1,7$ |
| LASSBio-1410 (3 mg/kg) | $58,3 \pm 11,2^*$ | $81,6 \pm 7,9^*$ | $16,5 \pm 7,3^*$ | $5,7 \pm 1,4^*$ |
| LASSBio-1410 (3 mg/kg) + Naloxona (2 mg/kg) | $14,7 \pm 5,5$ | $31,8 \pm 8,1$ | $55,4 \pm 10,3$ | $11,8 \pm 2,4$ |

*P<0,05 comparado ao DMSO (veículo)

Para investigar se a ativação de receptores opióides estaria envolvido com o efeito ansiolítico observado, foi realizado o pré-tratamento com o antagonista opióide não seletivo naloxona (2 mg/kg i.p.). Este reverteu o efeito ansiolítico promovido pelo derivado, reduzindo a porcentagem de entrada nos braços abertos para $31,8 \pm 8,1$ % assim como a porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos para $14,7 \pm 5,5$ %, indicando que a ativação de receptores opióides no SNC está relacionado com o efeito ansiolítico promovido por LASSBio-1410 (Tabela 3 e Figura 32).

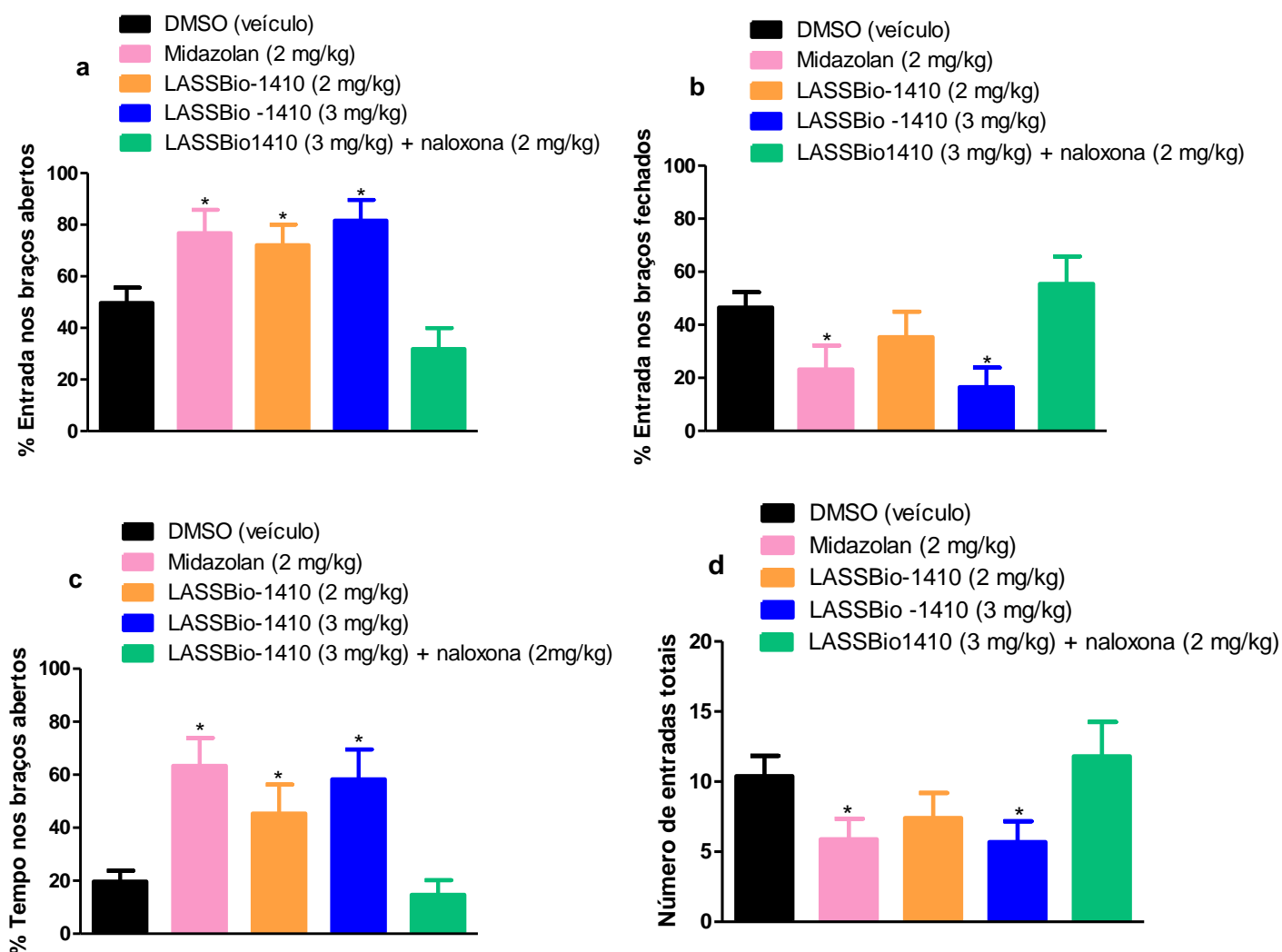


Figura 32. Efeito ansiolítico do derivado LASSBio-1410 no labirinto de cruz elevado (Plus Maze) em camundongos. * $P < 0,05$ comparado ao DMSO. As substâncias foram administradas i.p, $n = 10$.

4.8 LASSBio-1410 e efeito sedativo

4.8.1 Efeito sedativo em Ratos Wistar

O modelo do campo aberto foi introduzido como uma forma de avaliar o comportamento emocional, o teste fornece uma oportunidade para se avaliar sistematicamente a exploração do ambiente, a atividade locomotora geral, e proporcionar uma avaliação inicial para o comportamento relacionado à ansiedade em roedores. A atividade sedativa de LASSBio-1410 em ratos

Wistar foi investigada, na tentativa de se investigar um possível efeito central que pudesse comprometer a avaliação do derivado em modelo de dor neuropática.

Nesta etapa do estudo foi investigado se o tratamento com LASSBio-1410 nas doses de 4 mg/kg i.p e 10 mg/kg p.o induziriam algum efeito sedativo que prejudicasse a avaliação do derivado na dor neuropática. O LASSBio-1410 (4 mg/kg i.p) não provocou efeito sedativo, com $187,70 \pm 11,89$ movimentos/min, assim como também na dose de 10 mg/kg p.o, $201,20 \pm 13,39$ movimentos/min, (Figura 33) portanto, não impediu que o derivado fosse avaliado em ratos, em modelos de dor.

