

UFFRJ

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

DISSERTAÇÃO

**Avaliação dos Efeitos Antinociceptivo, Anti-inflamatório e Anti-
artrite do LQB-118 em Camundongos**

Rafael Moreira da Silva

2023



UFRRJ

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVO, ANTI-
INFLAMATÓRIO E ANTIARTRITE DO LQB-118 EM
CAMUNDONGOS**

RAFAEL MOREIRA DA SILVA

Sob a Orientação do Professor
David do Carmo Malvar

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas

Seropédica
Fevereiro de 2023

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Biblioteca

Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada

com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M136a Moreira da Silva, Rafael, 1990-
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVO, ANTI
INFLAMATÓRIO E ANTIARTRITE DO LQB-118 EM CAMUNDONGOS /
Rafael Moreira da Silva. - Seropédica, 2023.
92 f.

Orientador: David do Carmo Malvar.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, MESTRADO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS, 2023.

1. Artrite reumatoide. 2. LQB-118. 3. Leflunomida.
I. do Carmo Malvar, David, 1982-, orient. II
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. MESTRADO
MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS III.
Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



TERMO Nº 161/2023 - DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)

Nº do Protocolo: 23083.010713/2023-17

Seropédica-RJ, 28 de fevereiro de 2023.

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

RAFAEL MOREIRA DA SILVA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas**, no Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, área de Concentração em Ciências Fisiológicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 09/02/2023

Banca Examinadora: **Titulares:**

Dr David do Carmo Malvar (Orientador, UFRRJ),

Dr Bruno Guimarães Marinho (Membro Interno, UFRRJ),

Dr Flávio Protásio Veras (Membro Externo, UNIFAL).

Documento não acessível publicamente

(Assinado digitalmente em 28/02/2023 11:53)

BRUNO GUIMARAES MARINHO

DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)

Matrícula: ###740#3

(Assinado digitalmente em 28/02/2023 12:45)

DAVID DO CARMO MALVAR

DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)

Matrícula: ###006#3

(Assinado digitalmente em 19/07/2023 08:59)

FLAVIO PROTASIO VERAS

CPF: ###.###.723-##

Dedico esse projeto à minha avó, Maria Francisca. Sei que você está muito feliz onde quer que estiver. Eu daria o universo e toda a sua imensidão para poder sentir o seu abraço de novo. Te amo!

AGRADECIMENTOS

Não sei como consegui chegar até aqui. Durante todas as dificuldades que eu tive que enfrentar no campo de batalha da minha mente, enquanto meu corpo se somatizava e tentava “verbalizá-las” em sinais de desgaste e ansiedade, pude contar com o auxílio de pessoas que sou eternamente grato.

De todas essas pessoas, meu companheiro de longos 8 anos foi o que mais me sustentou. Carlos Emanuel, agradeço por ter você comigo, pelas horas que você gastou tentando fazer com que eu não desistisse desse sonho e de como você demonstra que eu, de alguma maneira, sou especial. Você esteve presente em todas as minhas crises, viu o meu pior momento e mesmo assim não desistiu de me incentivar. Amo você!

Agradeço à minha família e minha mãe, Maria do Livramento, por ter me ensinado que conhecimento é uma ferramenta de alto poder e que ninguém pode ser capaz de roubá-lo de mim e por ter dado todo o seu esforço para que eu chegasse até aqui também.

À minha amiga Joze de Paula por me apoiar – seu senso de sinceridade e realidade são fora do comum. À Adriana de Carvalho, por me ouvir sem julgar. À Shirli de Menezes e Mariana Dias por se importarem comigo.

Às minhas companheiras de trabalho, Marcela Guimarães e Isabella Victal, por acreditarem em mim e pelo incentivo que me deram mesmo com nossas muitas atribuições de trabalho. Vocês tanto falaram para eu não desistir desse projeto e não consigo acreditar que estou sentado de frente para o computador com ele finalizado e escrevendo essas dedicatórias. Vocês são demais!

Por fim, quero agradecer ao meu orientador David Malvar. Obrigado pela paciência comigo; nunca vou esquecer daquele telefonema seu quando eu estava por um triz de desistir do programa de mestrado. Suas orientações foram essenciais para o meu aprimoramento!

Deixo meu agradecimento aos professores da Universidade Federal do Rio de Janeiro Chaquip Daher Netto, Paulo Roberto Ribeiro Costa e Fernando Armani Aguiar pelo fornecimento do LQB-118. Ao professor Flávio Protásio Veras, da Universidade Federal de Alfenas, pela colaboração com os experimentos in vitro e por aceitar participar da banca de avaliação.

Não posso deixar de agradecer à excepcional equipe de alunos de iniciação científica: Emanelly Barbosa Sacramento, Lizandra de Fátima Brandão Torquato e Raquel Barcellos Brasil, pela participação ativa nos experimentos que compõem esse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), edital N° 05/2020, processo N° E-26/210.085/2021 (258981); com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo N° 114771/2022-7 e com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Obrigado Deus, por me cercar de pessoas que se importam e por não permitir que eu enlouquecesse ao longo do caminho (risos).

Chegar até aqui tem um sabor inexplicável!

RESUMO

SILVA, Rafael Moreira. **Avaliação dos efeitos antinociceptivo, anti-inflamatório e antiartrite do LQB-118 em camundongos.** 2022. 92 pgs. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2022.

A artrite reumatoide, uma doença autoimune inflamatória crônica e progressiva, leva à erosão óssea, destruição da cartilagem e perda de função, cursando com intensas dores articulares. No desenvolvimento da doença, os macrófagos são os responsáveis por produzir e secretar citocinas inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α e IL-17, que são capazes de ativar células da imunidade adaptativa, expandindo o processo inflamatório. Mulheres com artrite apresentam melhora no quadro clínico durante a gravidez, o que sugere que os hormônios sexuais tenham algum efeito protetor sobre a doença. Apesar de existir muitas ferramentas farmacológicas para o tratamento da artrite, os medicamentos usados, como a leflunomida, provocam muitos efeitos colaterais ou possuem um custo muito elevado. Sendo assim, o presente estudo visou avaliar o potencial antinociceptivo e antiartrite do LQB-118, uma pterocarpaquinona desenhada a partir da junção do lapachol com o pterocarpano, bem como o envolvimento de receptores de estrogênio no mecanismo de ação deste composto. Para isso foram utilizados métodos experimentais clássicos que avaliam o comportamento nociceptivo e o modelo de artrite induzida por zimosan em camundongos. O teste de contorção abdominal indicou efeito antinociceptivo, pois o tratamento subcutâneo com LQB-118 (3, 10 e 30 mg/kg) reduziu o número de contorções abdominais de forma dose-dependente. No teste da formalina, não houve alteração do tempo de reatividade do comportamento nociceptivo durante a dor neurogênica (0-5 min), porém houve redução da reatividade dos animais durante a dor inflamatória (15-30 min), sugerindo envolvimento de mecanismos anti-inflamatórios. O teste da placa quente descartou o envolvimento de mecanismos antinociceptivos centrais, uma vez que o LQB-118 (30 mg/kg, *s.c.*) não alterou o tempo de queda dos camundongos. Além disso, o teste rota rod descartou alterações nas funções motoras dos animais, pois o tempo de queda dos camundongos não foi alterado pelo LQB-118 (30 mg/kg, *s.c.*). No modelo de artrite induzida por zimosan, o LQB-118 (30 mg/kg, *s.c.*) aumentou em 50,2% o limiar nociceptivo, enquanto a lapachol e lausona não alteraram este parâmetro. Os tratamentos com LQB-118, lapachol e lausona reduziram significativamente a migração de leucócitos para a cavidade articular induzida por zimosan. A ovariectomia (OVX) demonstrou que o tratamento com LQB-118 (10 e 30 mg/kg) manteve as fases do ciclo estral em metaestro e diestro, descartando uma possível ação agonista sobre os receptores de estrogênio. O tratamento com LQB-118 (30 mg/kg) reduziu significativamente o peso do útero de animais OVX em 47,4%, indicando um possível efeito antagonista sobre os receptores de estrogênio. Corroborando com esta hipótese, em animais OVX que receberam cipionato de estradiol, o tratamento com LQB (30mg/kg, *s.c.*) reverteu o aumento do peso do útero em 29,4% e manteve 75% dos animais em metaestro ou diestro. *In vitro*, o LQB-118 (10-100 μ M) reduziu a síntese de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-10) e a proliferação de macrófagos primários estimulados com LPS. Esse conjunto de dados sugere que o LQB-118 possui efeito antinociceptivo, antiartrite e antiproliferativo, indicando esse composto como uma promissora ferramenta farmacológica para o tratamento da AR. Nossos dados também sugerem que o LQB-118 possa atuar como antagonista de receptores de estrogênio. Entretanto, novos estudos precisam ser realizados para melhor investigar seu mecanismo de ação.

Palavras-chave: Artrite reumatoide, LQB-118, Leflunomida

ABSTRACT

SILVA, Rafael Moreira. **Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiarthritis effects of LQB-118 in mice.** 2022. 92 pgs. Dissertation (Master's degree in Physiological Sciences). Multicenter Graduate Program in Physiological Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2022.

Rheumatoid arthritis, a chronic and progressive inflammatory autoimmune disease, leads to bone erosion, cartilage destruction and loss of function, leading to severe joint pain. In the development of arthritis, macrophages are responsible for producing and secreting inflammatory cytokines that are able to activate immune system cells, expanding the inflammatory process. In addition, after the menopause period, the incidence of arthritis is three times higher in women when compared to men and women with arthritis show improvement in the health state during pregnancy, which suggests that sex hormones have some protective effect on the disease. Although there are many pharmacological tools for the treatment of arthritis, these drugs cause many side effects or are very expensive. Therefore, the present study aimed to evaluate the antinociceptive and antiarthritis potential of LQB-118, a pterocarpaquinone designed from the combination of lapachol and pterocarpan, as well as the involvement of estrogen receptors in the mechanism of action of this compound. For this, experimental models that evaluate the nociceptive behavior and the model of zymosan-induced arthritis in mice were used. In the acetic acid-induced writhing, LQB-118 (3, 10 and 30 mg/kg, *s.c.*) reduced the number of writhings in a dose-dependent manner (25.4%, 55.6% and 68.7 %, respectively), indicating an antinociceptive effect. In the formalin test, LQB-118 (30 mg/kg, *s.c.*) did not change the reactivity time of nociceptive behavior during neurogenic pain, but reduced the reactivity of the animals by 46.6% during the inflammatory pain, suggesting an antinociceptive effect involving anti-inflammatory mechanisms. The hot plate test ruled out the involvement of central antinociceptive mechanisms, since LQB-118 (30 mg/kg, *s.c.*) did not change the fall time of the mice. In addition, the rota rod test ruled out changes in the animal motor functions, as the mice's falling time was not altered by LQB-118 (30 mg/kg, *s.c.*). In the zymosan-induced arthritis, LQB-118 (30 mg/kg, *s.c.*) increased the nociceptive threshold by 50.2%, while lapachol and lausone did not change this parameter. Treatments with LQB-118, lapachol and lausone significantly and similarly reduced zymosan-induced leukocyte migration into the joint cavity. The treatment of ovariectomized animals (OVX) with LQB-118 (10 and 30 mg/kg, *s.c.*) did not alter the estrous cycle phases of these animals, which remained in metestrus and diestrus, ruling out a possible agonist action on estrogen receptors. In contrast, LQB-118 (30 mg/kg) significantly reduced the uterine weight of OVX animals by 47.4%, suggesting a possible antagonistic effect on estrogen receptors. Corroborating this hypothesis, in OVX animals that received estradiol cypionate, treatment with LQB (30mg/kg, *s.c.*) reversed the increase in uterine weight by 29.4% and maintained 75% of the animals in metestrus or diestrus. In vitro, LQB-118 (10-100 μ M) reduced the cytokine synthesis (TNF- α , IL-6 and IL-10) and the proliferation of LPS-stimulated primary macrophages. This dataset suggests that LQB-118 has antinociceptive, antiarthritis and antiproliferative effects, indicating this compound as a promising pharmacological tool for the treatment of arthritis. Our data also suggest that LQB-118 may act as an estrogen receptor antagonist. However, further studies need to be carried out to better investigate its mechanism of action.

