



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE
JANEIRO**

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E
QUÍMICA MEDICINAL**

**ISATINA, N-METIL-ISATINA E N-
METIL-3-(2-OXOPROPIL)-3-HIDROXI-2-
OXINDOL: PERFIL ANTINOCICEPTIVO
E MECANISMO DE AÇÃO**

THAIS BIONDINO SARDELLA

RIO DE JANEIRO

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E

QUÍMICA MEDICINAL

ISATINA, N-METIL-ISATINA E N-METIL-3-(2-OXOPROPIL)-3-HIDROXI-2-OXINDOL: PERFIL ANTINOCICEPTIVO E MECANISMO DE AÇÃO

THAIS BIONDINO SARDELLA

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

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Dias Fernandes

RIO DE JANEIRO

Março de 2014

ISATINA, N-METIL-ISATINA E N-METIL-3-(2-OXOPROPIL)-3-HIDROXI-2-OXINDOL: PERFIL ANTINOCICEPTIVO E MECANISMO DE AÇÃO

Thais Biondino Sardella

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Dias Fernandes

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

Aprovada por:

Prof. Dra. Gilda Angela Neves

Prof. Dr. Luis Eduardo Menezes Quintas

Prof. Dr. Luiz Eurico Nasciutti

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

Profa. Dra. Patrícia Dias Fernandes (Orientadora)

RIO DE JANEIRO
Março de 2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Sardella, Thais Biondino.

Isatina, *N*-metil-isatina, *N*-metil-3-(2-oxopropil)-3-hidroxi-2-oxindol: Perfil Antinociceptivo e Mecanismo de Ação/Thais Biondino Sardella – Rio de Janeiro: UFRJ, ICB – PPGFQM, 2014. xvii, 116f.:il; 31 cm

Orientadora: Patrícia Dias Fernandes

Dissertação (Mestrado), UFRJ, ICB, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, 2014.

Referências Bibliográficas: f. 105-116.

1. Isatina. 2. Dor 3. Atividade antinociceptiva. 4. Fibras nervosas. 5. Modulação da dor. I. Fernandes, Patrícia Dias. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal. III. Isatina, *N*-metil-isatina, *N*-metil-3-(2-oxopropil)-3-hidroxi-2-oxindol: Perfil Antinociceptivo e Mecanismo de Ação.

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original.”
Albert Einstein

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Milton, à minha mãe, Sandra e minha avó, Idalina, que são meus exemplos de vida e fizeram o possível e o impossível para que eu conseguisse chegar até aqui.

À minha querida irmã e amiga, Amanda, que sempre esteve ao meu lado em momentos divertidos e decisivos.

Ao meu amor, Bruno, que todo este tempo teve paciência e me acompanha em todos os momentos.

Com todo meu amor,

Thais Biondino Sardella

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos e decisões me permitido um crescimento intelectual e moral.

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

A minha orientadora, Prof. Dra. Patrícia Dias Fernandes, pelos conhecimentos transmitidos, pela constante orientação, pela confiança, paciência e companheirismo. E pelo entusiasmo durante a realização de todo este trabalho. Obrigada pela rigidez e incentivo constantes para busca de novos ensinamentos e também por reconhecer o meu potencial desde a iniciação científica.

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

À Profa. Dra. Tereza Sollero Cláudio-da-Silva, pelas contribuições e zelo durante a revisão desse trabalho.

Aos professores Dra. Gilda Angela Neves, Dr. Luis Eduardo Menezes Quintas, Dr. Luiz Eurico Nasciutti, Dra. Josiane Sabbadini Neves (suplente) e Dra. Suzana Guimarães Leitão (suplente) pela participação na Banca Examinadora.

Ao Prof. Carlos Alberto Mansour Fraga, coordenador de Pós-Graduação deste programa, pela excelente coordenação, pela confiança e incentivo transmitidos aos alunos de Pós-Graduação.

A todos os professores de farmacologia do curso de graduação em Farmácia da UFRJ por todos os ensinamentos transmitidos e por me ensinarem uma disciplina a qual passei a amar e escolher como objeto de estudo.

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

Ao nosso querido técnico do laboratório, Alan Minho, por sempre estar presente nos momentos em que mais precisamos. Você sempre será o nosso eterno XY.

Aos meus amigos de laboratório, Natália, Carol, Gabi, Larissa, Fabiana, Jorge, Andrea, Carla, Patrícia, Stephanie, Andressa e Jéssica, muito obrigada por tudo. Caroles, Lalá, Gabian, Fabi e Nat, valeu meninas pelo companheirismo, amizade e convívio diário no lab. À ex-aluna Renata Zardo por me ensinar e ajudar no desenvolvimento de vários experimentos, obrigada pela sua amizade. Profa. Dra. Mariana Martins Gomes Pinheiro, meu muito obrigada por várias orientações e disponibilidade nos momentos de dúvida. Obrigada a todos!!

A UFRJ centro de excelência, referência e de grandes pesquisadores.

A todos os funcionários do bloco J (Farmacologia).

A todos os funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas.

Ao Instituto Vital Brazil pelos camundongos doados.

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

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

RESUMO

Isatina, N-metil-isatina, N-metil-3-(2-oxopropil)-3-hidroxi-2-oxindol: Perfil Antinociceptivo e Mecanismo de Ação

Thais Biondino Sardella

Orientadora: Dra. Patrícia Dias Fernandes.

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

A atividade antinociceptiva da Isatina e de dois novos derivados (ISA017 e ISA155) foi avaliada em modelos algésimétricos (formalina, placa quente, capsaicina, glutamato, hiperalgesia térmica e avaliação do envolvimento das fibras sensíveis à capsaicina). Para investigar o(s) mecanismo(s) de ação antinociceptivo foram administrados naloxona (antagonista não seletivo de receptor opioide), atropina (antagonista não seletivo de receptor muscarínico), L-NAME (inibidor da enzima óxido nítrico sintase), mecamilamina (antagonista não seletivo de receptor nicotínico), glibenclamida (bloqueador do canal de K⁺ sensível ao ATP), ioimbina (antagonista seletivo de receptor α 2-adrenérgico), AM251 (antagonista de receptor canabinoide CB₁) e ondasetrona (antagonista de 5-HT₃) na placa quente.

No modelo da formalina, todas as substâncias inibiram significativamente o tempo em que o animal permaneceu lambendo a pata injetada com formalina na 1^a (fase neurogênica) e 2^a fase (fase inflamatória), nas três doses testadas (0,1, 1 e 10 mg/kg). Os três derivados apresentaram efeito antinociceptivo supra-espinal (modelo da placa quente). As três substâncias mostraram por via oral significativa nos modelos de nocicepção induzida por capsaicina (0,1, 1 e 10 mg/kg) e glutamato (1 e 10 mg/kg). Na investigação do possível mecanismo de ação antinociceptivo, o pré-tratamento com o antagonista opioide, naloxona ou atropina reverteram o efeito antinociceptivo das três substâncias no modelo da placa quente. O L-NAME e a glibenclamida reverteram o efeito apenas da ISA017 e ISA155. O pré-tratamento com mecamilamina ou ondasetrona somente foi capaz de reverter o efeito da ISA155. Em relação à avaliação do envolvimento da fibras sensíveis à capsaicina, foi observado que os animais dessensibilizados pela capsaicina e que foram tratados com Isatina, ISA017 e ISA155 (10 mg/kg) quando submetidos ao modelo da formalina, não tiveram o seu tempo de lambadura diminuído.

No modelo da hiperalgesia térmica, com exceção da Isatina, seus dois derivados foram capazes de aumentar o tempo de latência dos animais na placa quente, com relevância para o tempo de 6 horas.

Nossos dados sugerem que a Isatina, ISA017 e ISA155 produzem: 1) antinocicepção periférica, mediada, em parte pela ativação de receptores vaniloides e glutamatérgicos e ação antinociceptiva supra-espinal; 2) efeito central e o mecanismo de ação parece envolver sistemas opioide, colinérgico, nitrérgico, serotoninérgico e a participação dos canais de K⁺ sensíveis ao ATP; 3) Um possível envolvimento das fibras sensíveis à capsaicina na mecanismo de modulação da dor; 4) efeito anti-hiperalgésico, inibindo a dor de origem inflamatória.

Palavras-chave: Isatina; dor; atividade antinociceptiva; fibras nervosas; modulação da dor.

Rio de Janeiro
Março de 2014

ABSTRACT

Isatin, N-methyl isatin, N-methyl-3-(2-oxopropyl)-3-hydroxy-2-oxindole: Antinociceptive Profile and Mechanism of Action

Thais Biondino Sardella

Orientadora: Dra. Patrícia Dias Fernandes.

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

The antinociceptive activity of Isatin and two new derivatives (ISA017 and ISA155) was evaluated in analgesics models (formalin, hot plate, capsaicin, glutamate, thermal hyperalgesia and evaluation of the involvement of capsaicin -sensitive fibers). To investigate (s) mechanism (s) of antinociceptive action were administered naloxone (non-selective opioid receptor antagonist), atropine (non-selective muscarinic antagonist), L -NAME (an inhibitor of nitric oxide synthase), mecamylamine (antagonist non-selective nicotinic acid receptor), glibenclamide (blockers of the K⁺ sensitive ATP channel), yohimbine (selective antagonist of α_2 -adrenergic receptor), AM251 (antagonist for cannabinoid CB1 receptor) and ondasetrona (antagonist of 5-HT₃) on the hot plate.

In the formalin model, all substances significantly inhibited the time that the animal remained licking the paw injected with formalin in the 1st (neurogenic phase) and 2nd phase (inflammatory phase) , the three doses tested (0.1 , 1 and 10 mg/kg). The three derivatives showed supraspinal antinociception (hot plate model). All three substances showed a significant oral in models of nociception induced by capsaicin (0.1 , 1 and 10 mg/kg) and glutamate (1 and 10 mg/kg). In the investigation of possible antinociceptive mechanism of action, the pre- treatment with the opioid antagonist, atropine or naloxone reversed the antinociceptive effect of three substances in the hot-plate model. The L-NAME and glibenclamide only reversed the effect of ISA017 and ISA155. Pretreatment with mecamylamine or ondasetrona was only able to reverse the effect of ISA155. Regarding the evaluation of the involvement of capsaicin -sensitive fibers, it was observed that the animals desensitized by the capsaicin and treated with Isatin, ISA017 and ISA155 (10 mg/kg) when subjected to the model of formalin were not its time to lick decreased.

In the model of thermal hyperalgesia, with the exception of Isatin, its two derivatives were able to increase the latency of the animal on the hot plate, relevant to the time of 6 hours.

Our data suggest that Isatin, ISA017 and ISA155 produce: 1) peripheral antinociception, mediated in part by activation of vanilloid receptors and glutamatergic and supraspinal antinociceptive action; 2) central effect and mechanism of action appears to involve opioid systems, cholinergic, nitregeric , and serotonergic involvement of sensitive K⁺ ATP channels; 3) A possible involvement of capsaicin -sensitive fibers in the mechanism of pain modulation; 4) anti-hyperalgesic effect, inhibiting pain of inflammatory origin.

Key words: Isatin, pain, antinociceptive activity, nerve fibers, pain modulation.

Rio de Janeiro
Março de 2014

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	XV
Lista de Tabelas.....	XV
Lista de Esquemas.....	XV
Lista de Gráficos.....	XVI
Abreviaturas.....	XVII
1- Introdução.....	1
1.1. Dor: Aspectos Gerais	2
1.2. Classificação dos Tipos de Dor.....	4
1.3. Neurofisiologia da Dor.....	5
1.3.1. Mecanismos Periféricos da Dor.....	5
1.3.2. Transmissão do Impulso Nervoso que leva à percepção da Dor.....	9
1.4. Mecanismos Endógenos de Controle da Dor.....	12
1.5. Tratamento Farmacológico para o Alívio da Dor.....	15
1.6. Isatina.....	18
1.7. Derivados da Isatina.....	19
2- Objetivos.....	20
2.1. Objetivo Geral.....	21
2.2. Objetivos Específicos.....	21
3- Materiais e Métodos.....	22
3.1. Síntese da Isatina e seus Derivados.....	23
3.2. Reagentes.....	25
3.3. Preparo das soluções utilizadas.....	25
3.4. Preparo e administração da Isatina, seus derivados e fármacos de referência.....	26
3.5. Animais.....	27
3.6. Modelo da Formalina.....	28
3.7. Modelo da Placa Quente.....	30
3.8. Nocicepção Induzida pela Injeção Intraplantar de Capsaicina.....	32
3.9. Nocicepção Induzida pela Injeção Intraplantar de Glutamato.....	34
3.10. Investigação de um Possível Mecanismo de Ação Antinociceptivo.....	36
3.11. Avaliação do Envolvimento das Fibras Sensíveis a Capsaicina.....	37
3.12. Modelo da Hiperalgesia Térmica.....	39
3.13. Avaliação do Desempenho Locomotor e Atividade Espontânea	40
3.13.1. Modelo do Rota-rod.....	40
3.13.2. Modelo do Campo Aberto.....	42
3.14. Toxicidade.....	44
3.15. Análise Estatística.....	44

4- Resultados	45
4.1. Efeito no Modelo da Formalina.....	46
4.2. Efeito no Modelo da Placa Quente.....	49
4.3. Efeito no Modelo de Nocicepção Induzida pela Injeção Intraplantar de Capsaicina.....	56
4.4. Efeito no Modelo de Nocicepção Induzida pela Injeção Intraplantar de Glutamato.....	60
4.5. Investigação do Mecanismo de Ação Antinociceptivo	62
4.5.1. Avaliação da Participação do Sistema Opióide	62
4.5.2. Avaliação da Participação do Sistema Nitrérgico.....	64
4.5.3. Avaliação da Participação do Sistema Colinérgico.....	66
4.5.4. Avaliação da Participação do Canal de K ⁺ Sensível ao ATP	68
4.5.5. Avaliação da Participação do Sistema Adrenérgico.....	70
4.5.6. Avaliação da Participação do Sistema Canabinoide.....	72
4.5.7. Avaliação da Participação do Sistema Serotoninérgico.....	74
4.6. Avaliação do Envolvimento das Fibras Sensíveis à Capsaicina.....	76
4.7. Modelo da Hiperálgia Térmica (Teste da Placa quente modificado).....	80
4.8. Avaliação do Desempenho Locomotor e Atividade Espontânea.....	85
4.9. Toxicidade.....	87
5- Discussão	88
6- Conclusões	102
7- Referências Bibliográficas	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mecanismos da dor: transdução, transmissão e modulação.....	6
Figura 2- Receptores e sinais intracelulares que participam das vias que levam à percepção da dor.....	7
Figura 3- Tipos de fibras nervosas. Diferentes nociceptores detectam diferentes tipos de dor.....	10
Figura 4- Projeções de aferentes nociceptivos primários no corno dorsal.....	12
Figura 5- Estrutura química da Isatina.....	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estruturas químicas, nomenclatura e peso molecular da Isatina, ISA017 e ISA155.....	24
Tabela 2- Efeito da Isatina, ISA017 e ISA155 no desempenho locomotor e atividade espontânea.....	86

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1- Método de Sandmeyer adaptado por Marvel e Hiers para a síntese as Isatina.....	23
Esquema 2- Método utilizado na preparação da ISA017 e ISA155.....	24
Esquema 3- Protocolo do modelo da formalina.....	29
Esquema 4- Protocolo do modelo da placa quente.....	31
Esquema 5- Protocolo nocicepção induzida por capsaicina.....	33
Esquema 6- Protocolo nocicepção induzida por glutamato.....	35
Esquema 7- Protocolo de avaliação de envolvimento das fibras sensíveis à capsaicina.....	38
Esquema 8- Protocolo do modelo do rota-rod.....	41
Esquema 9- Protocolo do modelo da campo aberto.....	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito das Isatina, ISA017 e ISA155 no modelo da formalina	48
Gráfico 2 - Efeito da Isatina no modelo da placa quente.....	51
Gráfico 3 – Efeito da ISA017 no modelo da placa quente.....	52
Gráfico 4 - Efeito da ISA155 no modelo da placa quente.....	53
Gráfico 5 - Área sob a curva (ASC) do efeito antinociceptivo da Isatina, ISA017 e ISA155 no modelo da placa quente.....	55
Gráfico 6 - Efeito antinociceptivo da Isatina, ISA017 e ISA155 no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina.....	57
Gráfico 7 - Efeito antinociceptivo da Isatina, ISA017 e ISA155 (via intraplantar) no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina.....	59
Gráfico 8 - Efeito antinociceptivo da Isatina, ISA017 e ISA155 no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato.....	61
Gráfico 9 - Avaliação da participação do sistema opioide sobre a antinocicepção da Isatina, ISA017 e ISA155 no modelo da placa quente.....	63
Gráfico 10 - Avaliação da participação do sistema nitrérgico sobre a antinocicepção da Isatina, ISA017 e ISA155 no modelo da placa quente.....	65
Gráfico 11 - Avaliação da participação do sistema colinérgico sobre a antinocicepção da Isatina, ISA017 e ISA155 no modelo da placa quente.....	67
Gráfico 12 - Avaliação da participação do canal de K ⁺ sensível ao ATP sobre a antinocicepção da Isatina, ISA017 e ISA155 no modelo da placa quente.....	69
Gráfico 13 - Avaliação da participação do sistema adrenérgico sobre a antinocicepção da Isatina, ISA017 e ISA155 no modelo da placa quente.....	71
Gráfico 14 - Avaliação da participação do sistema canabinoide sobre a antinocicepção da Isatina, ISA017 e ISA155 no modelo da placa quente.....	73
Gráfico 15 - Avaliação da participação do sistema serotoninérgico sobre a antinocicepção da Isatina, ISA017 e ISA155 no modelo da placa quente.....	75
Gráfico 16 - Teste para confirmação da dessensibilização das fibras C pela capsaicina.....	77
Gráfico 17 - Efeito do tratamento com capsaicina em camundongos neonatos no efeito antinociceptivo da Isatina, ISA017 e ISA155 no modelo da formalina.....	79
Gráfico 18 - Efeito da Isatina no modelo da hiperalgesia térmica.....	82
Gráfico 19 - Efeito da ISA017 no modelo da hiperalgesia térmica.....	83
Gráfico 20 - Efeito da ISA155 no modelo da hiperalgesia térmica	84

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina
AA	Ácido araquidônico
ACh	Acetilcolina
AINEs	Anti-inflamatórios não-esteroidais
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolil ácido propiônico
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
B1	Receptor de bradicinina tipo 1
B2	Receptor de bradicinina tipo 2
BK	Bradicinina
BSA	Albumina bovina sérica
CAUAP	Comissão de avaliação de uso de animais em pesquisa
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COBEA	Conselho Brasileiro de Experimentação animal
COX	Ciclo-oxigenase
COX-1	Ciclo-oxigenase-1
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
COX-3	Ciclo-oxigenase-3
d.p.	Desvio padrão
DLF	funículo dorso-lateral
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
HIS	Histamina
i.p.	Intraperitoneal
IASP	Associação Internacional para estudo da dor
ISA 017	<i>N</i> -metil-isatina
ISA 155	<i>N</i> -metil-3-(2-oxopropil)-3-hidroxi-2-oxindol
Kg	Quilograma
L-NAME	<i>N</i> ω -nitro-L-arginina-metil-éster
MAO	Monoamino oxidase
MAO-A	Monoamino oxidase A
MAO-B	Monoamino oxidase B
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
NMR	Núcleo Magno da Rafe
NK	Células <i>Natural killer</i>
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
NMR	Núcleo Magno da Rafe
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOSc	Óxido nítrico sintase constitutiva

NOS_e	Óxido nítrico sintase endotelial
NOS_i	Óxido nítrico sintase induzida
NOS_n	Óxido nítrico sintase neuronal
PBS	Tampão fosfato salina
PAF	Fator de agregação plaquetária
PAG	Substância Cinzenta Periaquedutal
PG	Prostaglandina
PGD₂	Prostaglandina D ₂
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGF₂α	Prostaglandina F ₂ α
PGH₂	Prostaglandina H ₂
PGI₂	Prostaciclina
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PLA₂	Fosfolipase A ₂
q.s.p	Quantidade suficiente para
r.p.m.	Rotações por minuto
RVM	Medula rostroventromedial
SG	Substância gelatinosa
SNC	Sistema nervoso central
sP	Substância P
v.o.	Via oral
v/v	Volume por volume

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dor: Aspectos Gerais

Segundo Rocha e cols. (2007), a dor está presente em mais de 70% dos pacientes que buscam atendimento clínico por motivos diversos, sendo a razão das consultas médicas em um terço dos casos. Mais de 1/3 dos brasileiros afirmam que a dor crônica compromete suas atividades habituais e muitas vezes também diárias, e mais de 3/4 destes consideram que a dor crônica é limitante para as atividades cotidianas e relações sociais e familiares (YENG e TEXEIRA, 2004). Em virtude dos dados de alta prevalência obtidos é demonstrada a importância da compreensão dos eventos que envolvem o comportamento doloroso e a busca por terapias (farmacológica ou não farmacológica) para a devida intervenção no modelo de assistência inter e multiprofissional.

A dor é um mecanismo protetor, de alerta, desencadeado por estímulos potencialmente lesivos, fazendo com que o indivíduo reaja para remover o estímulo doloroso (GUYTON e HALL, 2011). Ao contrário da maioria das modalidades sensoriais, a dor é essencial à sobrevivência (CAILLIET, 1999). A sua fisiologia envolve uma interação complexa de diferentes estruturas periféricas e centrais da superfície da pele até o córtex cerebral (FÜRST, 1999). Assim que o mecanismo de alerta é estabelecido, a dor pode provocar uma resposta comportamental generalizada, incluindo ativação simpática, com elevações da frequência cardíaca e pressão arterial e também respostas neuroendócrinas como a secreção de glicocorticoides que auxiliam as ações comportamentais que visam o afastamento de situações de risco (MILLAN, 1999).

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) (1986), Merskey e Bogduk (1994) e Millan (1999), a dor pode ser definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada ao dano real ou potencial dos

tecidos ou descrita em termos de tais lesões”. Baseado nesta definição, a experiência dolorosa é considerada como multidimensional, privada e particular (PEREIRA e RABELLO, 2003), isto é, leva em consideração a subjetividade do fenômeno da dor: os aspectos afetivos, motivacionais e cognitivos (ALMEIDA e cols., 2004).

A dor apresenta dois componentes importantes: o componente sensorial, controlado pelo córtex somatossensorial e o componente emocional/afetivo, controlado pelo tálamo. O componente sensorial que corresponde ao mecanismo neurofisiológico permite, por meio da ativação de receptores, a transmissão e interpretação do estímulo nocivo, que em geral, é forte o suficiente para provocar lesão tecidual. O componente emocional corresponde à percepção do estímulo doloroso pelo indivíduo que é seguida pela tomada de consciência e pela reação da dor (RAMADABRAN e BABSINATH, 1996). Neste, sentido a dor, além de uma sensação, é uma experiência. Isto é relevante porque as sensações possuem vias neuroanatômicas importantes, com receptores específicos que permitem a detecção e medida do estímulo. Já as experiências incorporam componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais.

Por isso, é necessário distinguir, conceitualmente, dor de nocicepção. Nocicepção se refere ao mecanismo pelo qual o dano tecidual - mecânico, térmico ou químico - excitando um nervo sensorial, dá início ao processo que conduz a informação nociceptiva ao Sistema Nervoso Central (SNC) (LOESER, 1975 *apud* PERISSINOTI, 2002). Sendo assim, a nocicepção se refere apenas às manifestações neurofisiológicas geradas pelo estímulo nocivo. Por outro lado, a dor envolve a percepção de um estímulo aversivo e exige a capacidade de abstração e elaboração de impulsos sensoriais (ALMEIDA e cols., 2004). Portanto, o domínio nociceptivo associado ao domínio afetivo determina o comportamento doloroso (PEREIRA e RABELLO, 2003).

1.2. Classificação dos Tipos de Dor

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

Pode ainda, somando-se a isso, ocorrer manifestações dolorosas decorrentes de algumas desordens comumente apresentadas em pacientes que a experimentam como a hiperalgesia (sensibilidade exacerbada a um estímulo doloroso), alodínia (dor em resposta a um estímulo não doloroso) e hiperestesia (sensibilidade anormal a um estímulo sensorial) (BESSON e CHAOUCH, 1987; DRAY, 1995; BESSON, 1999; CARR e GOUDAS, 1999).

Em relação à sensação dolorosa, a dor pode ser classificada em aguda, transitória ou crônica. Quando o episódio doloroso é transitório ocorre a ativação dos nociceptores sem que haja dano tecidual e ele se dissipa em poucos segundos ou minutos. A dor aguda é caracterizada por lesão tecidual e eminente que leva à ativação direta dos nociceptores no local da injúria. O processo de cura dura poucos dias ou semanas e a dor desaparece com a recuperação da lesão. Já a dor crônica ocorre devido a uma lesão ou patologia, podendo ser perpetuada por outros fatores além daqueles que causaram a

dor propriamente dita e pode se prolongar por semanas, meses e anos após recuperação tecidual (LOESER e MELZACK, 1999; BASBAUM e cols., 2009).

A dor crônica se diferencia da aguda em relação à sua persistência e alterações adaptativas, tais como a plasticidade do SNC e periférico que resulta na incapacidade do organismo restaurar as funções fisiológicas para os níveis homeostáticos, o que torna difícil o tratamento (BESSON, 1999; LOESER e MELZACK, 1999; BASBAUM e cols., 2009).

1.3. Neurofisiologia da Dor

1.3.1. Mecanismos Periféricos da Dor

De maneira geral, podemos considerar que o mecanismo da dor compreende três fases básicas (Figura 1): transdução, que é a ativação dos nociceptores por transformação de um estímulo nocivo (térmico, mecânico ou químico) em potencial de ação; transmissão, que é o conjunto de eventos que permitem que o impulso nervoso, gerado no nociceptor, seja conduzido para o sistema nervoso central; e modulação, que são os mecanismos e vias responsáveis pela supressão ou facilitação da dor e que podem ser ativados pelas próprias vias nociceptivas (PORTO, 2004).

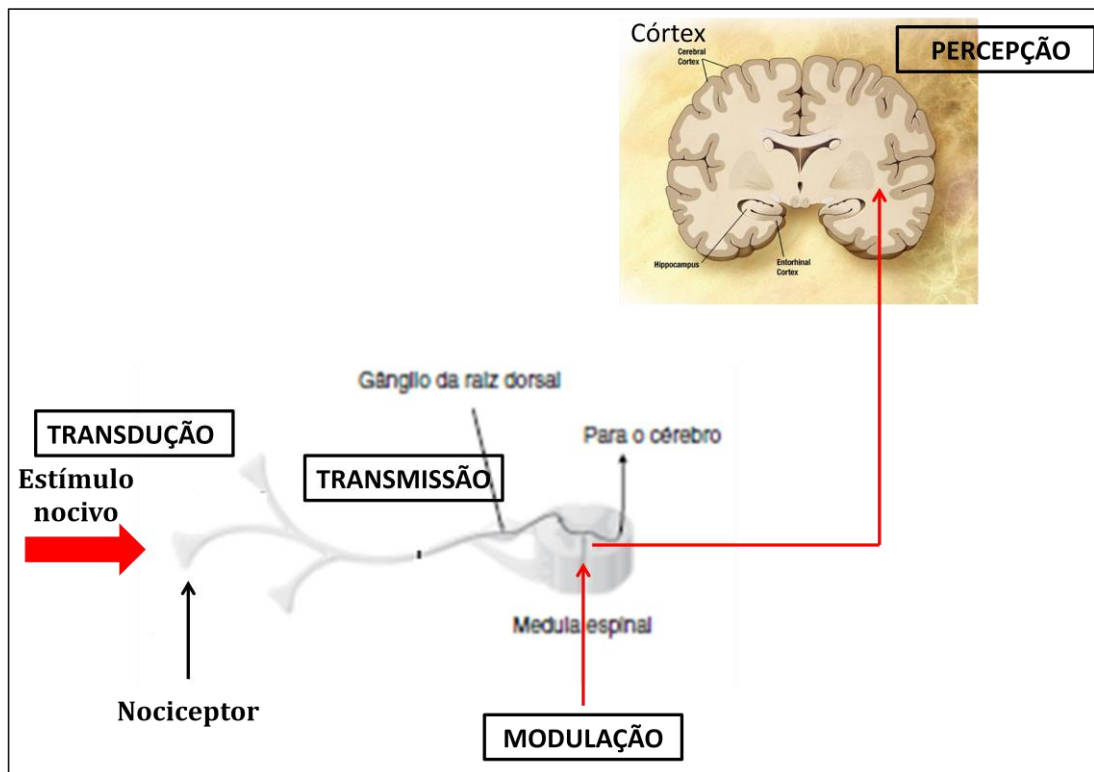


Figura 1: Mecanismos da dor: transdução, transmissão e modulação (Adaptado de: DOL: DOR ON LINE - Acesso em 04/12/2013).

Quando há um estímulo térmico, mecânico ou químico ocorre um dano tecidual, gerando um potencial de ação que será propagado por todo o neurônio sensorial aferente primário. O estímulo doloroso é propagado através das fibras aferentes primárias C ou A δ onde se encontram os nociceptores, os quais são ativados por diversos neuromediadores inflamatórios quando liberados por macrófagos, mastócitos, células endoteliais ou nervos traumatizados, facilitando a transmissão dolorosa e as alterações inflamatórias periféricas e, conseqüentemente, o quadro de hiperalgesia, sendo chamados de algogênicos. Dentre estes, se destacam a acetilcolina, a histamina, bradicinina, o leucotrieno, a substância P, o fator de agregação plaquetária (PAF), os radicais ácidos, os íons potássio, as prostaglandinas, os tromboxanos, as interleucinas e

o fator de crescimento neuronal (NGF) (KRAYCHETE e cols., 2006; MA e QUIRION, 2008) (Figura 2).