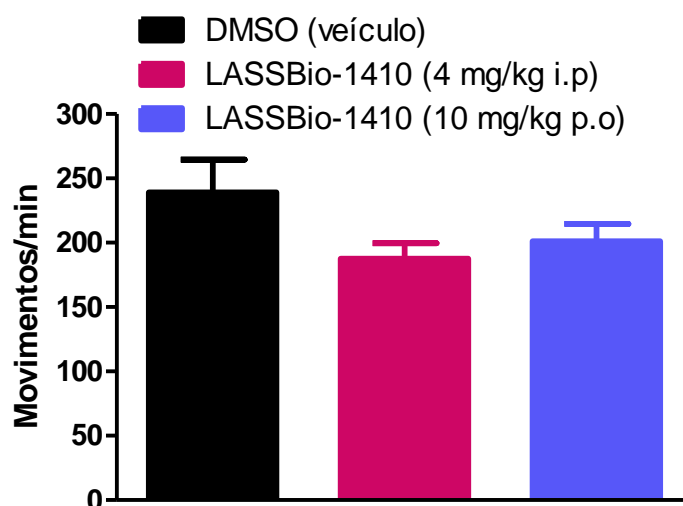


Figura 33 Avaliação da atividade sedativa em ratos após tratamento com LASSBio-1410 utilizando o modelo de campo aberto. n= 6.

4.8.2 Efeito sedativo em Camundongos Swiss

Diferenças acentuadas nos comportamentos de espécies e linhagens diferentes mostram que a constituição genética é um fator importante no comportamento exploratório e ansiedade de roedores, portanto, foi importante investigar a atividade sedativa em um segundo gênero de roedor, o camundongo, da espécie *Mus musculus*, da linhagem Swiss.

O derivado LASSBio-1410 promoveu sedação de forma dose dependente observada através da avaliação da atividade motora, indicando possível efeito central do derivado (Figura 34). A atividade motora expressa em movimentos/min foi de $214,4 \pm 18,9$ quando animais foram tratados com

veículo (DMSO). LASSBio-1410 não apresentou efeito significativo quando comparado ao controle na dose de 2 mg/kg, ($148,0 \pm 13,8$ movimentos/min), assim como na dose de 3 mg/kg ($160,1 \pm 10,4$ movimentos/min). O derivado LASSBio-1410 (4 mg/kg) promoveu atividade sedativa, reduzindo os movimentos para $54,6 \pm 6,5$ movimentos/min.

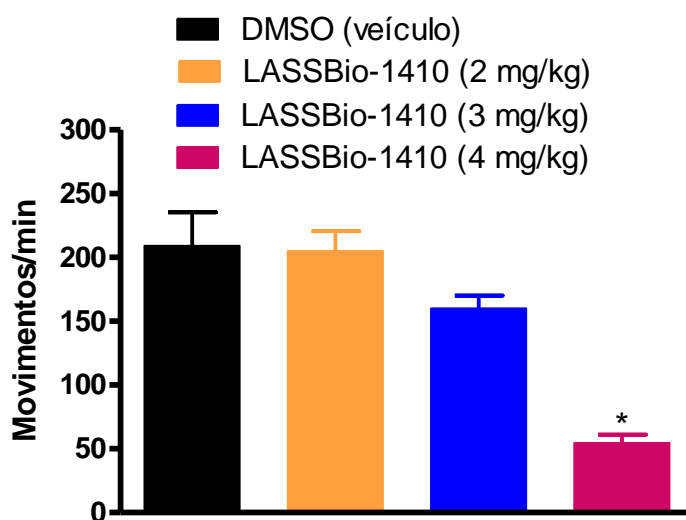


Figura 34. Avaliação da atividade sedativa de LASSBio-1410 em camundongos. * $P < 0,05$ comparado ao DMSO. As substâncias foram administradas i.p, $n = 10$.

Após a evidência de que LASSBio-1410 provocava sedação em camundongos *Swiss*, numa etapa seguinte foi realizada a identificação das prováveis vias envolvidas para este efeito. Inicialmente, a via muscarínica foi investigada, e a fisostigmina (0,2 mg/kg) foi utilizada como controle positivo, indicando que quando a via muscarínica está ativada há a diminuição do número de movimentos realizados pelo animal. Após tratamento com fisostigmina a atividade foi reduzida para $99,6 \pm 15,9$ movimentos/min (Figura 35). O pré-tratamento com a atropina (2 mg/kg) não reverteu o efeito sedativo do derivado, permanecendo reduzida a atividade motora em $73,9 \pm 19,4$ movimentos/min; sugerindo que a via muscarínica provavelmente não está relacionada com a atividade sedativa do LASSBio-1410 (Figura 35).

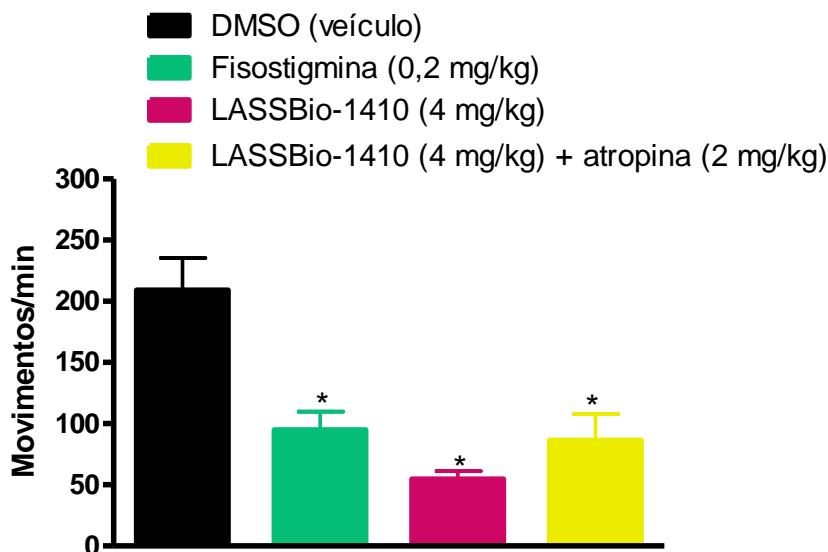


Figura 35. Avaliação do envolvimento da via muscarínica na ação sedativa induzida pelo LASSBio-1410 em camundongos. * $P < 0,05$ comparado ao DMSO. As substâncias foram administradas i.p, $n=10$.

O pré-tratamento com o antagonista opióide naloxona (2 mg/kg) reverteu de forma significativa o efeito do derivado no campo aberto com $98,1 \pm 20,8$ movimentos/min. Este fato evidencia que a possível ação farmacológica do LASSBio-1410 seja através da via opióide. (Figura 36).