Keywords: Rheumatoid arthritis, LQB-118, Leflunomide.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. FATORES QUE CONTRIBUEM PARA O DESENVOLVIMENTO DA ARTRITE REUMATOIDE. FONTE: LIN ET AL, 2020.** TANTO FATORES AMBIENTAIS (FUMO, OBESIDADE E ATÉ MESMO INFECÇÃO POR ALGUNS PATÓGENOS) QUANTO GENÉTICOS (MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS, POLIMORFISMOS GENÉTICOS QUE AFETAM A APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS) CONTRIBUEM PARA O DESENVOLVIMENTO DA ARTRITE REUMATOIDE. A INJÚRIA SINOVIAL E A HIPERPLASIA DOS FIBROBLASTOS TAMBÉM CONTRIBUEM PARA O ESTABELECIMENTO DA DOENÇA ATRAVÉS DE ATIVAR CONDIÇÕES INFLAMATÓRIAS QUE LEVAM À MODIFICAÇÃO DE AUTOANTÍGENOS (GERALMENTE POR CITRULINAÇÃO), AUMENTANDO A SUSCETIBILIDADE DE DEGRADAÇÃO PROTEOLÍTICA 17
- FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO IMUNOPATOLÓGICO DA ARTRITE REUMATOIDE. FONTE: MORAES ET AL, 2014.** AS CÉLULAS B (LB) SÃO ATIVADAS POR AUTOANTÓGENOS PRODUZINDO AUTOANTICORPOS CONTRA ANTÍGENOS CITRULINADOS E FATOR REUMATOIDE. OS LINFÓCITOS TH1 PRODUZEM IFN- γ E OS LINFÓCITOS TH17 PRODUZEM IL-17 QUE, JUNTOS, ESTIMULAM OS MACRÓFAGOS A PRODUZIREM CITOCINAS, COM DESTAQUE PARA TNF QUE POSSUI VÁRIOS EFEITOS CELULARES: ATIVAÇÃO DO ENDOTÉLIO, ATIVAÇÃO DE FIBROBLASTOS (PRODUÇÃO DE IL-6), ATIVAÇÃO DE OSTEOCLASTOS, CONDROCITOS E MASTÓCITOS..... 20
- FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA DOS ESTROGÊNIO ENDÓGENOS: ESTRONA (E₁ EM VERMELHO); ESTRADIOL (E₂ EM AZUL); ESTRIOL (E₃ EM VERDE) E ESTRETROL (E₄ EM LARANJA). FONTE: FUENTES, 2019.** OS QUATRO COMPOSTOS CONTÊM 18 CARBONOS (C₁₈H₂₄O₂), DOS QUAIS 17 CARBONOS ESTÃO REARRANJADOS EM QUATRO ANÉIS (UM ANEL AROMÁTICO, DOIS ANÉIS CICLOHEXANO E UM ANEL CICLOPENTANO), ALÉM DISSO TAMBÉM POSSUEM UM GRUPO HIDROXIL FENÓLICO, UM GRUPO CETONA (ESTRONA), OU UM (17 β -ESTRADIOL), DOIS (ESTRIOL), OU TRÊS (ESTRETROL) GRUPOS HIDROXILA [FUENTES F; SILVEYRA P, 2019]..... 24
- FIGURA 4. AROMATIZAÇÃO DA TESTOSTERONA (HORMÔNIO ANDRÓGENO) PARA FORMAR O ESTRADIOL (HORMÔNIO ESTRÓGENO). FONTE: ATTAR, 2006.** REAÇÃO CATALISADA PELA ANZIMA AROMATASE..... 25
- FIGURA 5. SINALIZAÇÃO DO ESTRADIOL. FONTE: ISLANDER ET AL, 2011.** MECANISMO 1: VIA CLÁSSICA NA QUAL O ESTRADIOL SE LIGA AO RE, É TRANSLOCADO AO NÚCLEO, SE LIGA AOS ERE E INICIA A TRANSCRIÇÃO; MECANISMO 2: VIA NÃO-CLÁSSICA NA QUAL O COMPLEXO ESTRADIOL/RECEPTOR SE LIGA A FATORES DE TRANSCRIÇÃO ALTERNATIVOS PARA INICIAR A TRANSCRIÇÃO; MECANISMOS 3 E 4: LIGAÇÃO DO ESTRADIOL A RECEPTORES DE ESTRÓGENOS ASSOCIADOS À MEMBRANA OU GPR30 LEVA A CASCATAS DE SINALIZAÇÃO ALTERNATIVAS 27
- FIGURA 6. PANORAMA SOBRE OS DMARDS COMUMENTE UTILIZADOS NO TRATAMENTO DA ARTRITE REUMATOIDE. FONTE: FIRES, 2000.** OS DMARDS ESTÃO AGRUPADOS EM SINTÉTICOS E BIOLÓGICOS. OS BIOLÓGICOS INCLUEM OS ANTICORPOS MONOCLONAIS E INIBIDORES DE CÉLULAS T 31
- FIGURA 7. ESTRUTURA QUÍMICA DO LQB-118 – DESIGN ESTRATÉGICO (A) E A ROTA SINTÉTICA (B) DA PTEROCARPAQUINONA LQB-118. FONTE: MODIFICADA DE DE SÁ BACELAR ET AL., 2013; LIMA, 2020.** A FIGURA A ILUSTRA O DESIGN ESTRATÉGICO QUE ORIGINOU A IDEIA PARA A SÍNTESE DO LQB-118 E A FIGURA B APRESENTA A ROTA SINTÉTICA DESTA PTEROCARPAQUINONA VIA ARILAÇÃO DE OXA-HECK CATALISADA POR PALÁDIO (PD) COM A SUBSTITUIÇÃO DO ANEL NAFTOQUINONA A PARTIR DA LAUSONA COMO SUBSTRATO DE PARTIDA, CONSERVANDO OS ANÉIS B, C E D DO PTEROCARPAQUINONA 4-HIDROXIMAACKIANA (LQB-79)..... 35
- FIGURA 8. EXEMPLIFICAÇÃO ESQUEMÁTICA DA METODOLOGIA REFERENTE AO EXPERIMENTO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO LQB-118 NO TESTE DA CONTORÇÃO ABDOMINAL 40**
- FIGURA 9. ESQUEMATIZAÇÃO DA METODOLOGIA REFERENTE AO TESTE DA FORMALINA, INDICANDO AS FASES DE DOR NEUROGÊNICA (FASE I) E INFLAMATÓRIA (FASE II), USADA PARA AVALIAR O POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO DO LQB-118. 41**

FIGURA 10. ESQUEMATIZAÇÃO DA METODOLOGIA REFERENTE AO TESTE DA PLACA QUENTE	41
FIGURA 11. EXEMPLIFICAÇÃO ESQUEMÁTICA DA METODOLOGIA REFERENTE AO TESTE ROTA ROD, PARA AVALIAÇÃO DA COORDENAÇÃO MOTORA APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE LQB-118.....	42
FIGURA 12. ESQUEMATIZAÇÃO DA METODOLOGIA USADA PARA AVALIAR O POTENCIAL ANTIARTRITE DO LQB-118	43
FIGURA 13. ESQUEMATIZAÇÃO DA METODOLOGIA DO EXPERIMENTO USADO PARA AVALIAR O POTENCIAL AGONISTA DO LQB-118 EM RECEPTORES DE ESTROGÊNIO EM CAMUNDONGOS FÊMEAS OVARIETOMIZADAS	44
FIGURA 14. ESQUEMATIZAÇÃO DA METODOLOGIA DO EXPERIMENTO USADO PARA AVALIAR O EFEITO ANTAGONISTA DO LQB-118 SOBRE RECEPTORES DE ESTROGÊNIO EM CAMUNDONGOS FÊMEAS OVARIETOMIZADAS	44
FIGURA 15. ESQUEMATIZAÇÃO DA METODOLOGIA APLICADA PARA A AVALIAÇÃO DO EFEITO DO LQB-118 NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E ANTI-INFLAMATÓRIAS POR MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM LPS	45
FIGURA 16. ESQUEMATIZAÇÃO DA METODOLOGIA UTILIZADA PARA A AVALIAÇÃO DO EFEITO DO LQB-118 SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE MACRÓFAGOS UTILIZANDO CITÔMETRO DE FLUXO.....	46
FIGURA 17. EFEITO DO LQB-118 SOBRE O NÚMERO DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS EM CAMUNDONGOS MACHOS SWISS. OS ANIMAIS FORAM ADMINISTRADOS POR VIA SUBCUTÂNEA COM ÓLEO (VEÍCULO), LQB-118 NAS DOSES DE 3, 10 OU 30 MG/KG OU INDOMETACINA 1 H ANTES DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL DE ÁCIDO ACÉTICO 0,8%. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DO NÚMERO DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS (N = 6), DURANTE 30 MIN, * (P < 0,05) INDICA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA QUANDO COMPARADO COM O GRUPO VEÍCULO, NO TESTE DE ANOVA SEGUIDO PELO PÓS-TESTE TUKEY	48
FIGURA 18. EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO LQB-118 EM CAMUNDONGOS MACHOS DURANTE A FASE DE DOR NEUROGÊNICA (A) E INFLAMATÓRIA (B) NO TESTE DA FORMALINA. PARA ESSE FIM OS ANIMAIS FORAM TRATADOS COM ÓLEO (VEÍCULO), LQB-118 (30 MG/KG) OU INDOMETACINA (10 MG/KG) 1H ANTES DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPLANTAR DE FORMALINA 2,5 %. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM DO TEMPO DE LAMBEDURA DA PATA, DURANTE 0-5 MIN (FASE I, DOR NEUROGÊNICA) E 15-30 MIN (FASE II, DOR INFLAMATÓRIA) APÓS A INJEÇÃO DE FORMALINA (N = 6). * (P < 0,05) INDICA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA QUANDO COMPARADO COM O GRUPO VEÍCULO, NO TESTE DE ANOVA SEGUIDO PELO PÓS-TESTE TUKEY	50
FIGURA 19. EFEITO DO LQB-118 SOBRE O TEMPO DE PERMANÊNCIA NO TESTE DA PLACA QUENTE. OS ANIMAIS FORAM TRATADOS COM ÓLEO DE GIRASSOL (VEÍCULO), FENTANIL (150 µG/KG) E LQB-118 (30 MG/KG) POR VIA SUBCUTÂNEA 30 MIN ANTES DO CONTATO COM O ESTÍMULO TÉRMICO (PLACA QUENTE, NOS TEMPOS 30, 60, 90, 120 E 150 MINUTOS APÓS O TRATAMENTO). CADA VALOR REPRESENTA A MÉDIA ± EPM DO TEMPO DE LATÊNCIA PARA O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO (N = 8). * P < 0,05 QUANDO COMPARADO COM O GRUPO TRATADO COM FENTANIL, NO TESTE DE ANOVA SEGUIDO PELO PÓS-TESTE BONFERRONI.	52
FIGURA 20. EFEITO DO LQB-118 SOBRE A FUNÇÃO MOTORA DOS CAMUNDONGOS NO TESTE ROTA ROD. OS ANIMAIS FORAM TRATADOS COM VEÍCULO (ÓLEO), DIAZEPAM (5 MG/KG) E LQB-118 (30 MG/KG) POR VIA SUBCUTÂNEA, 1 HORA ANTES DO INÍCIO DO TESTE. OS ANIMAIS FORAM COLOCADOS SOBRE A BARRA GIRATÓRIA (12 RPM) PARA AVALIAÇÃO DO TEMPO DE PERMANÊNCIA SOBRE A MESMA DURANTE 1 MINUTO. CADA VALOR REPRESENTA A MÉDIA ± EPM DO TEMPO DE PERMANÊNCIA DOS ANIMAIS SOBRE A BARRA GIRATÓRIA (N = 8). * P < 0,05 QUANDO COMPARADO COM O GRUPO TRATADO COM VEÍCULO, NO TESTE DE ANOVA SEGUIDO PELO PÓS-TESTE TUKEY	54
FIGURA 21. EFEITOS ANTINOCICEPTIVO DO LQB-118 SOBRE O LIMIAR NOCICEPTIVO NA ARTRITE INDUZIDA POR ZIMOSAN ATRAVÉS DO MÉTODO DE VON FREY MODIFICADO (A); E ANTI-INFLAMATÓRIO DO LQB-118 SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS EM	