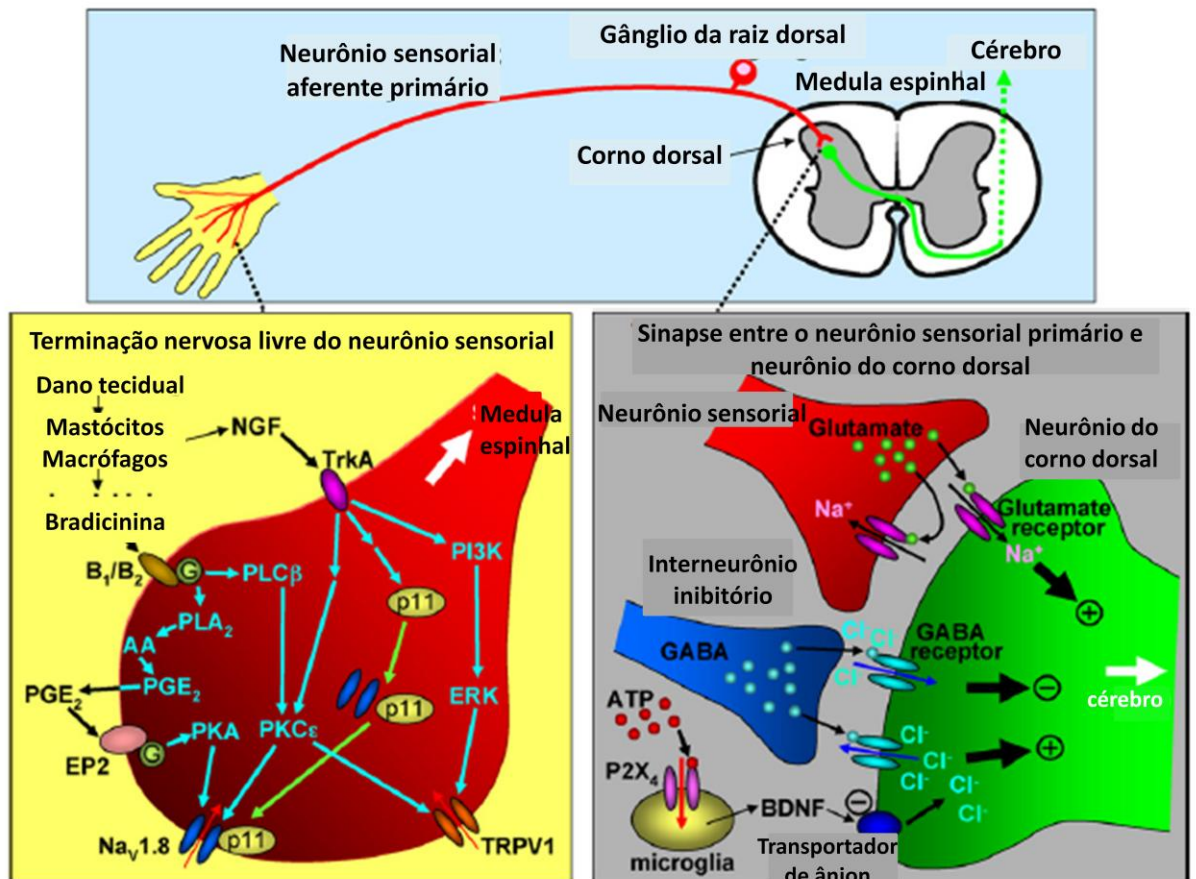


Figura 2: Receptores e sinais intracelulares que participam das vias que levam à percepção da dor. *NGF*: fator de crescimento neuronal; *TrkA*: receptor de tirosina cinase; *PKA*: Proteína cinase A; *PKC*: proteína cinase C; *PLA₂*: fosfolipase A₂; *PLC*: fosfolipase C; *AA*: ácido araquidônico, *PGE₂*: prostaglandina; *B₁/B₂*:receptor de bradicinina, *EP2*: receptor de prostaglandina; *TRPV-1*: receptor vaniloide; *ERK*: sinal extracelular regulado por quinase; *PI3K*:fosfatidil inositol-3 quinase; *NaV1.8*: canal de sódio; *ATP*: trifosfato de adenosina, *P2X₄*: receptor purinérgico ativado por ATP; *BDNF*: fator neutrófico derivado do cérebro; *GABA*: ácido γ -amino butírico (Adapatdo de OKUSE, 2007).

A bradicinina, assim como o íon potássio, é responsável por provocar intensa dilatação arteriolar e aumentar a permeabilidade capilar, contribuindo para a propagação da reação inflamatória. A bradicinina e a PGE₂ causam alterações nos receptores vaniloides específicos (TRPV1) acoplados aos canais iônicos ligante-dependentes, via ativação de adenosinamonofosfato cíclica (AMPC), e das proteínas cinases (PKs) A e C, reduzindo o tempo pós-hiperpolarização da membrana neural, causando redução do limiar para disparo da fibra nervosa (ROCHA e cols., 2007; STAROWICZ e cols., 2007).

A histamina, prostaglandinas e leucotrienos provocam inflamação e sensibilização das terminações nervosas, surgindo o edema e a dor. Assim, ocorre maior expressão de moléculas de adesão e infiltração de macrófagos e células T no local, causando aumento das citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1, IL-6 e IL-8) no disco intervertebral (KRAYCHETE e cols., 2006).

O NGF aumenta a excitabilidade elétrica dos neurônios aferentes nociceptivos e também promove a formação de contatos sinápticos. Estimulam também a produção de PGE₂ nos mastócitos (CAMPBELL e MEYER, 2006; MA e QUIRION, 2008).

A substância P age na periferia, promovendo uma inflamação por seus efeitos sobre os vasos sanguíneos (vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular) e células do sistema imune (atração das células do sistema imune para o local da lesão e desgranulação de mastócitos com liberação de diversos neuromediadores) (DRESSLER e cols., 2005; ROCHA e cols., 2007). A inibição da transmissão da substância P e a emissão periférica podem aumentar o arsenal terapêutico no controle da dor (ONETTA, 2005).

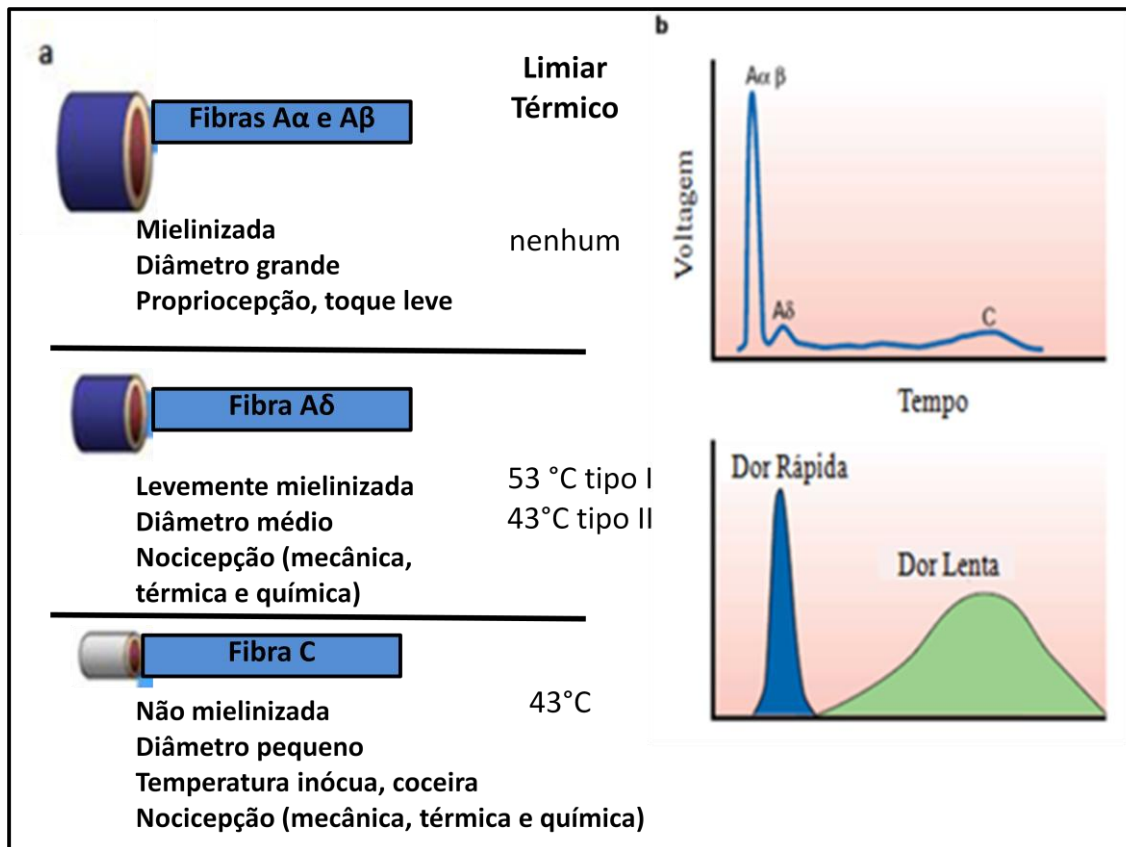
Outro transmissor importante na dor é o glutamato, provável neurotransmissor das fibras do tipo A δ . É um dos transmissores excitatórios mais amplamente utilizados

no SNC dos mamíferos, no corno dorsal da medula espinhal, tendo período de ação de apenas alguns milissegundos. Esta neurotransmissão é controlada por interneurônios inibitórios gabaérgicos e glicinérgicos (CAROBREZ, 2003; SCHMIDTKO e cols., 2008).

1.3.2. Transmissão do Impulso Nervoso que leva à Percepção da Dor

Quando o estímulo nocivo é produzido, as terminações livres dos neurônios aferentes primários, chamados de nociceptores, o detectam e transmitem para o SNC (CATERINA e cols., 2000). Os nociceptores são encontrados em praticamente todos os tipos de tecido do corpo e são classificados em termos de estrutura, diâmetro e velocidade de condução em A δ e C (ALMEIDA e cols., 2004).

As fibras nervosas A δ são levemente mielinizadas, sendo responsáveis pela dor rápida e bem localizada, desencadeada por estímulos mecânicos ou térmicos. Essas fibras têm diâmetro de 2,0 a 6,0 μm e velocidade de condução de 12 – 30 m/s. Já as fibras nervosas C não são mielinizadas, sendo responsáveis pela dor lenta, difusa e mal localizada. Essas fibras são polimodais, sendo desencadeadas por estímulos químicos e também por estímulos mecânicos ou térmicos persistentes, têm diâmetro de 0,4 a 1,2 μm e uma velocidade de condução de 0,5 a 2,0 m/s (ALMEIDA e cols., 2004; ABRAHAMSEN e cols., 2008) (Figura 3).



V

Figura 3: Tipos de fibras nervosas. Diferentes nociceptores detectam diferentes tipos de dor. **a**– tipos das fibras aferentes primárias, além de suas respectivas características e limiar térmico. As fibras A δ e C são responsáveis pela condução da dor até a medula espinal. **b** - velocidade de condução da fibra relacionada ao diâmetro da mesma: a velocidade de condução é maior de acordo com a maior presença de bainha de mielina na fibra nervosa. As fibras A- δ e C são responsáveis pelos tipos de dor rápida e lenta, respectivamente (Adaptado de JULIUS e BASBAUM, 2001).

Quando ativadas, as fibras A δ e C sofrem alterações em suas membranas, permitindo a deflagração de potenciais de ação ao longo de toda a fibra (ROCHA e cols., 2007). As fibras nociceptivas possuem elevado limiar de ativação, e se projetam da periferia para o corno dorsal da medula espinal onde ativam grande número de neurônios de segunda ordem que podem ser interneurônios ou neurônios de projeção (CARVALHO e LEMÔNICA, 1998). As fibras nociceptivas adentram no corno dorsal da medula espinal pelas raízes espinais dorsais e estabelecem conexões sinápticas com neurônios espinais de distribuição altamente organizada (MILLAN, 1999). De acordo com critérios histoarquitéticos, o corno dorsal da medula espinal se divide em várias camadas, denominadas lâminas de Rexed. As fibras A δ terminam principalmente nas lâminas I e V e as fibras C nas 22 lâminas II e III (CAILLIET, 1999)(Figura 4). A conexão sináptica entre fibras aferentes primárias e neurônios do corno dorsal envolve neurotransmissores como glutamato e a substância P, que são responsáveis pela produção de potenciais pós-sinápticos excitatórios rápidos e lentos, respectivamente (MILLAN, 1999; ROCHA e cols., 2007).

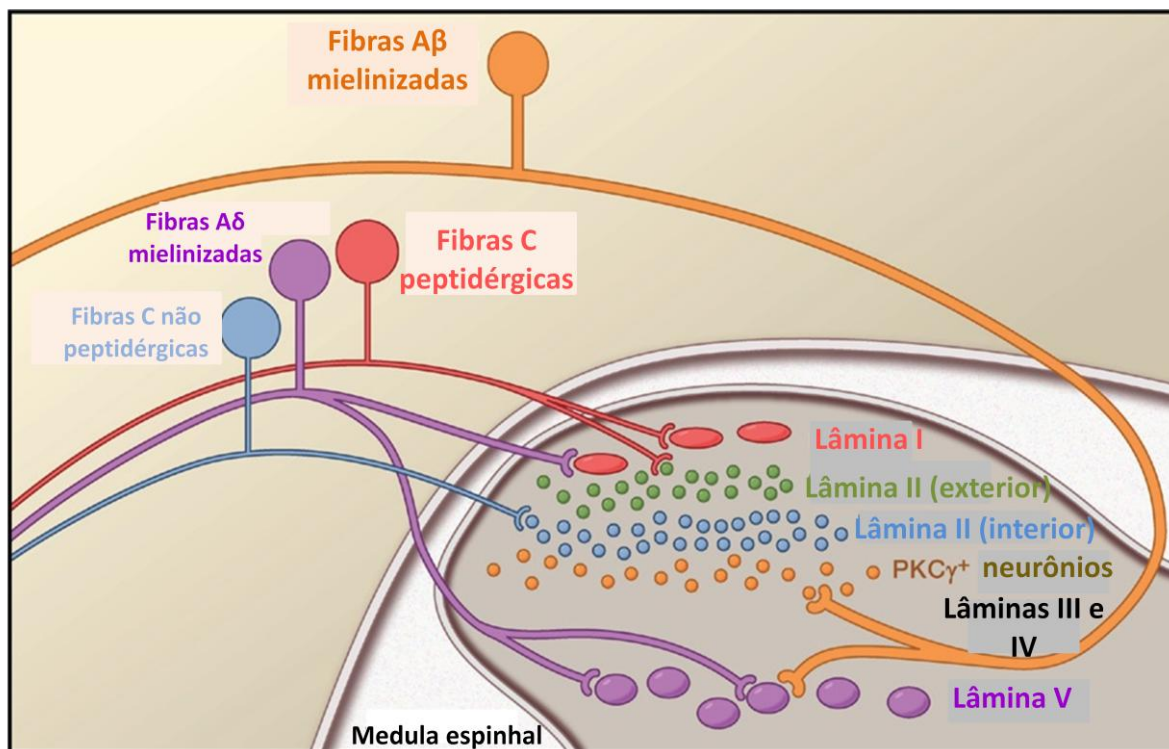


Figura 4: Projeções de aferentes nociceptivos primários no corno dorsal (Adaptado de BASBAUM e Cols., 2009).

1.4. Mecanismos Endógenos de Controle da Dor

Em 1965, Melzack e Wall sugeriram a existência de uma espécie de comporta ou portão no corno dorsal da medula. De acordo com essa teoria, alguns neurônios teriam a capacidade de suprimir a transmissão do sinal doloroso do corno dorsal da medula, fechando, então, um portão hipotético, e inibindo a passagem do impulso doloroso (Teoria da Comporta Espinhal) (MELZACK e WALL, 1965). As células da lâmina II do corno posterior (substância gelatinosa) são principalmente interneurônios inibitórios curtos que se projetam às lâminas I e V, e regulam a transmissão na primeira sinapse da via nociceptiva entre as fibras aferentes primárias e os neurônios de transmissão do trato espinotalâmico. Assim, as células da substância gelatinosa

respondem tanto à atividade das fibras aferentes que entram na medula quanto à atividade das vias descendentes (RANG e cols., 2008).

A sensação de dor pode ser modificada pelos sistemas endógenos inibitórios da dor, predominantemente através das vias descendentes de noradrenalina, serotonina e opioides endógenos, tais como β -endorfina e dinorfina (YOSHIMURA e cols., 2006). Essas vias descendentes constituem um dos mecanismos de controle do portão que controlam a transmissão de impulsos dolorosos (relacionados com a sensação de dor) no corno posterior da medula espinhal. Muitas classes de neurônios do corno dorsal, as próprias fibras aferentes primárias e as fibras descendentes do cérebro exercem uma potente influência modulatória sobre a transferência de informação nociceptiva que chega da periferia para a medula espinhal e da medula para o cérebro (MILLAN, 2002).

A modulação descendente da dor depende da via que liga a substância cinzenta periaquedutal (PAG) ao núcleo magno da rafe (NMR), de onde partem as fibras serotoninérgicas que seguem pelo funículo dorso-lateral (DLF) até alcançarem a substância gelatinosa (SG / lâminas II de Rexed) da medula espinhal. Neste local, são ativados os interneurônios inibitórios que bloqueiam a passagem do impulso doloroso proveniente da periferia através da liberação de encefalinas, peptídeos com atividade opioide (FIELDS e BASBAUM, 1999). Sabe-se atualmente que a injeção local de morfina na PAG também causa um efeito analgésico que é bloqueado por naloxona, o antagonista específico da morfina, ou por lesões do NMR ou das vias descendentes para a medula espinhal.

Desta forma, os mediadores químicos dentro do cérebro podem produzir efeitos lentos e de longa duração e podem agir muito difusamente, distantes do seu local de ação, e produzir efeitos diversos, afetando a condutância iônica das células pós-sinápticas. A transmissão química da dor através das vias sensoriais aferentes depende

da liberação de várias substâncias (neurotransmissores álgicos), tais como: noradrenalina, serotonina (5-HT), acetilcolina (Ach), aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato), aminoácidos inibitórios (GABA e glicina), histamina, óxido nítrico (NO), prostaglandinas e peptídeos sensoriais (RANG e cols., 1991). A modulação da dor através das fibras aferentes também obedece à mesma dinâmica e nesse sentido, diversos neurotransmissores contribuem alterando o limiar doloroso, como por exemplo, a noradrenalina, dopamina e serotonina que atuam em vias e receptores específicos, e ainda os opioides endógenos, como as encefalinas e endorfinas. Desta maneira, alguns neurotransmissores desempenham um papel dúbio na dinâmica que envolve o processo doloroso. O conhecimento da natureza dessas substâncias e dos mecanismos pelos quais estimulam as terminações nervosas sensoriais pode conduzir à descoberta de novos fármacos com propriedades analgésicas distintas daquelas que existem atualmente (MOGIL e GRISEL, 1998; GRÜBB, 1998, MILLAN, 2002).

Os mecanismos descendentes modulam a resposta nociceptiva por exercer suas ações em nociceptores presentes nas fibras aferentes primárias, bem como em neurônios intrínsecos do corno dorsal, como interneurônios excitatórios, inibitórios e neurônios de projeção (MILLAN, 2002). Uma das descobertas mais interessantes a respeito do circuito modulatório da dor é que esse pode tanto facilitar, quanto inibir a transmissão nociceptiva (JULIUS e BASBAUM, 2001; PORRECA e cols., 2002). Na medula rostroventromedial (RVM) estão presentes dois tipos de neurônios, as chamadas células “liga” (on) e as células “desliga” (off), as quais estão envolvidas na modulação nociceptiva. É proposto que as células “liga” (on) facilitam a condução de estímulos nociceptivos quando ativadas, e as células “desliga” (off) inibem a transmissão nociceptiva, provocada pela estimulação da PAG. Logo, o balanço entre a ativação dessas duas subpopulações de neurônios determina a resposta a um estímulo

nociceptivo periférico. No entanto, em situações de dor persistente, as alterações da neuroplasticidade podem resultar em uma estimulação facilitatória sustentada, o que ocasiona respostas persistentes e exageradas à dor (PORRECA e cols., 2002).

Muitos mecanismos moleculares envolvidos na sensibilização central já foram estabelecidos, mas os mecanismos de sensibilização periférica ainda não foram completamente elucidados. O conhecimento da biologia molecular dos receptores permitiu um extraordinário progresso no entendimento do mecanismo de ação de diversos neurotransmissores e fármacos envolvidos na modulação central e periférica da nocicepção. O mecanismo de transdução neuroquímica da dor envolve, geralmente, a interação dos mediadores inflamatórios com um canal iônico da membrana tipo voltagem-dependente (canais de sódio, potássio e cálcio), com canais iônicos operados por receptor (receptor NMDA, receptor colinérgico nicotínico), com receptores associados à tirosina quinase ou ainda com receptores de membrana que usualmente encontram-se acoplados à proteína G, como é o caso dos receptores das prostaglandinas e bradicinina (LEVINE e TAIWO, 1999; MILLAN, 1999; CALIXTO e cols., 2000).

1.5. Tratamento Farmacológico para o Alívio da Dor

Apesar da função fisiológica protetora da dor aguda, a dor intensa, persistente ou crônica necessita de intervenção medicamentosa. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e os opioides são as duas principais classes atualmente utilizadas como analgésicos. Os AINEs exercem seu efeito analgésico e anti-inflamatório através da inibição das enzimas COXs, com consequente redução na formação de prostaglandinas (MACPHERSON, 2000). Os AINEs inibidores não seletivos da COX, como por exemplo, o ácido acetilsalicílico e a indometacina, apesar de tradicionais na prática

clínica, causam efeitos adversos, como por exemplo, desconforto gastrointestinal e risco de hemorragia.

Os analgésicos opioides ao se ligarem aos receptores opioides exercem analgesia no corno posterior da substância cinzenta da medula espinhal e no sistema límbico, onde modificam as reações emocionais à dor, tornando-a mais tolerável; e no córtex cerebral, onde modificam os processamentos cognitivos associados a dor. Na substância gelatinosa há predominância de receptores opioides μ . A ativação destes receptores resulta na redução da liberação de neurotransmissores excitatórios (FIELDS, 2004). Os opioides, como morfina e fentanil, são tradicionalmente usados no manejo da dor aguda e crônica em vários estágios (MACPHERSON, 2000). No entanto, apesar da eficácia em uma variedade de síndromes dolorosas, esses fármacos causam efeitos colaterais graves, sobretudo mediante uso prolongado (REISINE e PASTERNAK, 1996 *apud* RAJENDRA e cols., 2004). Os opioides causam constipação, náuseas, vômitos, broncoconstrição, hipotensão, bradicardia, depressão respiratória e tolerância (SANTOS, 2011).

Além desses analgésicos convencionais, antidepressivos, neurolépticos, anticonvulsivantes, anestésicos locais e miorelaxantes, também podem ser utilizados como analgésicos ao proporcionarem ativação do sistema analgésico endógeno, normalização do sono, redução da hiperexcitabilidade neuronal e relaxamento muscular, respectivamente. Apesar dessa relativamente grande gama de opções para o tratamento da dor, alguns estados de dor como os de origem neuropática, são muito refratários a analgésicos, e apenas 1/3 dos pacientes referem analgesia superior a 50% (SINDRUP e JENSEN, 1999). Por isso, o controle da dor ainda depende do desenvolvimento de fármacos mais eficazes, com menos efeitos indesejados e com indicação para

modalidades de dor ainda de difícil tratamento, como a dor crônica, dor neuropática e fibromialgia (JULIUS e BASBAUM, 2001; JUNIOR, 2005)

1.6. Isatina

A Isatina (1H-indol-2,3-diona) (Figura 5) foi obtida pela primeira vez por Erdman e Laurent em 1841 como um produto da oxidação do indigo por ácidos nítrico e crômico.

Na natureza, a Isatina é encontrada em plantas do gênero *Isatis* (GUO e CHEN, 1986), nas espécies *Calanthes discolor* Lindl. (YOCHIKAWA e cols., 1998) e *Couroupita guianensis* Aubl. (BERGMAN e cols., 1985) e em seres humanos como um derivado metabólico de adrenalina (ISCHIA e cols., 1998; PALUMBO e cols., 1989; HALKET e cols., 1991). É encontrada endogenamente em tecidos e fluidos de mamíferos em diferentes concentrações e sua distribuição é heterogênea. No cérebro, uma maior concentração está presente no hipocampo e cerebelo (MEDVEDEV e cols., 2007). Foi originalmente identificada como inibidor endógeno da monoamina oxidase (MAO) e posteriormente identificada como inibidor seletivo da MAO-B. Dentre suas ações, descritas em experimentos *in vitro*, pode-se destacar ação antagonista do peptídeo natriurético atrial e da ativação da guanilato ciclase estimulada por óxido nítrico (NO) (MEDVEDEV e cols., 2007; CHEN e cols., 2011).

Muito pouco se conhece sobre a via endógena de formação da Isatina, porém há evidências de que sua formação se dá a partir do aminoácido triptofano, que é convertido em indol pelas bactérias do trato gastrointestinal e, posteriormente, oxidado no fígado pelas enzimas do citocromo P450 (GUILLAN e cols., 2000).

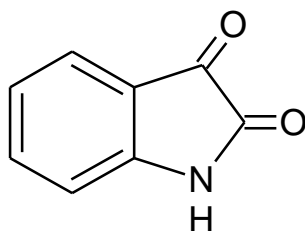


Figura 5 - Estrutura química da Isatina.

1.7. Derivados da Isatina

Como a Isatina possui uma grande versatilidade sintética, houve crescimento no interesse na síntese de novas moléculas a partir da molécula de Isatina. Muitos derivados já demonstraram atividades biológicas e farmacológicas, tais como atividades analgésica, anti-inflamatória e antipirética (SRIDHAR e RAMESH, 2001; MUTHUKUMAN e cols., 2008), atividade citotóxica em linhagem celular de linfoma (VINE e cols., 2007) e também em linhagem celular de carcinoma derivado de mama, próstata (MATESIC e cols., 2008), cólon (LANE e cols., 2008; PATYNA e cols., 2006) pulmão (LI e cols., 2007) e leucemia linfóide aguda (MOLT-4) (GAO e cols., 2006; WANG e cols., 2008).

Segundo Premanathan e cols. (2012), a Isatina apresentou atividade antioxidante e foi citotóxica para linhagem celular HL60 (leucemia promielocítica) devido à indução de apoptose e fragmentação do DNA, confirmados através do experimento de citometria de fluxo.

Também inibe a produção de NO, prostaglandina E₂ (PGE₂) e fator de necrose tumoral (TNF), devido em parte à inibição na expressão das enzimas ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzida (NOSi) (MATHEUS e cols., 2007), dentre outras. Tem crescido também o interesse de novos derivados da Isatina como agentes antineoplásicos, uma vez que já foi demonstrada atividade como inibidores de proteínas quinases (LECLERC e cols., 2001; SENDEROWICZ, 2003) e inibidores de caspases-3 e 7 (CHU e cols., 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os potenciais efeitos antinociceptivos da Isatina, da ISA017 e da ISA155 em diferentes modelos *in vivo*, bem como tentar elucidar o(s) possível (is) mecanismos de ação.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar a atividade antinociceptiva da Isatina, da ISA017 e da ISA155 em modelos de nocicepção:

- Química induzida pela formalina; capsaicina ou glutamato;
- Térmica: modelo da placa quente;

Investigar o(s) possível(is) mecanismo(s) de ação envolvido(s) no efeito antinociceptivo da Isatina, da ISA017 e da ISA155 através do modelo de nocicepção térmica (modelo da placa quente):

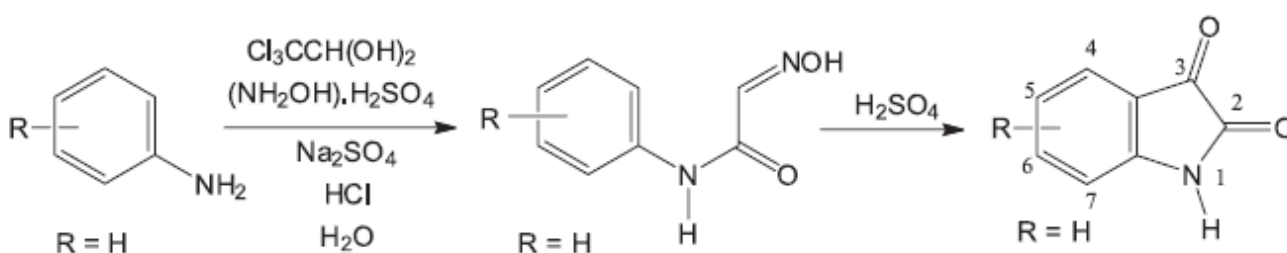
- Utilização de antagonistas e/ou inibidores de vários receptores/vias que modulam a transmissão nociceptiva;
- Envolvimento das fibras C (sensíveis à capsaicina) no modelo da formalina;
- Avaliar a atividade das três substâncias no modelo de dor inflamatória aguda (Modelo da Hiperalgisia Térmica);

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Síntese da Isatina e seus derivados

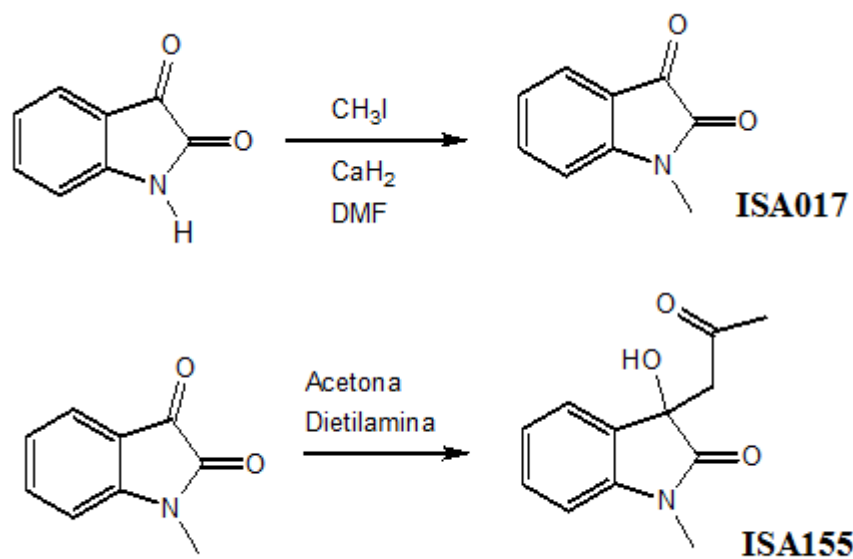
A Isatina e seus derivados (*N*-metil-isatina (ISA017) e *N*-metil-3-(2-oxopropil)-3-hidroxi-2-oxindol (ISA155)) foram sintetizados pelo grupo da Profa. Dra. Bárbara Vasconcellos da Silva e Prof. Dr. Ângelo da Cunha Pinto, do Laboratório de Química Orgânica, do Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

A Isatina foi sintetizada seguindo o método de Sandmeyer (1919), adaptada por Marvel e Hiers (1941), que consiste no tratamento de anilinas com hidrato de cloral, sulfato de hidroxilamina, sulfato de sódio, ácido clorídrico, água e álcool etílico, para a obtenção das respectivas isonitrosoacetanilidas (GARDEN e cols., 1997). Em seguida, as isonitrosoacetanilidas foram ciclizadas com H₂SO₄ concentrado, fornecendo a Isatina (Esquema 1).



Esquema 1- Método de Sandmeyer adaptado por Marvel e Hiers para síntese da Isatina.

A ISA017 foi sintetizada a partir da Isatina através de uma reação de *N*-alquilação (reação de substituição - introdução do grupamento metila no nitrogênio do anel indólico). Em seguida, ela foi submetida à condensação aldólica com acetona na presença de quantidades catalíticas de dietilamina originando o derivado ISA155 (PAKRAVAN e cols., 2013) (Esquema 2).



Esquema 2- Método utilizado na preparação da ISA017 e ISA155.

Código	Estrutura	Nomenclatura	Peso Molecular
Isatina		Isatina ou 1H-indole-2,3-diona	147 g/mol
ISA017		N-metil-isatina	161 g/mol
ISA155		N-metil-3-(2-oxopropil)-3-hidroxi-2-oxindol	219 g/mol

Tabela 1 – Estruturas químicas, nomenclatura e peso molecular da Isatina, ISA017 e ISA155.