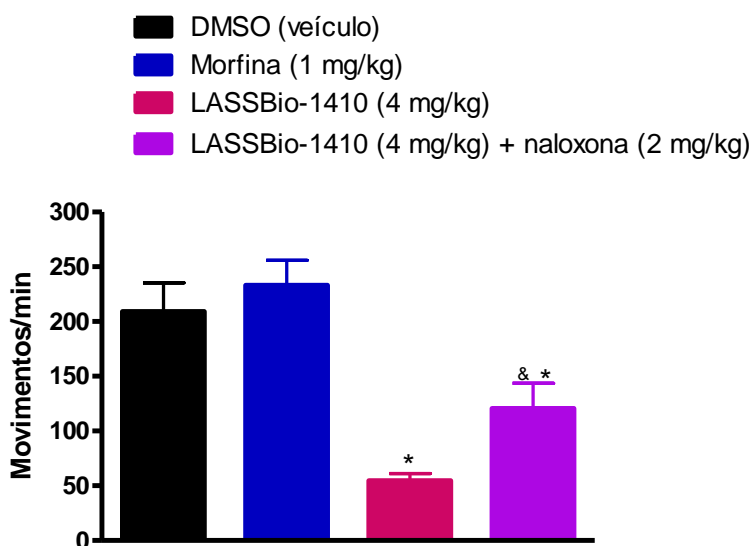


Figura 36. Avaliação do envolvimento da via opióide na ação sedativa induzida pelo LASSBio-1410 em camundongos. * $P < 0,05$ comparado ao DMSO, & $P < 0,05$ comparado ao LASSBio-1410. As substâncias foram administradas i.p, $n= 10$.

Ao utilizar os antagonistas seletivos para os subtipos do receptor opióide (Figura 37), foi observado que apenas o naltrindol que é um antagonista de

receptor δ opióide reverteu parcialmente o efeito sedativo promovido por LASSBio-1410 pois a atividade motora foi de $114,2 \pm 22,6$ movimentos/min. No entanto, após pré-tratamento com o CTOP e binaltorfimina a atividade motora permaneceu reduzida em $67,4 \pm 23,0$ ($p < 0,05$) e $22,9 \pm 4,7$ ($P < 0,05$) movimentos/min, respectivamente.

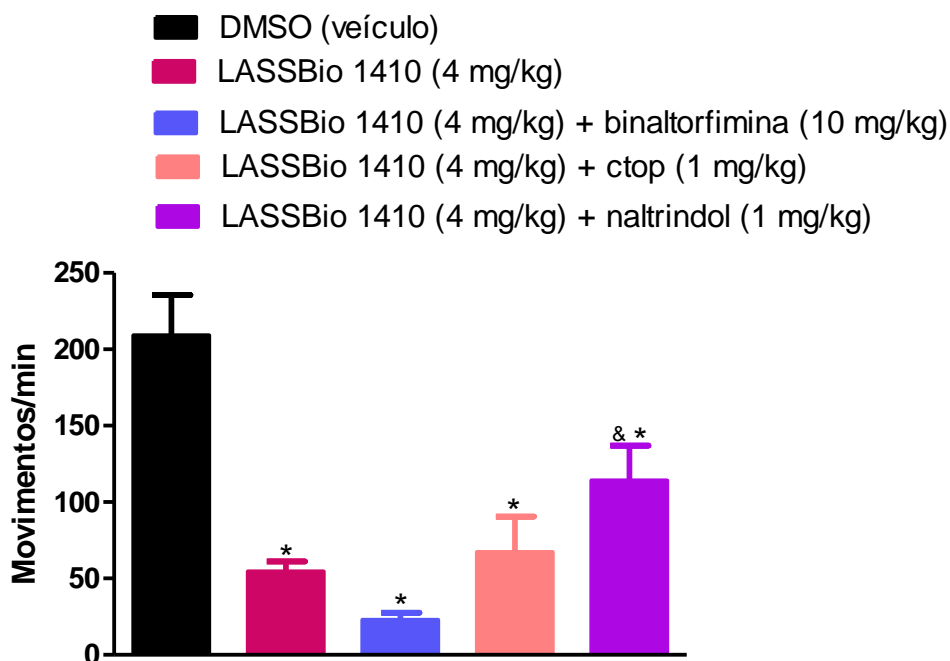


Figura 37. Avaliação do envolvimento da via opióide na ação sedativa induzida pelo LASSBio-1410 em camundongos. Binaltorfimina (antagonista κ opióide), ctop (antagonista μ opióide) e naltrindol (antagonista δ opióide)* $P < 0,05$ comparado ao DMSO, & $P < 0,05$ comparado ao LASSBio-1410. As substâncias foram administradas i.p, $n=10$.

Ao se investigar a contribuição dos receptores benzodiazepínicos, observou-se que o flumazenil (20 mg/kg) não interferiu com a ação sedativa do LASSBio-1410 (4 mg/kg) pois a atividade motora foi mantida reduzida em $75,4 \pm 19,3$ movimentos/min ($p < 0,05$; Figura 38).

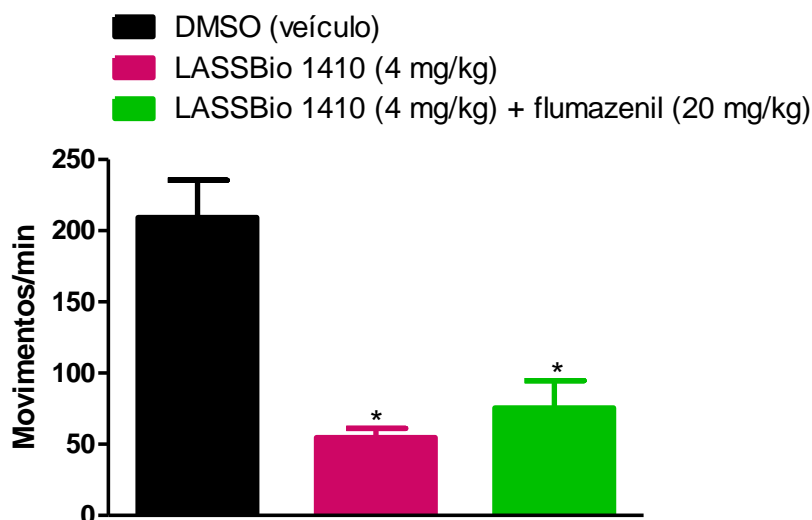


Figura 38. Avaliação do envolvimento da via gabaérgica na ação sedativa induzida pelo LASSBio-1410 em camundongos. * $P < 0,05$ comparado ao DMSO. As substâncias foram administradas i.p, $n = 10$.

4.9 LASSBio-1410 e avaliação da coordenação motora

O teste do rota-rod representa uma abordagem na caracterização fenotípica motora. O tempo em que o animal permanece na barra giratória reflete o produto de cinco grandes fatores envolvidos na função motora do camundongo: 1. Equilíbrio dinâmico, 2. Coordenação motora 3. Planejamento motor 4. Aprendizagem motora 5. Condições físicas gerais (desempenho cardio-pulmonar).