LAVADO ARTICULAR ATRAVÉS DA CONTAGEM LEUCOCITÁRIA EM CÂMARA DE NEUBAUER (B). OS ANIMAIS FORAM TRATADOS COM ÓLEO DE GIRASSOL 10 MG/KG (VEÍCULO), LQB-118 (30 MG/KG), LAUSONA (17,3 MG/KG, DOSE EQUIMOLAR AO LQB-118) OU LAPACHOL (24 MG/KG, DOSE EQUIMOLAR AO LQB-118). 30 MIN ANTES DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-ARTICULAR DE ZIMOSAN (150 μ G, 10 μ L) DILUÍDO EM SOLUÇÃO SALINA 0,9%. O LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO E O NÚMERO DE LEUCÓCITOS FOI DETERMINADO 5 E 6H APÓS A INJEÇÃO DE ZIMOSAN, RESPECTIVAMENTE. CADA VALOR REPRESENTA A MÉDIA \pm EPM DO LIMIAR NOCICEPTIVO MECÂNICO (A) E DO NÚMERO DE LEUCÓCITOS NA CAVIDADE ARTICULAR (N = 6). * P < 0,05 QUANDO COMPARADO COM O GRUPO TRATADO COM VEÍCULO, NO TESTE ANOVA SEGUIDO PELO PÓS-TESTE TUKEY 56

FIGURA 22. EFEITO DO TRATAMENTO COM CIPIONATO DE ESTRADIOL (E2) E LQB-118 SOBRE O PESO DA HIPÓFISE (A) E DO ÚTERO (B) EM ANIMAIS OVARIETOMIZADOS. UMA SEMANA APÓS A CIRURGIA, OS ANIMAIS FORAM TRATADOS COM ÓLEO (VEÍCULO), CIPIONATO DE ESTRADIOL (2,5 μ G/KG) E LQB-118 (10 E 30 MG/KG), DURANTE 6 DIAS CONSECUTIVOS. AO FINAL DO TRATAMENTO, OS ANIMAIS FORAM EUTANASIADOS E O PESO DA HIPÓFISE E DO ÚTERO FORAM ANALISADOS. OS RESULTADOS REPRESENTAM A MÉDIA \pm EPM DE 6 ANIMAIS. * (P < 0,05) INDICA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA QUANDO COMPARADO COM O GRUPO SHAM-PROESTRO/ESTRO, # (P < 0,05) INDICA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA QUANDO COMPARADO COM O GRUPO OVX-ÓLEO..... 60

FIGURA 23. EFEITO DO TRATAMENTO COM CIPIONATO DE ESTRADIOL (E2) E LQB-118 SOBRE O PESO DA HIPÓFISE (A) E SOBRE O PESO DO ÚTERO (B) EM ANIMAIS OVARIETOMIZADOS. UMA SEMANA APÓS AS CIRURGIAS, ANIMAIS FALSO OPERADOS (SHAM - DIVIDIDOS CONFORME CICLO ESTRAL) E OVARIETOMIZADOS (OVX) FORAM TRATADOS DIARIAMENTE DURANTE SEIS DIAS CONSECUTIVOS COM VEÍCULO (ÓLEO), CIPIONATO DE ESTRADIOL (2,5 μ G/KG) OU CIPIONATO DE ESTRADIOL (2,5 μ G/KG) + LQB-118 (30 MG/KG). NO SÉTIMO DIA APÓS OS TRATAMENTOS OS ANIMAIS FORAM EUTANASIADOS E A HIPÓFISE E O ÚTERO FORAM COLETADOS E PESADOS. CADA VALOR REPRESENTA A MÉDIA \pm EPM (N = 6-7 ANIMAIS POR GRUPO). \$(P < 0,05) INDICA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA QUANDO COMPARADO COM O GRUPO SHAM-DIESTRO/METAESTRO. *(P < 0,05) INDICA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA QUANDO COMPARADO COM O GRUPO OVX-ÓLEO. # (P < 0,05) INDICA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA QUANDO COMPARADO COM O GRUPO OVX-E2, RESPECTIVAMENTE 64

FIGURA 24. EFEITO DO TRATAMENTO COM LQB-118 SOBRE O PESO DOS ANIMAIS (A), FÍGADO (B), CORAÇÃO (C), RIM DIREITO (D) E ESQUERDO (D) EM CAMUNDONGOS OVARIETOMIZADOS. OS ANIMAIS FORAM TRATADOS POR 6 DIAS COM VEÍCULO (ÓLEO), CIPIONATO DE ESTRADIOL (E2; 2,5 μ G/KG) E LQB-118 (30 MG/KG). CADA VALOR REPRESENTA A MÉDIA \pm EPM DO PESO EM GRAMAS DOS ANIMAIS OU DOS TECIDOS COLETADOS (N = 6-7 ANIMAIS POR GRUPO)..... 66

FIGURA 25. EFEITO *IN VITRO* DO LQB-118 SOBRE A PRODUÇÃO DAS CITOCINAS IL-6 (A), TNF-A (B) E IL-10 (C) EM MACRÓFAGOS PRIMÁRIOS ESTIMULADOS COM LPS. OS MACRÓFAGOS PRIMÁRIOS (2 X 10⁶ CÉLULAS/POÇO) FORAM TRATADOS COM VEÍCULO (VEÍ; DMSO 2% EM MEIO RPMI 10% FBS) OU LQB-118 (1, 3, 10, 30 E 100 μ M) E ESTIMULADOS COM LPS (5 NG/POÇO) DURANTE 24H. EM SEGUIDA O MEIO DE CULTURA FOI COLETADO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS CITOCINAS (IL-6, IL-10 E TNF- α) POR ELISA. CADA VALOR REPRESENTA A MÉDIA \pm EPM DA CONCENTRAÇÃO DE IL-6 (A), TNF-A (B) E IL-10 (C) NO MEIO DE CULTURA (N = 4). * P < 0,05 QUANDO COMPARADO COM O GRUPO TRATADO COM VEÍCULO E ESTIMULADO COM MEIO DE CULTURA E # (P < 0,05) INDICA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA QUANDO COMPARADO COM O GRUPO TRATADO COM VEÍCULO E ESTIMULADO COM LPS, NO TESTE ANOVA SEGUIDO PELO PÓS-TESTE TUKEY.71

FIGURA 26. EFEITO *IN VITRO* DO LQB-118 SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE MACRÓFAGOS PRIMÁRIOS ESTIMULADOS COM LPS. OS MACRÓFAGOS PRIMÁRIOS (2 X 10⁶ CÉLULAS/POÇO) FORAM MARCADOS COM DYE EFLUR 670 POR 15 MIN A 37°C. EM SEGUIDA, OS MACRÓFAGOS FORAM LAVADOS, PARA RETIRAR O EXCESSO DA PROBE, TRATADOS COM VEÍCULO (DMSO 2% EM RPMI 10% FBS) OU LQB-118 (1, 3, 10, 30 E 100 μ M), ESTIMULADOS

COM LPS (5 NG/POÇO) E ENCUBADOS DURANTE 48H COM MEIO RPMI 10% FBS. A PROLIFERAÇÃO CELULAR DE MACRÓFAGOS FOI DETERMINADA POR CITÔMETRO DE FLUXO. (A) HISTOGRAMA REPRESENTATIVO DA PROLIFERAÇÃO DE MACRÓFAGOS PRIMÁRIOS NOS GRUPOS AVALIADOS. (B) MÉDIA \pm EPM DA PORCENTAGEM DE PROLIFERAÇÃO DE MACRÓFAGOS (N = 4). * P < 0,05 QUANDO COMPARADO COM O GRUPO TRATADO COM VEÍCULO E ESTIMULADO COM LPS, NO TESTE ANOVA SEGUIDO PELO PÓS-TESTE TUKEY.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. EFEITOS ADVERSOS CRÔNICOS DOS GLICOCORTICOIDES	33
TABELA 2. EFEITO DO TRATAMENTO COM CIPIONATO DE ESTRADIOL OU LQB-118 SOBRE O CICLO ESTRAL DE CAMUNDONGOS FÊMEAS.....	58
TABELA 3. EFEITO DO TRATAMENTO COM CIPIONATO DE ESTRADIOL E LQB-118 SOBRE O CICLO ESTRAL DE CAMUNDONGOS FÊMEAS	62
TABELA 4. VALORES REFERENTES A DOSAGEM DE IL-6 NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS	68
TABELA 5. VALORES REFERENTES A DOSAGEM DE TNF- α NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS	69
TABELA 6. VALORES REFERENTES A DOSAGEM DE IL-10 NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS	70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1. Aspectos Inflamatórios envolvidos na Artrite Reumatoide	18
2.2. Aspectos Imunológicos da Artrite Reumatoide	18
2.2.1. Monócitos/ Macrófagos e Neutrófilos.....	18
2.2.2. Linfócitos T.....	21
2.2.3. Linfócitos B.....	22
2.4. Efeitos do estrogênio e a relação entre seus receptores e doenças autoimunes	25
2.5. Alterações fisiológicas durante o ciclo estral em roedores fêmeas	28
2.6. Diagnóstico da artrite reumatoide	29
2.7. Ferramentas terapêuticas na artrite reumatoide	30
2.8. O DMARD leflunomida e seu uso no tratamento da artrite reumatoide	33
2.9. Pterocarpaquinona: LQB-118 e seu potencial protetor na artrite reumatoide	34
3. OBJETIVOS	37
3.1. Objetivos específicos	37
3.2. Modelos animais de artrite reumatoide	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1. Animais	38
4.2. Fármacos, doses, reagentes e preparo das soluções utilizadas	39
4.3. Avaliação do efeito antinociceptivo do LQB-118	40
4.3.1. Teste de contorção abdominal.....	40
4.3.2. Teste da Formalina	40
4.3.3. Teste da Placa Quente	41
4.4. Avaliação da ação do LQB-118 sobre a coordenação motora	42
4.4.1. Teste rota rod.....	42
4.4.2. Avaliação do efeito anti-inflamatório do LQB-118 na artrite induzida por zimosan	42
4.5. Ovariectomia, avaliação do ciclo estral e análise da massa do útero e da hipófise	43
4.6. Avaliação in vitro do efeito do LQB-118 sobre cultura de macrófagos primários	45
4.6.1. Efeito do LQB-118 sobre a produção de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-6) e anti-inflamatória (IL-10) por macrófagos estimulados com LPS	45
4.6.2. Proliferação celular de macrófagos	46
4.7. Análise estatística	47
5. RESULTADOS	47
5.1. Avaliação do efeito antinociceptivo do LQB-118	47
5.1.1. Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8%	47

5.1.2. Teste da formalina 2,5%.....	49
5.1.3. Teste da placa quente	51
5.1.4. Teste rota rod.....	53
5.2. Avaliação do efeito anti-inflamatório do LQB-118 em um modelo de artrite induzida por zimosan.....	55
5.3. Avaliação do LQB-118 como agonista de receptores de estrogênio: Análise das fases do ciclo estral	57
5.4. Avaliação do LQB-118 como agonista de receptores de estrogênio: Análise do peso da hipófise e do útero.....	59
5.5. Avaliação do LQB-118 como antagonista de receptores de estrogênio: Análise das fases do ciclo estral	61
5.6. Análise do peso da hipófise e do útero após tratamento com veículo (óleo), cipionato de estradiol ou LQB-118.....	63
5.7. Análise da toxicidade do LQB-118 na dose de 30 mg/kg.....	65
5.8. Efeito do LQB-118 sobre a produção de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF-α) e anti-inflamatória (IL-10) por macrófagos primários estimulados com LPS.....	67
5.9. Efeito do LQB-118 sobre a proliferação celular de macrófagos	72
6. DISCUSSÃO	74
7. CONCLUSÕES	80
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXO 1	92

1. INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide é classificada como uma doença autoimune crônica, de caráter inflamatório progressivo que afeta as regiões das articulações ocasionando erosão óssea, destruição da cartilagem e perda de função. Nos estágios iniciais da doença, poucas articulações são afetadas, porém, acomete um número maior dessas regiões nos estágios mais avançados, nos quais também é possível apresentar sintomas extra articulares.