3.2. Reagentes

Os reagentes utilizados foram:

Capsaicina (Galena, Campinas, SP), dimetilsulfóxido P.A. (DMSO) (Fisher Biotech), etanol P.A. (Merck AG, Darmstadt, Alemanha), éter etílico e tween 80 (Isolar, Rio de Janeiro, Brasil), formaldeído (Reagen), sulfato de morfina e cloridrato de naloxona (Cristália, São Paulo, Brasil). O ácido acetilsalicílico (AAS), ácido glutâmico (glutamato), AM251, capsazepina, carragenina- λ V, cloridrato de iombina, cloridrato de mecamilamina, cloridrato de ondasetrona, glibenclamida, sulfato de atropina, cloridrato de N $^{\omega}$ -Nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

Os reagentes utilizados apresentavam grau de pureza e propriedades analíticas adequadas.

3.3. Preparo das soluções utilizadas

Soluções estoques:

Ácido Acetilsalicílico: 100mg/mL em PBS

AM251: 10 mg/mL em PBS

Capsaicina: 1,6 mg/mL em 5% de etanol P.A., 5% de tween 80 e 90% de salina

Capsazepina: 10 nmol/pata (em PBS)

Carragenina: 2% (p/v) em PBS

Formalina: 2,5% de formaldeído em PBS

Glibenclamida: 10 mg/mL em PBS

Glutamato: 20 μ mol/pata (em PBS)

Iombina: 10 mg/mL em PBS

L-NAME: 10 mg/mL em PBS

Mecamilamina: 10 mg/mL em PBS

Morfina: 10 mg/mL em PBS

Naloxona: 10 mg/mL em PBS

Atropina: 10 mg/mL em PBS

Ondasentrona: 1 mg/mL em PBS

3.4. Preparo e administração da Isatina, seus derivados e fármacos de referência

A Isatina, ISA017 e ISA155 foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) de modo a preparar uma solução estoque na concentração de 100 mg/mL, a qual foi armazenada à -20⁰C. No dia do experimento foram preparadas soluções intermediárias em PBS. A concentração final de DMSO não excedeu 0,5% (v/v), de modo a não produzir qualquer efeito.

A Isatina e seus derivados foram administrados nos animais por via oral, 60 ou 30 minutos antes dos testes farmacológicos, nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg em volume final de 0,1 mL. Por via intraplantar, foram testadas na dose de 25 nmol/pata (em um volume final de 10 µL) e administradas 15 minutos antes da injeção de capsaicina (5,2 nmol/pata).

Os fármacos de referência utilizados foram o ácido acetilsalicílico (AAS, 200 mg/kg) e morfina (2,5 mg/kg) administrados por via oral, 60 minutos antes dos testes farmacológicos.

Naloxona (antagonista de receptor opioide, 1 mg/kg), atropina (antagonista não seletivo de receptor muscarínico, 1mg/kg), L-NAME (inibidor da óxido nítrico sintase, 3 mg/kg), mecamilamina (antagonista não seletivo de receptor nicotínico, 2 mg/kg), glibenclamida (bloqueador do canal de K⁺ sensível ao ATP, 2mg/kg), iombina (antagonista de receptor α 2 adrenérgico, 3 mg/kg), AM251 (antagonista de receptor

canabinoide CB1, 1mg/kg) e ondasentrona (antagonista de receptor serotoninérgico 5-HT₃, 0,5 mg/kg) foram utilizados por via intraperitoneal, 15 minutos antes da administração por via oral da Isatina ou de seus derivados. O grupo controle foi composto pelo veículo, constituído de PBS, por via oral.

3.5. Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss Webster (20-25g), de ambos os sexos, doados pelo Centro de Produção de Animais de Laboratório, do Instituto Vital Brazil. Os animais foram mantidos em nosso próprio biotério, com ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura ambiente controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e livre acesso à ração e água. Os camundongos foram distribuídos homogeneamente entre os grupos e aclimatizados no laboratório no mínimo 1h antes do início dos experimentos.

Para a realização de cada teste, a ração foi retirada, no máximo, 6 horas antes, mantendo-se a água *ad libitum* durante todo o período. As condições ambientais, onde foram realizados os experimentos, eram mantidas as mais confortáveis possíveis, evitando-se variação de temperatura e luminosidade.

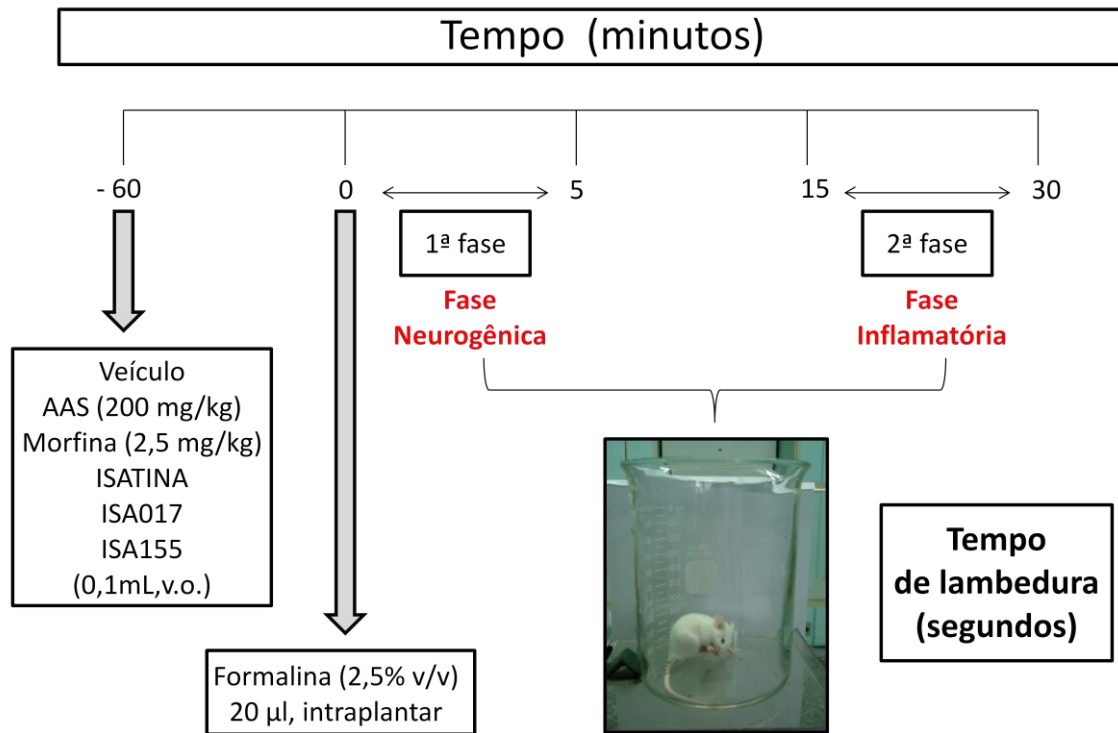
A manipulação de animais obedeceu ao guia de cuidados de animais de laboratório e no guia ético para investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). Os protocolos experimentais de uso de animais de laboratório obedeceram aos princípios da Comissão de Avaliação de Uso de Animais em Pesquisa (CAUAP), do Centro de Ciências da Saúde, da UFRJ e as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sendo aprovado sob protocolo DFBCICB015–04/16. O número de animais utilizados e os estímulos empregados foram os mínimos necessários para demonstrar efeito dos tratamentos.

3.6. Modelo da Formalina

Este é que permite a avaliação de duas fases de sensibilidade dolorosa: a primeira fase ocorre durante os 5 primeiros minutos após a injeção da formalina e provoca uma dor de origem neurogênica (estimulação direta dos neurônios nociceptivos) e a segunda fase, que ocorre entre 15 a 30 minutos após a injeção de formalina, provocando uma dor de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios) (HUNSKAAR e cols., 1987; TJOLSEN e cols., 1992).

O modelo consistiu na injeção intraplantar de 20 µL de formalina (2,5% v/v) na pata posterior direita do camundongo. Imediatamente após a administração de formalina, mediu-se, com o auxílio de um cronômetro, o somatório dos tempos (em segundos) nos quais o animal permaneceu lambendo a pata injetada nos períodos entre 0 a 5 min e entre 15 a 30 min, que correspondem à primeira e à segunda fase da resposta nociceptiva, respectivamente.

Os animais foram tratados com a Isatina, ISA017, ISA155, veículo, AAS ou morfina por via oral, 60 min antes da injeção de formalina. O protocolo experimental seguiu o esquema abaixo (Esquema 3).

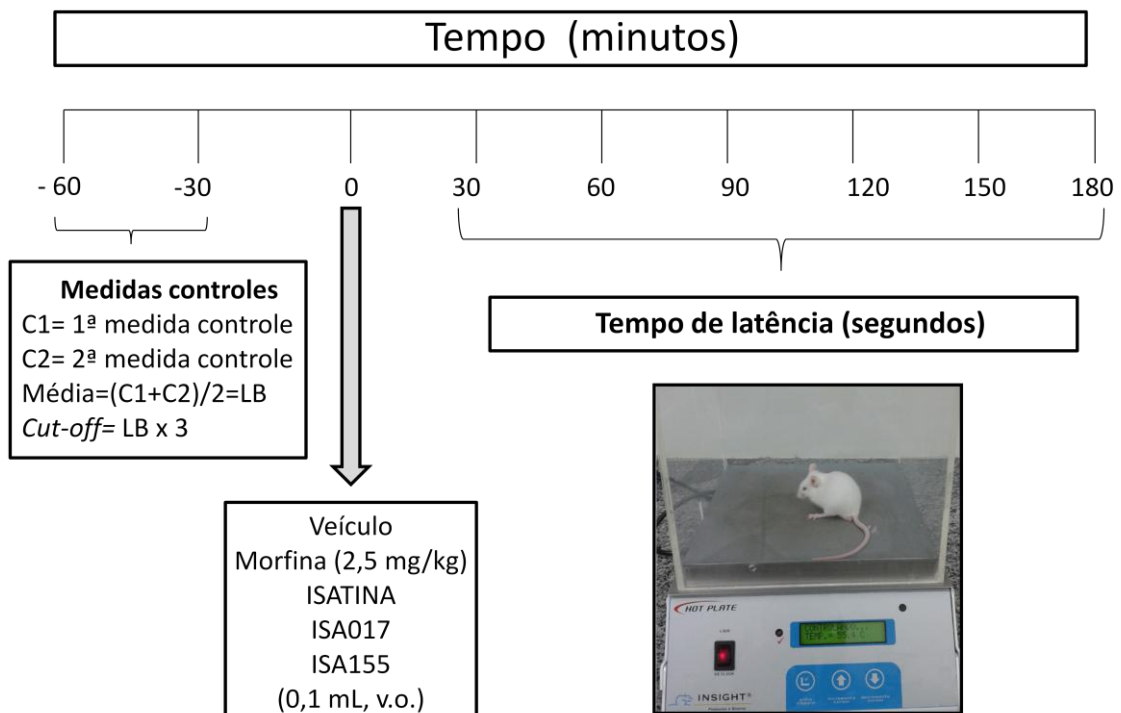


Esquema 3 - Protocolo do modelo da formalina.

3.7. Modelo da Placa Quente

A metodologia utilizada foi descrita por Sahley e Berntson (1979) e avaliou a atividade antinociceptiva central. O modelo da placa quente consiste em colocar o camundongo sobre uma placa aquecida à temperatura de $55\pm 1^{\circ}\text{C}$. O tempo, em segundos, que o animal demorou para saltar e/ou lambe uma das duas patas traseiras, foi registrado com o auxílio de um cronômetro e denominado de “tempo de latência”.

Foram realizadas duas medidas controles (C1 e C2) com intervalo de 30 minutos, antes do tratamento dos animais. A média das medidas controles foi denominada como “linha de base”. Trinta minutos após a segunda medida controle, os animais foram tratados por via oral com a Isatina, ISA017, ISA155, veículo ou morfina. Foram realizadas várias medidas dos tempos de latência com intervalos de 30 minutos entre cada uma delas. Com o objetivo de se evitar danos teciduais, se estabeleceu um tempo máximo de exposição das patas do animal à placa aquecida, representado como três vezes o valor da linha de base e denominado tempo de corte (ou “*cut-off*”). Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação à linha de base (= tempo de latência x 100/linha de base - 100). Os valores da área sob curva (ASC) foram calculados pelo programa Prisma 5.0. a partir da curva de resposta de percentual de aumento em relação à linha de base (% AERLB) no teste da placa quente, durante 30 a 180 minutos após a administração, segundo a fórmula da área do trapézio: $ASC = 30 \times \%AERLB [(min30) + (minu60) + \dots + (min180)]$. O protocolo seguiu o esquema abaixo (Esquema 4).



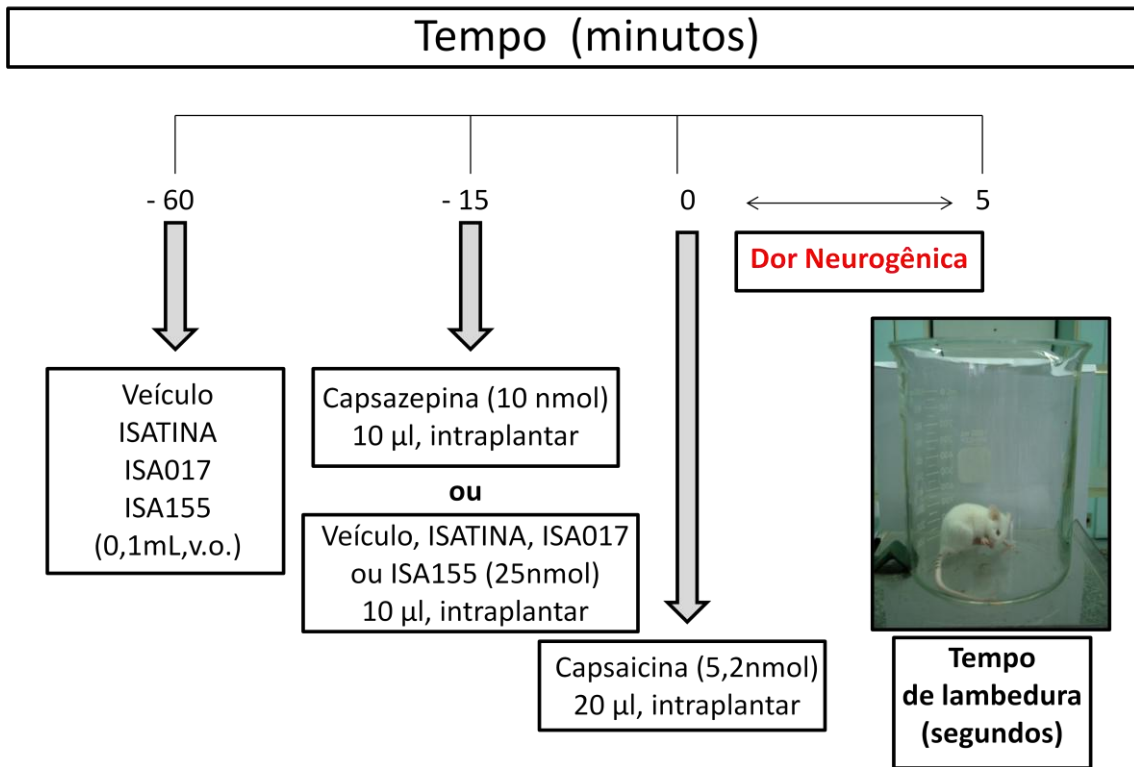
Esquema 4: Protocolo do modelo da placa quente.

3.8. Nociceção Induzida pela Injeção Intraplantar de Capsaicina

Este modelo foi proposto por Sakurada e cols. (1992) e tem como objetivo avaliar o envolvimento dos receptores vaniloides no efeito antinociceptivo da Isatina e seus derivados sobre a dor de origem neurogênica.

Após a injeção intraplantar de 20 μ L de capsaicina (5,2 nmol/pata) na pata posterior direita, os animais foram colocados em um aparato transparente e o tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi cronometrado por um período de 5 minutos, sendo considerada como uma reação nociceptiva. Os animais foram tratados por via oral 1 hora antes da injeção de capsaicina com a Isatina, ISA017, ISA155 ou veículo. Também foram tratados por via intraplantar com capsazepina (10nmol/pata), um antagonista do receptor TRPV-1, 15 minutos antes da injeção intraplantar da capsaicina.

Com o objetivo de avaliarmos uma possível ação direta das substâncias testadas nos nociceptores e receptores TRPV-1 presentes na pata do animal e supostamente descartar que a ação das substâncias testadas possam ser devido a geração de metabólitos ativos quando a administração é feita por via oral, a Isatina, ISA017 ou ISA155 foram administradas i.pl. parte na dose de 25nmol/pata (em um volume final de 10 μ L) 15 minutos antes da injeção intraplantar de capsaicina. O protocolo experimental segue o esquema abaixo (Esquema 5).



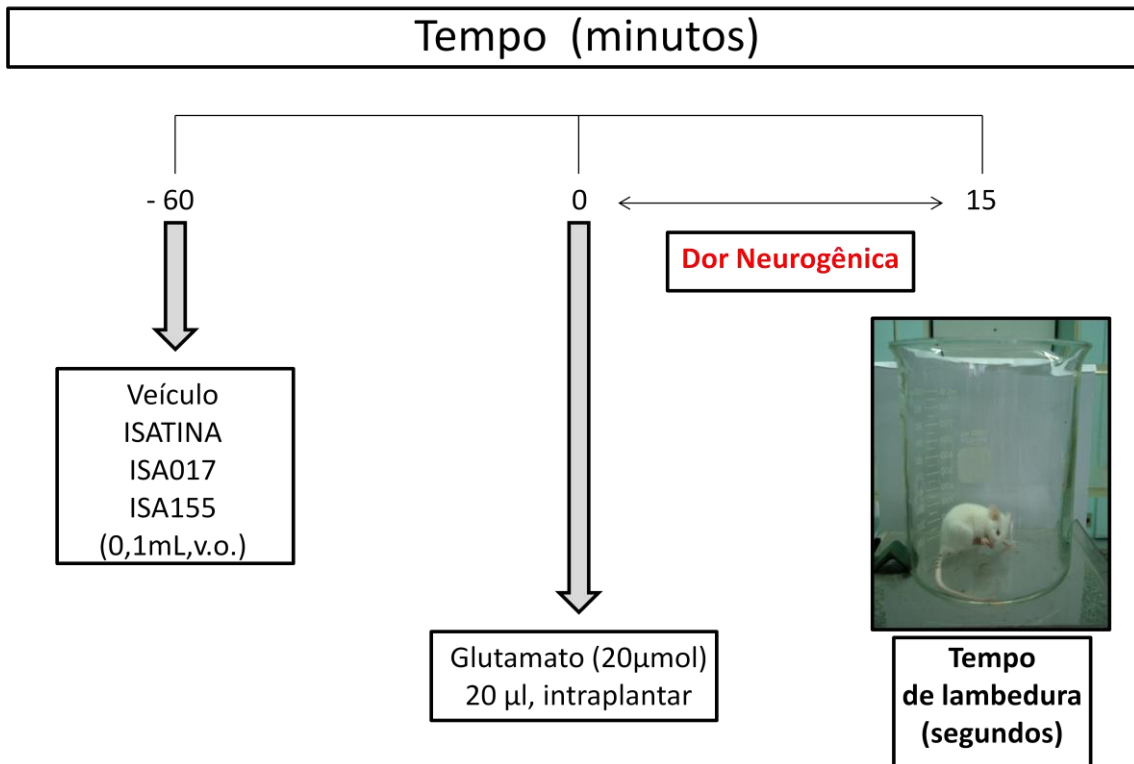
Esquema 5: Protocolo da nociceção induzida pela capsaicina.

3.9. Nocicepção Induzida pela Injeção Intraplantar de Glutamato

Este modelo foi proposto primeiramente por Beirith e cols. (1998) e avalia substâncias que atuam no sistema glutamatérgico envolvido na transmissão nociceptiva.

A injeção de glutamato induz uma estimulação direta dos neurônios nociceptivos, levando a liberação de mediadores inflamatórios e neuropeptídeos envolvidos na transmissão dolorosa. Com o objetivo de investigarmos se os aminoácidos excitatórios estariam envolvidos na atividade antinociceptiva da Isatina e seus derivados, estas foram avaliadas na nocicepção induzida pelo glutamato (BEIRITH e cols., 2002).

Após o tratamento com a Isatina, ISA017, ISA155, ou veículo, os animais receberam a injeção intraplantar de 20 μ L de glutamato (20 μ mol/pata). Imediatamente após a injeção, os animais foram colocados em um aparato transparente e o tempo em que os animais ficaram lambendo ou mordendo a pata foi cronometrado por um período de 15 minutos. O protocolo experimental seguiu o esquema abaixo (Esquema 6).



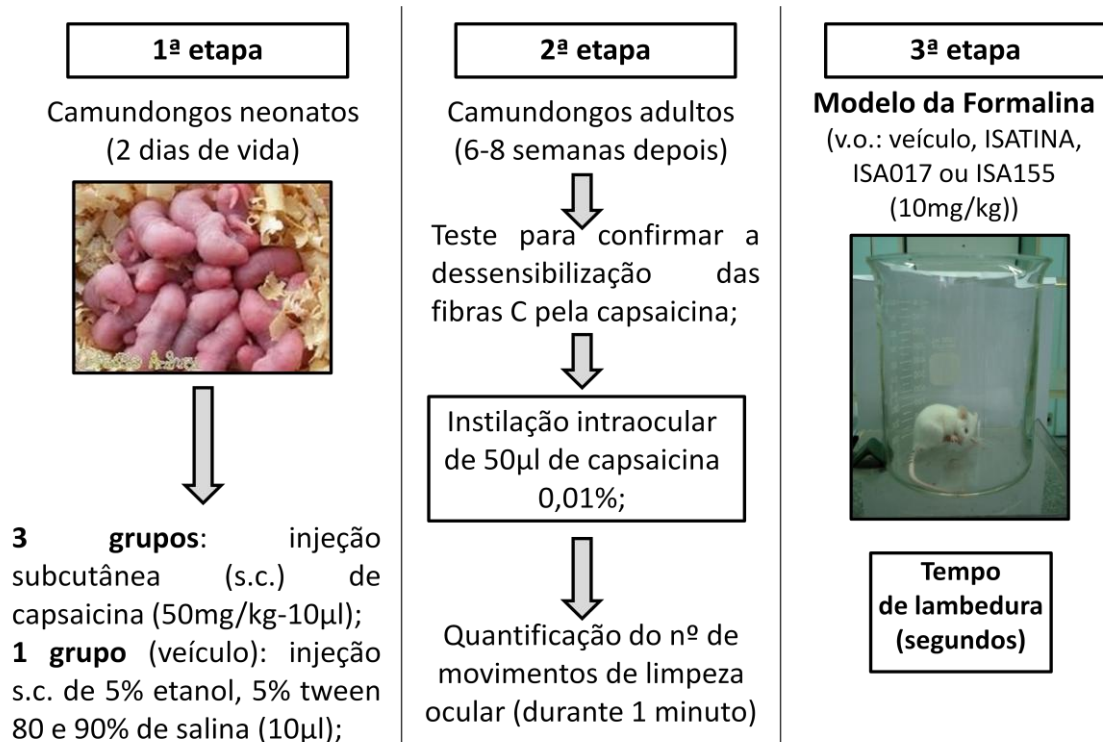
Esquema 6: Protocolo da nociceção induzida pelo glutamato.

3.10. Investigação de um Possível Mecanismo de Ação Antinociceptivo

Com o objetivo de tentar esclarecer o mecanismo de ação antinociceptivo da Isatina e seus derivados, os animais foram pré-tratados, por via intraperitoneal, 15 minutos antes da administração por via oral do veículo, Isatina, ISA017 ou ISA155 (dose de 10 mg/kg) com: naloxona (antagonista não seletivo de receptor opioide, 1mg/kg), atropina (antagonista não seletivo de receptor muscarínico, 1mg/kg), L-NAME (inibidor da enzima óxido nítrico sintase, 3mg/kg), mecamilamina (antagonista não seletivo de receptor nicotínico, 2mg/kg), glibenclamida (bloqueador do canal de K⁺ sensível ao ATP, 2mg/kg), ioimbina (antagonista seletivo de receptor α 2-adrenérgico, 2mg/kg), AM251 (antagonista de receptor canabinoide CB₁, 1mg/kg) e ondasetrona (antagonista de 5-HT₃, 0,5 mg/kg). Após 30 minutos do tratamento com a Isatina ou seus derivados, os animais foram submetidos ao teste da placa quente. As doses utilizadas dos antagonistas foram escolhidas baseando-se em dados da literatura, (SANTOS e cols., 2005; PIETROVSKI e cols., 2006; MARCON e cols., 2009) e de nosso próprio grupo (PINHEIRO e cols., 2010).

3.11. Avaliação do Envolvimento das Fibras Sensíveis à Capsaicina

Seguindo o modelo proposto por Santos e Cols. (2005), camundongos neonatos (2 dias de vida) foram tratados uma única vez com capsaicina (50 mg/kg, s.c.) com o propósito de induzir a degeneração irreversível de neurônios aferentes não mielinizados, especialmente as fibras C) e com o objetivo de explorarmos o papel das fibras sensíveis à capsaicina no efeito antinociceptivo da Isatina e seus derivados. Os animais controle receberam, o mesmo volume de veículo utilizado para dissolver a capsaicina. Após 8 semanas, para confirmar a dessensibilização das fibras C causada pela capsaicina, foi feita a instilação intraocular de 50 μ L de capsaicina (0,01%) e foi quantificado o número de movimentos de limpeza ocular (piscadas) durante 1 minuto como (SANTOS e cols., 2005). Estes animais foram submetidos ao modelo da formalina, no dia seguinte após a confirmação da dessensibilização, Os animais foram tratados com o veículo, Isatina, ISA017 ou ISA155 (dose de 10mg/kg, v.o.). O protocolo experimental seguiu o esquema abaixo (Esquema 7).



Esquema 7: Protocolo de avaliação do envolvimento das fibras sensíveis à capsaicina.

3.12. Modelo da Hiperálgia Térmica (Teste da placa quente modificado)

Segundo Sammons e cols. (2000), o modelo da hiperálgia térmica segue os princípios do modelo da placa quente, porém com algumas modificações, visto que neste caso há a indução da resposta inflamatória aguda.

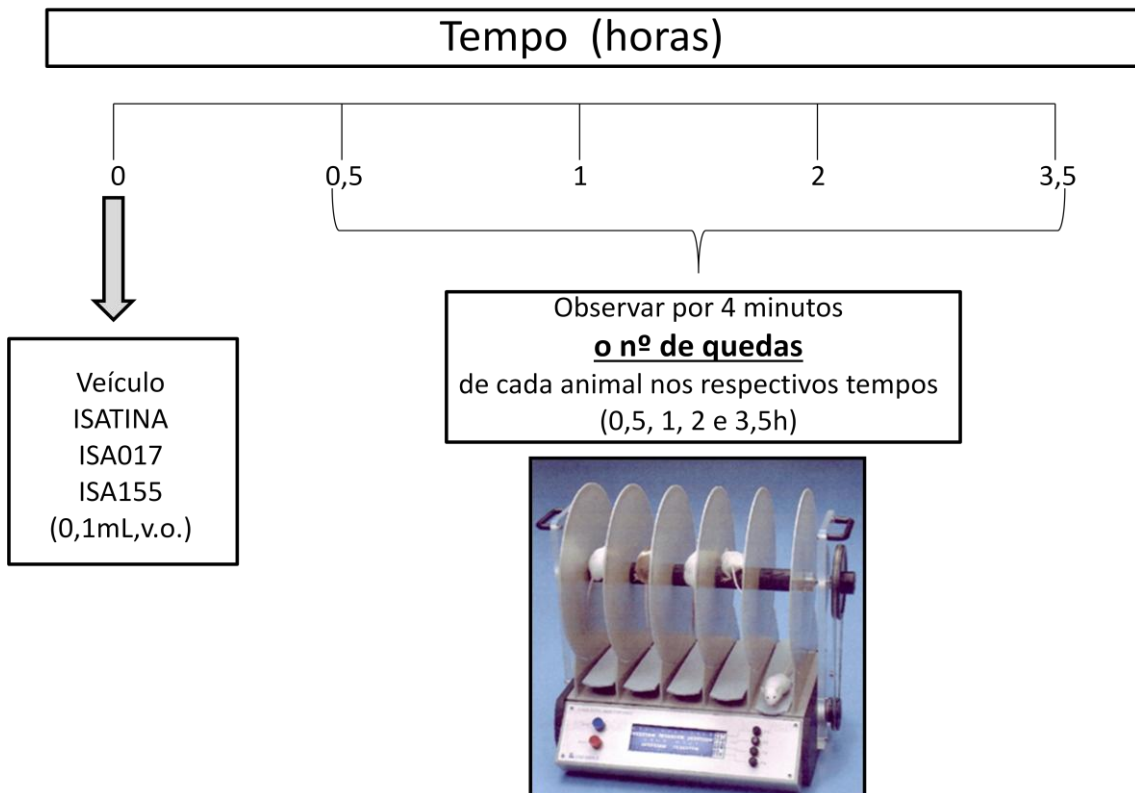
O camundongo foi colocado sobre uma placa aquecida à temperatura de $55^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. O tempo, em segundos, que o animal demorou para saltar e/ou lambear a pata posterior direita, foi registrado com o auxílio de um cronômetro e denominado de “tempo de latência”.

Foram realizadas duas medidas controles (C1 e C2) com intervalo de 30 minutos antes da administração por via oral com o veículo, Isatina, ISA017 ou ISA155. A média das medidas controles foi denominada “linha de base”. Meia hora após a administração por via oral das substâncias foi feita uma injeção intraplantar de carragenina 2%, na pata posterior direita do animal (25 μL /pata). Foram realizadas várias medidas dos tempos de latência com intervalos de 1 hora entre cada uma delas (de 1 hora até 6 horas). Com o objetivo de se evitar danos teciduais, se estabeleceu um tempo máximo de exposição das patas do animal à placa aquecida, representado como três vezes o valor da linha de base e denominado tempo de corte (ou “*cut-off*”). Reduções no tempo de permanência do animal sobre a placa aquecida, observadas nos diferentes tempos após a injeção de carragenina foram tomadas como indicativo do desenvolvimento da hiperálgia inflamatória. (LAVICH e cols., 2005).

3.13. Avaliação do Desempenho Locomotor e Atividade Espontânea

3.13.1. Modelo do Rota-rod

Para avaliar o efeito da Isatina e seus derivados no desempenho locomotor dos camundongos utilizou-se o aparelho de rota rod. O aparelho contém uma barra de ferro giratória com velocidade regulável em rotações por minuto (8 rpm, 3,7 cm de diâmetro) (DUNHAM e MIYA, 1957; GODOY e cols., 2004). Vinte e quatro horas antes dos experimentos, todos os animais foram treinados até que eles pudessem permanecer no aparelho durante 60 segundos sem cair. No dia do experimento, os camundongos foram tratados com veículo, Isatina, ISA017 ou ISA155 (10 mg/kg, v.o.) e testados no rotarod desde 0,5 até 3,5 h após a sua administração. O número de quedas dos camundongos foi contabilizado até 240 segundos. O protocolo experimental seguiu o esquema abaixo (Esquema 8).