Este teste foi utilizado para avaliar e identificar efeitos adversos motores e sistêmicos, que poderiam influenciar nas respostas comportamentais. A Figura 39 mostra que o LASSBio-1410 na dose de 2 mg/kg ($180,0 \pm 0,0$ s), 3 mg/kg ($179,6 \pm 0,3$ s) e 4 mg/kg ($177,8 \pm 2,1$ s) não alterou o tempo de permanência dos animais na barra giratória, semelhante ao veículo DMSO, ($180,0 \pm 0,0$ s) até 120 minutos após a administração indicando que não há comprometimento de estruturas centrais do sistema motor (Figura 39). O diazepam (10 mg/kg) utilizado como controle positivo, reduziu significativamente o tempo de permanência dos animais, 15 minutos ($86,6 \pm 16,5$ s) e 30 minutos ($115,7 \pm 17,0$ s) após a administração ($p < 0,05$).

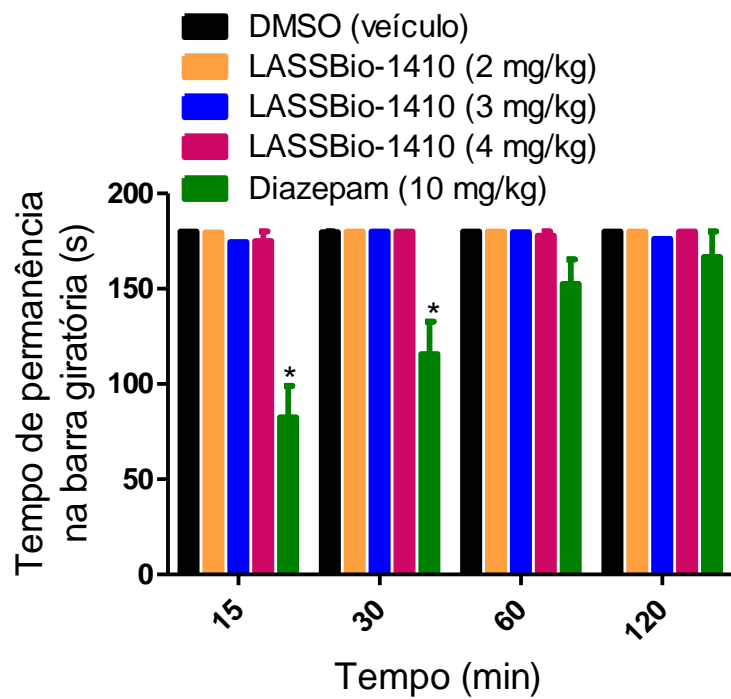


Figura 39. Avaliação da coordenação motora de camundongos tratados com LASSBio-1410. * $P < 0,05$ comparado ao DMSO. As substâncias foram administradas i.p, $n = 10$.

Discussão

5 Discussão

A busca de novos candidatos a protótipos de fármacos que modulassem as desordens de ansiedade e dor crônica culminou na identificação de novos padrões estruturais, derivados pirazolo[3,4-b]pirrolo[3,4-d]piridínicos, desenhados por analogia estrutural ao zolpidem. O derivado LASSBio-873 apresentou atividade sedativa através da redução da atividade motora, sendo este efeito revertido pela atropina e a pirenzepina. Também apresentou atividade antinociceptiva em protocolos de dor aguda (teste de Hargreaves e formalina) e crônica, inibindo o desenvolvimento da hiperalgesia térmica em modelos de injúria constritiva crônica (ICC) e ligadura do nervo espinhal (LNE) quando administrados por via oral ou intraperitoneal, e também revertendo a hiperalgesia já instalada. (MENDES et al, 2009)

A síntese de LASSBio-1410 foi realizada através de uma simplificação molecular do LASSBio-873 na intenção inicial de se investigar a importância desta porção para os efeitos observados com LASSBio-873. LASSBio-1410 foi avaliado em diferentes protocolos experimentais para se investigar efeitos na dor aguda e crônica.

LASSBio-1410 promoveu antinocicepção tanto na fase neurogênica quanto na fase inflamatória de forma dose-dependente no teste da formalina. Ao se utilizar a naloxona com o intuito de se investigar a atuação do derivado pela via opióide, foi observada a reversão do efeito em ambas as fases. Este fato indica que a via opióide pode estar relacionada com o efeito analgésico de LASSBio-1410. O naltrindol, que é um antagonista δ opióide reverteu significativamente o efeito promovido por LASSBio-1410, indicando que a ativação de receptores delta opióides seria responsável pelo efeito antinociceptivo do derivado. Adicionalmente, flumazenil, antagonista da via benzodiazepínica também reverteu completamente o efeito antinociceptivo na fase neurogênica e parcialmente na fase inflamatória, sugerindo a participação adicional da via gabaérgica para ação analgésica de LASSBio-1410. Tanto os receptores delta-opióide como os receptores gabaérgicos parecem participar para que o LASSBio-1410 exerça seu efeito antinociceptivo. Então, foi realizada a associação de flumazenil e naltrindol que reverteu completamente o

efeito do derivado em ambas as fases do teste da formalina, indicando que há importante envolvimento das vias opióide e gabaérgica.

A comunicação da informação nociceptiva entre neurônios ocorre por mediadores químicos (neurotransmissores) que são: aminoácidos excitatórios ou inibitórios e neuropeptídeos que são produzidos, armazenados e liberados tanto nas terminações dos nervos aferentes como nos neurônios do corno dorsal. Os principais aminoácidos excitatórios são o glutamato e o aspartato, porém, em fibras aferentes do tipo C também se encontra uma variedade de neuropeptídeos como a substância P, neurotensina, peptídeo relacionado com o gene da calcitonina e colecistocinina (LAMONT e TRANQUILLI, 2000). A ativação do interneurônio gabaérgico na via ascendente de transmissão da dor inibe ou diminui a propagação do sinal doloroso na via aferente e, portanto, LASSBio-1410 pode estar ativando tanto mecanismos que modulam a via ascendente da dor, quanto a via inibitória descendente da dor. Em contraste aos receptores μ opióide, os agonistas dos receptores δ opióide modulam fracamente a dor nociceptiva aguda, no entanto, são eficazes em condições que envolvam a dor persistente, o estresse e inflamação. Mecanismos subjacentes ao aumento da eficácia nessas condições envolvem o aumento da densidade dos receptores delta opióides externalizados e melhor acoplamento de sinalizadores à esses receptores (PRADHAN et al, 2013)

O método da administração de ácido acético no peritônio foi importante para avaliar e comprovar o efeito antinociceptivo de LASSBio-1410 na dor de origem inflamatória. O ácido acético atua indiretamente liberando mediadores endógenos como a bradicinina, serotonina, histamina e prostaglandinas, que estão envolvidos na modulação da nocicepção. A nocicepção induzida pelo ácido acético também depende da liberação de citocinas pelos macrófagos e basófilos residentes na cavidade abdominal, que em conjunto com outros mediadores induzem a nocicepção deste modelo (WHITTLE, 1964). Portanto, LASSBio-1410 exerceu efeito analgésico na dor de origem inflamatória confirmado pela redução do número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, e este efeito possivelmente está relacionado com a ativação de receptores δ opióide.