Os sintomas da artrite podem diferenciar de acordo com o estágio em que a doença se apresenta. O estágio inicial é caracterizado por apresentar sintomas mais generalizados, como fadiga, inchaço nas articulações, bem como rigidez matutina (dificuldade de movimento articular ao levantar-se da cama ou após permanecer na mesma posição por um longo tempo). Já no estágio avançado, ou em casos de tratamentos malsucedidos, podem ocorrer manifestações sistêmicas em decorrência do quadro inflamatório constante, como anemia, leucopenia e doenças pulmonares, erosão óssea, perda de movimento e destruição da cartilagem.

Ademais, a artrite reumatoide é classificada como uma das doenças inflamatórias de caráter crônico mais prevalentes atingindo a faixa de 0,5 – 1% da população mundial e 0,2 – 1% da população brasileira. A etiologia a artrite ainda é desconhecida, entretanto, seu desenvolvimento pode estar associado a fatores genéticos (mutações no gene HLA-DRB), ambientais (tabagismo, infecções) e hormonais (deficiência de hormônios sexuais), além do sexo e da idade (Figura 1).

De modo geral, na progressão, as articulações sinoviais são infiltradas por macrófagos, células T e B, enquanto o fluido sinovial é predominantemente invadido por neutrófilos intensificando o processo inflamatório. Além disso, a artrite cursa com o quadro de intensas dores articulares crônicas. A dor crônica configura um determinante sinal clínico de morbidade e desvio cognitivo na artrite, contribuindo significativamente para a perda da funcionalidade articular, com consequentes impactos socioeconômicos em termos de qualidade de vida do paciente e de custos para a saúde pública.

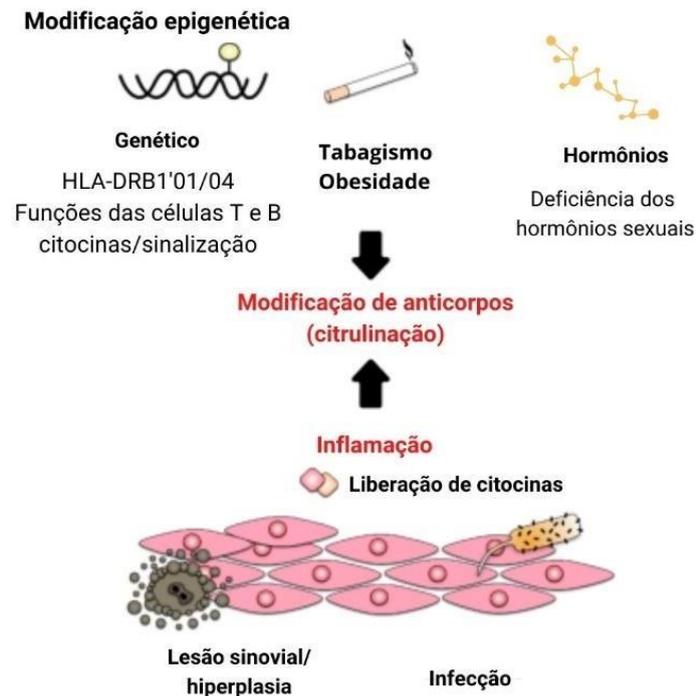


Figura 1. Fatores que contribuem para o desenvolvimento da artrite reumatoide. Fonte: LIN et al, 2020. Tanto fatores ambientais (fumo, obesidade e até mesmo infecção por alguns patógenos) quanto genéticos (modificações epigenéticas, polimorfismos genéticos que afetam a apresentação de antígenos) contribuem para o desenvolvimento da artrite reumatoide. A injúria sinovial e a hiperplasia dos fibroblastos também contribuem para o estabelecimento da doença através de ativar condições inflamatórias que levam à modificação de autoantígenos (geralmente por citrulinação), aumentando a suscetibilidade de degradação proteolítica.

O tratamento da artrite merece atenção, já que dados mostram que cerca de 40% dos pacientes estarão inaptos a trabalhar dentro de 10 anos após o início da doença, o que configura um problema de saúde pública. Após o diagnóstico, o objetivo principal das modalidades de tratamento existentes é alcançar total remissão ou diminuir a atividade e progressão da doença em um período de seis meses, aproximadamente, para prevenir os danos, como a perda de função e as manifestações sistêmicas da artrite reumatoide.

O tratamento é com base no uso de anti-inflamatórios esteroidais (AIES) e não esteroidais (AINES) e de terapia com os medicamentos modificadores da doença (DMARD). Entretanto, todos induzem importantes efeitos colaterais que limitam o seu uso. Dessa forma, a busca de novos medicamentos capazes de tratar a artrite é imperativo na busca de tratamentos mais eficazes e seguros. O composto LQB-18 é uma pterocarpoquinona sintética com efeito anti-inflamatório evidenciado em estudos prévios, o que habilita esse composto como uma droga com potencial para terapia da artrite.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Aspectos Inflamatórios envolvidos na Artrite Reumatoide

A inflamação é uma resposta fisiológica orquestrada por vários mediadores, tanto inflamatórios quanto anti-inflamatórios, induzidos pela lesão tecidual (de origem mecânica, química ou infecciosa) com o objetivo de eliminar o fator patogênico e iniciar a resposta de regeneração ou cicatrização. Isso se dá devido a ativação de um processo que tem como ponto inicial o recrutamento de células e moléculas pertencentes à imunidade inata, que migram da circulação sanguínea para o tecido a fim de desempenhar um papel de combate e destruição de microrganismos e tecidual [MURPHY et al, 2010].

Os mediadores inflamatórios são os responsáveis pela indução dos sinais cardinais da inflamação, através da indução de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, levando ao aumento da temperatura local, ruborização e inchaço nos tecidos inflamados. Além disso, esses mediadores também são responsáveis por provocar a sensibilização de nociceptores, ocasionando a hiperalgesia inflamatória. Ao longo desse processo, os mecanismos envolvidos na ação microbicida podem levar à lesão celular, portanto, o quadro de inflamação crônica pode levar à perda de função tecidual [LIN et al, 2020; WEYAND et al, 2021].

2.2. Aspectos Imunológicos da Artrite Reumatoide

2.2.1. Monócitos/ Macrófagos e Neutrófilos

Os monócitos são produzidos na medula óssea e permanecem na circulação sanguínea por aproximadamente 5 dias, e se tornam macrófagos após migrarem para os tecidos. Os macrófagos são células que estão presentes em praticamente todos os tecidos e órgãos, podendo se diferenciar em macrófagos tecido específicos, como células de Kupffer no fígado e macrófagos intestinais e pulmonares [CUTOLO, 1999].

Os neutrófilos são produzidos na medula óssea e possuem vida curta de circulação, sendo os leucócitos mais abundantes no organismo, e possuem em sua superfície celular receptores para o reconhecimento de estruturas bacterianas e para o sistema complemento, sendo as principais células responsáveis pela captura e destruição de patógenos, através da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) que levam à liberação de proteases que, por fim, ocasionam a morte celular do microrganismo. [MURPHY et al, 2010; KAPLAN, 2013; FRESNEDA et al, 2021].

Neutrófilos e macrófagos residentes representam a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos, e estão associados a fase aguda e crônica da inflamação. Os macrófagos residentes são ativados por microrganismos invasores através do mecanismo de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos, e desempenham um papel central na progressão da artrite reumatoide, sendo considerados uma importante fonte de mediadores inflamatórios presentes no tecido sinovial de indivíduos acometidos pela doença. Essas células produzem e secretam IL-1 e TNF- α , citocinas que levam ao processo de destruição tecidual [LIN et al, 2020; AREND, 1995; CUTOLO et al, 2003].

Os macrófagos estão relacionados com a imunopatologia da artrite reumatoide, pois foi observado que quanto mais essas células infiltram as articulações sinoviais, maior é a destruição óssea. Além disso, tanto a terapia convencional quanto a terapia baseada em neutralizar citocinas (TNF- α , IL-1 e IL-6) promovem diminuição dos níveis desses mediadores inflamatórios que são sintetizados e secretados, principalmente, por macrófagos [MORAIS et al, 2014].

De forma geral, os macrófagos podem assumir um fenótipo mais inflamatório classificado como M1, ou podem apresentar atividade anti-inflamatória ao assumirem o fenótipo M2, no qual há liberação de citocinas que amenizam o processo inflamatório, como a IL-10. No quadro da artrite reumatoide, a maioria dos macrófagos se apresentam no perfil M1, uma vez que expressam citocinas pró-inflamatórias [GIERUT et al, 2010; MORAIS et al, 2014].

O TNF- α produzido por macrófagos M1 afeta as células da membrana sinovial e induz inflamação local com lesão tecidual da cartilagem e destruição óssea, através da ativação de osteoclastos, condrócitos, mastócitos e sinoviócitos. Além disso, a ativação dessas células produz grandes quantidades de citocinas inflamatórias como a IL-1 β , TNF- α e IL-17, além de quimiocinas e moléculas de adesão, como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), que ocasionam hiperplasia e destruição articular [MORAIS et al, 2014; LIN et al, 2020; CUTOLO et al, 2003].

A membrana sinovial na artrite reumatoide possui expressiva infiltração de células de origem mieloide (eosinófilos, macrófagos, basófilos) e linfóide (células T, B e Natural killers), bem como hiperplasia de fibroblastos e angiogênese que formam uma camada anormal de tecido (*pannus*), alterando a estrutura e funcionalidade das articulações sinoviais. Além disso,

as articulações sinoviais são infiltradas por outras células de caráter inflamatório, como células dendríticas e mastócitos [CAÑETE, 2013; MORAIS et al, 2014].

A produção constante de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-6 por macrófagos faz com que o sistema imune inato esteja cronicamente ativado, e induz a migração de leucócitos para o local. A ativação da imunidade inata inicia a resposta autoimune, levando a ativação dos mecanismos da imunidade adaptativa (células T e B), num processo que induz a produção de autoanticorpos autorreativos, sustentando as doenças autoimunes [LIN et al, 2020; MORAIS et al, 2014].

Nesse contexto crônico de inflamação e ativação celular, a cartilagem e os tecidos ósseos passam pelo processo de degradação que pode levar à destruição completa da cartilagem e erosão óssea. O processo de erosão óssea se dá pela presença de um infiltrado inflamatório ósseo que contribui para a ativação da reabsorção óssea (Figura 2) [MORAIS et al, 2014; LIN et al, 2020].