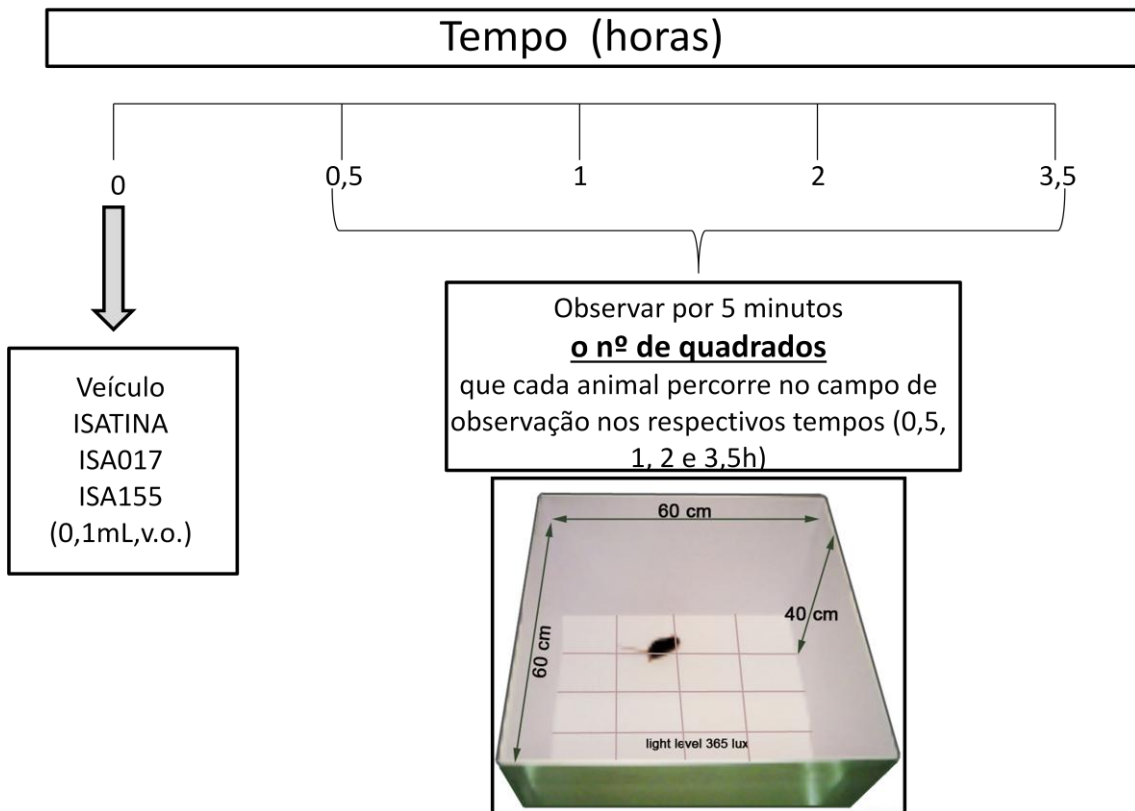


Esquema 8: Protocolo do modelo do rota-rod.

3.13.2. Modelo do Campo Aberto

Este teste foi baseado na metodologia descrita por Sielgel (1946), validado por Archer (1973) e adaptado por Barros e cols. (1991) e permite uma avaliação da atividade estimulante ou depressora de um dado composto, podendo ainda indicar atividades mais específicas como ação ansiolítica.

Os camundongos receberam, por via oral, o veículo, Isatina, ISA017 ou ISA155 (10mg/kg) e 60 minutos após o tratamento eles foram colocados individualmente em uma câmara de observação, cujo piso era dividido em 50 quadrados (5 cm × 5 centímetros), sendo avaliado a atividade exploratória dos animais (O número total de quadrados percorridos pelos animais foi contado durante 5 minutos. O protocolo experimental seguiu o esquema abaixo (Esquema 9).



Esquema 9: Protocolo do modelo do campo aberto.

3.14. Toxicidade

Durante os procedimentos experimentais não foram observados quaisquer efeitos que indicassem sinais de toxicidade da ISATINA ou de seus derivados, nos animais tratados nas diferentes doses testadas. Foram feitas observações considerando alteração da locomoção, alteração do tônus muscular, contorções abdominais, alteração na frequência respiratória, sedação, hipnose, agressividade, hiperexcitabilidade, convulsões, diarreia, piloereção, sialorréia, alergia e morte.

Ao final dos experimentos, os animais sofreram eutanásia por deslocamento cervical, os estômagos e intestinos foram retirados e observados quanto a presença ou ausência de gases ou outras alterações visíveis. Os estômagos foram abertos pela grande curvatura e, na região interna, foi avaliado o aparecimento de úlceras, pontos, hemorrágicos ou feridas.

3.15. Análise Estatística

Para a realização dos experimentos foram utilizados entre 5 e 8 animais por grupo. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão (d.p.). A significância estatística entre os grupos foi calculada pelo teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni, utilizando o programa *GraphPad Prism 5.0*. Os valores de p menores de 0,05 (*p < 0,05) foram considerados como indicativos de significância.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito no modelo da formalina

A administração intraplantar de formalina (2,5%) desencadeia uma nocicepção caracterizada por duas fases distintas, onde a primeira fase é denominada neurogênica e ocorre entre o momento da injeção da formalina e 5 minutos após a aplicação da mesma e a segunda fase, denominada inflamatória, que ocorre entre 15 e 30 minutos após a injeção da formalina.

No grupo de animais tratados oralmente com o veículo, o tempo em que os animais permaneceram lambendo as patas foi de $52,4 \pm 2,6$ segundos na 1ª fase e de $231,9 \pm 3,6$ segundos na 2ª fase. O ácido acetilsalicílico (AAS, 200 mg/kg) e a morfina (2,5 mg/kg) foram utilizados como fármacos de referência. No grupo pré-tratado oralmente com AAS, 60 minutos antes da injeção de formalina, o tempo obtido na 1ª fase foi de $45,7 \pm 4,1$ segundos e na 2ª fase foi de $109,6 \pm 5,6$ segundos, com inibição de 52,7% na 2ª fase. No grupo pré-tratado oralmente com morfina o tempo obtido na 1ª fase foi de $28,8 \pm 3,7$ segundos e na 2ª fase foi de $45,7 \pm 6,1$ segundos, com consequente inibição de 45% na 1ª fase e 80,3% na 2ª fase.

O gráfico 1 mostra que a Isatina foi capaz de inibir significativamente a 1ª fase da resposta à formalina nas 2 maiores doses (1 e 10 mg/kg), com valores de inibição de 29,9% e 26,3%, respectivamente. Quando a 2ª fase da resposta à formalina foi estudada, observou-se que as 3 doses (0,1, 1 e 10 mg/kg) foram capazes de reduzir significativamente o tempo que o animal permaneceu lambendo a pata, com valores de inibição de 19,1%, 38,8% e 35,5%, respectivamente.

A ISA017 e a ISA155 foram capazes de inibir significativamente e em todas as doses testadas a 1ª e a 2ª fase da resposta à formalina (valores de inibição: 1ª fase (ISA017: 0,1 mg/kg: 27,7%; 1mg/kg: 42,5% ; 10 mg/kg: 33,4%; ISA155: 0,1 mg/kg:41% ; 1mg/kg:38,5% ; 10 mg/kg: 58,4%) e 2ª fase:(ISA017: 0,1 mg/kg: 29,1% ;

1mg/kg: 23,8% ; 10 mg/kg: 66,6%; ISA155: 0,1 mg/kg: 32,5% ; 1mg/kg: 36,8% ; 10 mg/kg: 64,9%).

Podemos observar que a ISA 017 e ISA155 na dose de 10 mg/kg, na 2ª fase do modelo da formalina, foram capazes de reduzir de maneira significativa o tempo de lambertura se comparado com o veículo e também com o AAS. Também diminuem em relação ao grupo tratado com a morfina.

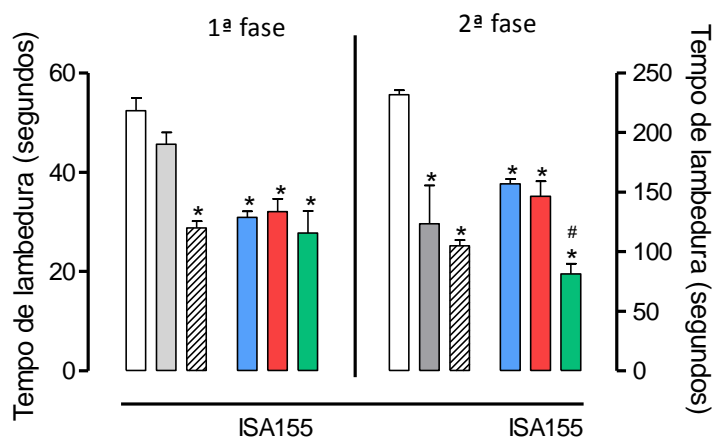
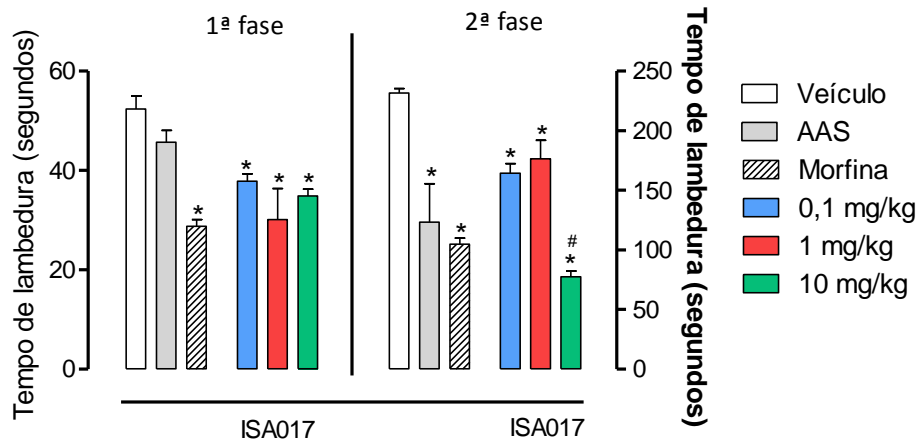
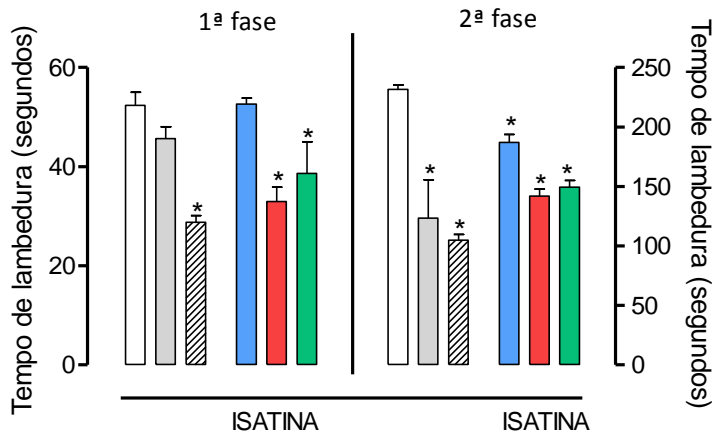


Gráfico 1: Efeito da Isatina, ISA017 e ISA155 no modelo da formalina. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (PBS), ácido acetilsalicílico (AAS, 200 mg/kg), morfina (2,5 mg/kg) ou a Isatina, ISA017 ou ISA155 (0,1, 1 ou 10 mg/kg), 60 minutos antes da injeção intraplantar de formalina (2,5%). Os resultados são expressos como média \pm d.p. do tempo em que os animais permaneceram lambendo a pata injetada com a formalina (n=6-8). A significância estatística de $p < 0,05$ foi calculada entre os grupos tratados com a Isatina, ISA017, ISA155 ou AAS e o veículo (*) e entre os grupo tratado com a Isatina, ISA017 ou ISA155e o AAS (#) por ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni.

4.2. Efeito no Modelo da Placa Quente

Como a Isatina e seus derivados mostraram resultado significativo na 1ª fase do modelo da formalina, uma fase neurogênica, decidimos avaliar uma possível atividade antinociceptiva central das substâncias. Para tanto, utilizamos o modelo da placa quente.

Os animais foram tratados com a Isatina, ISA017 ou ISA155, nas doses de 0,1, 1 ou 10 mg/kg. Os efeitos antinociceptivos das três substâncias foram comparados com o da morfina, na dose de 2,5 mg/kg. O grupo de animais tratados com a Isatina apresentou, na dose de 10 mg/kg, 120 e 150 minutos após a sua administração, um efeito antinociceptivo com percentual de aumento em relação à linha de base de 70% e 76%, respectivamente, sendo superior aos valores da morfina (Gráfico 2).

Os animais tratados com a ISA017 apresentaram, também na dose de 10 mg/kg, e no tempo de 60, 120 e 150 minutos e após a sua administração, um efeito antinociceptivo com percentual de aumento em relação à linha de base de 65,9%, 66,7% e 59,7%, respectivamente na dose de 0,1 mg/kg, nos tempos de 90 e 120 minutos (gráfico 3) Já o gráfico 4, mostra que o tratamento com a ISA155, nas doses de 1 e 10 mg/kg, 120 e 150 minutos após a sua administração, um efeito antinociceptivo

com percentual de aumento em relação à linha de base de 70,3% e 68,8, e 61,8% e 62,3%, respectivamente.

Ao compararmos no tempo de efeito máximo da ISA017 e ISA155 (120 minutos) o seu efeito antinociceptivo com o efeito da morfina, observamos que nas doses de 10 mg/kg (ISA017) e de 1 mg/kg (ISA155) estas duas substâncias se mostraram significativamente mais eficaz do que o analgésico opioide

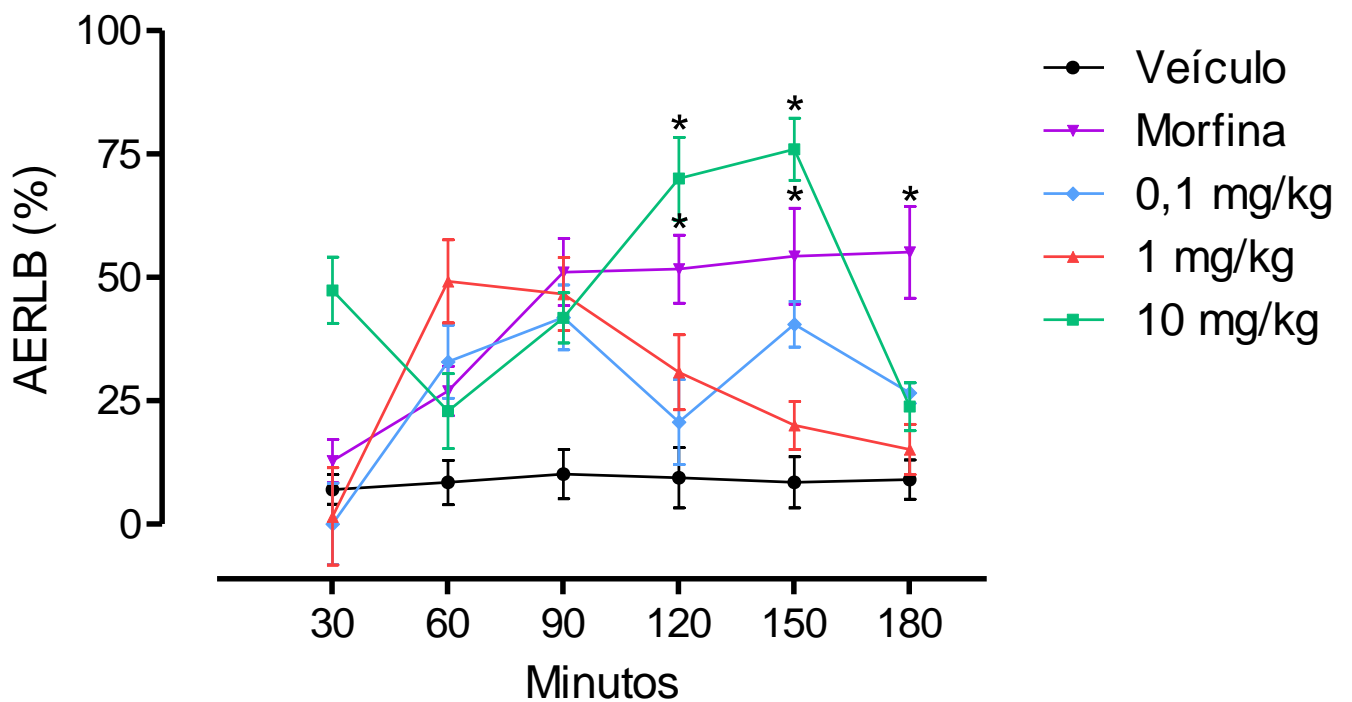


Gráfico 2: Efeito da Isatina no modelo da placa quente. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (PBS), morfina (2,5 mg/kg) ou a Isatina (0,1, 1 ou 10 mg/kg). O tempo necessário para o animal lambar as patas ou saltar da placa aquecida foi quantificado em segundos. Os resultados são expressos como média \pm d.p. do percentual de aumento em relação à linha de base (n=6-8). A significância estatística ($p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com a Isatina ou morfina e o veículo (*) e entre os grupos tratados com a Isatina e a morfina (#), por ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni.

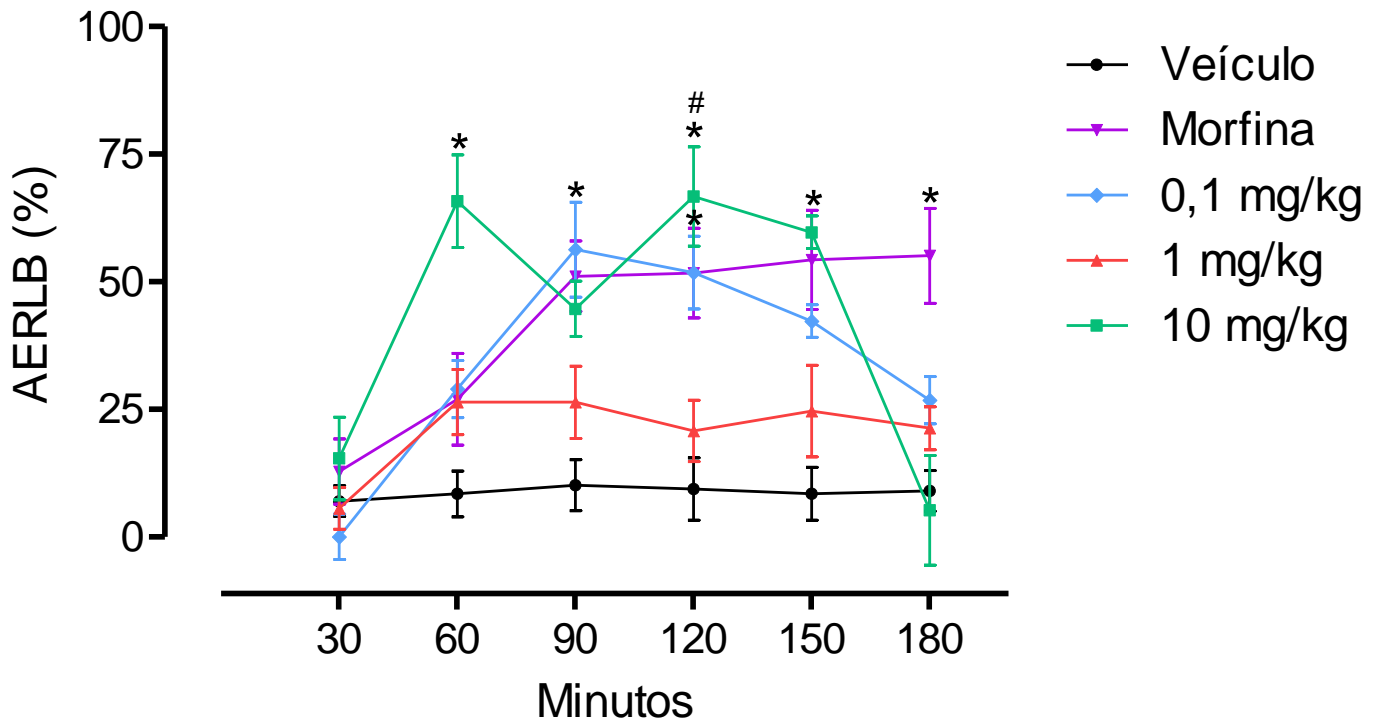


Gráfico 3: Efeito da ISA017 no modelo da placa quente. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (PBS), morfina (2,5 mg/kg) ou a ISA017(0,1, 1 ou 10 mg/kg). O tempo necessário para o animal lambar as patas ou saltar da placa aquecida foi quantificado em segundos. Os resultados são expressos como média \pm d.p. do percentual de aumento em relação à linha de base (n=6-8). A significância estatística ($p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com a Isatina ou morfina e o veículo (*) e entre os grupos tratados com a Isatina e a morfina (#), por ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni.

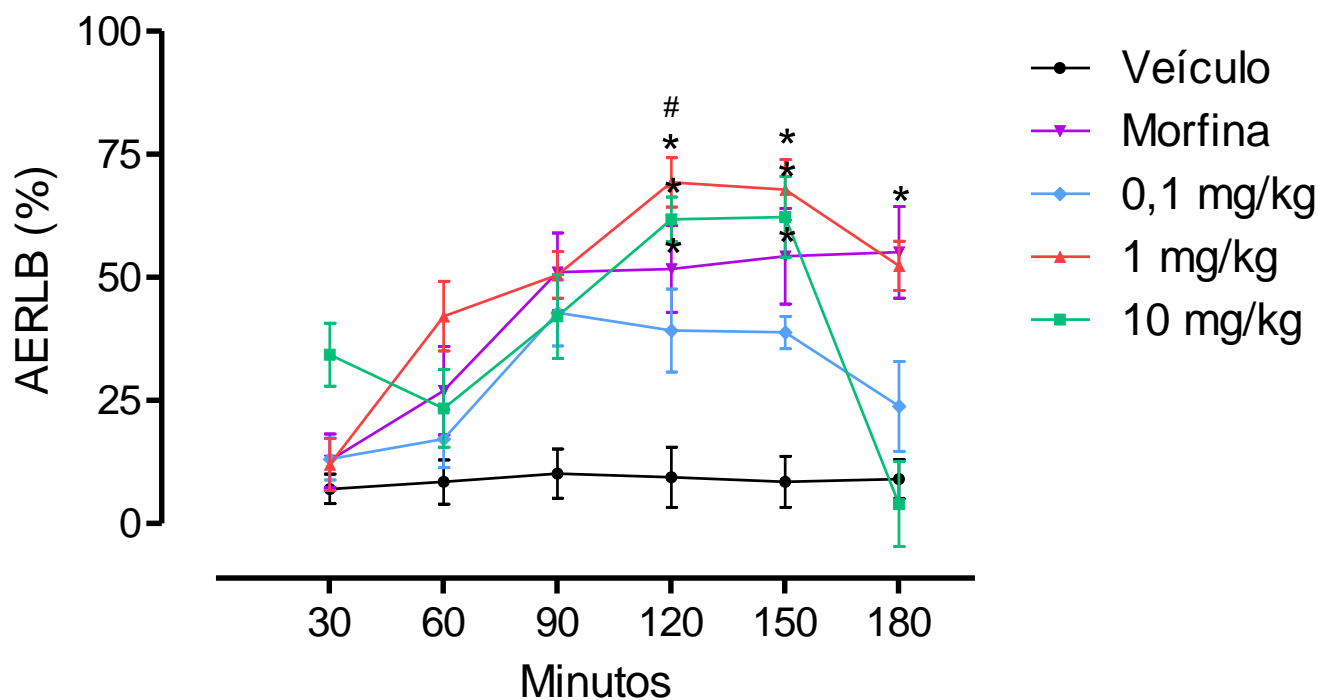


Gráfico 4: Efeito da ISA155 no modelo da placa quente. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (PBS), morfina (2,5 mg/kg) ou a ISA155(0,1, 1 ou 10 mg/kg). O tempo necessário para o animal lambar as patas ou saltar da placa aquecida foi quantificado em segundos. Os resultados são expressos como média \pm d.p. do percentual de aumento em relação à linha de base (n=6-8). A significância estatística ($p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com a Isatina ou morfina e o veículo (*) e entre os grupos tratados com a Isatina e a morfina (#), por ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni.

Quando os resultados expressos em tempo de latência ao longo do tempo foram convertidos em um gráfico em forma de área sob a curva (ASC) foi observado que o tratamento com a Isatina, ISA017 ou ISA155 tiveram um efeito antinociceptivo que não apresentou um perfil dose-dependente. Foi observado que a Isatina, ISA017 e ISA155 em todas as três doses testadas foram capazes de aumentar a ASC se comparada com o grupo tratado com o veículo. A ISA017, na dose de 10 mg/kg e a ISA155, na dose de 1 mg/kg também foram capazes de aumentar a ASC em relação ao grupo tratado com morfina (gráfico 5).

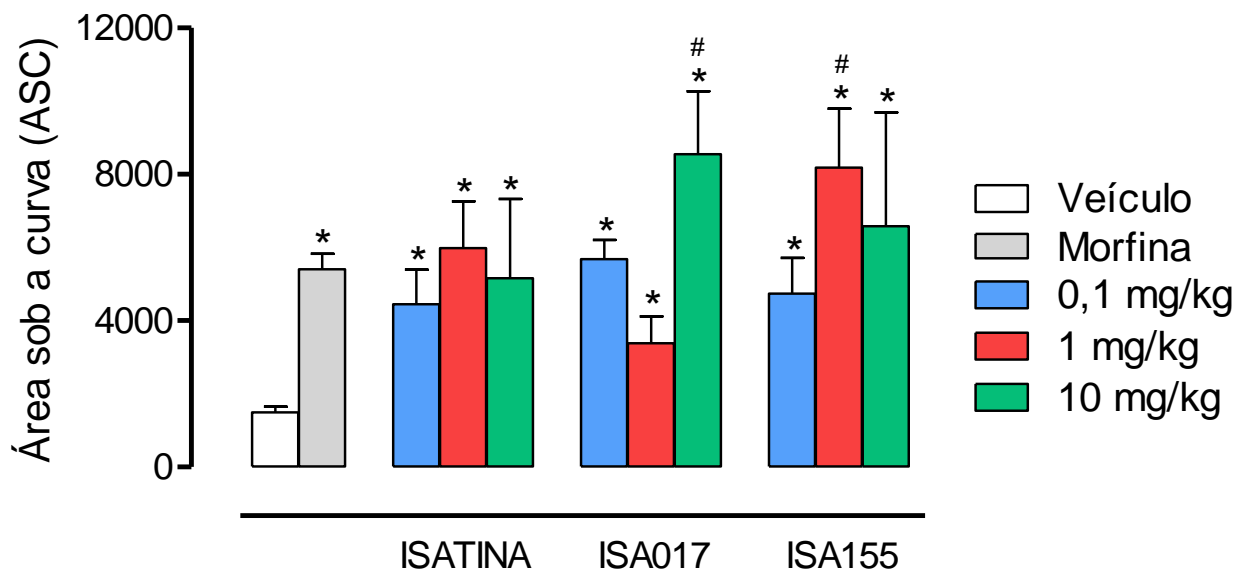


Gráfico 5: Área sob a curva (ASC) do efeito antinociceptivo da Isatina, ISA017 e ISA155 no modelo da placa quente. Os resultados são expressos como média da ASC \pm d.p. (n=6-8). A significância estatística de $p < 0,05$ foi calculada entre os grupos tratados com a Isatina, ISA017, ISA155 ou morfina (2,5 mg/kg) e o veículo (*) e entre os grupos tratados com a Isatina, ISA017 ou ISA155 e a morfina (#), por ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

4.3. Efeito no Modelo de Nociceção Induzida pela Injeção Intraplantar de Capsaicina

Com objetivo de avaliarmos se os receptores TRPV-1 estariam envolvidos na antinociceção da Isatina, ISA017 e ISA155, utilizamos o modelo de algesia induzida pela injeção intraplantar de capsaicina, como descrito por Sakurada e cols. (1992). A injeção intraplantar de capsaicina induz uma resposta nociceptiva aguda através da ativação de receptor TRPV-1, expresso em neurônios sensitivos na periferia. O gráfico 6, mostra que o pré-tratamento dos animais com a Isatina, ISA017, nas 3 doses testadas ou ISA155, na dose de 0,1 mg/kg, foram capazes de causar redução significativa do tempo de lambertura dos animais submetidos à nociceção induzida pela capsaicina,. Os resultados obtidos podem ser comparados ao efeito antinociceptivo apresentado pelo pré-tratamento intraplantar com capsazepina (10 nmol/pata, um antagonista do receptor TRPV-1) que reduziu em 67,8% o efeito da capsaicina ($96,7 \pm 3,4$ segundos no grupo veículo *versus* $32,5 \pm 2,9$ segundos no grupo pré-tratado com o antagonista).

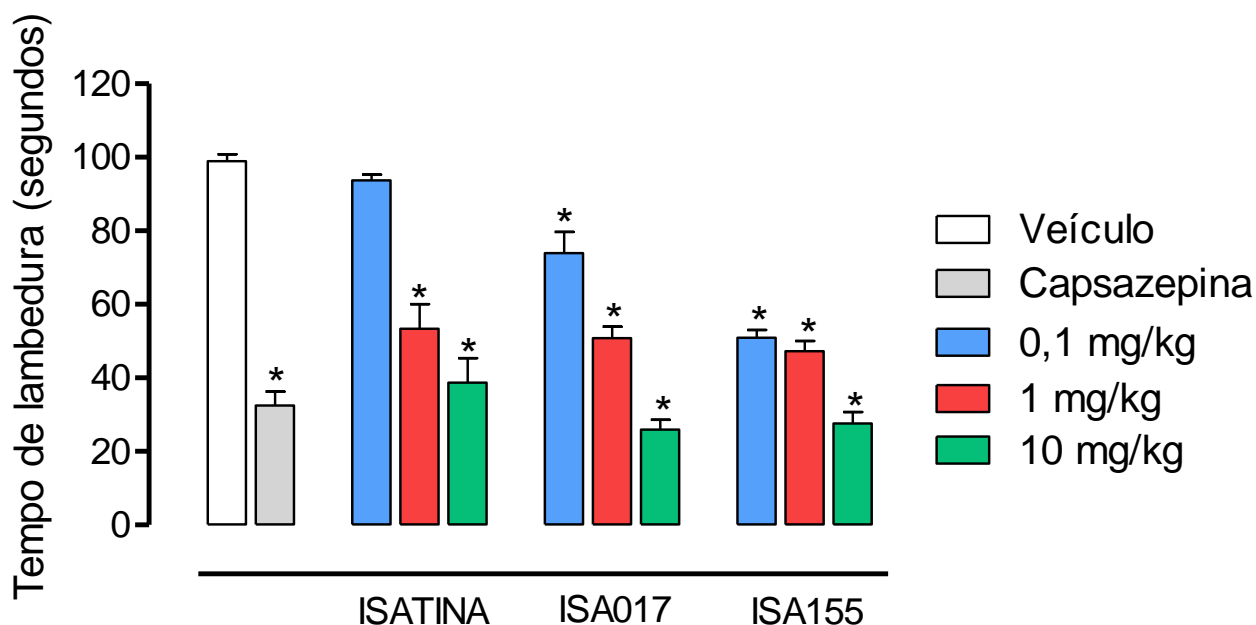


Gráfico 6: Efeito antinociceptivo da Isatina, ISA017 e ISA155 no modelo de nociceção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo, Isatina, ISA017 ou ISA155 (0,1, 1 ou 10 mg/kg), 60 minutos da injeção intraplantar de capsaicina (5,2 nmol/pata). Os resultados são expressos como média \pm d.p. do tempo de lambedura (em segundos) (n=6-8). A significância estatística de $p < 0,05$ foi calculada entre os grupos tratados com capsazepina (10 nmol/pata), Isatina, IS017 ou ISA155 e o veículo (*) por ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

Com o objetivo de avaliar se as substâncias testadas poderiam gerar seu efeito antinociceptivo por uma ação local e/ou sem sofrer metabolização pelo sistema hepático (que pode ocorrer quando são administradas por via oral), resolvemos administrar a Isatina, ISA017 ou ISA155 pela via intraplantar para ver se o efeito gerado iria ser diferente ou similar aquele gerado pela administração oral.