Mediadores pró-inflamatórios como prostaglandinas e citocinas, podem desencadear a dor de origem inflamatória devido a sensibilização de

nociceptores em fibras A δ e C; e em consequência, potenciais de ação são desencadeados por estímulos sublimiares, levando a hiperalgesia. O sistema imune utiliza mecanismos de migração celular não apenas para combater patógenos, mas também para controlar a dor e inflamação após a injúria. Alguns autores demonstraram que a dor inflamatória periférica pode ser controlada com a liberação de peptídeos opióides por células imunológicas. (HASHIMI et al, 2013)

Um dos principais métodos para investigar a propriedade anti-inflamatória de uma substância é a avaliação do edema de pata induzido pela carragenina. Este edema depende da participação de cininas e leucócitos com seus fatores pró-inflamatórios, incluindo prostaglandinas (DAMAS et al, 1986). Os principais componentes da inflamação são a formação de edema, infiltração de leucócitos e formação de granuloma. A formação de edema na pata é o resultado de um sinergismo entre vários mediadores inflamatórios que levam ao aumento da permeabilidade vascular, fluxo sanguíneo e formação de exsudato. O desenvolvimento do edema na pata de rato após a injeção de carragenina é um evento bifásico (VINEGAR et al, 1969). A fase inicial (1-2h) é atribuída à liberação de histamina e serotonina, que são responsáveis pelos eventos vasculares (CRUNKHON e MEACCOCK, 1971). A segunda fase do edema (3-6h) é resultante da liberação de prostaglandina, citocinas e óxido nítrico. Utilizando-se esta metodologia, foi observado que LASSBio-1410 apresentou um importante efeito anti-edematogênico, em ambas as fases, provavelmente por inibir os estágios da inflamação, assim como reverteu a hiperalgesia promovida pela carragenina no teste descrito por Randall-Selitto.

A analgesia mediada por opióides é investigado no sistema nervoso central e vários mecanismos estão interligados, particularmente, nas fases iniciais da inflamação (HUA e CABOT, 2010). Acredita-se que o efeito anti-inflamatório esteja relacionado a ativação do receptor opióide nos neurônios, prevenindo a liberação de noradrenalina e substância P. A noradrenalina aumenta a expressão de COX-2 (SCHLACHETZKI et al. 2010) e a substância P liberada produz degranulação de mastócitos, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de plasma, aumento da produção e liberação de enzimas lisossômicas, liberação de prostaglandinas e de interleucina-1 e interleucina-6. Pode ainda estimular a síntese de óxido

nítrico (NO) pelo endotélio vascular, causando vasodilatação e extravasamento de mediadores inflamatórios para os tecidos.

Como LASSBio-1410 foi potente analgésico em modelo de dor aguda, numa etapa seguinte foi avaliado seu perfil farmacológico em modelo animal de dor crônica. A dor neuropática é produzida pelo dano ao tecido nervoso, e possui mecanismos diversos, tanto periféricos quanto centrais, incluindo o estado inflamatório. Caracteriza-se pela aparição de hiperalgesia, dor espontânea, parestesia e alodinia mecânica e por frio (PISERA, 2005). Os modelos de injúria constrictiva crônica (ICC) e ligadura do nervo espinhal (LNE) são testes eficientes e reprodutíveis para se estudar a dor neuropática.

O derivado LASSBio-1410 preveniu o estabelecimento da dor neuropática nos modelos de ICC e LNE, possivelmente por modular os mecanismos que estão relacionados à gênese desta condição. Como um agonista opióide, LASSBio-1410 poderia atuar hiperpolarizando as fibras nociceptivas (pela abertura dos canais de K^+) e diminuindo a liberação de neurotransmissores (pelo fechamento dos canais de Ca^{2+}), o que resultaria em diminuição da transmissão do sinal doloroso, além disso, por apresentar um efeito anti-inflamatório, LASSBio-1410 pode impedir o desenvolvimento da dor neuropática por diminuir a ativação de células que contribuem para esta condição, como as células do sistema imune e as células da glia. Além disso, LASSBio-1410 promoveu efeito significativo anti-hiperalgésico em ratos ICC demonstrando não somente ação preventiva como terapêutica. O tratamento oral de LASSBio-1410 em ambos os modelos de dor neuropática, ICC e LNE, reduziu a hiperalgesia térmica, porém não reverteu a alodinia mecânica. Uma justificativa a este fato seria a localização dos receptores delta opióide. Estudos de imunohistoquímica mostraram maior expressão de receptores delta opióide em fibras amielínicas (fibra C) em contraste com fibras sensoriais. (WANG et al., 2010)

Abordagens genéticas reafirmam a importância dos receptores delta opióide na dor crônica. Camundongos *knockout* para receptores delta opióides mostraram aumento da dor neuropática e inflamatória, o que demonstram uma atividade endógena desta via que reduz a dor crônica. (NADAL et al, 2006)

A analgesia preemptiva que consiste em prevenir o desenvolvimento de sensibilização central seria a meta em algumas condições clínicas evitando-se

o tratamento da dor já estabelecida (JORGEN e STEEN, 2004). O conceito de analgesia preemptiva foi formulado inicialmente na primeira década do século XX, quando foi recomendada a associação de anestesia regional à geral para prevenir a dor causada por mudanças no SNC durante o ato operatório, devido à não supressão da condução do estímulo doloroso para o encéfalo. Em animais submetidos a estímulos nociceptivos intensos, foram observadas alterações sensoriais (dor contínua, aumento de sensibilidade dolorosa e dor em resposta a estímulos não dolorosos), decorrentes não apenas de mecanismos periféricos, mas também por mudanças (hiperexcitabilidade) na atividade da medula espinhal (GARCIA et al, 2001)

Assim, o derivado LASSBio-1410 por promover a prevenção do estabelecimento da dor neuropática, assim como reduzir a hiperalgesia térmica no tratamento terapêutico, poderia ser útil no desenvolvimento de fármacos para uso na analgesia preemptiva e na dor neuropática.