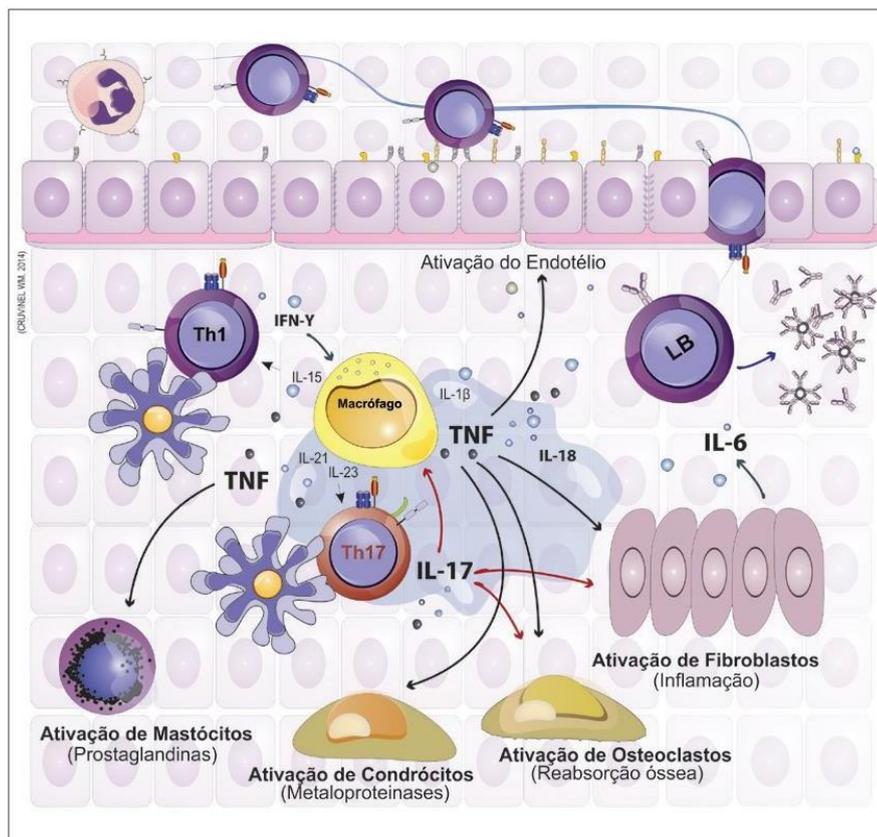


Figura 2. Representação do mecanismo imunopatológico da artrite reumatoide. Fonte: MORAES et al, 2014. As células B (LB) são ativadas por autoantígenos produzindo autoanticorpos contra antígenos citrulinados e fator reumatoide. Os linfócitos Th1 produzem IFN- γ e os linfócitos Th17 produzem IL-17 que, juntos, estimulam os macrófagos a produzirem citocinas, com destaque para TNF que possui vários efeitos celulares: ativação do endotélio, ativação de fibroblastos (produção de IL-6), ativação de osteoclastos, condrocitos e mastócitos.

2.2.2. *Linfócitos T*

O desenvolvimento da artrite reumatoide é marcado por uma sequência de eventos imunológicos e celulares, através da perda da tolerância imunológica de células T e B contra autoantígenos em decorrência da influência de fatores genéticos e ambientais. Essas células começam a responder contra autoantígenos citrulinados, que são produzidos através de síntese proteica, e irão se associar a moléculas do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) para apresentação às células T [SCOTT et al, 2011; YOSHIDA, 2014].

No tecido articular, os linfócitos T ativados estimulam os linfócitos B a produzirem autoanticorpos anti-citrulina e mediadores inflamatórios, sendo esse processo amplificado pela ação de diversas células do sistema imunológico. As respostas mediadas pelas células T são importantes para o início do processo inflamatório e na cronificação da inflamação devido à ativação de monócitos/macrófagos. Dessa forma, os linfócitos T se destacam, pois podem estimular outras células do sistema imunológico a induzir o processo de lesão tecidual [MORAIS et al, 2014; LIN et al, 2020].

Entre os linfócitos T auxiliares (Th), as subpopulações Th1 e Th17 apresentam um perfil pró-inflamatório, enquanto as células Th2 e Treg apresentam um perfil anti-inflamatório [MADDUR, 2012]. Uma vez infiltrados nas articulações, as células Th1 desenvolvem uma resposta imune através da produção de interferon gama (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral (TNF). Já as Th17 são responsáveis pela produção de IL-17A, IL-22 e TNF [MORAIS et al, 2014; LIN et al, 2020].

As células Th17 são caracterizadas por induzir inflamação tecidual e, por isso, estão envolvidas na patogênese da artrite reumatoide através da produção de IL-17A que possui o caráter de desenvolver osteoclastogênese e reabsorção óssea, uma vez que tanto as células Th17 quanto altos níveis de IL-17 foram evidenciados em lesões teciduais em pacientes com artrite reumatoide, o que contribui para a progressão da doença [MORAIS et al, 2014].

Outra característica da IL-17A é promover o recrutamento e geração de neutrófilos a partir da produção do fator estimulador de colônias de granulócitos. Além disso, as células Th17 promovem ativação de fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos [MESQUITA JR et al, 2009; BOISSIER et al, 2012; MORAIS et al, 2014].

O ambiente inflamatório caracterizado pela presença de citocinas inflamatórias, como a IL-1 β , IL-6, IL-23 e TGF- β estimula a diferenciação de linfócitos T virgens em linfócitos Th17

efetores, num evento que suprime a diferenciação de células T reguladoras, contribuindo com a fisiopatogênese [MORAIS et al, 2014].

As células Th1 também participam dos mecanismos fisiopatogênicos através da produção de citocinas, como o INF- γ responsável por ativar macrófagos e intensificar a resposta inflamatória. Essas células são reguladas por células apresentadoras de antígenos (APC) que residem nas articulações e são responsáveis pela captura e apresentação de auto-antígenos em moléculas do MHC de classe II, o que conduz a respostas imunes contra autoantígenos [MORAIS et al, 2014].

2.2.3. *Linfócitos B*

As células B também estão relacionadas com a fisiopatologia da artrite reumatoide, uma vez que é evidente a eficácia da terapia de depleção desse tipo celular através da administração de anticorpos monoclonais. Nesse contexto, as células B iniciam o processo de ativação policlonal para se diferenciarem em plasmócitos produtores de autoanticorpos, porém também podem atuar como APC para células T formando complexos imunes circulantes que se depositam em diversos tecidos e ativam a via clássica do sistema complemento, favorecendo a lesão tecidual [MORAIS et al, 2014; THURLINGS et al, 2008].

O fator reumatoide é um autoanticorpo presente em pacientes com AR. Além dele, outros já foram descritos na AR, como o autoanticorpo contra antígenos epiteliais da mucosa oral (anti-filagrina e anti-profilagrina) e o anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico (Anti-CCP). Todos eles têm em comum a propriedade de reagir contra epítomos de proteínas que contém o aminoácido citrulina. Fatores ambientais podem influenciar induzir a citrulinização de proteínas próprias, através de modificações enzimáticas em indivíduos predispostos [NIELEN et al, 2004; VAN DER WOUDE et al, 2010; MORAIS et al, 2014].

2.3. Hormônios sexuais femininos: características principais e esteroidogênese

A artrite reumatoide é mais frequente em mulheres do que em homens, em uma relação de 3:1, sendo o pico de incidência máxima durante o período perimenopausal. O período do climatério é uma etapa importante no envelhecimento feminino, uma vez que é caracterizado por hipoestrogenismo progressivo, o que acarreta a interrupção definitiva dos ciclos menstruais, devido à diminuição das concentrações de estrogênio, e a menopausa é o sinal que marca essa fase. Um estudo concluiu que a deficiência de 17β -estradiol durante esse período pode aumentar a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β , contribuindo para a patogênese da artrite reumatoide [KROTH et al, 2010; SHAH et al, 2020; AL-SALMAN, 2019]

Apesar de ser um processo fisiológico, a menopausa provoca modificações no organismo feminino, o vulnerabilizando a um conjunto de doenças que podem se manifestar nesse período, como doenças autoimunes, ou podem ter seus sintomas agravados. [KROTH et al, 2010; SHAH et al, 2020]. Além disso, mulheres com artrite geralmente apresentam melhoria no quadro clínico durante a gravidez, período em que a concentração plasmática de estrogênio se eleva significativamente, sugerindo que os hormônios sexuais possam ter algum efeito protetor sobre a doença [LIN et al, 2020].

O termo “estrogênios” se refere a um grupo de hormônios femininos que inclui estrona (E1), estradiol (E2 ou 17β -estradiol), estriol (E3) e estretrol (E4), pertencentes quimicamente à família de compostos orgânicos chamados de esteróis. Esses compostos possuem 18 carbonos, com uma estrutura base com 17 carbonos distribuídos em quatro anéis - três ciclohexanos e um anel ciclopentano (Figura 3) [FUENTES, 2019].

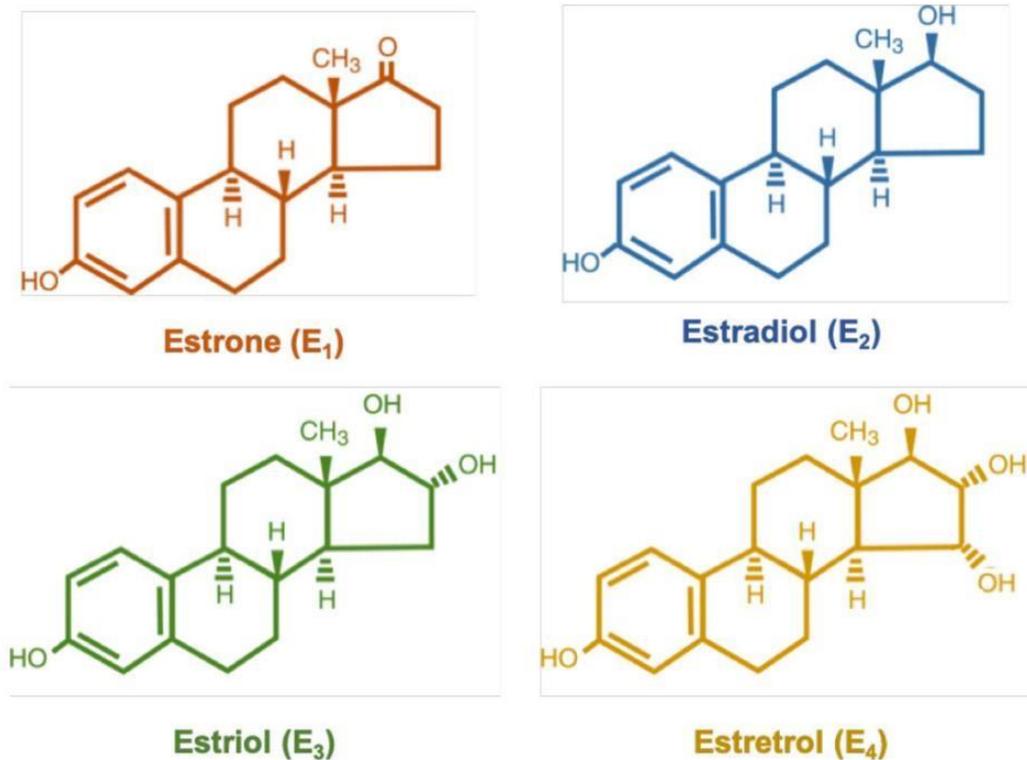


Figura 3. Estrutura química dos estrogênios endógenos: Estrona (E₁ em vermelho); Estradiol (E₂ em azul); Estriol (E₃ em verde) e Estretrol (E₄ em laranja). Fonte: FUENTES, 2019. Os quatro compostos contêm 18 carbonos (C₁₈H₂₄O₂), dos quais 17 carbonos estão rearranjados em quatro anéis (um anel aromático, dois anéis ciclohexano e um anel ciclopentano), além disso também possuem um grupo hidroxil fenólico, um grupo cetona (estrona), ou um (17 β -estradiol), dois (estriol), ou três (estretrol) grupos hidroxila [FUENTES F; SILVEYRA P, 2019].

O principal substrato para o início da biossíntese do estrogênio é o colesterol obtido através da dieta, mais especificamente a lipoproteína de baixa densidade (LDL). Através do processo chamado de bioesteroidogênese, o colesterol sofre mudanças estruturais nas gônadas, córtex da adrenal e tecido adiposo, e é convertido a hormônios esteroides de 21-carbonos (pregnanes, progestogenos), 19-carbonos (androstanos) e 18-carbonos (estranos). O principal local para a síntese do estrogênio é nos ovários, especificamente nas células da granulosa [FUENTES, 2019].