O gráfico7, mostra que a Isatina, ISA017 ou ISA155 quando administradas por via intraplantar na dose de 25 nmol/pata, 15 minutos antes da injeção de capsaicina também reduziram o tempo de lambadura da pata se comparado com o grupo veículo, ou seja, a administração oral e intraplantar apresentam um perfil semelhante quanto à inibição da nocicepção produzida pela capsaicina.

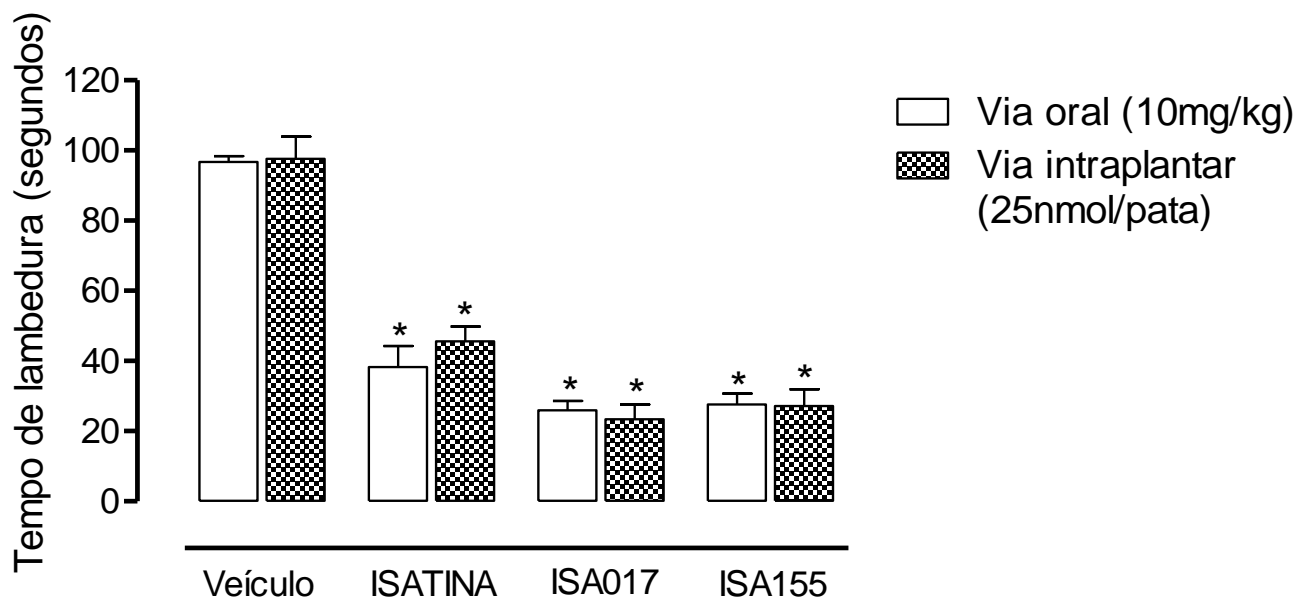


Gráfico 7: Efeito antinociceptivo da Isatina, ISA017 e ISA155 (via intraplantar) no modelo de nociceção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina. Os animais foram pré-tratados por via intraplantar com veículo, Isatina, ISA017 ou ISA155 (25 nmol/pata), 15 minutos da injeção intraplantar de capsaicina (5,2 nmol/pata). Os resultados são expressos como média \pm d.p. do tempo de lambedura (em segundos) (n=6-8). A significância estatística de $p < 0,05$ foi calculada entre os grupos tratados com capsazepina (10 nmol/pata), Isatina, IS017 ou ISA155 e o veículo (*) por ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

4.4. Efeito no Modelo de Nociceção Induzida pela Injeção Intraplantar de Glutamato

Diversas evidências indicam o envolvimento do glutamato na transmissão nociceptiva por fibras aferentes primárias, assim como no desenvolvimento e na manutenção da responsividade à dor (AANONSEN e WILCOX, 1990; BUDAI e cols., 1995; CARLTON, 2001). O glutamato evoca uma resposta nociceptiva de curta duração, mediada por receptores NMDA e não NMDA, através da excitação e sensibilização de nociceptores presentes na periferia e em locais de ação tanto espinal como supra-espinal. A fim de investigar se a ação glutamatérgica estava envolvida na antinociceção da Isatina, ISA017 e ISA155, avaliamos se o pré-tratamento dos animais com estas substâncias seria capaz de reverter o efeito antinociceptivo de corrente da injeção intraplantar de glutamato.

O pré-tratamento dos animais com a Isatina, ISA017 ou ISA155 causou, nas doses de 1 e 10 mg/kg, redução significativa do tempo de lambertura da pata, nos animais submetidos à nociceção induzida pelo glutamato.

Na dose de 1 mg/kg, a Isatina, ISA017 e ISA155 reduziram em 48,6% ($66,6 \pm 3,5$ segundos), 54,5% ($59 \pm 2,9$ segundos) e 58,6% ($53,6 \pm 4,9$ segundos), respectivamente, o tempo de lambertura, quando comparados ao grupo tratado com o veículo ($129,6 \pm 4,5$). Já na dose de 10 mg/kg, as três substâncias testadas reduziram em 69,8% ($39,1 \pm 2,3$ segundos), 75,4% ($31,9 \pm 3,2$ segundos) e 76,8% ($30 \pm 1,9$ segundos), respectivamente quando comparados com o grupo tratado com o veículo (gráfico 8).

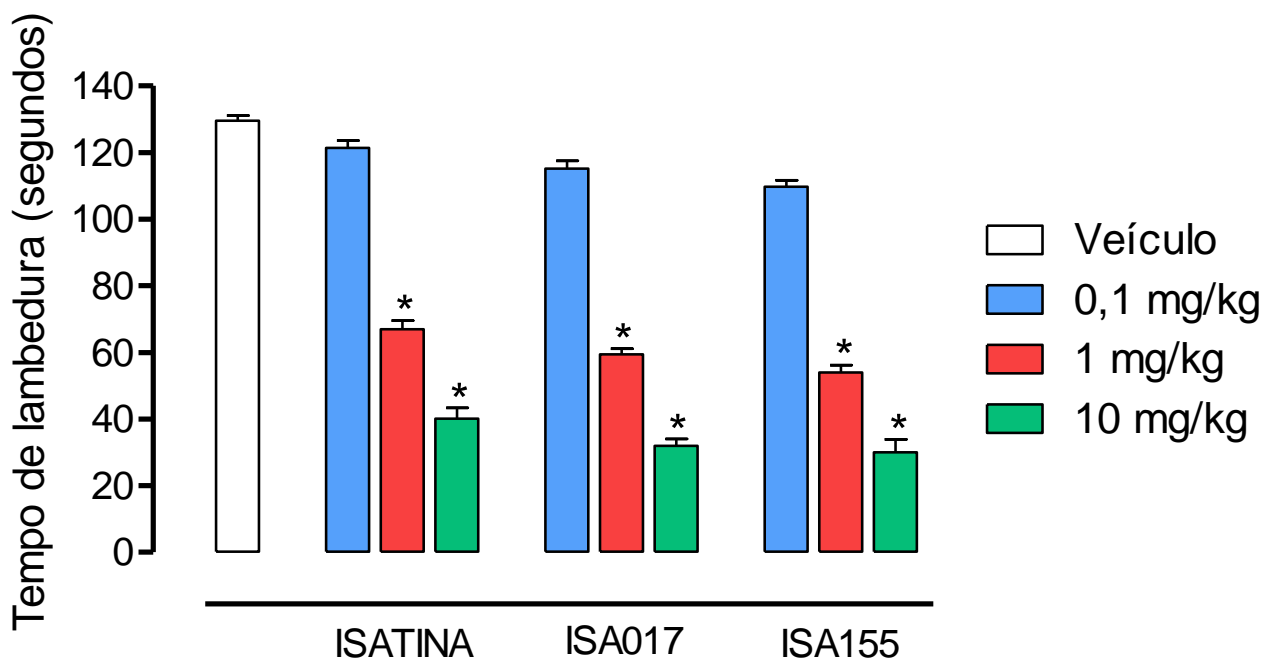


Gráfico 8: Efeito antinociceptivo da Isatina, ISA017 e ISA155 no modelo de nociceção induzida pela injeção intraplantar de glutamato. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo, Isatina, ISA017 ou ISA155 (0,1, 1 ou 10 mg/kg), 60 minutos da injeção intraplantar de glutamato (20 μ mol/pata). Os resultados são expressos como média \pm d.p. do tempo de lambertura (em segundos) (n=6-8). A significância estatística de $p < 0,05$ foi calculada entre os grupos tratados com Isatina, ISA17 ou ISA155 e o veículo (*) por ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

4.5. Investigação do Mecanismo de Ação Antinociceptiva

Como a Isatina, ISA017 e ISA155 mostraram efeito antinociceptivo significativo, resolvemos investigar a participação dos diferentes sistemas endógenos envolvidos tanto na transmissão do impulso nociceptivo quanto na ativação de vias que participam do controle da nocicepção.

Dessa forma, os animais foram pré-tratados com diferentes antagonistas dos principais receptores participantes dos mecanismos inibitórios da dor e, após 15 minutos, receberam a injeção da Isatina, ISA017 ou ISA155, na dose de 10 mg/kg. esta dose foi a escolhida por ter apresentado o melhor efeito antinociceptivo. As doses dos antagonistas utilizados foram escolhidas a partir de experimentos previamente realizados pelo nosso grupo e conforme descrito por Pinheiro e colaboradores (2010).

4.5.1. Avaliação da Participação do Sistema Opioide

Os animais foram pré-tratados com naloxona (dose de 1mg/kg, por via intraperitoneal), um antagonista não seletivo dos receptores opioides. Posteriormente receberam a administração, por via oral, da Isatina, ISA017 ou ISA155 (10 mg/kg) e foram submetidos à avaliação da resposta nociceptiva no modelo da placa quente.

Os resultados, apresentados na forma de ASC do efeito da Isatina, ISA017 e ISA155 mostram que o pré-tratamento com naloxona foi capaz de inibir de maneira significativa o efeito antinociceptivo das três substâncias testadas.

O valor da ASC nos animais tratados com a Isatina foi de 5.160. Após o pré-tratamento com naloxona os valores da ASC foram reduzidos para 1.566. A naloxona também foi capaz de inibir o efeito da ISA017, reduzindo valores de ASC de 7.622 para 1.458. O mesmo foi observado com a ISA155, onde a naloxona reduziu os valores de

ASC de 6.319 para 1.302, indicando uma participação do sistema opioide na ação antinociceptiva dessas substâncias (gráfico 9).

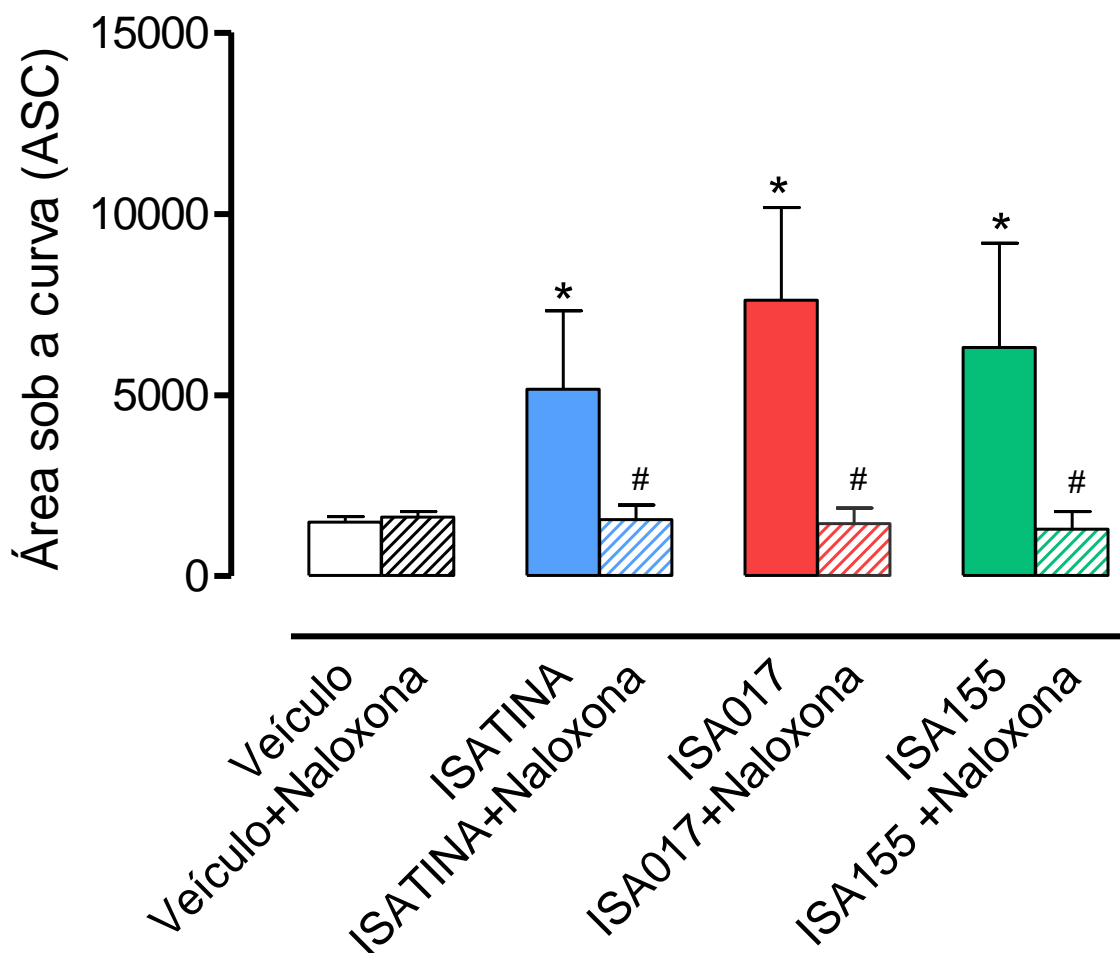


Gráfico 9: Avaliação da participação do sistema opioide sobre a antinociceção da Isatina, ISA017 e ISA155 no modelo da placa quente. Os animais foram pré-tratados com naloxona (1 mg/kg, i.p.), 15 minutos antes da administração oral da Isatina, ISA017 ou ISA155 (10 mg/kg). Os resultados são expressos como média \pm d.p. da ASC (n=6-8). A significância estatística de $p < 0,05$ foi calculada entre os grupos tratados com Isatina, ISA017 ou ISA155 e o veículo (*) e entre os grupos tratados com veículo+Naloxona, Isatina+Naloxona, ISA017+Naloxona ou ISA155+Naloxona e os seus respectivos grupos controles veículo, Isatina, ISA017 e ISA155 (#) por ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

4.5.2. Avaliação da Participação do Sistema Nitrérgico

Os animais foram pré-tratados com L-NAME, um inibidor da enzima óxido nítrico sintase, na dose de 3 mg/kg por via intraperitoneal. Após a administração por via oral com a Isatina, ISA017 ou ISA155 (10 mg/kg), os animais foram avaliados pelo modelo da placa quente.

O efeito antinociceptivo da ISA017 e ISA155 foi inibido significativamente pelo pré-tratamento dos animais com L-NAME, obtendo-se uma ASC de 1874 (ISA017 + L-NAME) *versus* 7622 (ISA017) e de 1676 (ISA155 + L-NAME) *versus* 6319 (ISA155). Estes resultados indicam a participação do NO na ação antinociceptiva da ISA017 e ISA155 (Gráfico 10).

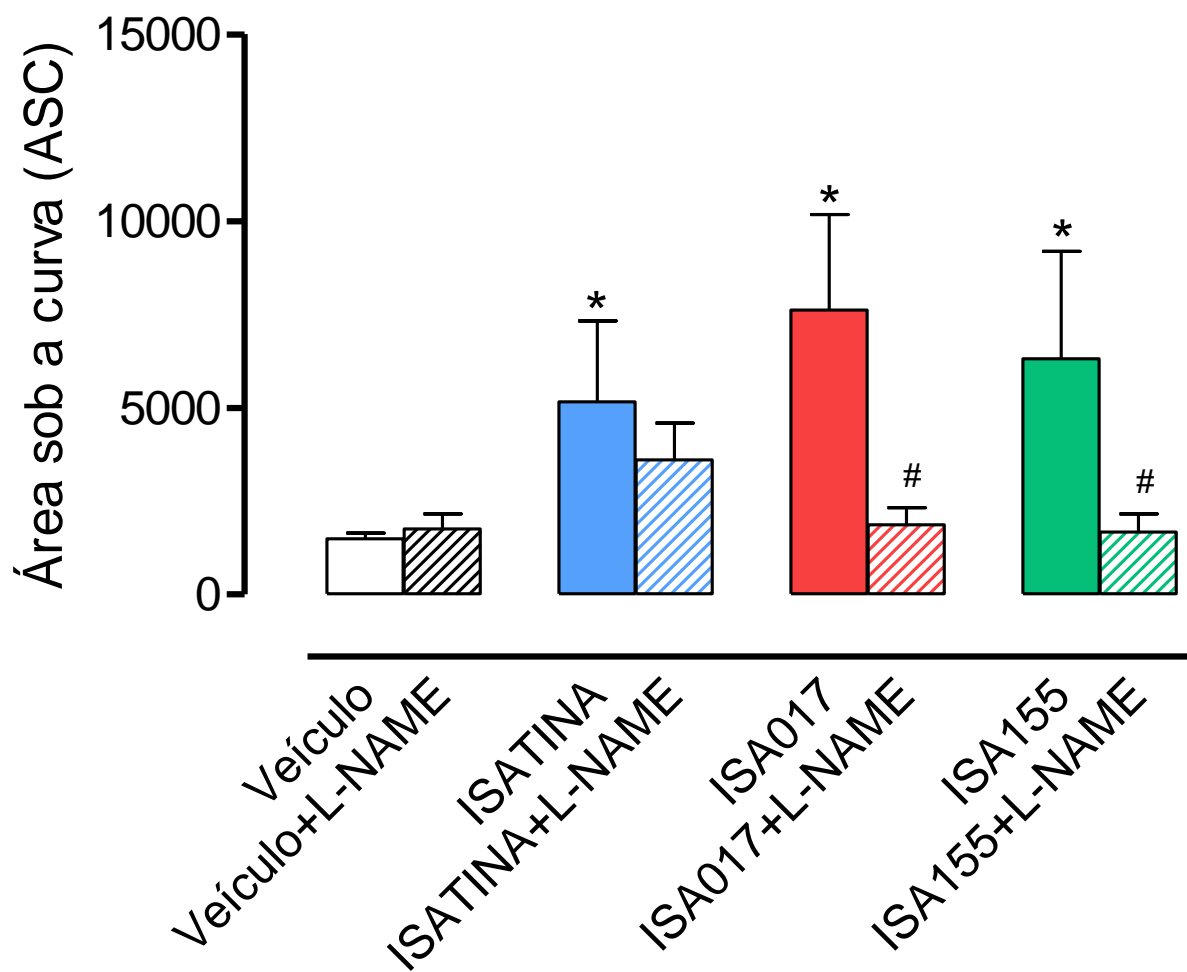


Gráfico 10: Avaliação da participação do sistema nitrérgico sobre a antinociceção da Isatina, ISA017 e ISA155 no modelo da placa quente. Os animais foram pré-tratados com L-NAME (3 mg/kg, i.p.), 15 minutos antes da administração oral da Isatina, ISA017 ou ISA155 (10 mg/kg). Os resultados são expressos como média \pm d.p. da ASC (n=6-8). A significância estatística de $p < 0,05$ foi calculada entre os grupos tratados com Isatina, ISA017 ou ISA155 e o veículo (*) e entre os grupos tratados com veículo+L-NAME, Isatina+L-NAME, ISA017+L-NAME ou ISA155+L-NAME e os seus respectivos grupos controles veículo, Isatina, ISA017 e ISA155 (#) por ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

4.5.3. Avaliação da Participação do Sistema Colinérgico

Os animais foram pré-tratados por via intraperitoneal com atropina, antagonista não seletivo dos receptores muscarínicos, na dose de 1 mg/kg ou com mecamilamina, antagonista dos receptores nicotínicos, na dose de 2 mg/kg. Após o tratamento por via oral com a Isatina, ISA017 ou ISA155 (10 mg/kg), os animais foram avaliados no modelo da placa quente. O pré-tratamento dos animais com a atropina foi capaz de prevenir os efeitos antinociceptivos das 3 substâncias, obtendo-se uma ASC de 1966 (Isatina + atropina) *versus* 5160 (Isatina), de 1897 (ISA017 + atropina) *versus* 7622 (ISA017) e de 1676 (ISA155 + atropina) *versus* 6319 (ISA155). Estes resultados indicam a participação do NO na ação antinociceptiva da ISA017 e ISA155.

Entretanto, o pré-tratamento dos animais com a mecamilamina foi capaz de inibir apenas o efeito antinociceptivo da ISA155, obtendo-se uma ASC de 1864 (ISA155 + mecamilamina) *versus* 6319 (ISA155) e esse mesmo antagonista resultou em aumento da ASC no efeito antinociceptivo da Isatina e ISA017 em relação ao grupo tratado com o veículo (gráfico 11).

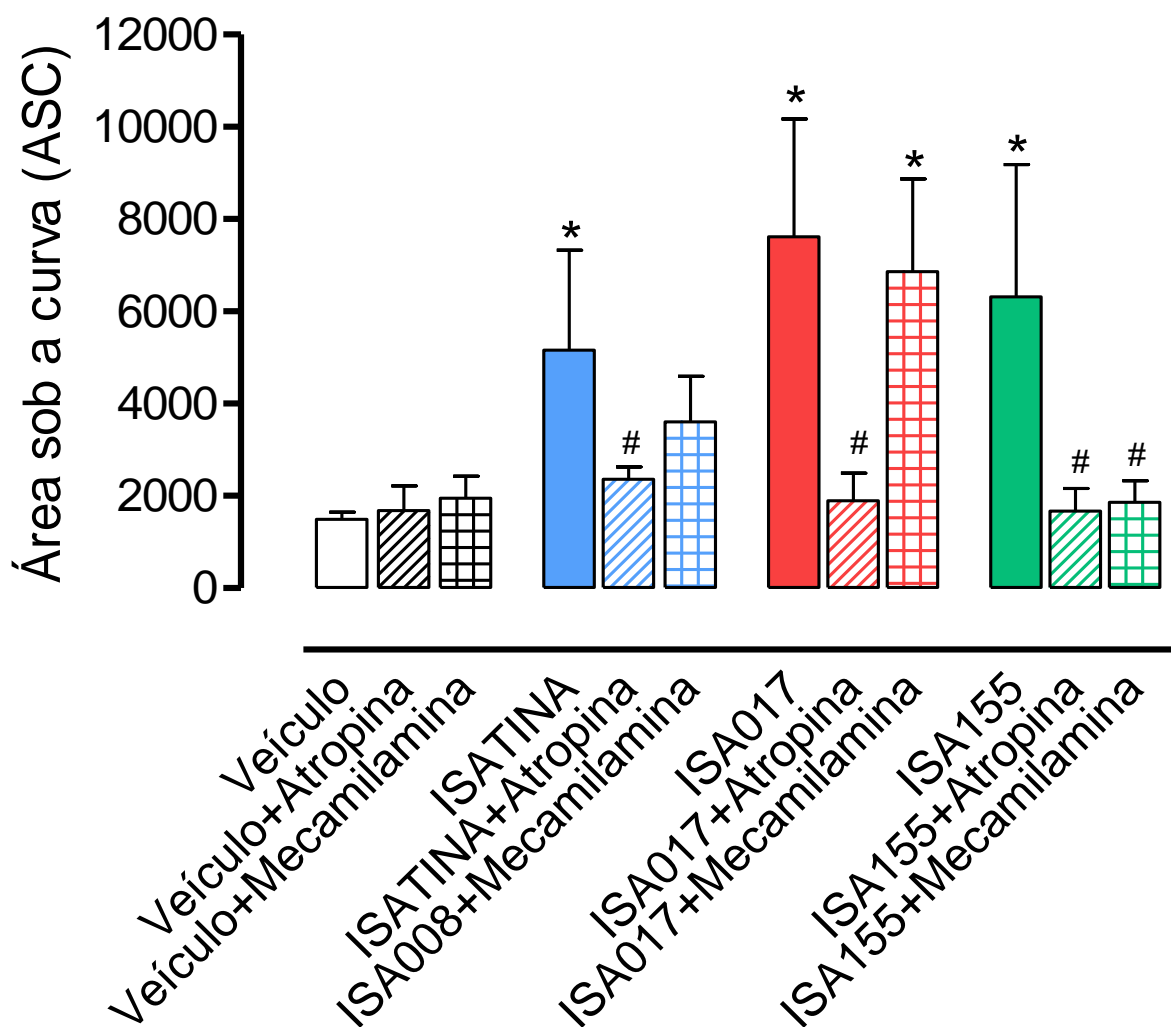


Gráfico 11: Avaliação da participação do sistema colinérgico sobre a antinociceção da Isatina, ISA017 e ISA155 no modelo da placa quente. Os animais foram pré-tratados com atropina (1 mg/kg, i.p.) ou mecamilamina (2 mg/kg), 15 minutos antes da administração oral da Isatina, ISA017 ou ISA155 (10 mg/kg). Os resultados são expressos como média \pm d.p. da ASC (n=6-8). A significância estatística de $p < 0,05$ foi calculada entre os grupos tratados com Isatina, ISA017 ou ISA155 e o veículo (*) e entre os grupos tratados com veículo+Atropina, Isatina+Atropina, ISA017+Atropina ou ISA155+Atropina, veículo+mecamilamina, Isatina+mecamilamina, ISA017+mecamilamina ou ISA155+mecamilamina, e os seus respectivos grupos controles veículo, Isatina, ISA017 e ISA155 (#) por ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

4.5.4. Avaliação da Participação do Canal de K⁺ sensível ao ATP

Os animais foram pré-tratados com glibenclamida, bloqueador da canal de K⁺ sensível ao ATP, na dose de 2 mg/kg por via intraperitoneal e posteriormente tratados por via oral com a Isatina, ISA017 ou ISA155 (10 mg/kg) e avaliados no modelo da placa quente.

Os resultados mostram que a o pré-tratamento com a glibenclamida foi capaz de inibir os efeitos antinociceptivos da ISA017 e ISA155, obtendo-se uma ASC de 1605 (ISA017 + glibenclamida) *versus* 7622 (ISA017) e de 1540 (ISA155 + glibenclamida) *versus* 6319 (ISA155). Esses resultados sugerem o envolvimento dos canais de K⁺ na ação antinociceptivo dessas duas substâncias (Gráfico 12).

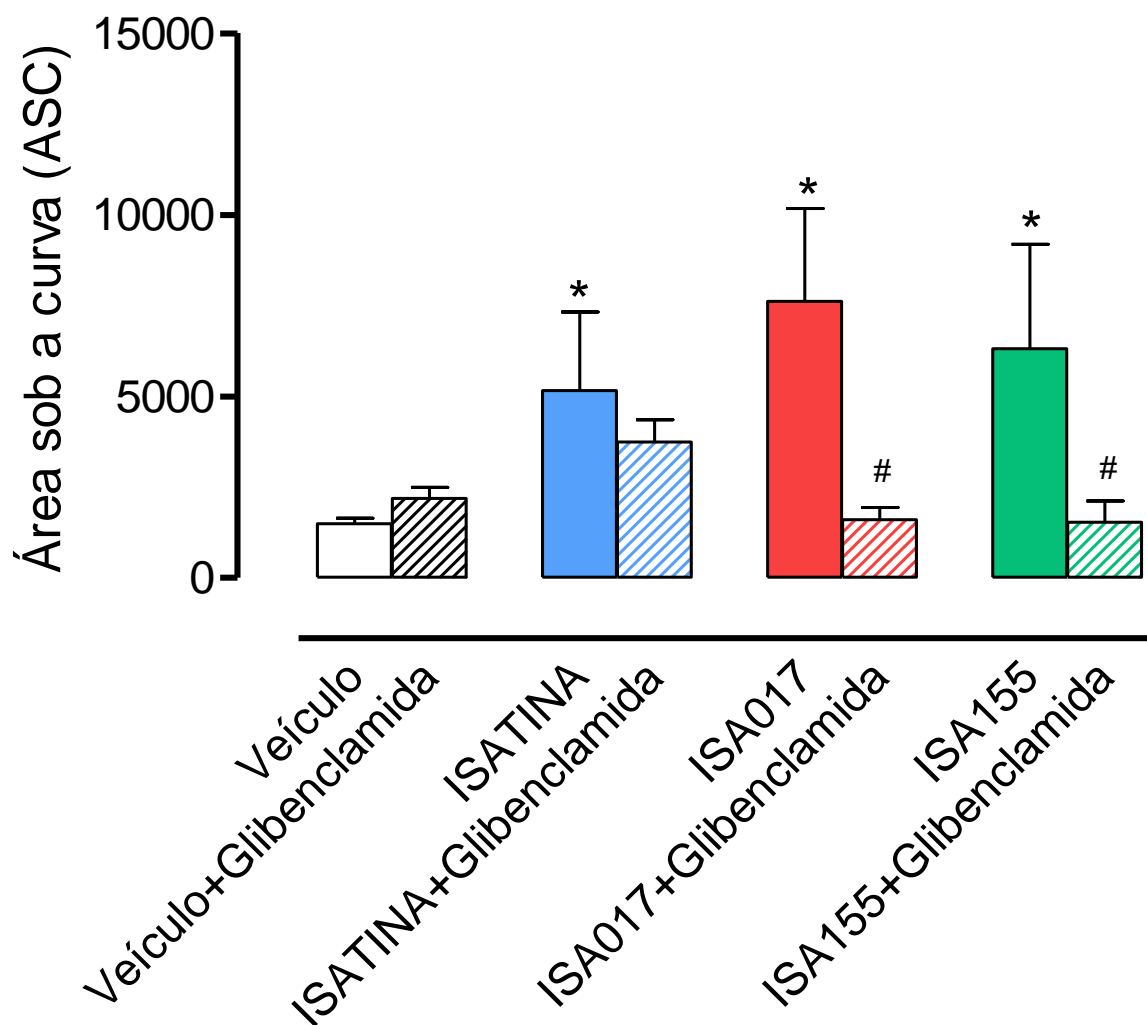


Gráfico 12: Avaliação da participação do canal de K^+ sensível ao ATP sobre a antinocicepção da Isatina, ISA017 e ISA155 no modelo da placa quente. Os animais foram pré-tratados com glibenclamida (2 mg/kg, i.p.), 15 minutos antes da administração oral da Isatina, ISA017 ou ISA155 (10 mg/kg). Os resultados são expressos como média \pm d.p. da ASC (n=6-8). A significância estatística de $p < 0,05$ foi calculada entre os grupos tratados com Isatina, ISA017 ou ISA155 e o veículo (*) e entre os grupos tratados com veículo+glibenclamida, Isatina+glibenclamida, ISA017+glibenclamida ou ISA155+glibenclamida e os seus respectivos grupos controles veículo, Isatina, ISA017 e ISA155 (#) por ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

4.5.5. Avaliação da Participação do Sistema Adrenérgico

Os animais foram pré-tratados com a ioimbina, um antagonista seletivo dos receptores α_2 adrenérgicos, na dose de 2 mg/kg, por via intraperitoneal. Posteriormente, foram tratados por via oral com a Isatina, ISA017 ou ISA55 (10mg/kg). O efeito antinociceptivo foi avaliado no modelo da placa quente.