Os opióides são fármacos analgésicos comumente utilizados para o tratamento da dor de intensidade moderada a elevada. Embora seja uma substância conhecida há aproximadamente 5.000 anos, somente nos últimos 20 anos houve uma extraordinária expansão do conhecimento sobre os locais e o mecanismo de ação. Os analgésicos opióides são caracterizados pelas suas importantes diferenças farmacológicas derivadas de suas complexas interações com três tipos de receptores: μ , δ e κ .

Os fármacos opióides mais utilizados para o tratamento da dor são os agonistas μ opióide. No entanto, há uma série de complicações que podem ocorrer com o uso desses fármacos, que incluem depressão respiratória, sedação, constipação e dependência. Além disso, podem apresentar eficácia variável no tratamento da dor crônica, em parte, pelo desenvolvimento de tolerância, existindo um debate sobre o uso de opióides no tratamento da dor não-oncológica crônica.(WILLIAMS et al, 2013)

Um desafio surgido com o uso de fármacos opióides foi separar os efeitos analgésicos dos efeitos adversos. Deve ser considerado que os opióides com maior potência analgésica são agonistas de receptores μ , cuja ativação é também responsável pela depressão respiratória (GOZZANI, 1994). Os agonistas de receptores κ respondem, também, por depressão respiratória e, em um percentual elevado, por disforias (MC QUAY,1977). Agonistas κ

opióide são potencialmente alucinógenos, reduzindo o interesse no desenvolvimento de fármacos para este alvo farmacológico com efeito central para o tratamento da dor (PRADHAN et al, 2011).

Desta forma, existe o interesse em se avaliar novos agonistas δ opióides, uma vez que estudos recentes têm demonstrado efeitos farmacológicos benéficos no tratamento de desordens neurológicas, psiquiátricas e dor crônica.

A dupla atividade de agonistas de receptores delta opióides na analgesia e ansiedade é particularmente atraente em termos de definição de novas estratégias terapêuticas, uma vez que estes podem eficazmente controlar distúrbios emocionais induzidos por dor, sendo assim, e por LASSBio-1410 ser um derivado de uma série de moléculas planejadas a partir do zolpidem que tem atuação no SNC, LASSBio-1410 também foi avaliado em modelos de ansiedade. Randall-Thompson, Pescatore e Unterwald (2010), mostraram a importância da ativação de receptores δ opióide na amígdala, área principal para o processamento emocional, na regulação de estados de ansiedade em ratos submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado (*plus maze*), e este efeito foi revertido com o antagonista naltrindol. LASSBio-1410 promoveu efeito ansiolítico, uma vez que alterou o comportamento exploratório dos animais no labirinto em cruz elevado (*plus maze*), aumentando o tempo dos animais nos braços abertos, e este efeito parece ser dependente da ativação de receptores δ opióide.

A possibilidade de LASSBio-1410 interferir com a atividade e coordenação motora dos animais foi investigada pelo fato deste composto corresponder a parte da estrutura química de LASSBio-873 que apresentou efeito hipnótico/sedativo. Ratos tratados por via oral com LASSBio-1410, não apresentaram modificação na atividade motora e nem na coordenação motora nas doses utilizadas e que produziram ação antinociceptiva. Alguns autores sugerem que a observação de que diferentes linhagens de animais possam responder de forma diferente aos desafios ambientais estaria relacionada aos fatores genéticos, e também linhagens diferentes possam apresentar liberação de serotonina no hipocampo ventral distintas, levando ao comportamento mais ou menos ansioso (NELOVKOV, 2006)

No entanto, ação sedativa mediada pela via opióide foi observada em camundongos tratados por via i.p. com LASSBio-1410. Apesar da sedação, estar associada frequentemente a ação dos fármacos que atuam pela via opióide, não seria fator limitante seu uso clínico para o tratamento da dor crônica levando-se em consideração o seu potencial benefício terapêutico. Sendo assim LASSBio-1410 demonstrou ser uma excelente alternativa para a continuidade do desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da dor crônica.

Conclusão

6 Conclusão

A partir do trabalho realizado pode-se concluir que o LASSBio-1410 promoveu antinocicepção em modelos de dor aguda e crônica, e também efeito anti-edematogênico e anti-inflamatório. Pode ser considerado um protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos seletivos para o receptor delta opióide, o qual tem sido amplamente pesquisado como alvo para o tratamento da dor.

LASSBio-1410, em dose que não interfere com atividade e coordenação motora, promoveu efeito significativo no tratamento da dor neuropática em modelos de ICC e LNE. Além disso, o derivado apresentou atividade ansiolítica mediada pela ativação de receptores opióides subtipo delta, o que poderia contribuir no tratamento da dor crônica por interferir com o componente afetivo da dor.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHBURN, M.A., STAATS, P.S. Management of chronic pain. **Lancet**, v. 353, p.1895-1969, 1999.

ATTAL, N. Chronic neuropathic pain: mechanisms and treatment. *Clin. J. Pain*, v.16, p. 118-130, 2000.

AYOKA, A.O., et al. Sedative, antiepileptic and antipsychotic effects of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae) in mice and rats. **J Ethnopharmacol.** v. 103, n.2, p.166-175, 2006.

BARON, R.; BINDER, A., WASNER, G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **Lancet. Neurol.** v.9 n.8, p.807-819, 2010.

BASBAUM, A.I. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell.** v.139, p.267-284, 2009.

BASIĆ-KES, V. et al. Neuropathic pain. **Acta. Clin. Croat.**, v.48, n.3, p.359-65, 2009. Review.

BEGGS. S, TRANG. T, SALTER. M.W. P2X4R+ microglia drive neuropathic pain. **Nat Neurosci.** v.15 n.8, p.1068-73, 2012.

BENNETT, G.J.; XIE, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain.**, v.33, n.1, p.87-107, 1988.

BODDEKE, E. W.G.M. Involvement of chemokines in pain. **Eur. J. of Pharmacol.** v.429, p. 115-119, 2001.

CROWLEY, J.J., et al. A genetic association study of the mu opioid receptor and severe opioid dependence. **Psychiatric Genetics.** v.13, n. 3, p.169-173, 2003.

CRUNKHON, P., MEACOCK, S.E.R. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenan. **Brit. J. Pharmacol.** V.42, p.392-402, 1971.

DAMAS, J., REMACLE-VOLON, G. Mast cell amines and the oedema induced by zymosan and carrageenins in rats. **Eur. J.Pharmacol.** v.121, p.367-376, 1986.

DREWES, A.M. The physiology of pain. **Ugeskrift for Laeger**, v.168, n. 20, p. 1941-1943, 2006.

DUNHAM N.W., MIYA T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J. Am. Pharm. Assoc.** v.46, p.208–209, 1957.

ELLIS A., BENNETT, D.L.H. Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. **Br J Anaesth**, v.111, p. 26–37, 2013.