Em mulheres pré-menopáusicas os estrogênios são produzidos principalmente nos ovários, no corpo-lúteo e na placenta. Os diferentes tipos de estrogênios representam os produtos gerados por reações em série ao longo da biossíntese do estrogênio, todos tendo o colesterol como molécula de partida. O principal produto do processo de biogênese é o E₂, sendo o estrogênio mais potente durante o período de pré-menopausa, enquanto o E₁ tem um papel maior após a menopausa, quando passa a ser sintetizado na zona reticulada da adrenal [CUI et al, 2013].

Em geral, os estrogênios são produzidos em maior quantidade pelos ovários (na menopausa há diminuição da produção de estrogênios pelos ovários) e, em menor quantidade, por outros tecidos, como fígado, pâncreas, tecido adiposo e seios [BARAKAT et al, 2016; ISLANDER et al, 2011].

Em ratas ovariectomizadas, a produção principal de estrógenos é alterada dos ovários para as regiões extra-gonadais. Isso ocorre devido a presença da enzima aromatase, cuja função é converter os andrógenos gerados na esteroidogênese que ocorre na zona reticulada da adrenal em estrógenos nas regiões extra-glandulares, como em células da pele, osteoblastos e condrócitos (Figura 4) [SIMPSON, 2001].



Figura 4. Aromatização da testosterona (hormônio andrógeno) para formar o estradiol (hormônio estrógeno). Fonte: ATTAR, 2006. Reação catalisada pela enzima aromatase.

2.4. Efeitos do estrogênio e a relação entre seus receptores e doenças autoimunes

Estrogênios são hormônios esteroides sexuais que possuem diversos efeitos fisiológicos, como regulação do ciclo menstrual e da reprodução, densidade óssea, função cerebral, mobilização do colesterol, desenvolvimento do tecido mamário e dos órgãos sexuais e, também, controle da inflamação; e exercem papel fisiológico em ambos os sexos [LIANG, 2013; FUENTES, 2019].

Em mulheres, as características sexuais primárias e secundárias são fornecidas pelos estrogênios. O estradiol está envolvido na proliferação de células epiteliais no endométrio do útero e, na gravidez, o estradiol produzido pela placenta auxilia o início da produção de leite. Em homens, os baixos níveis de estrogênios são essenciais para funções fisiológicas, como maturação do espermatozoide, manutenção da função erétil e da libido. Todos os efeitos mencionados são desencadeados pela ativação de receptores de estrogênios [FUENTES, 2019].

As macromoléculas responsáveis pelo desencadeamento dos efeitos do estrogênio são complexos proteicos denominados receptores de estrogênio (RE). Esses receptores são nucleares e possuem dois subtipos ($ER\alpha$ e $ER\beta$) que são expressos em células das articulações e do sistema imune, incluindo neutrófilos, células dendríticas, macrófagos e células T e B. Existem dados que propõem um papel anti-inflamatório para o $ER\alpha$, entretanto, o papel anti-inflamatório do $ER\beta$ ainda precisa ser melhor investigado [CUNNINGHAM, 2011; RIÇA et al, 2016].

Dessa forma, o estrogênio/estradiol se liga ao RE, formando um dímero que é translocado para o interior do núcleo celular, onde se ligará a proteínas co-regulatórias, formando um complexo que se ligará aos elementos responsivos ao estrógeno (ERE) para, enfim, dar início ao processo de transcrição, na via clássica 1 (Figura 5) [ISLANDER et al, 2011].

Na via de sinalização transcricional não-clássica, o complexo receptor/estrogênio inicia a transcrição através da ligação a fatores de transcrição alternativos, por exemplo AP-1, que por sua vez irá se ligar em regiões não-ERE. Além disso, há a presença de receptores de estrogênio associados à membrana que se associam com receptores acoplados à proteína G, como o GPR30, levando à rápida ativação ou repressão de sinalizações intracelulares através da mobilização de cálcio. Um mecanismo não-genômico também pode ser ativado através do envolvimento de outros fatores de transcrição (Figura 5) [ISLANDER et al, 2011].

Os estrógenos desempenham algumas funções sobre o sistema imune, uma vez que inibem a função de neutrófilos e sua adesão ao endotélio, diminuem a atividade de células *natural killers* (NK), induzem a apoptose de monócitos e, ainda, possuem ação regulatória sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos e macrófagos [ISLANDER, 2011].

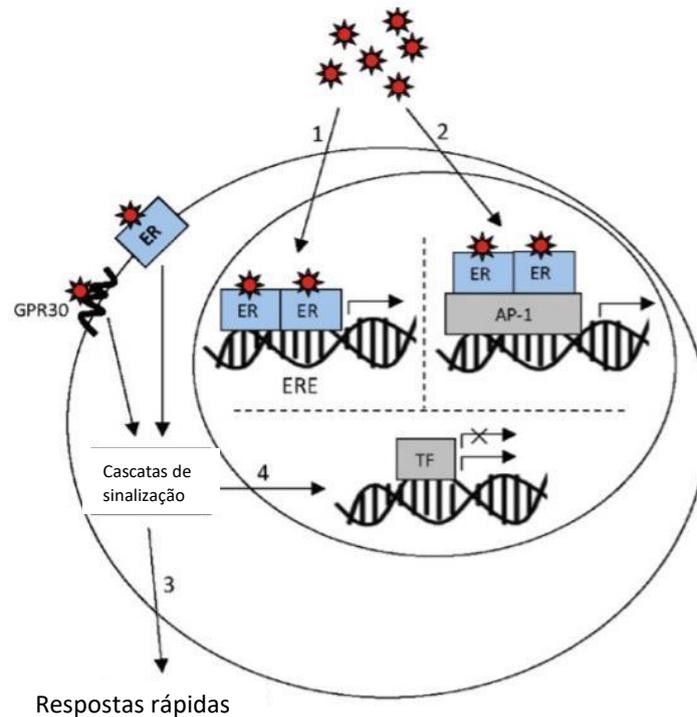


Figura 5. Sinalização do estradiol. Fonte: ISLANDER et al, 2011. Mecanismo 1: via clássica na qual o estradiol se liga ao RE, é translocado ao núcleo, se liga aos ERE e inicia a transcrição; Mecanismo 2: Via não-clássica na qual o complexo estradiol/receptor se liga a fatores de transcrição alternativos para iniciar a transcrição; Mecanismos 3 e 4: ligação do estradiol a receptores de estrógenos associados à membrana ou GPR30 leva a cascatas de sinalização alternativas.

A ligação entre o estrógeno e as doenças autoimunes é complexa, já que o estrógeno pode provocar diferentes efeitos dependendo da doença analisada. No lúpus eritematoso sistêmico, o estrógeno endógeno e exógeno potencializam o desenvolvimento da doença, tendo em vista seu efeito deletério para essa condição clínica. Entretanto, no modelo experimental de esclerose múltipla, a encefalite autoimune, a administração de estradiol provoca inibição do desenvolvimento da doença, e o mesmo é visto nos modelos experimentais de artrite induzida por colágeno em camundongos [JANSSON et al, 1998].

O estrógeno, em altas doses, possui papel protetor na AR, uma vez que é capaz de se ligar ao receptor ER α presente nas células T, levando à inibição de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e IL-17. Já em baixas doses, no modelo de miastenia gravis, a administração de estrógeno levou à ativação de células dendríticas e à produção de citocinas inflamatórias [GUÉRY, 2012].

Estudos sugerem que a redução da produção de hormônios sexuais durante o período da perimenopausa pode favorecer o desenvolvimento e a progressão da AR. Além disso, há dados

que corroboram essa hipótese, onde 75% das pacientes humanas grávidas com altas concentrações plasmáticas de hormônios sexuais apresentaram melhoras nos sinais clínicos da doença. Ademais, durante a fase pós-ovulatória do ciclo menstrual e durante a gravidez, quando os hormônios sexuais estão em altas concentrações plasmáticas, há diminuição frequente da intensidade da AR [SILMAN et al, 1992; CUTOLO, 2005; ISLANDER et al, 2010].

A ovariectomia em roedores fêmeas consiste na retirada dos ovários, mimetizando a menopausa nesses animais, uma vez que há privação dos hormônios produzidos pelo organismo. Corroborando com os dados descritos na literatura, foi demonstrado que a ovariectomia, em camundongos fêmeas, agrava a artrite, bem como a síntese de TNF- α articular induzida pela administração intra-articular de zimosan. Os efeitos da ovariectomia foram revertidos pelo tratamento subcutâneo com cipionato de estradiol ou agonistas seletivos dos receptores ER α e ER β , indicando que o estradiol produz efeitos protetores na artrite através da ativação dos receptores nucleares ER α e ER β . Esses resultados sugerem que os receptores nucleares de estrogênio possam ser potenciais alvos terapêuticos para o tratamento da artrite reumatoide em mulheres [SCHENEIDER et al, 2019].

2.5. Alterações fisiológicas durante o ciclo estral em roedores fêmeas

Em humanos do sexo feminino, o ciclo reprodutivo é chamado de ciclo menstrual, com duração de aproximadamente 28 dias. Em roedores fêmeas o ciclo reprodutivo recebe o nome de ciclo estral e possui duração de 4-5 dias, aproximadamente. Através da estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, a atividade dos gonadotrofos presentes na hipófise leva à secreção do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH) que, juntos, estimulam células específicas presentes nos ovários, levando à ovulação e à secreção de estrogênio (E2) [CALIGIONI, 2009].

Na maior parte do tempo, a concentração plasmática de E2 é baixa, porém um pico de concentração é alcançado no período pré-ovulatório. Por possuírem um ciclo reprodutivo de curta duração, os roedores configuram o modelo animal mais adequado para investigar as mudanças que ocorrem durante esse ciclo. Esses animais dispõem, na maior parte do tempo, de ciclos regulares, os quais são de fácil manipulação e não sofrem variações facilmente, mesmo em condições de estresse dos animais [CALIGIONI, 2009].

Em estudos envolvendo a análise de sistemas reprodutivos e a influência do ciclo estral, a citologia do esfregaço vaginal é utilizada para determinar as fases do ciclo, através da proporção de três tipos celulares presentes no esfregaço: células epiteliais, células cornificadas e leucócitos, sendo possível determinar quatro estágios ou fases: proestro, estro, metaestro e diestro [LONG, 1922; CALIGIONI, 2009].

O estágio chamado de **proestro** é marcado pela presença de células epiteliais no lavado vaginal, correspondendo ao dia pré-ovulatório, quando as concentrações de E2 aumentam e, no período da noite, ocorre a ovulação pela influência do LH e FSH. No estágio denominado **estro**, o lavado vaginal apresenta células cornificadas e sem núcleo visível, e as concentrações de E2 permanecem elevadas ao longo da manhã e são reduzidas a níveis basais no período vespertino. Entretanto, no estágio **metaestro** o lavado vaginal apresenta um mix celular com predominância de leucócitos, e a concentração plasmática de E2 é baixa. Assim como o metaestro, o estágio **diestro** é marcado pela predominância de leucócitos, porém os níveis de E2 começam a ser elevar [WALMER et al, 1992; CALIGIONI, 2009].

As variações das concentrações plasmáticas de E2 durante o ciclo estral influencia o comportamento dos animais. Estudos demonstraram que os animais apresentaram aumento na atividade locomotora, baixos níveis de estresse e diminuição na ingesta de alimentos durante a fase estro, na qual a concentração de E2 está elevada. Além disso, o E2 induz efeito hipertrófico sobre a parede uterina e sobre os lactotrofos (aumentando a produção de prolactina) localizados na adenohipófise. Sendo assim, nas fases proestro e estro, onde os níveis de estrogênio encontram-se elevados, ocorre o aumento do peso uterino e hipofisário, enquanto nas fases metaestro e diestro e em animais ovariectomizados, onde os níveis de estrogênio encontram-se baixos, ocorre o inverso [INOUE, 2021; AJAYI et al, 2020; MARCONDES, 2002].