O pré-tratamento com ioimbina não foi capaz de inibir de maneira significativa o efeito antinociceptivo da Isatina, ISA017 e ISA155 esses resultados indicam que não há participação do sistema adrenérgico na ação antinociceptiva destas substâncias (gráfico 13).

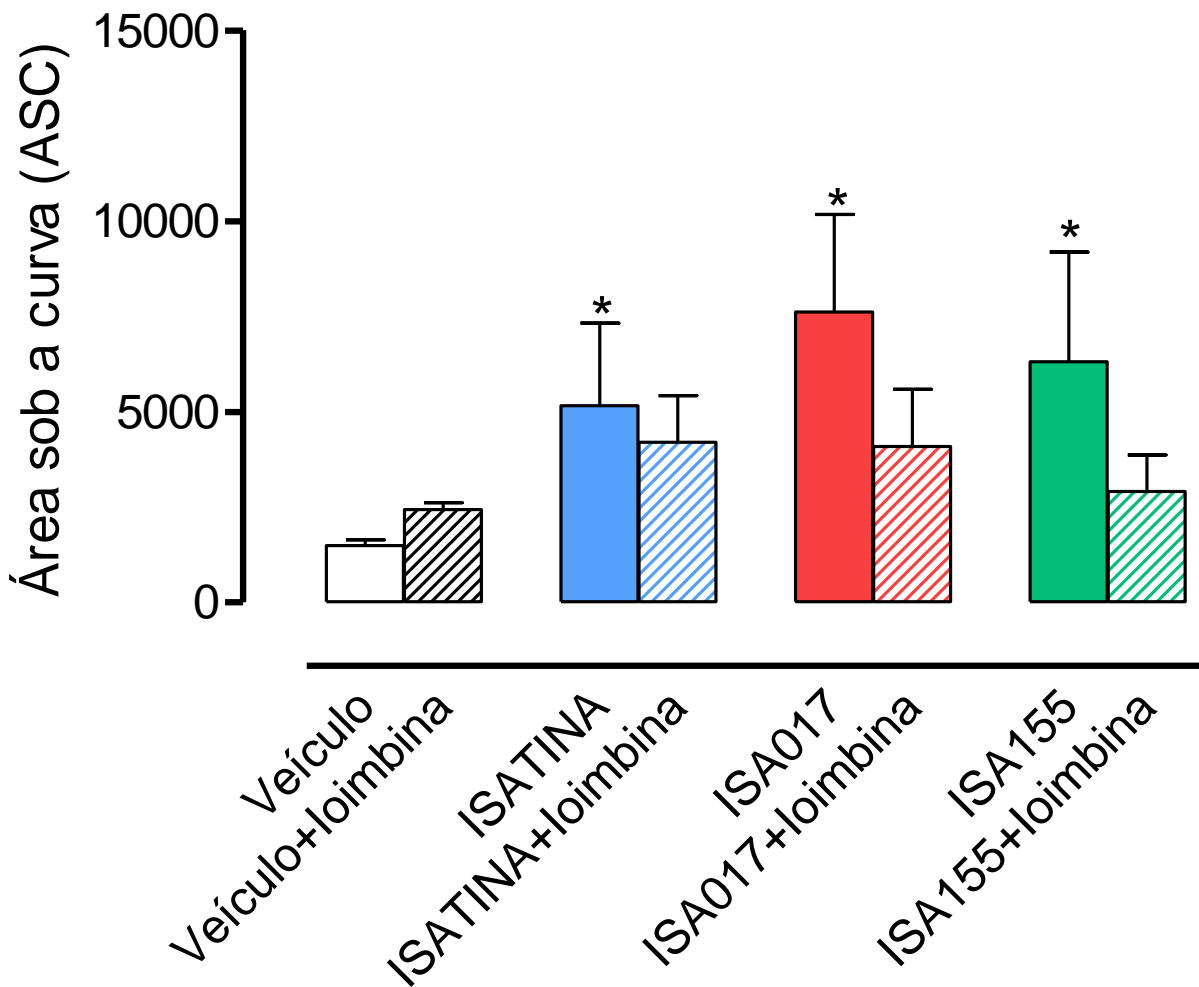


Gráfico 13: Avaliação da participação do sistema adrenérgico sobre a antinocicepção da Isatina, ISA017 e ISA155 no modelo da placa quente. Os animais foram pré-tratados com ioimbina (2 mg/kg, i.p.), 15 minutos antes da administração oral da Isatina, ISA017 ou ISA155 (10 mg/kg). Os resultados são expressos como média \pm d.p. da ASC (n=6-8). A significância estatística de $p < 0,05$ foi calculada entre os grupos tratados com Isatina, ISA017 ou ISA155 e o veículo (*) e entre os grupos tratados com veículo+Ioimbina, Isatina+Ioimbina, ISA017+Ioimbina ou ISA155+Ioimbina e os seus respectivos grupos controles veículo, Isatina, ISA017 e ISA155 (#) por ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

4.5.6. Avaliação da Participação do Sistema Canabinoide

Os animais foram pré-tratados com AM251, antagonista do receptor canabinoide CB1, na dose de 1 mg/kg. Após o tratamento por via oral com a Isatina, ISA017 ou ISA155 (10 mg/kg), o efeito antinociceptivo foi avaliado no modelo da placa quente.

Os resultados obtidos mostraram que o pré-tratamento com o antagonista AM251 não foi capaz de inibir o efeito antinociceptivo de nenhuma das três substâncias, indicando que o sistema canabinoide (via receptor CB1) não está envolvido na ação antinociceptiva destes compostos (Gráfico 14).

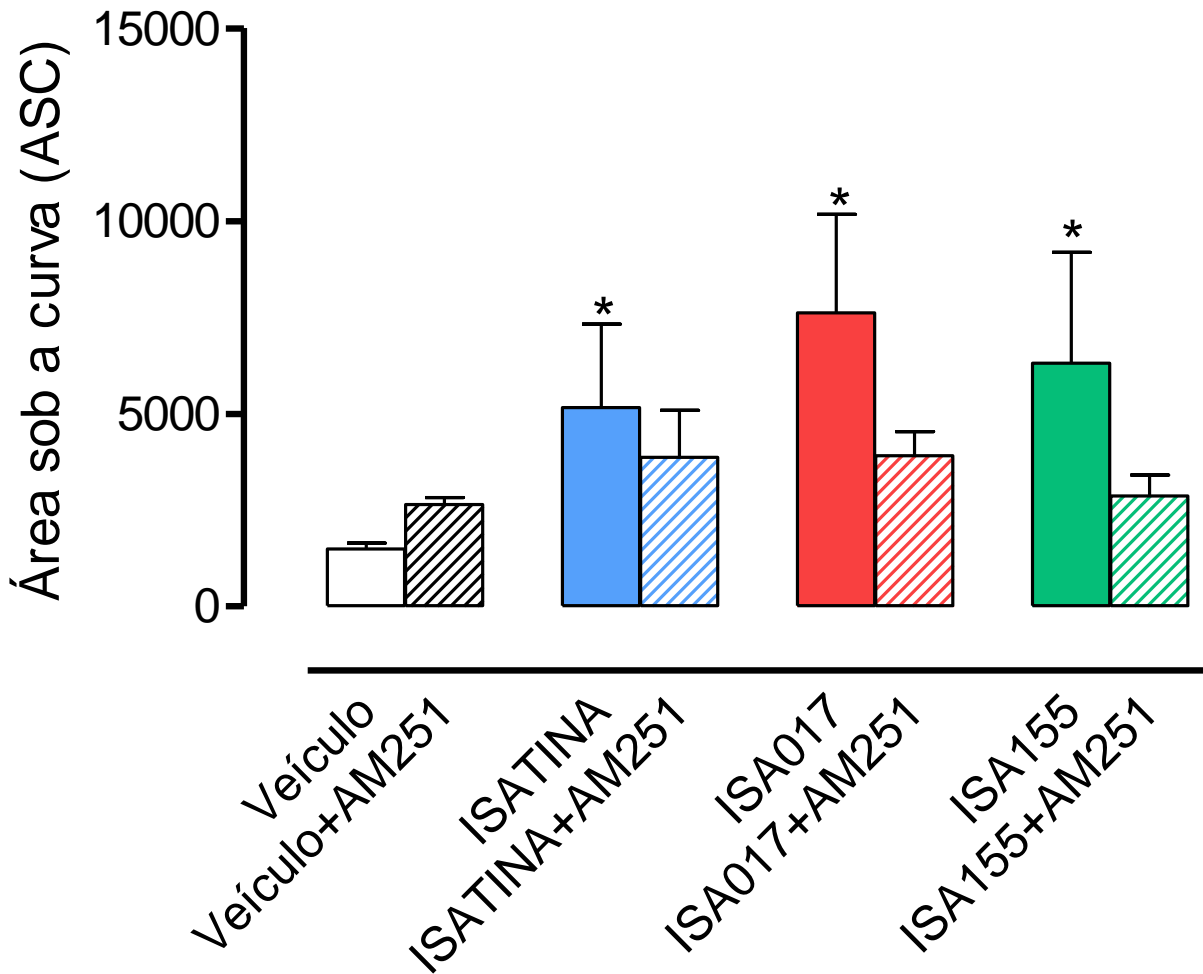


Gráfico 14: Avaliação da participação do sistema canabinoide sobre a antinocicepção da Isatina, ISA017 e ISA155 no modelo da placa quente. Os animais foram pré-tratados com AM251 (1 mg/kg, i.p.), 15 minutos antes da administração oral da Isatina, ISA017 ou ISA155 (10 mg/kg). Os resultados são expressos como média \pm d.p. da ASC (n=6-8). A significância estatística de $p < 0,05$ foi calculada entre os grupos tratados com Isatina, ISA017 ou ISA155 e o veículo (*) e entre os grupos tratados com veículo+AM251, Isatina+AM251, ISA017+AM251 ou ISA155+AM251 e os seus respectivos grupos controles veículo, Isatina, ISA017 e ISA155 (#) por ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

4.5.7. Avaliação da Participação do Sistema Serotoninérgico

Com o objetivo de avaliar se a ação antinociceptiva da Isatina, ISA017 e ISA155 poderia envolver o sistema serotoninérgico através de uma interação com os receptores 5-HT₃, os animais foram pré-tratados com ondasetrona, um antagonista do receptor serotoninérgico 5-HT₃, na dose de 0,5 mg/kg, 15 minutos antes do tratamento oral com a Isatina, ISA017 ou ISA155 (10 mg/kg) e o efeito antinociceptivo foi avaliado no modelo da placa quente.

O pré-tratamento com a ondasetrona somente foi capaz de inibir significativamente o efeito antinociceptivo da ISA155, produzindo uma redução significativa da ASC, obtendo-se uma ASC de 2671 (ISA155 + ondasetrona) *versus* 6319 (ISA155) (gráfico 15).

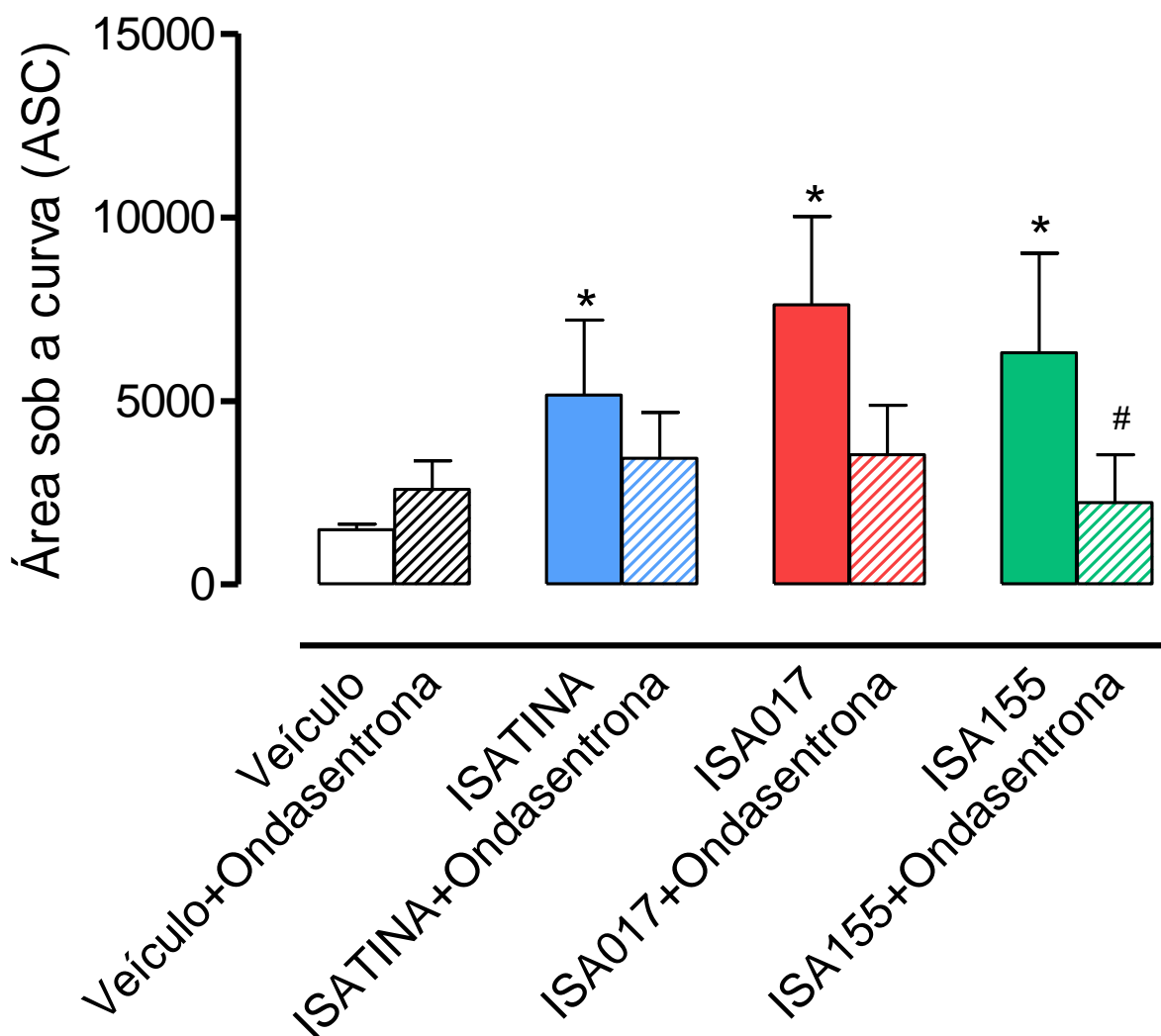


Gráfico 15: Avaliação da participação do sistema serotoninérgico sobre a antinociceção da Isatina, ISA017 e ISA155 no modelo da placa quente. Os animais foram pré-tratados com ondasentrona (0,5 mg/kg, i.p.), 15 minutos antes da administração oral da Isatina, ISA017 ou ISA155 (10 mg/kg). Os resultados são expressos como média \pm d.p. da ASC (n=6-8). A significância estatística de $p < 0,05$ foi calculada entre os grupos tratados com Isatina, ISA017 ou ISA155 e o veículo (*) e entre os grupos tratados com veículo+Ondasentrona, Isatina+Ondasentrona, ISA017+ Ondasentrona ou ISA155+ Ondasentrona e os seus respectivos grupos controles veículo, Isatina, ISA017 e ISA155 (#) por ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni.

4.6. Avaliação do Envolvimento das Fibras Sensíveis à Capsaicina

Com o objetivo de explorar o papel das fibras sensíveis à capsaicina no efeito antinociceptivo da Isatina, ISA017 e ISA155 os animais foram tratados com 50 mg/kg de capsaicina (s.c.) no 2 ° dia de vida com o propósito de induzir a degeneração irreversível de neurônios aferentes não mielinizados, especialmente as fibras C (Santos e cols., 2005)

Primeiramente, foi feita a confirmação da dessensibilização das fibras C pela capsaicina através da quantificação do número de movimentos de limpeza ocular e foi observado que o grupo o qual havia sido injetado a capsaicina (50 mg/kg) por via subcutânea, apresentou 3,5 movimentos de limpeza ocular *versus* 28,8 se comparado com o grupo tratado com o veículo (gráfico 16).

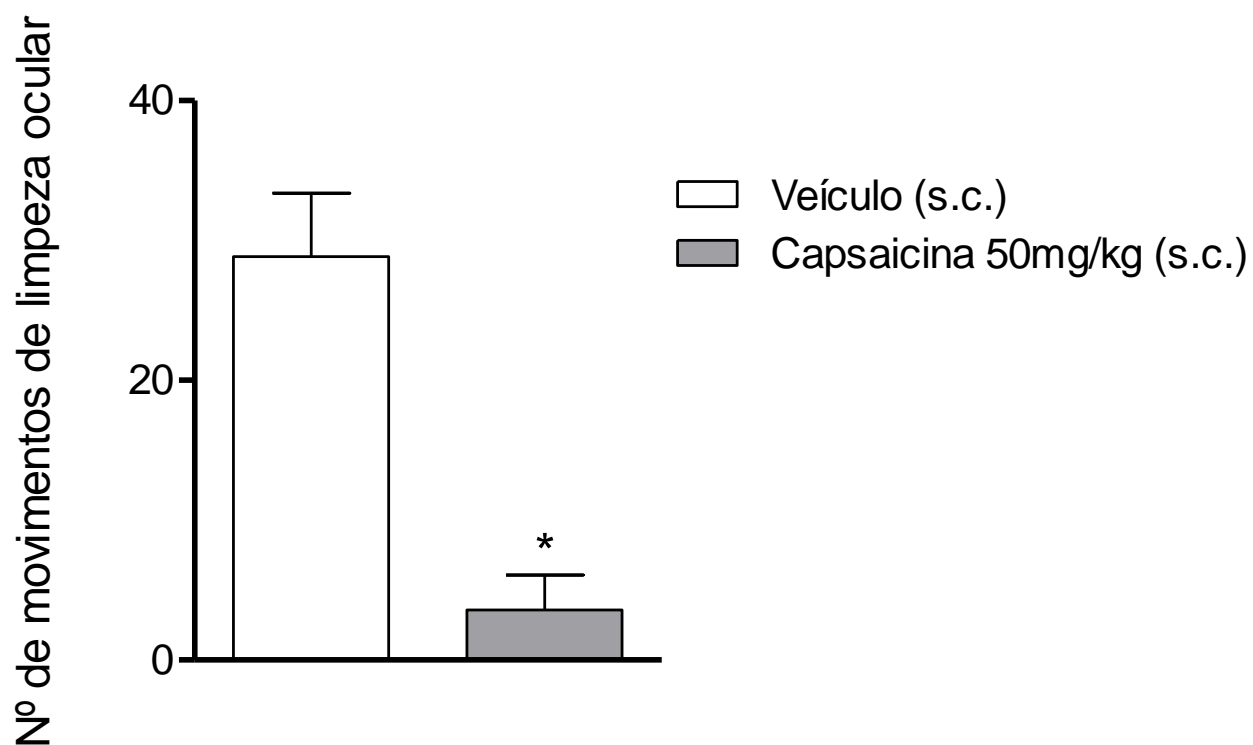


Gráfico 16: Teste para confirmação da dessensibilização das fibras C pela capsaicina. Nos camundongos adultos (8 semanas) foi feita uma instilação intraocular de 50 μ L de capsaicina (0,01%) e foi quantificado o número de movimentos de limpeza ocular (piscadas) durante 1 minuto. Os resultados são expressos como média \pm d.p. do número de movimentos de limpeza ocular (n=6-8). A significância estatística (* $p < 0,05$) foi calculada por ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni.

O tratamento neonatal dos animais com capsaicina (50 mg/kg, s.c.) foram capazes de gerar dessensibilização irreversível das fibras C e os mesmos animais, após oito semanas, foram testados no modelo da formalina. O tratamento dos animais com a Isatina, ISA017 ou ISA155, na dose de 10 mg/kg (dose escolhida para realizar este experimento, pois foi a que mais inibiu o tempo de lambedura da pata injetada no modelo da formalina antes realizado) não foi capaz de reduzir o tempo de lambedura tanto na 1ª quanto na 2ª fase, como observado no primeiro experimento de formalina realizado (gráfico 17).

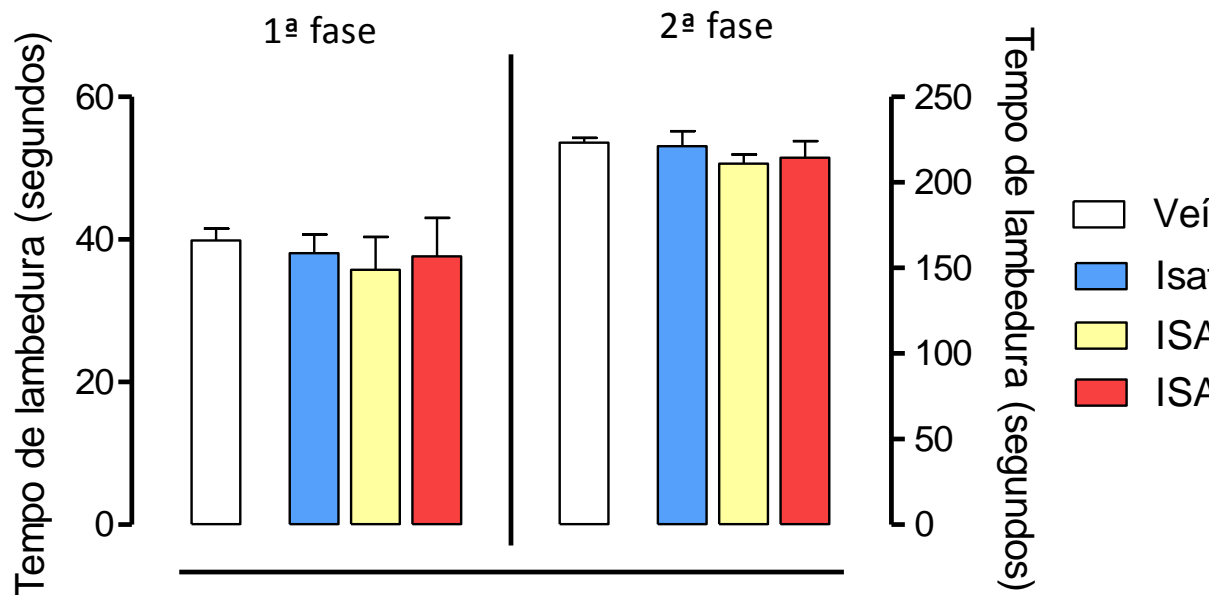


Gráfico 17: Efeito do tratamento com capsaicina em camundongos neonatos no efeito antinociceptivo da Isatina, ISA017 e ISA155 no modelo da formalina. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (PBS), Isatina, ISA017 ou ISA155 (10 mg/kg), 60 minutos antes da injeção intraplantar de formalina (2,5%). Os resultados são expressos como média \pm d.p. do tempo em que os animais permaneceram lambendo a pata injetada com a formalina (n=6-8). A significância estatística (* $p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com a ISA017 ou AAS e o veículo por ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni.

4.7. Modelo da Hiperalgisia Térmica (Teste da placa quente modificado)

Com o objetivo de avaliar se a Isatina, ISA017 e ISA155 também poderiam ter seu efeito antinociceptivo modulado através da inibição da nocicepção associada a dor inflamatória aguda foi feito o modelo da hiperalgisia térmica.

A injeção intraplantar de carragenina (25 µL, 2%) no grupo tratado oralmente com o veículo produziu uma hiperalgisia térmica tempo-dependente que persistiu até 6 horas após a injeção da mesma, sendo a hiperalgisia mais evidenciada no tempo de 4 horas, diminuindo o tempo de latência, ou seja, diminuindo o limiar de dor dos animais.

Uma redução significativa no tempo de latência (segundos) foi observada 4 e 6 horas após a injeção de carragenina, reduzindo o tempo $8,45 \pm 2,9$ segundos (1 hora após a injeção) para $2,66 \pm 3,1$ segundos e $3,18 \pm 1,8$ segundos, 4 e 6 horas após, respectivamente.

O gráfico 18 mostra que a Isatina, administrada por via oral, não foi capaz de aumentar ou diminuir o tempo de latência dos animais, nas três doses testadas e também nos quatro tempos avaliados, sugerindo que esta substância não inibe mecanismos de dor com componente inflamatório.

Porém, o tratamento por via oral com a ISAS017 foi capaz de aumentar o tempo de latência dos animais na placa quente no tempo de 6 horas após a injeção de carragenina, nas doses de 1 e 10 mg/kg, sugerindo que esta substância possa atuar inibindo a liberação de componentes inflamatórios, aumentando o limiar de excitabilidade da fibra nervosa (gráfico 19).

Já o gráfico 20, mostra que o tratamento oral com a ISA155 foi capaz de aumentar o tempo de latência dos animais na placa quente no tempo de 4 e 6 horas após a injeção de carragenina, nas doses de 1 e 10 mg/kg, sendo o efeito mais pronunciado no tempo de 6 horas, sugerindo que esta substância seja ainda mais eficaz em modelos de

hiperalgesia térmica, onde também se avalia o processo de dor inflamatória gerada pela injeção de carragenina.

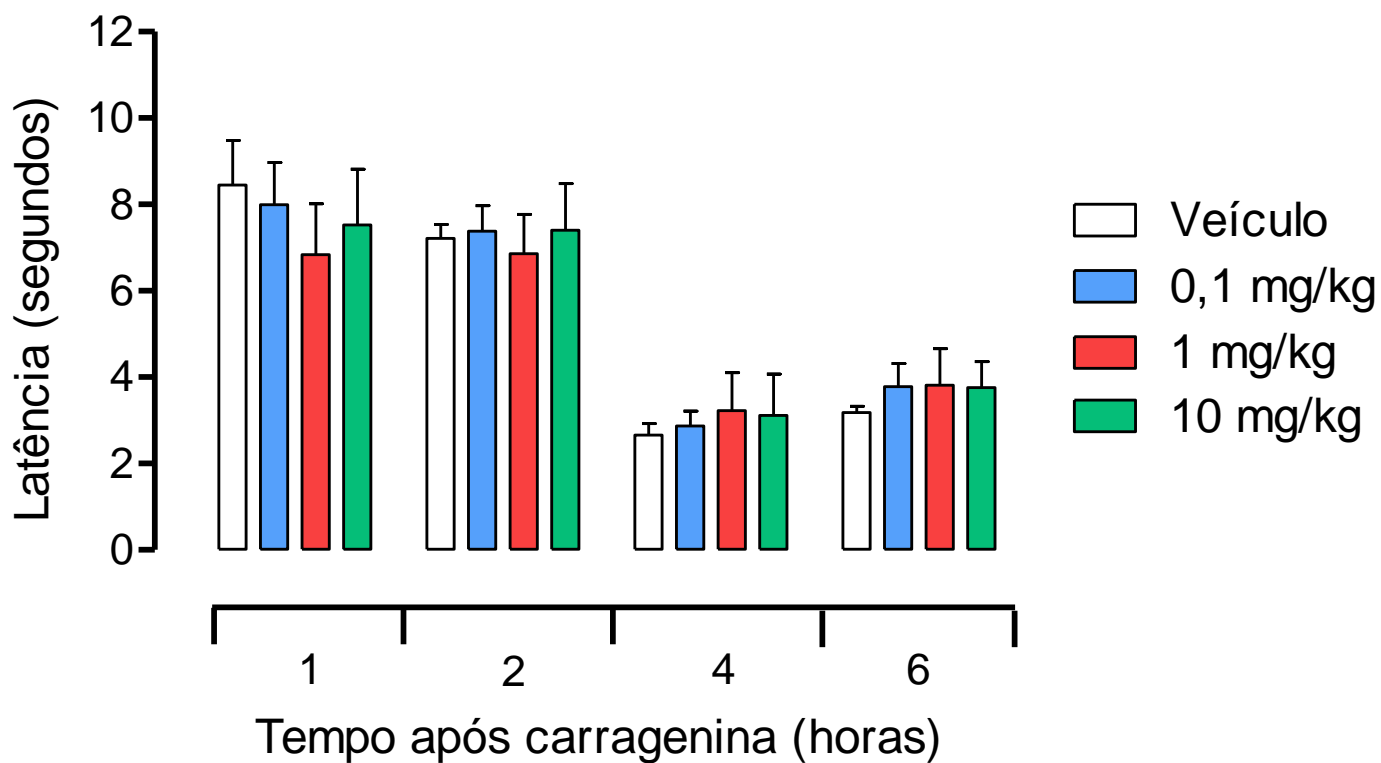


Gráfico 18: Efeito da Isatina no modelo da hiperalgesia térmica. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (PBS) ou a Isatina (0,1, 1 ou 10 mg/kg) 60 minutos antes da injeção intraplantar de carragenina 2% e observados nos tempos de 1, 2, 4 e 6 horas após essa injeção. O tempo necessário para o animal lambear as patas ou saltar da placa aquecida foi quantificado em segundos. Os resultados são expressos como média \pm d.p. do tempo de lambedura. A significância estatística (* $p < 0,05$) foi calculada por ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni.