FAHEY, J.M., GRASSI, J.M., REDDI, J.M., GREENBLATT, D.J. Acute zolpidem administration produces pharmacodynamic and receptor occupancy changes at similar doses. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 83, n. 1, p. 21-27, 2006.

GALLER, B.S. Neuropathic pain of peripheral origin: advances in pharmacologic treatment. **Neurology**, v.45, p.17-25, 1995.

GALLUZZI, K.E. Managing neuropathic pain. **J Am Osteopath Assoc.** v.107, p.39-48, 2007.

GARCIA, J.B.S., ISSY, A.M., SAKATA, R.K. Analgesia preemptiva. **Revist. Brasil. de Anestes.**, v. 51, 2001

GILROY, D.W, LAWRENCE, T., PERRETTI, M., ROSSI, A.G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Rev Drug Discov.** v.3, p.401–416, 2004.

GRACE, P.M. et al. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nature Ver. Immunol.** v. 12, p. 217-231, 2014

GRANADOS-SOTO, V., ARGUELLES, C.F., ALVAREZ-LEEFMANS, F.J. Peripheral and central antinociceptive action of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter blockers on formalin-induced nociception in rats. **Pain**, v. 114, n. 1-2, p. 231-238, 2005.

GOTTESMANN, C. GABA mechanisms and sleep. **Neurosci**, v. 111, n. 2, p. 231-239, 2002 Review.

GOZZANI, J.L. Opióides e antagonistas. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 44, p. 65-73, 1994.

GUSTAFSSON, H., et al. Gabapentin reverses mechanical allodynia induced by sciatic nerve ischemia and formalin-induced nociception in mice. **Exp. Neurology**, v. 182, p. 427-434, 2003.

GUTSTEIN, H.B., AKIL, H. Opioid Analgesics, em: Hardman JG, Limbird LL - Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th Ed, New York, McGraw-Hill. 2001;569-619.

HADDAD, J.J. Molecular Regulation of Inflammatory Pain and Hyperalgesia – Is NFκB the Lynchpin? Focus Article and Critical Review. **EXCLI. J.**, v.6, p.68-92, 2007.

HARGREAVES, K., et al. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, v. 32, p. 77-88, 1988.

HASHIMI, M.A., et al. Opioids and immune modulation: more questions than answers. **Br. J. Anaesth.** v.111, n.1, p.80-88, 2013.

HOLDCROFT, A. POWER, I. Recent developments: management of pain. **BMJ**, v. 326, p. 635-637, 2003.

HUA S., CABOT P. J. Mechanisms of peripheral immune-cell-mediated analgesia in inflammation: clinical and therapeutic implications. **Trends Pharmacol. Sci.** v.31 p.427–433, 2010

JANSSEN, P.A. Potent new analgesics tailor-made for different purposes. **Acta Anaesthesiol Scand.** v.26, p.262-268, 1982.

JORGEN B. D., STEEN, M. Pre-emptive analgesia. **Br Med Bull** v. 71 n.1 p.13-27, 2004

KIM, K.J., YOON, Y.W., CHUNG, J.M. Comparison of three rodent neuropathic pain models. **Exp. Brain. Res.**, v.113, n.2, p.200-206, 1997.

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

LAMONT, L. A., TRANQUILLI, W. J. Physiology of Pain. **The Veter. Clin. of North Amer.: Small Anim. Pract.**, v.30, n.4, p. 703-728, 2000.

LE BARS, D., GOZARIU, M., CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev.** v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001. Review.

LIAO, D. et al. Mu-opioid receptors modulate the stability of dendritic spines. **The National Academy of Sciences**. v.102. p, 1725–1730, 2005.

LOESES, J.D., MELZACK, R. Pain: an overview. *Lancet*, v. 353, p. 1607-1609, 1999.

MARCHAND, F., PERRETTI, M., MACMAHON, S. B., Role of the Immune system in chronic pain. **Nature Rev, Neuroscienc**. v. 6, p. 521-532, 2005

MC QUAY, H.J. Opioid use in chronic pain, **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 17, p. 175-183, 1977.

MENDELL, J.R.; SAHENK, Z. Painful sensory neuropathy. **N. Engl. J. Med**. v.348, p. 1243-1255, 2003.

MENDES, T. C. F., et al. 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, n. 1 p. 70-74, 2009.

MENEGATTI, R., et al. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of new neuroactive pyrazolo[3,4-b]pyrrolo[3,4-d]pyridine derivatives with in vivo hypnotic and analgesic profile. **Bioorg Med Chem**. v. 14, n. 3, p. 632-640, 2006.

MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L.; SILVA, L.F.S. Mecanismos neurais e modulação da dor. *In Dor: princípios e prática* (NETO O A, COSTA C M C, SIQUEIRA J T T , TEIXEIRA M J) p.235-246 (Porto Alegre: Artmed, 2009).

MILLIGAN, E. D., WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. Nat. Rev. Neurosc. v.10, p. 23-36, 2009

NADAL, X., BAÑOS, J.E., KIEFFER, B.L., MALDONADO, R. Neuropathic pain is enhanced in delta-opioid receptor knockout mice. **Eur J Neurosci**. v.23 n.3 p.830-834, 2006

NASCIMENTO-JÚNIOR, N.M. ET al. Microwave-assisted synthesis and structure–activity relationships of neuroactive pyrazolo[3,4-b]pyrrolo[3,4-d]pyridine derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 20, p.74–77, 2009

NELOVKOV, A. et al. Rats displaying distinct exploratory activity also have different expression patterns of γ -aminobutyric acid- and cholecystokinin-related genes in brain regions. **Brain Research**. p.21-31, 2006.

NORA, F.S., FORTIS, E.A.F. Remifentanil: porque precisamos de outros opióides? **Rev Bras Anesthesiol**, v. 51, p. 146-159, 2001.

PAN, H.L. et al. Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. **Pharmacol. Ther.**, v.17, n.1, p.141-61, 2008. Review.

PICK, C.G., CHERNES, Y., RIGAI, T., RICE, K.C., SCHREIBER, S. The antinociceptive effect of zolpidem and zopiclone in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 81, n. 3, p. 417-423, 2005.

PISERA, D. Fisiologia da dor. In: Dor Avaliação e Tratamento em Pequenos Animais. OTERO, P. E. São Paulo:Interbook, 2005. p. 30-74.

POYARES, D. PINTO, L.R. TAVARES, S. BARROS-VIEIRA, S. Sleep promoters and insomnia. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 27 (Supl I), p. 2-7, 2005.

PRADHAN, A., SMITH, M., MCGUIRE, B., EVANS, C., WALWYN, W. Chronic inflammatory injury results in increased coupling of delta opioid receptors to voltage-gated Ca²⁺ channels. **Mol. Pain**. v.9, p. 8, 2013.