2.6. Diagnóstico da artrite reumatoide

Pacientes com artrite reumatoide apresentam perfil clínico de alterações ósseas, inchaço as articulações, rigidez articular pela manhã e sintomas generalizados que levam a alterações em exames laboratoriais. Nesse contexto, um diagnóstico rápido e preciso é de grande importância na condução do tratamento desses pacientes, já que é uma ferramenta fundamental para impedir a progressão a doença e seus danos, como lesões articulares irreversíveis e perda de função [LIN et al, 2020].

O diagnóstico consiste basicamente em reunir dados dos pacientes acerca de seus sintomas, fatores de risco, história familiar e combiná-los com resultados de ultrassonografia das articulações, exames laboratoriais para detecção de autoanticorpos específicos para artrite reumatoide e a avaliação médica. Além disso, imagens de ressonância magnética juntamente com resultados de ultrassonografia configuram ferramentas para monitorar a progressão da doença, através da detecção de processos inflamatórios nas articulações e avaliar a presença ou ausência de erosão óssea [LIN et al, 2020].

Já as citocinas inflamatórias IL-6, IL-1b e TNF-a são os principais gatilhos para a produção de proteína C reativa (PCR) pelos hepatócitos e funcionam como biomarcadores clínicos para avaliar o perfil inflamatório desses pacientes.

2.7. Ferramentas terapêuticas na artrite reumatoide

Segundo Lin et al, 2020, o tratamento da artrite merece atenção, já que dados mostram que cerca de 40% dos pacientes estarão inaptos a trabalhar dentro de 10 anos após o início da doença, o que configura um problema de saúde pública. Após o diagnóstico, o objetivo principal das modalidades de tratamento existentes é alcançar total remissão ou diminuir a atividade e progressão da doença em um período de seis meses, aproximadamente, para prevenir os danos, como a perda de função e as manifestações sistêmicas da artrite reumatoide.

No passado, utilizava-se um tratamento com base na seguinte tríade: descanso, administração de medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e, se estes não fossem eficazes, lançava-se mão da terapia com os medicamentos modificadores da doença (DMARD) (Figura 6). Ao passar dos anos essa abordagem se mostrou limitada, uma vez que os pacientes frequentemente eram acometidos por destruição de cartilagem, perda de função e incapacidade de trabalho [FRIES, 2000; ALETAHA et al, 2018].

Atualmente os AINES e os DMARDs ainda são utilizados, porém com o avanço das descobertas científicas, houve mudanças significativas na abordagem terapêutica e outras ferramentas foram introduzidas, como os medicamentos glicocorticoides imunossupressores e abordagens não-medicamentosas, como exercícios físicos e aconselhamento dos pacientes [LIN et al, 2020; ALETAHA et al, 2018].].

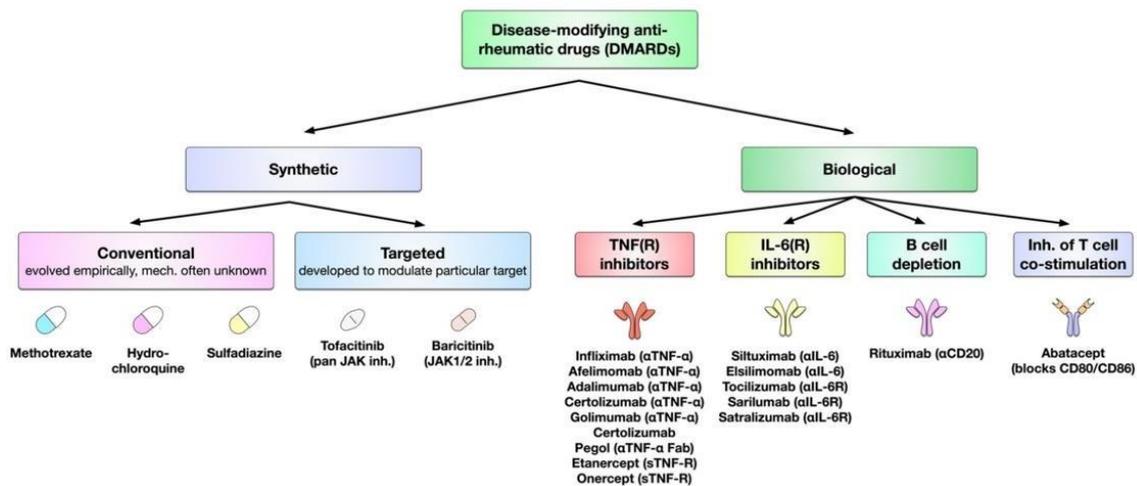


Figura 6. Panorama sobre os DMARDs comumente utilizados no tratamento da artrite reumatoide. Fonte: FIRES, 2000. Os DMARDs estão agrupados em Sintéticos e Biológicos. Os biológicos incluem os anticorpos monoclonais e inibidores de células T.

Muitas são as ações benéficas desses medicamentos, entretanto ainda possuem algumas limitações. Os AINES, como o ibuprofeno, são eficazes em diminuir a dor por atuarem na inibição da síntese de prostaglandinas, mas não previnem o dano à cartilagem e articulações [BRUNE et al, 2015; ALETAHA et al, 2018].

Já os medicamentos modificadores da doença são fármacos que atuam na inflamação podendo diminuir a progressão da doença e, portanto, também podem prevenir futuros danos nas articulações, uma vez que podem reestabelecer a função física e interferir nos sinais e sintomas da doença. Além disso, essa classe de fármacos se divide em (1) sintéticos convencionais (sulfadiazina, metotrexato e leflunomida); (2) sintéticos específicos (atuam inibindo estruturas específicas, como JAK1/2) e (3) biológicos (anticorpos monoclonais inibidores de citocinas, como TNF- α , IL-6, bem como seus receptores) [SMOLEN, 2016; LIN et al, 2020].

Apesar de se apresentarem como uma ferramenta de êxito no tratamento da artrite reumatoide, os DMARDs possuem um custo elevado e causam efeitos adversos que podem limitar o seu uso a longo prazo [BURMESTER, 2017; LIN et al, 2020].

Os sintéticos específicos e os biológicos causam efeitos adversos semelhantes, por atuarem na inibição dos mecanismos pró-inflamatórios da doença, e incluem aumento de infecções, níveis de colesterol aumentados, linfopenia, neutropenia e efeitos gastrointestinais. Além disso, os biológicos ainda podem causar outros efeitos adversos, como elevação de

enzimas hepáticas, esclerose e psoríase [BURMESTER, 2017; LIN et al, 2020], o que reforça a necessidade de pesquisa de novas moléculas para desenvolver fármacos promissores cujos alvos sejam os elementos envolvidos na patogênese da doença e que possuam maior segurança em relação aos efeitos adversos já citados [SMOLEN et al, 2016].

Os glicocorticoides regulam o metabolismo e a inflamação, e provocam efeitos fisiológicos e bioquímicos em diversos tecidos do corpo. Dessa forma, essa classe de medicamentos compõe a terapia-padrão para reduzir a inflamação e a ativação do sistema imune em várias condições clínicas, como asma, alergia e doenças reumatóides [ORAY et al, 2016].

Entretanto, muitos são os efeitos adversos atribuídos ao uso crônico dos glicocorticoides, e podem aparecer em aproximadamente 90% dos pacientes que fazem uso desses medicamentos por mais de 60 dias, independente da dose utilizada afetando vários sistemas e estruturas fisiológicas, o que dificulta seu uso em terapias crônicas (Tabela 1) [CURTIS et al, 2006; ALETAHA et al, 2018].

Apesar de possuírem ações anti-inflamatórias e imunossupressoras, a terapia com os glicocorticoides também apresenta efeitos adversos indesejados, o que torna o tratamento com esses medicamentos difícil e, de certa forma, penoso. No sistema ósseo, os glicocorticoides inibem a ativação de osteoblastos, levando à diminuição da formação óssea, aumentando o risco de fraturas vertebrais ou no quadril [ORAY et al, 2016].

Os efeitos adversos dos glicocorticoides sobre os músculos esqueléticos incluem diminuição da síntese proteica e aumento da taxa de catabolismo proteico, o que leva à atrofia muscular. Além disso, esses medicamentos podem afetar diretamente o metabolismo da glicose, gerando hiperglicemia através do aumento da gliconeogênese hepática, inibição da captação de glicose pelos tecidos adiposos e, até mesmo, alteração nos receptores de glicose [ORAY et al, 2016; WEINSTEIN, 2012].

O uso de glicocorticoides pode interferir no ganho de peso, suprimir atividade da glândula adrenal, aumentar a pressão intraocular, causar irritabilidade do sistema gastrointestinal e suprimir a imunidade celular predispondo o paciente a desenvolver infecções intracelulares [OREY et al, 2016].

Tabela 1. Efeitos adversos crônicos dos glicocorticoides.

Sistemas Afetados	Efeitos Adversos dos Glicocorticoides
Muscular e esquelético	Osteoporose, necrose óssea avascular, miopatia
Endócrino e metabólico	Hiperglicemia, diabetes mellitus, dislipidemia, ganho de peso, supressão do crescimento e da adrenal
Gastrointestinal	Gastrite, úlcera péptica, sangramento gastrointestinal, perfuração visceral, esteatose hepática, pancreatite
Cardiovascular	Hipertensão, doença cardíaca coronária, isquemia cardíaca, falência cardíaca
Dermatológico	Erosões cutâneas, estrias, retardo no processo de cicatrização, acne, hirsutismo, perda de cabelo
Neuropsiquiátrico	Mudanças de humor, depressão euforia, irritabilidade, ansiedade, transtorno cognitivo, psicose, delírio
Oftalmológico	Catarata, glaucoma, midríase, infecções oculares oportunistas
Imunológico	Supressão da imunidade celular, predisposição a infecções, reativação de infecções latentes

Fonte: ORAY et al, 2016.

2.8. O DMARD leflunomida e seu uso no tratamento da artrite reumatoide

A leflunomida é um fármaco pertencente à classe dos medicamentos modificadores da doença sintéticos com potente ação imunossupressora que foi aprovado para o tratamento de pacientes com AR em 1998. Sendo um pró-fármaco, é convertida in vivo em seu metabólito ativo primário A771726, conhecido como teriflunomida [PERES et al, 2017].

Utilizado no tratamento de doenças autoimunes, a teriflunomida diminui a síntese de DNA e RNA, bem como a proliferação celular, principalmente de linfócitos, apresentando eficácia para o tratamento da artrite reumatoide, tanto em sua forma moderada quanto na severa [WANG et al, 2019; SATO et al, 2017].

Um dos mecanismos propostos para a leflunomida é a inibição da enzima mitocondrial dihidroorato desidrogenase, que catalisa a reação de síntese das pirimidinas para a manutenção do metabolismo e da proliferação celular, o que leva à diminuição da proliferação de linfócitos

e da produção de citocinas pró-inflamatórias, corroborando seu efeito anti-inflamatório [PERES et al, 2017].

Além disso, estudos demonstraram que o metabólito ativo da leflunomida foi capaz de exercer efeitos anti-inflamatórios através da supressão da síntese de TNF- α e IL-1 β durante a ativação da interação célula-célula entre linfócitos T e monócitos [AREND, et al 1997; CUTOLO et al, 2003]. Também é atribuída à teriflunomida a atividade supressora da produção do fator nuclear κ B (NF- κ B), um potente fator de transcrição, além de diminuir a glicosilação de moléculas de adesão celular, como a ICAM-I, levando à redução do contato celular durante uma reação inflamatória. Dados na literatura mostram que houve redução da expressão de ICAM-I, TNF- α e IL-1b no líquido sinovial de pacientes após 4 meses de tratamento com leflunomida [CUTOLO et al, 2003; KRAAN et al, 2000].

Apesar de ser um fármaco eficaz, eventos adversos associados ao uso crônico da leflunomida já foram relatados, como náusea, diarreia, imunossupressão, rash cutâneo, anemia, e dificultam seu uso prolongado [SATO et al, 2017].