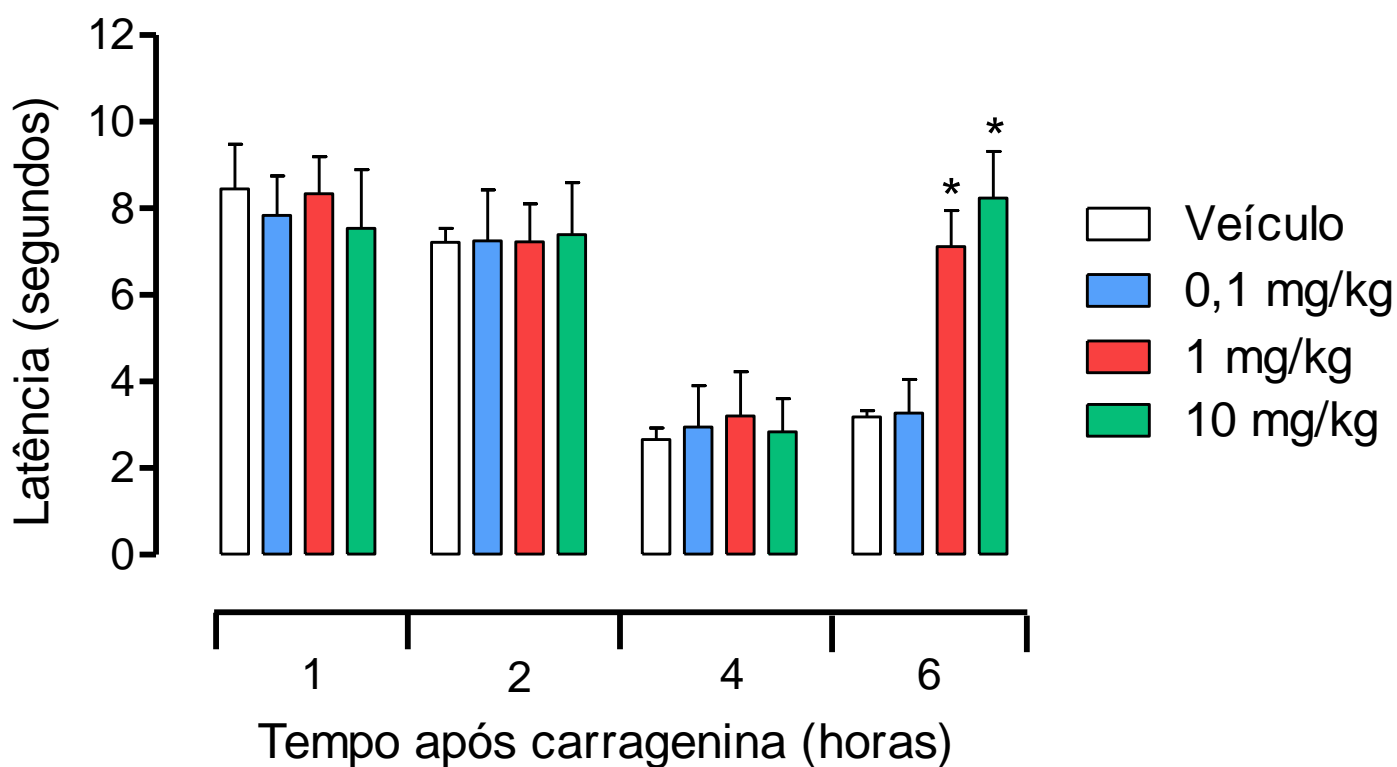


Gráfico 19: Efeito da ISA017 no modelo da hiperalgesia térmica. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (PBS) ou a ISA017 (0,1, 1 ou 10 mg/kg) 60 minutos antes da injeção intraplantar de carragenina 2% e observados nos tempos de 1, 2, 4 e 6 horas após essa injeção. O tempo necessário para o animal lambear as patas ou saltar da placa aquecida foi quantificado em segundos. Os resultados são expressos como média \pm d.p. do tempo de lambedura. A significância estatística (* $p < 0,05$) foi calculada por ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni.

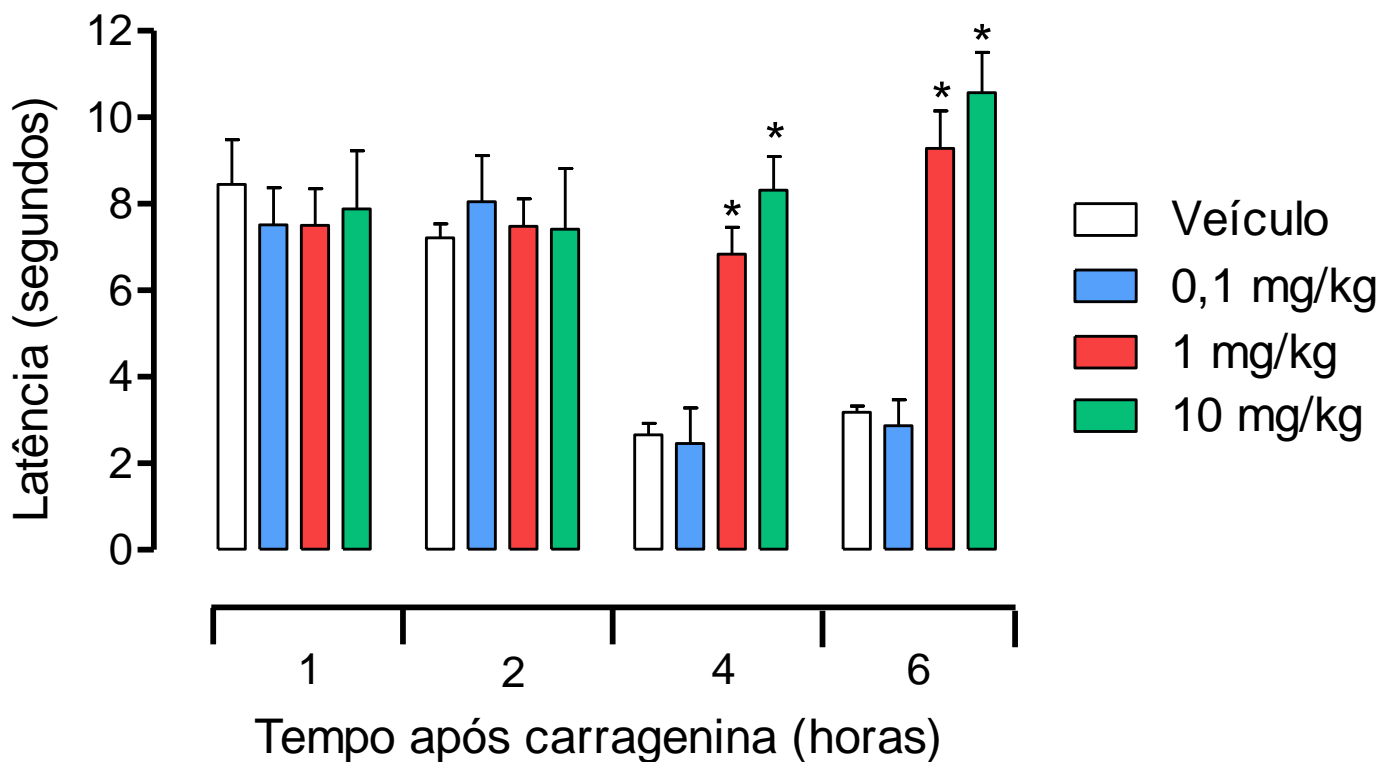


Gráfico 20: Efeito da ISA155 no modelo da hiperalgesia térmica. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (PBS) ou a ISA155 (0,1, 1 ou 10 mg/kg) 60 minutos antes da injeção intraplantar de carragenina 2% e observados nos tempos de 1, 2, 4 e 6 horas após essa injeção. O tempo necessário para o animal lambear as patas ou saltar da placa aquecida foi quantificado em segundos. Os resultados são expressos como média \pm d.p. do tempo de lambedura. A significância estatística (* $p < 0,05$) foi calculada por ANOVA seguida do pós-teste de Bonferroni.

4.8. Avaliação do Desempenho Locomotor e Atividade Espontânea

A fim de descartar a atividade estimulante ou depressora e até uma ação do tipo ansiolítica das substâncias testadas e verificar se estas poderiam promover incoordenação motora dos animais, seja por sedação e/ou por relaxamento muscular, foram utilizados os modelos do campo aberto e *Rota-rod*, respectivamente.

Após administração da dose de 10mg/kg (v.o.) da Isatina, ISA017 ou ISA155 foi avaliado o desempenho locomotor, quantificando-se o número de quedas que cada animal apresentou no aparelho *Rota-rod* e observou-se que as três substâncias não foram capazes de aumentar ou diminuir o número de quedas se comparado com os valores do grupo tratado com o veículo.

O mesmo também foi observado no modelo do campo aberto, o qual se avalia a atividade espontânea. O tratamento com a Isatina, ISA017 ou ISA155, na dose de 10 mg/kg não foi capaz de aumentar ou diminuir o número de quadrados percorridos se comprado com os valores do grupo tratado com o veículo (tabela 2).

Atividade Espontânea	Horas após tratamento			
	0,5	1	2	3,5
	Nº de quadrados percorridos			
Veículo	56,2 ± 7,8	58,4 ± 9,2	52,8 ± 12,2	50 ± 6,2
ISATINA	64,6 ± 9,3	68,4 ± 8,2	56,2 ± 9,4	59,8 ± 6,9
ISA017	56,4 ± 8,4	48,8 ± 5,5	50,2 ± 8,5	66,8 ± 13,1
ISA155	60,2 ± 8,4	63,4 ± 8,8	50,8 ± 4,4	48,2 ± 5,6
Desempenho Locomotor	0,5	1	2	3,5
	Nº de quedas do animal			
Veículo	0,2 ± 0,9	0,4 ± 0,9	0,2 ± 0,4	0 ± 0
ISATINA	0,2 ± 0,4	0,4 ± 0,9	0,6 ± 0,5	0,2 ± 0,4
ISA017	0,2 ± 0,4	0,4 ± 0,5	0,4 ± 0,5	0,2 ± 0,4
ISA155	0,2 ± 0,4	0,4 ± 0,5	0,4 ± 0,9	0,2 ± 0,4

Tabela 2: Efeito da Isatina, ISA017 e ISA155 no desempenho locomotor e atividade espontânea.

4.9. Toxicidade

Durante a realização dos protocolos experimentais, não foram observadas alterações de comportamento dos animais, tais como sedação, perda de coordenação e/ou agitação ou outros sinais que indicassem toxicidade da Isatina e seus derivados nas diferentes doses testadas.

5. DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi investigar uma possível atividade antinociceptiva da Isatina e de dois novos derivados.

A Isatina é encontrada em plantas do gênero *Isatis* (GUO e CHEN, 1986), nas espécies *Calanthe discolor* Lindl. (YOCHIKAWA e cols., 1998) e *Couroupita guianensis* Aubl. (BERGMAN e cols., 1985) e em seres humanos como um derivado metabólico de adrenalina (ISCHIA e cols., 1998; PALUMBO e cols., 1989; HALKET e cols., 1991). Atua inibindo a monoamina oxidase (MAO) e promovendo uma ação antagonista do peptídeo natriurético atrial e da ativação da guanilato ciclase (MEDVEDEV e cols., 2007; CHEN e cols., 2011).

Como a Isatina possui uma grande versatilidade sintética, houve interesse na síntese de novas moléculas a partir da molécula de Isatina. Assim, o grupo liderado pelo professor Angelo da Cunha Pinto, do Instituto de Química, UFRJ foi o primeiro a utilizar a Isatina como matéria prima para a síntese de diversas outras moléculas (GARDEN e cols., 1997).

O primeiro modelo utilizado para iniciar os estudos foi o modelo da formalina. Este teste representa um modelo de estudo de dor moderada e tônica (HUNSKAARE e cols., 1985). Apresenta duas fases distintas, as quais refletem dois tipos diferentes de dor. A primeira fase (dor neurogênica) é caracterizada pela estimulação química direta dos nociceptores, predominantemente fibras aferentes do tipo C e, em parte, as do tipo A δ , enquanto a segunda fase (fase inflamatória) é caracterizada pelo surgimento de um processo inflamatório local, onde há liberação de vários mediadores químicos pró-inflamatórios (CHICHORRO e cols., 2004).

Além disso, a injeção intraplantar da formalina também é capaz de degranular mastócitos, causando a liberação de histamina e serotonina (PARADA e cols., 2001). Esses mediadores, por sua vez, ativam os nociceptores, promovendo também a liberação

de neuropeptídeos como substância P (sP), neurocinina A, neurocinina B e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina CGRP, nos terminais periféricos dos aferentes primários (SANTOS e CALIXTO, 1997).

Segundo resultados descritos na literatura, a primeira fase está associada com a liberação de vários mediadores químicos como sP, o glutamato e a bradicinina, enquanto que na segunda fase os mediadores químicos detectados foram histamina, serotonina, prostaglandina E2 (PGE₂) e bradicinina (HUNSKAAR e HOLE, 1987; SHIBATA e cols., 1989; TJOLSEN e cols., 1992; CORRÊA e CALIXTO, 1993; TJOLSEN e HOLE, 1997).

Fármacos analgésicos possuem ações diferentes na primeira e na segunda fase do teste da formalina. Os opioides possuem ação central e inibem as duas fases similarmente. Por outro lado, fármacos com ação periférica, como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e glicocorticoides, inibem somente a segunda fase (HUNSKAAR e cols., 1985; HUNSKAAR e HOLE, 1987).

Os resultados obtidos mostraram que a Isatina (com exceção da dose de 0,1 mg/kg na primeira fase), a ISA017 e a ISA155 nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg foram capazes de inibir significativamente tanto a primeira fase quanto a segunda fase do modelo da formalina. Os resultados da primeira fase sugerem uma atividade antinociceptiva que pode ser decorrente tanto da atuação direta em receptores opioides ou ainda, uma inibição na liberação de mediadores como serotonina, sP, cininas, histamina e CGRP. Já o efeito inibitório apresentado pelas 3 substâncias na segunda fase da formalina pode sugerir uma inibição na formação e/ou liberação de metabólitos do ácido araquidônico, como prostaglandinas e leucotrienos, bem como outros mediadores inflamatórios como bradicinina, histamina e serotonina, assim como também citocinas, eicosanoides, cininas, glutamato e óxido nítrico (NO).

Assim, os resultados obtidos no modelo da formalina sugerem que a Isatina, ISA017 e ISA155 são eficazes não apenas na redução da dor neurogênica como também da dor inflamatória, podendo, ambas estarem envolvidas tanto na inibição de vias centrais e periféricas de geração da dor como na inibição na produção e/ou ação dos mediadores inflamatórios.

Como as três substâncias apresentaram efeito antinociceptivo periférico, isto nos motivou a avaliar se eles apresentariam algum efeito antinociceptivo espinhal. Para tanto, utilizamos o modelo da placa quente.

No modelo da placa quente, um estímulo térmico ativa nociceptores que transmitem informação nociceptiva aguda a regiões específicas do sistema nervoso central (SNC) (p. ex., ativação do córtex somatossensorial), produzindo uma resposta organizada, refletindo em uma resposta motora de elevação e/ou lambadura das patas (MOGIL e ADHIKRI, 1999).

Estudos recentes sugerem a participação de mecanismos periféricos na transmissão da resposta térmica. Assim, além do receptor vaniloide tipo 1 (VR-1), outros receptores como o receptor relacionado ao VR-1 (VLR-1) e o canal iônico ativado pelo estiramento (ASIC) foram clonados e identificados como proteínas termoreceptoras. A ativação destas proteínas causa influxo de íons em neurônios sensoriais, iniciando o processo de condução da informação nociceptiva térmica (REICHLING e LEVINE, 2000). Desta forma, é possível observar o envolvimento de mecanismos supra-espinhais, a nível talâmico-cortical, através do mecanismo de defesa do animal frente a um estímulo nocivo (BARS e cols., 2001).

As três substâncias testadas apresentaram efeito antinociceptivo significativo no modelo da placa quente. Os animais tratados com a Isatina apresentaram elevado tempo de latência frente ao estímulo térmico, sendo o pico máximo observado nos tempos de

120 e 150 minutos após a sua administração (dose de 10 mg/kg). Os animais tratados com a ISA017 ou com a ISA155 apresentaram, também na dose de 10 mg/kg, e entre os tempos de 60 a 150 minutos após a sua administração, um elevado tempo de latência frente ao estímulo térmico.

A possível ação antinociceptiva periférica e central nos levou a investigar se as substâncias também teriam efeito na nocicepção neurogênia induzida pela capsaicina.

Sakurada e cols. (1992; 1993) foram os primeiros a demonstrar que a injeção intraplantar de capsaicina na pata posterior de camundongos causa vigorosa dor, caracterizada por lambidas e mordidas na pata injetada, sendo esse efeito relacionado com a dor de origem neurogênica. A capsaicina é uma amina neurotóxica extraída de plantas do gênero *Capsicum* (pimenta vermelha) e que, quando aplicada na pele ou injetada em animais, produz irritação caracterizada por reação dolorosa e subsequente dessensibilização para a dor induzida quimicamente (JANCSO e cols., 1981).

Estudos já demonstraram que a capsaicina atua através da ativação de receptores específicos, os quais foram denominados de receptores vaniloides do tipo 1 (TRPV-1). A capsaicina ativa uma distinta subpopulação de neurônios primários sensoriais, com corpos celulares na raiz dorsal, gânglios nodoso e trigeminal. Esses neurônios transmitem informações nociceptivas para o SNC (função aferente), ao passo que suas terminações periféricas são sítios de liberação de neuropeptídeos pró-inflamatórios (função eferente). A susceptibilidade à capsaicina distingue estes neurônios aferentes primários (GAMSE e cols., 1981; SZOLCSANY, 1985; LEMBECK, 1988; OH e cols., 1996; CATERINA e cols., 1997, 2000; SANTOS e CALIXTO, 1997). Tais receptores estão acoplados a um canal iônico permeável a cátions mono e divalentes que, quando ativados, levam a uma despolarização e excitabilidade de neurônios resultando na liberação de neuropeptídeos, como a sP, neurocinina A, neurocinina B, aminoácidos

excitatórios, NO, CGRP e somatostatina, entre outros (GAMSE e cols., 1981; LEMBECK, 1988; SZALLASI e BLUMBERG, 1996, 1999; SANTOS e CALIXTO, 1997; CATERINA e cols., 1997).

Nossos resultados mostraram que a Isatina, a ISA017 e a ISA155 foram capazes de inibir de maneira significativa, nas três doses avaliadas e após administração oral, a nocicepção neurogênica causada pela capsaicina, sendo a dose de 10 mg/kg de todas as substâncias aquela com percentuais de inibição próximos ao apresentado pela capsazepina, um antagonista do receptor TRPV-1.

Quando a Isatina, ISA017 ou a ISA155 foram também administradas pela via intraplantar, com o objetivo de avaliar se as substâncias testadas poderiam ainda ter seu efeito antinociceptivo por uma ação local direta e/ou sem sofrer metabolização pelo sistema hepático (que pode ocorrer quando são administradas por via oral), observamos que a Isatina, ISA017 e a ISA155 também reduziram o tempo de lambertura da pata. Ou seja, tanto a administração oral como a intraplantar de qualquer uma das três substâncias foram capazes de reduzir a nocicepção causada pela capsaicina. Estes dados sugerem que o efeito das substâncias possa estar sendo mediado por uma ação direta nos receptores da capsaicina. Apesar de não termos tentado identificar a possibilidade de metabolização hepática das substâncias após a administração oral, os dados obtidos sugerem que o efeito observado não deva ser decorrente de algum metabólito formado após o metabolismo.

Diversos neurotransmissores estão envolvidos na nocicepção, dentre eles o glutamato, um dos principais neurotransmissores excitatórios que tem papel relevante na sensibilização do corno dorsal da medula espinhal, uma vez que a estimulação das fibras aferentes primárias induz a liberação deste neurotransmissor no local (MILLAN, 2002).

A injeção intraplantar ou intratecal de glutamato é capaz de promover uma reação nociceptiva no animal, através de lambedura e mordidas no local (AANONSEN e WILCOX, 1990; BEIRITH e cols., 1998). O tratamento oral com a Isatina, ISA017 ou ISA155 promoveu redução da nocicepção induzida pelo glutamato indicando que a ação antinociceptiva destas substâncias possa também ser resultante em parte devido a uma modulação direta, através do bloqueio de receptores N-metil D-aspartato (NMDA) e não-NMDA ou ação indireta, atuando sobre outros mediadores integrados com o sistema glutamatérgico.

Sasamura e cols. (1998) reportaram, no hipotálamo, a presença de terminações glutamatérgicas sensíveis à capsaicina, algumas destas expressando TRPV-1, que quando ativados evoca a liberação de glutamato (PALLAZO e cols., 2002). Esses achados podem justificar, pelo menos em parte os resultados obtidos neste estudo, nos modelos de nocicepção induzida por capsaicina e por glutamato.

Sabendo-se que diversos sistemas endógenos, como o sistema opioide, serotoninérgico e canabinoide estão envolvidos no controle da dor, também investigamos o mecanismo de ação antinociceptivos da Isatina e de seu análogos através da administração de agentes farmacológicos, como antagonistas de receptores envolvidos no mecanismo inibitório da dor. A reversão do efeito antinociceptivo pelo antagonista sugere o envolvimento da via endógena inibitória.

O pré-tratamento com naloxona provocou a reversão da antinocicepção causada pela Isatina, ISA017 e ISA155 sugerindo a participação do sistema opioide no efeito antinociceptivo destas substâncias. Os receptores opioides μ , δ , e κ e são encontrados em regiões periféricas, espinhal e supra-espinhal. Tais receptores são densamente expressos no corno dorsal da medula (lâmina I e II), no gânglio da raiz dorsal, no núcleo magno da rafe e na substância cinzenta periaquedutal. A ação analgésica promovida

pelos opioides se dá pela ativação de receptores opioides, principalmente receptores μ e κ , acoplados à proteína G_i . Uma vez ativada, a enzima inibe a atividade da adenilato ciclase que conseqüentemente promove a abertura do canal de K^+ e o fechamento dos canais de Ca^{2+} . Esse efeito inibitório do influxo de cálcio resulta em diminuição na liberação de neurotransmissores, como o glutamato e sP, no corno dorsal da medula, mecanismo esse envolvido no controle ascendente da dor (PAN e cols., 2008).

A modulação descendente da dor também envolve a participação de receptores opioides, os quais promovem redução na liberação sináptica de ácido γ -aminobutírico (GABA) na medula espinhal por projeções rostro-medial e na substância cinzenta periaquedutal; ocorrendo subseqüentemente a desinibição espinhal de projeções de neurônios adrenérgicos do *locus coeruleus* (PAN e cols., 2008). Nesse contexto, as três substâncias testadas podem exercer seus efeitos antinociceptivos via sistema opioide a nível periférico, espinhal e/ou supra-espinhal.

O conhecimento do papel dual do NO na transmissão nociceptiva e sua contribuição na antinocicepção por analgésicos opioides e anti-inflamatórios nos motivou a avaliar se a antinocicepção da Isatina, ISA017 ou da ISA155 envolveria a via nitrérgica. O NO presente no corno dorsal da medula é capaz de estimular a liberação de neurocinina A (NKA), sP, CGRP e glutamato pelas fibras aferentes primárias facilitando a transmissão nociceptiva. A ativação de receptores do tipo NMDA pelo NO está envolvida no mecanismo de sensibilização central. Essas evidências surgiram da observação de que a administração de inibidores da enzima óxido nítrico sintase (NOS), como o L-NAME, causava uma liberação de glutamato no corno dorsal evocando nocicepção. Na presença do NO a enzima guanilato ciclase catalisa a conversão de guanosina trifosfato (GTP) em GMPc (CURY e cols., 2011). A via de sinalização NO-GMPc está presente em neurônios no corno dorsal da medula e também participa na

sensibilização central. Além da estimulação de GMPc, o NO está envolvido na modulação da proteína cinase C dependente-GMPc, de canais iônicos e das fosfodiesterases (CURY e cols., 2011).

Várias evidências mostram a relação entre a via NO-GMPc e a abertura dos canais de K⁺ sensível ao ATP. A elevação no nível de GMPc promove abertura do canal de K⁺ sensível ao ATP e conseqüente nocicepção. A observação do antagonismo na liberação de metionina-encefalina no corno dorsal da medula por um inibidor da NOS evidencia o papel do NO na liberação neuronal de opioides endógenos (HARA e cols., 1995).

Nesse contexto, nossos resultados mostraram que o efeito antinociceptivo da ISA017 e da ISA155 foi revertido pelo pré-tratamento com L-NAME e pela glibenclamida, bloqueador de canal de K⁺. Tais resultados sugerem que o efeito antinociceptivo desses dois derivados envolve a inibição da atividade enzimática da NOS e que a reversão da antinocicepção também promovida pela glibenclamida pode indicar que o mecanismo se assemelha ao de opioides, sendo um mecanismo dependente de NO. Entretanto, para termos certeza de que estes análogos poderiam ter efeito inibitório direto na NOS ainda será necessário ensaios *in vitro* da atividade da NOS (o que será realizado futuramente).

A participação do sistema colinérgico foi avaliada através do pré-tratamento com os antagonistas de receptor não seletivo muscarínico, a atropina e de receptor nicotínico, a mecamilamina. A pronunciada analgesia causada pela administração de agonistas nicotínicos ou muscarínicos indica a participação da via colinérgica na modulação da dor. A ativação de receptores nicotínicos, principalmente do subtipo $\alpha_2\beta_4$, no corno dorsal da medula espinhal contribui para analgesia espinhal e supra-espinhal (NIROGI e cols., 2011).

Khan e cols. (2001) também propuseram que a ativação de receptor nicotínico em terminações adrenérgicas resultava em um efeito antinociceptivo. Além disso, refletindo a complexidade das interações da via colinérgica com outros sistemas de dor, foi demonstrado que a antinocicepção resultante da ativação de receptores nicotínicos envolvia a ativação do sistema serotoninérgico descendente do núcleo magno da rafe (MILLAN, 2002). Os estudos sobre a via colinérgica muscarínica mostram que a ativação de receptor muscarínico do subtipo M₂ é capaz de reduzir a resposta periférica de nociceptores frente a estímulos nódicos. No corno dorsal da medula espinhal, a estimulação de receptores muscarínicos M₂ e M₄ contribui para o efeito analgésico através da desinibição dos interneurônios inibitórios da lâmina II reduzindo a transmissão nociceptiva (WESS e cols., 2003).

Nossos resultados evidenciaram a reversão do efeito antinociceptivo da Isatina, da ISA017 e da ISA155 com pré-tratamento com atropina sugerindo que tal efeito seja mediado pela via muscarínica. Já o pré-tratamento com mecamilamina somente reverteu o efeito antinociceptivo da ISA155, sugerindo o envolvimento da via nicotínica somente em parte do efeito antinociceptivo deste análogo.

Ao investigar a participação do sistema adrenérgico no efeito antinociceptivo das substâncias testadas, observamos que o pré-tratamento com ioimbina (antagonista seletivo de receptor alfa-2 adrenérgico) não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo da Isatina, da ISA017 e da ISA155. Os receptores alfa-2 adrenérgicos (alfa 2A, 2B e 2C) são densamente encontrados no sistema nervoso periférico e central, destacando-se as regiões do *locus coeruleus*, do corno dorsal da medula e nos neurônios do gânglio da raiz dorsal (MILLAN, 2002). Nossos resultados sugerem que não há o envolvimento dos receptores alfa-2 adrenérgicos presentes nas terminações de aferentes primários no mecanismo de ação da isatina e dos seus dois análogos.

A participação do sistema canabinoide na analgesia é decorrente da ativação de receptores CB1 presentes em neurônios no gânglio da raiz dorsal, na região do funículo dorsolateral e nas lâminas I e II do corno dorsal da medula. Diversos trabalhos indicam que a ativação de receptor CB1 exerce antinocicepção frente a estímulos como capsaicina e formalina (HOHMANN e cols., 2004; REA e cols., 2007; PAN e cols., 2008). Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com AM251, antagonista de receptor CB1, não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo da Isatina, da ISA017 ou da ISA155 sugerindo que a ação dessas substâncias também não envolve o sistema canabinoide.

O envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo somente foi observado no derivado ISA155 após pré-tratamento com o antagonista de receptor 5-HT₃, a ondasetrona. Sabe-se que a serotonina pode atuar através de vários receptores inibindo ou facilitando a transmissão nociceptiva (KAYSER e cols., 2007). Os resultados obtidos mostraram que a reversão do efeito antinociceptivo da ISA155 pela ondasetrona indica que a via serotoninérgica contribui, pelo menos em parte, para a ação deste derivado. Tal ação poderia estar relacionada com a produção e liberação da serotonina e/ou uma atuação antagonista direta em receptores 5-HT₃, presentes nas terminações de fibras aferentes primárias.

Como parte dos nossos resultados sugere haver um envolvimento das fibras ascendentes de dor decidimos tentar avaliar a participação das fibras C e A δ . Sabe-se que o tratamento subcutâneo de camundongos neonatos com capsaicina causa diminuição das fibras A δ e depleção total das fibras C e também uma diminuição da expressão do receptor TRPV-1 no gânglio da raiz dorsal e da medula espinhal (JANCOSO, 1978; KAWAKAMI e cols., 1993; MILLER e cols., 1982; SZOKE

e cols., 2002). No entanto, tem sido assumido que nem todas as fibras nociceptivas aferentes são sensíveis à capsaicina (MICHAEL e PRIESTLEY, 1999).

No presente estudo, os efeitos antinociceptivos da Isatina e seus derivados parecem estar relacionados com as fibras C nociceptivas visto que seus efeitos foram reduzidos nos camundongos adultos que haviam sido expostos à capsaicina quando ainda neonatos. Além disso, o tratamento neonatal dos camundongos com a capsaicina, também bloqueou significativamente a antinocicepção promovida Isatina e seus derivados no modelo da formalina. Portanto, estes resultados sugerem ainda mais a importância de fibras sensíveis capsaicina no efeito antinociceptivo da Isatina, da ISA017 e da ISA155.

Outro tipo de dor que foi investigada foi a dor inflamatória aguda.

Um importante aspecto da dor inflamatória aguda é a hiperalgesia, que envolve tanto a sensibilização das terminações nervosas nociceptivas periféricas quanto a facilitação da transmissão central a nível do corno dorsal da medula espinhal. O seu componente periférico reflete a ação de mediadores inflamatórios que atuam sobre as terminações nervosas, enquanto a central decorre da facilitação da transmissão sináptica (MORRIS e cols., 2003).

No modelo da hiperalgesia térmica, após a obtenção de um valor basal o animal recebe a injeção intraplantar de um estímulo inflamatório, normalmente carragenina (CG), em doses suficientemente baixas para que o animal continue apoiando a pata injetada sobre a superfície aquecida. O período transcorrido entre o contato com a superfície e a ocorrência da resposta descrita é medido. A redução neste tempo de latência é entendida como um índice da hiperalgesia inflamatória (MENÉNDEZ e cols., 2002).