PRADHAN, A.A., BEFORT, K., NOZAKI, C., GAVERIAUX-RUFF, C., KIEFFER, B.L., The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders. **Trends in Pharmacol. Scienc.** v. 32. n. 10, 2011.

PRINSINZANO, T.E., 2012 David W. Robertson Award for Excellence in Medicinal Chemistry: Neoclerodanes as Atypical Opioid Receptor Ligands. **J. Med. Chem.** v. 56. n. 9. p. 3435-3443, 2013

RANDALL L.O. SELITTO J.J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.** v.111, p.409–419, 1957.

RANDALL-THOMPSON, J.F., PESCATORE, K.A., UNTERWALD, E.M. A role for delta opioid receptors in the central nucleus of the amygdala in anxiety-like behaviors. **Psychopharmac.** v.212, p.585–595, 2010.

REN, K., DUBNER, R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. **Nat. Med.** v.16, p. 1267-1276, 2010.

SAH, D.W.Y., OSSIPOV, M.H., PORRECA, F. Neurotrophic factors as novel therapeutics for neuropathic pain. **Nat. Rev.** v.2, p.460-472, 2003.

SAVIC, M.M., et al. Bidirectional effects of benzodiazepine binding site ligands in the elevated plus-maze: differential antagonism by flumazenil and beta-Cct. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 79, n. 2, p. 279-290, 2004.

SCHESTATSKY. Definition, diagnosis and treatment of neuropathic pain. **Hosp. de Clin. de Porto Alegre**. v.28, p. 177-187, 2008.

SCHLACHETZKI J. C., et al. Norepinephrine enhances the LPS-induced expression of COX-2 and secretion of PGE2 in primary rat microglia. **J. Neuroinflamm.** v.7, p.210-236, 2010

SCHOLZ J., WOOLF, C.J. Can we conquer pain? **Nat. Neurosci.** v. 5, p.1062-1067, 2002.

SCHOLZ J., WOOLF, C.J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. **Nat. Neurosci.** v.10, p.1361–1368, 2007.

TEIXEIRA, M.J., MARCON, R.M., ROCHA, R.O. Epidemiologia da dor. In: TEIXEIRA, M.J., FIGUEIRÓ, J.A.B. Dor: epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento. São Paulo: Moreira Júnior, p. 1-7 2001.

TRESCOT, A.M, et al. Opioid guidelines in the management of chronic non-cancer pain. **Pain Phys.** v. 9, p. 1-40, 2006.

THOMAS, R. KOSTEN,; TONY, P. GEORGE. The Neurobiology of Opioid Dependence: Implications for Treatment. **Science & pract. perspect.**, p.13-21, 2006

TJØLSEN A.; HOLE, K. : DICKENSON, A.; BESSON, J. Animal models of analgesia. **Pharmacol. pain**, v.130, p. 1-20, 1997.

UTESHEV, V.V., MEYER, E.M., PAPKE, R.L. Regulation of neuronal function by choline and 4OH-GTS-21 through alpha 7 nicotinic receptors. **J. Neurophysiol**, v. 89, n. 4, p.1797-1806, 2003.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L.; JOHSTON, P.R. Antagonism of pain and Hyperalgesia, anti-inflammatory drugs. **Handbook of Exper. Pharmacol.** v. 50, p.208-222, 1979.

WANG, Y., SU, D.M., WANG, R.H., LIU, Y., WANG, H. Antinociceptive effects of choline against acute and inflammatory pain. **Neurosci.** v. 132, n. 1, p. 49-56. 2005

WANG H. B., et al. Coexpression of delta- and mu-opioid receptors in nociceptive sensory neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.107, n.29, p.13117-13122, 2010

WIDGEROW, A.D., KALARIA, S. Pain mediators and wound healing—establishing the connection. **Burns.** v. 38, p. 951-959, 2012

WILLIAMS J.T., et al. Regulation of μ -opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. **Pharmacol Rev.** v. 15 n. 65 p. 223-254, 2013

WILLIS, W.D.; WESTLUND, K.N. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. **J. Clin. Neurophysiol.**, v. 14, n. 1, p. 2-31, 1997. Review.

WINTER, C.A., RISLEY, E.A., NUSS, G.W. Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rats as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceed. of the Soc. Exper. Biol.** v. 111, p. 544-547, 1962.

WHITTLE, B.A. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, v.22, p.246-253, 1964.

WOOLF, C.J., CHONG, M.S. Preemptive analgesia-treating postoperative pain by preventing the establishment of central sensitization. **Anesth Analg**, v. 77, p. 362–379, 1993

WOOLF, C.J., MANNION, R.J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms and management. **Pain.** v.353, p. 1959-1964, 1999.

WOOLFE, G. & MACDONALD, A.D. The evaluation of analgesic action of pethidine hydrochloride. **J.Pharm. Exp. Ther.**, v. 80,p. 300-30, 1944.

YILMAZER-HANKE DM, ROSKODEN T, ZILLES K, SCHWEGLER H. Anxiety-related behavior and densities of glutamate, GABAA, acetylcholine and serotonin receptors in the amygdala of seven inbred mouse strains. **Behav Brain Res.** v. 145, n. 1-2, p. 145-159. 2003



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl



Microwave-assisted synthesis and structure–activity relationships of neuroactive pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine derivatives

Nailton M. Nascimento-Júnior^{a,b}, Thaiana C. F. Mendes^{c,d}, Daniella M. Leal^c, Claudia Maria N. Corrêa^c, Roberto T. Sudo^c, Gisele Zapata-Sudo^c, Eliezer J. Barreiro^{a,b,c,d}, Carlos A. M. Fraga^{a,b,c,d,*}

^a Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, PO Box 68023, Rio de Janeiro 21941-902, RJ, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21949-9000, RJ, Brazil

^c Programa de Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21949-900, RJ, Brazil

^d Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21949-000, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 September 2009

Revised 7 November 2009

Accepted 10 November 2009

Available online 16 November 2009

Keywords:

Hetero Diels–Alder

Microwave

Cycloaddition

Pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine

Sedative agents

Muscarinic agonists

Molecular simplification

ABSTRACT

We described herein the optimization of the synthetic methodology exploited to obtain the pyrazolo[3,4-*b*]pyrrolo[3,4-*d*]pyridine sedative prototype **1a** and novel analogues designed by successive molecular simplifications. By applying microwave irradiation during the hetero Diels–Alder key-step to obtain the heterocyclic scaffold, under solvent-free conditions, we were able to obtain the desired compounds in drastically shorter times and better yields. Additionally, *in vivo* evaluation of the sedative effects of these heterocyclic derivatives showed that **1a** and the novel structurally-related analogue **1e** were the most efficient compounds to impair the locomotor activity in mice at the dose of 10 μmol/kg.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.