A inflamação induzida pela carragenina foi descrita originalmente por Winter e cols. (1962), como sendo uma resposta aguda, não imune e altamente reprodutível. Os sinais cardinais da inflamação: edema, hiperalgesia, dor e eritema desenvolvem-se após a injeção subcutânea da carragenina, resultando da ação de agentes pró-inflamatórios como a bradicinina, histamina, eicosanoides, radicais livres do oxigênio, liberados diretamente na pata do animal. Tais agentes podem ser gerados no local da lesão ou por células migratórias. Segundo Lavich e cols. (2005), a estimulação plantar de ratos com a carragenina (250 e 50 µg/pata) leva a uma rápida resposta hiperalgésica na pata injetada que pode ser avaliada pelo teste da hiperalgesia térmica (teste da placa quente modificada).

Além do mais, os receptores metabotrópicos de glutamato do subtipo 5 (mGlut5) também estão envolvidos na hiperalgesia térmica sugerindo que estes possam estar envolvidos no mecanismo de ação de substâncias testadas (DOGRUL e cols.,2000). De acordo com os resultados obtidos, a ISA017 foi capaz de aumentar o tempo de latência dos animais na placa quente no tempo de 6 horas após a injeção de carragenina sugerindo que esta substância possa também atuar inibindo a liberação de componentes inflamatórios, aumentando o limiar de excitabilidade da fibra nervosa. Já a ISA155 foi capaz de aumentar o tempo de latência dos animais na placa quente no tempo de 4 e 6 horas após a injeção da carragenina sendo o efeito mais pronunciado no tempo de 6 horas. Esses dados sugerem que a ISA155 também deve estar agindo via inibição da liberação e/ou produção de outros mediadores inflamatórios formados em tempos mais tardios após a injeção da carragenina.

Para confirmar o efeito antinociceptivo das substâncias testadas e descartarmos que poderíamos estar observando um efeito sedativo foram realizados ensaios nos modelos do *rota rod* e do campo aberto.

O *rota rod* é um dispositivo que mede a atividade forçada, através da avaliação do equilíbrio e da coordenação dos animais, parâmetros esses indicativos de transtornos neurológicos (ROSLAND e cols., 1990). Este modelo experimental avalia a coordenação motora, que está associada com cerebelo e fatores cognitivos (GASBARRI e cols., 2003).

Os resultados obtidos nesse modelo mostraram que a Isatina, a ISA017 e a ISA155 não foram capazes de alterar o desempenho motor dos animais, comprovando assim que a redução dos tempos de lambadura dos animais tratados com as substâncias no modelo da formalina, capsaicina e glutamato é resultante de uma ação antinociceptiva e não decorrente de uma redução do desempenho motor.

No teste do campo aberto, foi avaliado o número total de cruzamentos, que avalia a atividade exploratória do animal. Esta atividade pode ser afetada por fármacos com ação no SNC ou relaxantes musculares periféricos (ARCHER, 1973; SIEGEL, 1946). A ausência de efeito das substâncias, na dose testada, sobre o número de cruzamentos realizados pelos camundongos é um importante indicativo de que estes compostos causam efeito antinociceptivo ao invés de qualquer outro efeito central que comprometeria as medidas baseadas no comportamento dos animais. É importante frisar que a Isatina, a ISA017 e a ISA155 não foram capazes de aumentar ou diminuir o número de quadrados percorridos se comparado com os valores do grupo tratado com o veículo.

6. CONCLUSÕES

Após a realização dos estudos farmacológicos com a Isatina, ISA017 e ISA155, podemos concluir que todos:

- Possuem efeito antinociceptivo periférico demonstrado através do modelo da formalina;
- Possuem efeito antinociceptivo central demonstrado pelo modelo de placa quente;
- A ação antinociceptiva das substâncias está relacionada com a ativação de receptores vaniloides TRPV1 (nocicepção induzida por capsaicina);
- A ação antinociceptiva das substâncias está relacionada direta ou indiretamente ao sistema glutamatergico (nocicepção induzida por glutamato);
- O sistema opioide está envolvido no efeito antinociceptivo das três substâncias testadas, como observado pela reversão do efeito da naloxona;
- A reversão por L-NAME do efeito antinociceptivo da ISA017 e ISA155 sugere o envolvimento da via nitrérgica;
- O sistema colinérgico participa em parte da ação antinociceptiva das três substâncias: a atropina, um antagonista não seletivo de receptor muscarínico foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo da Isatina, ISA107 e ISA155 e a mecamilamina, um antagonista do receptor nicotínico, somente foi capaz de reverter o efeito da ISA155;
- A via do NO-GMPc-PKG-K⁺_{ATP} participou do efeito antinociceptivo da ISA107 e ISA155 como observado com o pré-tratamento com glibenclamida, um bloqueador de canal de K⁺ sensível ao ATP;
- O sistema adrenérgico não está envolvido no efeito antinociceptivo das três substâncias testadas, já que a ioimbina não foi capaz de reverter a ação destas;

- A ação antinociceptiva das três substâncias não está relacionada com o sistema endógeno canabinoide, já que o AM251 não foi capaz de reverter a ação antinociceptiva destas;
- O sistema serotoninérgico está envolvido no efeito antinociceptivo da ISA155;
- Possam ter um possível mecanismo de ação mediante o envolvimento das fibras sensíveis à capsaicina, em especial a fibra C, conforme a realização do experimento da formalina realizado com os animais dessensibilizados;
- Com exceção da Isatina, seus dois derivados foram capazes de aumentar o tempo de latência dos animais na placa quente, com relevância para o tempo de 6 horas, no modelo da hiperalgesia térmica;
- Não alteraram o desempenho locomotor (modelo do *Rota-Rod*) e a atividade espontânea (modelo do campo aberto);
- Não apresentaram alterações de comportamento ou sinais de toxicidade quando avaliados nos modelos *in vivo*;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AANONSEN, L.M.; WILCOX, G.L. Excitatory amino acid receptors and nociceptive neurotransmission in rat spinal cord. **Pain**, 41: 309-321, 1990.

ABRAHAMSEN, B., ZHAO, J., ASANTE, C. O., CENDAN, C. M., MARSH, S., MARTINEZ-BARBERA, J. P., NASSAR, M. A., DICKENSON, A. H., WOOD, J. N. The cell and molecular basis of mechanical, cold and inflammatory pain. **Science**, 321: 702-705, 2008.

ALMEIDA, T. F., ROIZENBLATT, S., TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, 1000: 40-56, 2004.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim. Behav.**, 21: 205-235, 1973.

BARROS, H.M.T.; TANNHAUSER, M.A.L.; TANNHAUSER, S.L.; TANNHAUSER, M. Enhanced detection of hyperactivity after drug withdrawal with a simple modification of the open-field apparatus. **J. Pharmacol. Methods**, 26: 269-275, 1991.

BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animals models of nociception. **Pharmacol. Rev.** 53: 597-652, 2001.

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

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; RODRIGUES, A.L.S.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; CALIXTO, J.B. Action of dipirone in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of supraspinal of the mechanism of action. **Eur. J. Pharmacol.**, 345: 233-245, 1998.

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, 924: 219-228, 2002.

BERGMAN, J.; LINDSTORM, J. O.; TILSTAM, U. The structure and properties of some indolic constituents in *Coroupita guianensis* Aubl. **Tetrahedron**, 41: 2879-2881, 1985.

BESSON, J.M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiol. Rev.**, 67: 67-187, 1987.

BESSON, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet**, 353: 1610-1615, 1999.

BUDAI, D.; WILCOX, G.L.; LARSON, A.A Effects of nitric oxide availability on responses of spinal wide dynamic range neurons to excitatory amino acids. **Eur. J. Pharmacol.**, 278: 39-47, 1995.

CAILLIET, R. **Dor: mecanismos e tratamento**. 2a ed. Editora Artes Médicas Sul, Porto Alegre, RS, 1999.

- CALIXTO, J.B.; CABRINI, D.A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, 87: 1-5, 2000.
- CAMPBELL, J. N.; MEYER, R. A. Mechanisms of Neuropathic Pain. **Neuron**, 52: 77-92, 2006.
- CARLTON, S.M. Peripheral excitatory amino acids **Curr. Opin. Pharmacol.**, 1: 52-56, 2001.
- CAROBREZ, A. de P. Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, 25: 52-58, 2003.
- CARR, D.B.; GOUDAS, L.C. **Acute pain**. *Lancet*, 353: 2051-2058, 1999.
- CARVALHO, W. A., LEMÔNICA, L. Mecanismos centrais de transmissão e de modulação da dor: atualização terapêutica. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, 48: 221-239, 1998.
- CATERINA, M.J.; SCHUMACKER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, 389:816-824, 1997.
- CATERINA, M. J., LEFFLER, A., MALMBERG, A. B., MARTIN, W. J., TRAFTON, J., PETERSEN-ZEITZ, K. R., KOLTZENBURG, M., BASBAUM, A. I., JULIUS, D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**, 288: 306-313, 2000.
- CHEN, G.; WANG, Y.; HAO, X.; MU, S.; SUN, Q. Simple isatin derivatives as free radical scavengers: Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship. **Chem. Cent. J.**, 5: 1-5, 2011.
- CHICHORRO, J.G.; LORENZETTI, B.B.; ZAMPRONIO, A.R. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. **Br. J. Pharmacol.**141:1175-1184. 2004.
- CHU, W.; ROTHFUSS, J.; ZHOU, D.; MACH, R. H. Synthesis and Evaluation of Isatin Analogs as Caspase-3 Inhibitors: Introduction of a Hydrophilic Group Increases Potency in a Whole Cell Assay. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 21: 2192-2197, 2011.
- CORRÊA, C.R.; CALIXTO, J.B. Evidence for participation of B₁ and B₂ kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, 110: 193-198, 1993.
- CURY, Y.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, V.P.; FERREIRA, S.H. Pain and analgesia: The dual effect of nitric in the nociceptive system. **Nitric Oxide**, 25: 243-254, 2011.
- DOGRUL, A.; OSSIPOV, M.H.; LAI, J.; MALAN, T.P.; PORRECA, F. Peripheral and spinal antihyperalgesic activity of SIB-1757, a metabotropic glutamate receptor (mGLUR(5)) antagonist, in experimental neuropathic pain in rats. **Neurosci. Lett.**, 292: 115-118, 2002.

- DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.**, 75: 125-131, 1995.
- DRESSLER, D.; SABERI, F. A.; BARBOSA, E. R. Botulinum toxin: mechanisms of action. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, 63: 180-185, 2005.
- DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J. Am. Pharmaceut. Assoc.**, 57: 208-210, 1957.
- FIELDS, H. State-dependent opioid control of pain. **Neuroscience**, 5: 565-575, 2004.
- FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I. Central nervous system mechanisms of pain modulation In: **Textbook of pain, Patrick Wall e Ronald Melzack**, 4a ed., Churchill Livingstone, Nova York, 1999.
- FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**, 48: 129-141, 1999.
- GAMSE, R.; LACKNER, D.; GAMSE, G.; LEEMAN, S.E. Effect of capsaicin pretreatment on capsaicin-evoked release of immunoreactive somatostatin and substance P from primary afferent neurons. **Naun. Sch. Arch. Pharmacol.**, 316: 38-41, 1981.
- GAO, N.; KRAMER, L.; RAHMANI, M.; DENT, P.; GRANT, S. The threesubstituted indolinone cyclin-dependent kinase 2 inhibitor 3-[1-(3H-imidazol-4-yl)-meth-(Z)-ylidene]-5-methoxy-1,3-dihydroindol-2-one (SU9516) kills human leukemia cells via downregulation of Mcl-1 through a transcriptional mechanism. **Mol. Pharmacol.**, 70: 645-55, 2006.
- GARDEN, S. J.; TORRES, J. C.; FERREIRA, A. A.; SILVA, R. B.; PINTO, A. C. A modified Sandmeyer methodology and the synthesis of (\pm) convolutamydine A. **Tetrahedron Lett.** 38: 1501-1504. 1997.
- GASBARRI e cols. Comparative effects of lesions to the ponto-cerebellar and olivo-cerebellar pathways on motor and spatial learning in the rat. **Neurosci.**, 116: 1131-1140, 2003.
- GODOY, M.C.M.; FIGUERA, M.R.; FLORES, A.E.; RUBIN, M.A.; OLIVEIRA, M.R.; ZANATTA, N. e cols. α 2-Adrenoceptors and 5-HT receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazoles, but not of dipyrone. **Eur. J. Pharmacol.**, 496: 93-97, 2004.
- GRÜBB, B.D. Peripheral and central mechanisms of pain **Br. J. Anaesth.**, 81: 8-11, 1998.
- GUILLAM, E. M.; NOTLEY, L. M.; CAI, H.; DE VOSS, J. J.; GUENGERICH, F. P. Oxidation of indole by cytochrome P450 enzymes. **Biochemistry.**, 39: 13817-24, 2000.
- GUO, Y.; CHEN, F. **Zhongcaoyao**, 17: 1-8, 1986.

GUYTON, A. C., HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Editora Elsevier/Medicinas Nacionais, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2011.

HALKET, J.M.; WATKINS, P.J.; PRZYBOROWSKA, A.; GOODWIN, B.L.; CLOW, A.; GLOVER, V.; SANDLER, M. **J.Chromatogr.**, 562:279, 1991.

HARA, S.; KUHNS, E.R.; ELLENBERGER, E.A.; MUELLER, J.L. e cols. Involvement of nitric oxide in intracerebroventricular b-endorphin-induced neuronal of methionine-enkephalin. **Brain Res.**, 675: 190-194, 1995.

HOHMANN, A.G.; FARTHING, J.N.; ZVONOK, A.M.; MAKRIYANNIS, A. Selective activation of cannabinoid CB2 receptors suppresses hyperalgesia evoked by intradermal capsaicin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 308: 446-453, 2004.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesia. **J.Neurosci. Methods**. 14:69-76. 1985.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**. 30: 103-114, 1987.

IASP. Classification of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **Pain**: 150:201-206, Supplement 3, 1986 .

ISCHIA, M.; PALUMBO, A.; PROTA, G. **Tetrahedron**, 44: 6441, 1998.

JANCZO, G. Selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones induced by capsaicin: glial changes. **Cell Tissue Res.**, 195: 145-152, 1978.

JANCZO, G.; HOKFELT, T.; LUNDEBERG, J.M.; KIRALY, E.; HALASZ, N.; NILSSON, G.; TERENIUS, L.; REHFELD, J.; STEINBUSCH, H.; VERHOFSTAD, A.; ELDE, E.; SAID, S.; BROWN, M. Immunohistochemical studies on the effects of capsaicin on spinal and medullary peptide and monoamine neurosn using antisera to substance P, gastrin CCK, somatostatin, VIP, enkephalin, neurotensin and 5-HT. **J. Neurocytol.**, 10: 963-980, 1981.

JULIUS, D., BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, 413: 203-210, 2001.

JUNIOR, O. S. **Efeito antinociceptivo da dotarizina e flunarizina em camundongos**. 2005. 75f. Dissertação (Mestrado em Neurociências). Curso de Pós-graduação em Neurociências do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2005.

KAWAKAMI, T.; HIKAWA, N.; KUSAKABE, T.; KANO, M.; BANDOU, Y.;GOTOH, H.; TAKENAKA, T. 1993. Mechanism of inhibitory action of capsaicin on particulate axoplasmic transport in sensory neurons in culture. **J. Neurobiol.**, 24: 545-551, 1993.

KAYSER, V.; ELFASSI, I.E.; AUBEL, B.; MELFORT, M. e cols. Mechanical thermal and formalin-induced nociception is differentially altered in 5-HT_{1A} ^{-/-}, 5-HT_{2A} ^{-/-}, 5-HT_{3A} ^{-/-} and 5-HT ^{-/-} knockout male mice. *Pain*, 130: 235-248, 2007.

KHAN, I.M.; STANISLAUS, S.; ZHANG, L.; TAYLOR, P.; YAKSH, T.L. A-85380 and epibatidine each interact with disparate spinal nicotinic receptor subtypes achieve analgesia and nociception. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **297**: 230-239, 2001.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A; VALENTE, C. M. L. Citocinas Pró-inflamatórias e Dor. *Revista Brasileira de Reumatologia*,46: 199-206, 2006.

LANE, M.E.; YU, B.; RICE, A.; LIPSON, K.E.; LIANG, C.; SUN, L. e cols. A novel cdk-2-nselective inhibitor, SU9516, induces apoptosis in colon carcinoma cells. *Cancer Res.*, 61: 6170-7, 2008.

LAVICH, T.R.; CORDEIRO, R.S.; SILVA, P.M.; MARTINS, M.A. A novel hot-plate test sensitive to hyperalgesic stimuli and non-opioid analgesics. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 38: 445-451, 2005.

LECLERC, S.; GARNIER, M.; HOESSEL, R. Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3b and CDK5/P25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's Disease. *J. Biol. Chem.*, 276: 251-260, 2001.

LEMBECK, F. The 1988 Ulf Von Euler Lecture: Substance P: from extract to excitement. *Acta Physiol. Scand.*, 133: 435-454, 1988.

LEVINE, J.D.; TAIWO, Y. Inflammatory pain. In: **Textbook of pain, Patrick Wall e Ronald Melzack**, 4^a e., Churchill Livenstone, Nova York, 1999.

LI, H.H; ZHANG, X.H.; TAN, J.Z.; CHEN, L.L; LIU, H.; LUO, X.M. e cols. Design, synthesis, antitumor evaluations and molecular modeling studies of novel 3,5-substituted indolin-2-one derivates. *Acta Pharmacol. Sin.*, 28: 140-52, 2007.

LOESER, J. D., BLACK, R. A taxonomy of pain. *Pain*, 1: 81-90, 1975. In: PERISSINOTTI, D. M. N. Compreendendo o processo doloroso. A dor como traição. **Associação Brasileira de Cuidados Paliativos**, maio. 2002. Disponível em: <<http://www.cuidadospaliativos.com.br/artigo.php?cdTexto=26>>. Acesso em: 29/11/2013.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. *Lancet.*, 353: 1607-1609. 1999.

MA, W.; QUIRION, R. Does COX2-dependent PGE2 play a role in neuropathic pain? *Neuroscience Letters*, 437: 165-169, 2008.

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

MARCON, R.; LUIZ, A.P.; WERNER, M. F. P.; FREITAS, C.S.; BAGGIO, C.H.; NASCIMENTO, F.P.; SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, A.R.S. Evidence of

TRPV1 receptor and PKC signaling pathway in the antinociceptive effect of amyryn octanoate. **Brain Research**, 1295: 76-88, 2009.

MARVEL, C. S.; HIERS, G. S. Isatin. **Organic Synthesis Collective**. 327-330. 1941.

MATESIC, L.; LOCKE, J.M.; BREMNER, J.B.; PYNE, S.G.; SKROPETA, D.; RANSON, M. e cols. N-phenethyl an N-naphthylmethyl isatins and analogues as in vitro cytotoxic agents. **Bioorg. Med. Chem.**, 16: 3118-24, 2008.

MATHEUS, M. E.; ALMEIDA, V. F.; GARDEN, S. J; PINTO, A. C.; FERNANDES, P. D. Isatins inhibit cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in a mouse macrophage cell line. **Eur. J. Pharmacol.**, 556: 200–206, 2007.

MEDVEDEV, A.; BUNEEVA, O.; GLOVER, V. Biological targets for isatin and its analogues: Implications for therapy. **Biol. Targets e Therapy.**, 1: 151-162, 2007.

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

MENÉNDEZ L, LASTRA A, HIDALGO A, BAAMONDE A. Unilateral hot plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice. **J. Neurosci.i Methods** , 113: .91-97, 2002.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of chronic pain: description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **IASP Press**, Seattle, 1994.

MICHAEL, G.J.; PRIESTLEY, J.V. Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. **J. Neurosci.**, 19: 1844-1854, 1999.

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

MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.**, 569: 1-120, 2002.

MILLER, M.S.; BUCK, S.H.; SIPES, I.G.; YAMAMURA, H.I.; BURKS, T.F. Regulation of substance P by nerve growth factor: disruption by capsaicin. **Brain Res.**, 250: 193-196, 1982.

MOGIL, J.S.; ADHIKARI, S.M. Hot and cold nociception are genetically correlated. **J. Neurosci.**, 19: RC25, 1999.

MOGIL, J.S.; GRISEL, J.E. Transgenic studies of pain. **Pain**, 77: 107-128, 1998.

MORRIS, CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse **In: WINYARD, PG AND WILLOUGHBY, DA. Methods in Molecular Biology, Inflammation Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 225: 115-121, 2003.**

MUTHUKUMAR, V. A.; GEORGE, S.; VAIDHYALINGAM, V. Synthesis and Pharmacological Evaluation of 1-(1-((Substituted)methyl)- 5-methyl-2-oxoindolin-3-

ylidene)-4-(substituted pyridin-2-yl)thiosemicarbazide. **Biol. Pharm. Bull.**, 31: 1461-1464, 2008.

NIROGI, R.; JAYARAJAN, P.; ABRAHAM, R.; SHANMUGANATHAN, D.; RASHEED, M.A. e cols. Antinociceptive activity of $\alpha 4\beta 2^*$ neuronal nicotinic receptor agonist A-366833 in experimental models of neuropathic pain. **Eur. J. Pharmacol.** 668: 155-162, 2011.

OH, V.; HWANG, S.W.; KIM, D. Capsaicin activates a nonselective cation channel in cultured neonatal rat dorsal root ganglion neurons. **Neurosci.**, 15:1659-1667, 1996.

OKUSE, K. Pain signalling pathways: From cytokines to ion channels. **The International Journal of Biochemistry e Cell Biology**, 39: 490-496, 2007.

ONETTA, R. C. **Bases neurofisiológicas da acupuntura no tratamento da dor.** 2005. 63f Monografia do Curso de Fisioterapia - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2005.

PAKRAVAN, P.; KASHANIAN, S.; KHODAEI, M.M.; HARDING, F.J. Biochemical and pharmacological characterization of isatin and its derivatives: from structure to activity. **Pharmacological Reports**, 65: 313-335, 2013.

PALLAZO, E.; de NOVELLIS, V.; MARABESE, I.; CUOMO, D. e cols. Interaction between vanilloid and glutamate receptors in the central modulation of nociception. **Eur. J. Pharmacol.**, 439: 69-75, 2002.

PALUMBO, A.; ISCHIA, M.; MISURACA, G.; PROTA, G. **Biochim. Biophys. Acta**, 990: 297, 1989.

PAN, H.L.; WU, Z.Z.; ZHOU, H.Y.; CHEN, S.R. e cols. Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. **Pharmacol. Ther.**, 117: 141-161, 2008.

PARADA, S.A.; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**. 4:937-944. 2001

PATYNA, S.; LAIRD, A.D.; MENDEL, D.B.; O'FARREL, A.M.; LIANG, C.; GUAN, H. e cols. SU14813: A novel multiple receptor tyrosine kinase inhibitor with potent antiangiogenic and antitumor activity. **Mol. Cancer Ther.**, 5: 1774-82, 2006.

PEREIRA, F. S., RABELLO, G. D. Aspectos psicológicos envolvidos no processo de cronificação algica. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, 32: 1-8, 2003.

PERISSINOTTI, D. M. N. Compreendendo o processo doloroso. A dor como traição. **Associação Brasileira de Cuidados Paliativos**, maio. 2002. Disponível em: <<http://www.cuidadospaliativos.com.br/artigo.php?cdTexto=26>>. Acesso em: 29/11/2013.

PIETROVSKI, E.F.; ROSA, K.A.; FACUNDO, V.A.; RIOS, K. e cols. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihidroxilup-20(29)-

ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacol. Biochem. Behavior**, 83: 90-99, 2006.

PINHEIRO, M.M.G.; BESSA, S.O.; FINGOLO, C.E.; KUSTER, R.M.; MATHEUS, M.E.; MENEZES, F.S.; FERNANDES, P.D. Antinociceptive activity of fractions from *Couroupita guianensis* Aubl. leaves. **J. Ethnopharmacol.**, 127: 407-413, 2010.

PORRECA, F.; OSSIPOV, M.H.; GEBHART, G.F.. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends Neurosci.**, 25:319 -325, 2002.

PORTO, C. C. **Exame Clínico: Bases para a prática médica**. 5a ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2004.

PREMANATHAN, M.; RADHAKRISHNAN, S.; KULANGIAPPAR, K.; SINGARAVELU, G.; THIRUMALAIARASU, V.; SIVAKUMAR, T.; KATHIRESAN, K. Antioxidant and anticancer activities of isatin (1H-indole-2,3-dione) isolated from the flowers of *Couroupita guianensis* Aubl. **Indian J. Med. Res.**, 136: 822-826, 2012.

RAJENDRA, W., ARMUGAM, A., JEYASEELAN, K. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. **Toxicon.**, 44: 1-17, 2004.

RAMADABRAN, K.; BANSINATH, M. A critical analysis of the experimental evaluation of nociceptive reactions in animals. **Pharmac. Res.**, 3: 263-269, 1996.

RANG, H.P.; BEVAN, S.J.; DRAY, A. Chemical activation of nociceptive peripheral neurons. **Br. Med. Bull.**, 47: 534-548, 1991.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Fármacos analgésicos. In: RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. P 492-507, 2008.

REA, K.; ROCHE, M.; FINN, D.P. Supraspinal modulation of pain by cannabinoids: the role of GABA and glutamate. **Br. J. Pharmacol.**, 152: 633-648, 2007.

REICHLING, D.B.; LEVINE, J.D. In hot pursuit of the elusive heat transducers. **Neuron.**, 26: 555-558, 2000.

REISINE, T., PASTERNAK, G. Opioid analgesics and antagonists. In: HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E., MOLINOFF, P. B., RUDDON, R. W., GILMAN, A. G. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 9. ed., McGraw-Hill, New York, p. 521 – 555, 1996. In: RAJENDRA, W., ARMUGAM, A., JEYASEELAN, K. Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. **Toxicon.**, 44: 1-17, 2004.

ROCHA, A. P. C., KRAYCHETE, D. C., LEMONICA, L., CARVALHO, L. R., BARROS, G. A. M., GARCIA, J. B. S., SAKATA, R. K. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, 57: 94-105, 2007.

ROSLAND, J. H.; HUNSKAAR, S.; HOLE, K. Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently im mice. **J. Pharmacol. Toxicol.**, 66: 382-386, 1990.

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

SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal Cord. **Neuropharmacology**, 31: 1279-1285, 1992.

SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; YOGO, H.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. Antinociception induced by CP 96,345, a non-peptide NK-1 receptor antagonist in the mouse formalin and capsaicin tests. **Neuroscience Letters**, 151:142-145, 1993.

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

SANDMEYER, T. Isonitrosoacetanilides and their condensation to form isatin derivatives. **Chemical Abstracts**, 13: 1840-1841. 1919.

SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, 31: 381-389, 1997.

SANTOS, A.R.S.; GADOTTI, V.M.; OLIVEIRA, G.L.; TIBOLA, D.; PASZCUK, A.F.; NETO, A.; SPINDOLA, H.M.; SOUZA, M.M.; RODRIGUES, A.L.; CALIXTO, J.B. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. **Neuropharmacology**, 48: 1021-1034, 2005.

SANTOS, G. G. L. **Caracterização farmacológica do efeito antinociceptivo do veneno de *Micrurus lemniscatus* (coral-verdadeira)** 2011. 68f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM), Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2011.

SASAMURA, T.; SASAKI, M.; TOHDA, C.; KURASHI, Y. Existence of capsaicin-sensitive glutamatergic terminals in rat hypothalamus. **Neuroreport**. 9: 2045-2048, 1998.

SCHMIDTKO, A.; LUO, C.; GAO, W.; GEISLINGER, G.; KUNER, R.; TEGEDER, I. Genetic deletion of synapsin II reduces neuropathic pain due to reduced glutamate but increased GABA in the spinal cord dorsal horn. **Pain**, 139: 632-643, 2008.

SENDEROWICZ, A. M. Novel small molecule cyclin-dependent kinases modulators in human clinical trials. **Cancer Biol. Ther.**, 2: 84-95, 2003.

SHIBATA, M.; OHKUDO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test characteristic biphasic pain response. **Pain**, 38:347-352, 1989.

SIELGEL, P.S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. **J. Psychol.**, 21: 227-236, 1946.

SIELGEL, P.S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. **J. Psychol.**, 21: 227-236, 1946.

SINDRUP, S. H., JENSEN, T. S. Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. **Pain**, 83: 389-400, 1999.

SRIDHAR, S. K.; RAMESH, A. Synthesis and Pharmacological Activities of Hydrazones, Schiff and Mannich Bases of Isatin Derivatives. **Biol. Pharm. Bull.**, 24: 1149-1152, 2001.

STAROWICZ, K.; NIGAM, S.; DI MARZO, V. Biochemistry and pharmacology of of endovanilloids. **Pharmacology e Therapeutics**, 114: 13-33, 2007.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Vanilloid receptors: new insights enhance potential as a therapeutic target. **Pain**, 68: 195-208, 1996.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol. Rev.**, 51:159-211, 1999.

SZOKE, E.; SERESS, L.; SZOLCSANYI, J. Neonatal capsaicin treatment results in prolonged mitochondrial damage and delayed cell death of B cells in the rat trigeminal ganglia. **Neuroscience**, 113: 925-937, 2002.

SZOLCSANYI, J. Sensory receptors and antinociceptive effects of capsaicin. In: HANKASON, R.; SUNDLER, F. (Eds). Tachykinin antagonists. Amsterdam: Elsevier, 45-56, 1985.

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

TJOLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: The pharmacology of pain (ed. Dickson, A. and Besson, J.-M.), pp 1-20, Springer, Berlin, 1997.

VINE, K. L.; LOCKE, J. M.; RANSON, M.; BENKENDORFF, K.; PYNE, S. G.; BREMNER, J. B. *In vitro* cytotoxicity evaluation of some substituted isatin derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, 15: 931-938, 2007.

WANG, F.Z.; FANG, Y.C.; ZHU, T.J.; ZHANG, M.; LIN, A.Q.; GU, Q.Q. e cols. Seven new prenylated indole diketopiperazine alkaloids from holothurian-derived fungus *Aspergillus fumigatus*. **Tetrahedron**, 64: 7986-91, 2008.

WESS, J.; DUTTARROY, A.; GOMEZA, J.; ZHANG, W. e cols. Muscarinic receptor subtypes mediating central and peripheral antinociception studied with muscarinic receptor knockout mice: A review. **Life Science**, 72: 2047-2954, 2003.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med. dec.**, 111: 544-547, 1962.

WOOF, C.J. Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**, 152: 2-15, 2010.

YENG, L. T., TEIXEIRA, M. J. Tratamento multidisciplinar dos doentes com dor crônica. **Prática Hospitalar**, ano VI, n. 35, 2004.

YOSHIKAWA, M.; MURAKAMI, T.; KISHI, A.; SAKURAMA, T.; MATSUDA, H.; NOMURA, M.; MATSUDA, H.; KUBO, M. Novel indole S,O-bisdesmoside, calanthoside, the precursor glycoside of tryptanthrin, indirubin and isatin with increasing skin blood flow promoting effects, from two *Calanthe* species (Orchidaceae). **Chem. Pharm. Bull.**, 46: 886-888, 1998.

YOSHIMURA, M.; FURUE, H. Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. **Journal of Pharmacological Sciences**, 101: 107-117, 2006.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, 16: 109-110, 1983.