2.9. Pterocarpaquinona: LQB-118 e seu potencial protetor na artrite reumatoide

A reação química de hibridação entre grupos pterocapanos e quinonas dão origem a moléculas híbridas sintéticas classificadas como pterocarpaquinonas. Nesse contexto, o LQB-118 é uma pterocarpaquinona sintética formada a partir da junção entre fragmentos bioativos de 1,4-naftoquinona lapachol e o pterocarpano 4-hidroximaackiana (LQB-79), por uma reação de hibridação, onde os anéis B, C e D são conservados (Figura 7). [RIÇA et al, 2016].

Os pterocarpanos possuem atividades biológicas já descritas na literatura, as quais incluem ação citotóxica, antioxidante, antiinflamatória e antimicrobicidas, sendo classificados como isoflavonoides que fazem parte do grupo de metabólitos secundários presentes em plantas da família *Fabaceae* [NETTO et al, 2009; CARVALHO et al, 2020; KIM et al, 2020]. Por outro lado, as quinonas são compostos neutros produzidos por insetos e vegetais e são utilizadas como fonte de defesa química, possuindo ações oxidantes e eletrofílicas, além já possuírem descrições na literatura possuindo propriedades antimicrobianas, anti-inflamatória, oxidante e antitumoral [COSTA, 2011; SILVA et al, 2012].

Estudos *in vitro* sugerem que o LQB-118 possui ações antileishmania e antineoplásicas, uma vez que foi capaz de inibir a proliferação de células tumorais e induzir apoptose em células de leucemia mieloide aguda [JUNIOR et al, 2011; MORAES, 2014].

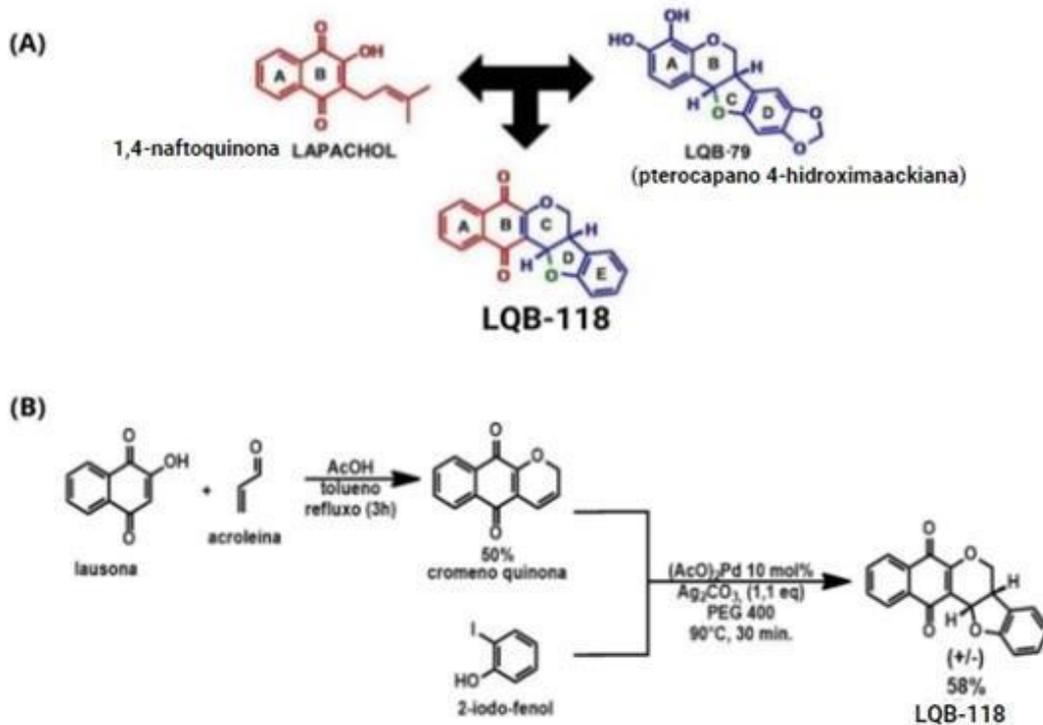


Figura 7. Estrutura química do LQB-118 – Design estratégico (A) e a rota sintética (B) da pterocarpaquinona LQB-118. Fonte: Modificada de DE SÁ BACELAR et al., 2013; LIMA, 2020. A figura A ilustra o design estratégico que originou a ideia para a síntese do LQB-118 e a figura B apresenta a rota sintética desta pterocarpaquinona via arilação de Oxa-Heck catalisada por paládio (Pd) com a substituição do anel naftoquinona a partir da lausona como substrato de partida, conservando os anéis B, C e D do pterocarpano 4-hidroximaackiana (LQB-79).

O lapachol é uma naftoquinona e um dos precursores da síntese do LQB-118 que possui efeitos biológicos microbicidas e anti-inflamatórios e, pelo menos em parte, o efeito anti-inflamatório do lapachol pode ter relação com a inibição da enzima dihidroorato desidrogenase, essencial para a síntese das pirimidinas. Nesse caso, Peres et al, 2017 demonstraram que o lapachol reduziu a artrite induzida por colágeno ou por antígeno (albumina sérica bovina) em camundongos, um modelo de artrite autoimune experimental, além de inibir a proliferação celular de linfócitos *in vitro* [PERES et al, 2017].

Esse efeito este que foi revertido pela suplementação de uridina, o que sugere a inibição da enzima dihidroorato desidrogenase como mecanismo de ação para este efeito. Esses resultados sugerem que o lapachol pode compartilhar de ações semelhantes às da leflunomida, um fármaco inibidor da dihidroorato desidrogenase e eficaz no tratamento de doenças autoimunes, como a artrite reumatoide [PERES et al 2017].

Além disso, estudo *in vivo* demonstrou que o pré-tratamento com LQB-118 inibiu a ativação de NFκB, um importante fator de transcrição de proteínas inflamatórias, no tecido pulmonar. O LQB-118 também foi capaz de reduzir a migração de neutrófilos e a concentração de TNF-α no lavado broncoalveolar em modelo murino de inflamação pulmonar induzido por LPS, sugerindo que o LQB-118 exerceu efeito anti-inflamatório neste modelo [RIÇA et al, 2019].

Adicionalmente, um recente estudo demonstrou a ação anti-inflamatória do LQB-118 no modelo murino de peritonite induzida por zimosan, um polissacarídeo insolúvel presente na parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* com ação agonista sobre receptores Toll-Like 2 (TLR2), que é abundantemente expresso em células do sistema imune e sua ativação induz a liberação de citocinas inflamatórias pelos macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. O estudo citado consistiu no pré-tratamento de camundongos com LQB-118 e mostrou redução da migração celular de leucócitos para a cavidade peritoneal e a concentração de TNF-α, IL-1β e IL-6 no lavado peritoneal. A molécula também foi capaz de inibir a síntese dessas citocinas em cultura de macrófagos estimulados por zimosan, e os autores demonstraram que o efeito do LQB-118 sobre esses macrófagos depende, pelo menos em parte, da redução da expressão de TLR2 e CD69 na membrana plasmática e da diminuição da fosforilação da p8MAPK [LIMA et al, 2020].

O conjunto de dados abordados anteriormente evidenciam o efeito anti-inflamatório do LQB-118 em diferentes modelos murinos, contudo o seu mecanismo de ação ainda não está claro. Além disso, os possíveis mecanismos de ação propostos para o LQB-118 indicam uma possível eficácia no tratamento da artrite. Diante da falta de evidências experimentais quanto ao efeito antinociceptivo do LQB-118, o presente projeto propõe avaliar efeito antinociceptivo deste composto em modelos experimentais específicos. Além disso, foi investigado o efeito anti-inflamatório do LQB-118 em modelo murino de artrite induzida por zimosan. Adicionalmente, vamos investigar o potencial do LQB-118 como agonista dos receptores

nucleares de estrogênio e como inibidor a enzima dihidroorato desidrogenase e relacionar esses resultados como os possíveis mecanismos de ação deste composto.

Sendo assim, diante da problemática relacionada ao tratamento crônico da artrite reumatoide e do caráter debilitante da doença, se faz necessária a busca e o desenvolvimento de novas moléculas que tenham potencial para constituírem novas ferramentas terapêuticas, visando melhorar a qualidade de vida dos pacientes e reduzir a progressão da doença.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo do LQB-118 em modelos experimentais murinos de nocicepção, inflamação e artrite, bem como investigar a sua possível ação agonista sobre os receptores nucleares de estrogênio em camundongos fêmeas e o seu potencial efeito inibidor da enzima dihidroorato desidrogenase em cultura primária de macrófagos, como mecanismo de ação.

3.1. Objetivos específicos

- Avaliar se o tratamento subcutâneo com LQB-118 possui efeito antinociceptivo através dos modelos de contorção abdominal induzida por ácido acético, formalina e placa quente;
- Validar os efeitos antinociceptivos investigando se o tratamento subcutâneo com LQB-118 altera a coordenação motora, através do teste rota rod;
- Investigar se o tratamento subcutâneo com LQB-118 induz efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios em modelo murino de artrite induzida por zimosan;
- Averiguar *in vitro* se os macrófagos são células alvo para o LQB-118;
- Investigando se esse composto inibe a síntese de citocinas induzida por LPS;
- Investigar se os efeitos do LBQ-118 em cultura de macrófagos primários envolvem a inibição da enzima dihidroorato desidrogenase como mecanismos de ação.

3.2. Modelos animais de artrite reumatoide

Os modelos experimentais de artrite são desenvolvidos para induzir a doença em animais, reproduzindo os parâmetros encontrados na AR em humanos. Para ser considerado um modelo

ideal de artrite, deve apresentar achados clínicos, radiológicos e histopatológicos semelhantes aos observados no quadro de artrite reumatoide, sem sistematização. Além disso, deve ser de fácil indução, baixo custo, boa reprodutibilidade, possuir confiabilidade e ter resposta a agentes terapêuticos semelhantemente à AR humana, além de ter parâmetros imunológicos mensuráveis [OLIVER, 1996].

O modelo de artrite induzida por zimosan, descrito por Keysone et al. (1997), é um interessante modelo murino para avaliar os parâmetros da imunidade inata envolvidos na inflamação sinovial. O zimosan é um polissacarídeo derivado de *Saccharomyces cerevisiae*, que provoca um intenso quadro inflamatório agudo após a sua administração intrarticular. Assim sendo, o zimosan ativa a proliferação celular do revestimento sinovial, erosão da cartilagem e formação do pannus, características específicas do quadro de AR [KEYSTONE et al, 1977].

Estudos demonstram que o zimosan é capaz de estimular a sinalização do NF- κ B através da ligação a receptores toll like 2 (TLR2) presentes em macrófagos residentes, além de estimular a secreção de TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias. Dessa forma, com o modelo de artrite induzida por zimosan, é possível analisar muitos parâmetros imunes e inflamatórios da artrite reumatoide, como hipernocicepção, edema articular, migração de leucócitos, resposta febril e síntese de mediadores inflamatórios. Ademais, as vantagens acerca desse modelo – boa reprodutibilidade e acessibilidade – fazem dele uma ferramenta relevante no desenvolvimento de pesquisas em reumatologia [SATO et al, 2003; KANASHIRO et al, 2009; SILVA, 2006].

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Os animais utilizados foram provenientes do Biotério de Criação de Roedores do Departamento de Ciências Fisiológicas/ICBS da UFRJ. Para os experimentos que avaliaram os efeitos antinociceptivo e antiartrite do LQB-118 foram utilizados camundongos machos e para os experimentos que avaliaram o potencial agonista de receptores de estrogênio foram utilizados camundongos fêmeas, ambos da linhagem Swiss, entre 30 e 40 gramas. Todos os experimentos seguiram as normas éticas estabelecidas para a experimentação com animais conscientes recomendadas pela IASP [ZIMMERMANN, 1983] e foram aprovadas pelo Comitê de Ética para Uso de Animais do ICBS/UFRRJ (protocolo número 019/2017 da CEUA/ICBS – Anexo 1).

4.2. Fármacos, doses, reagentes e preparo das soluções utilizadas

- Cipionato de estradiol: Solubilizado em óleo vegetal e administrado na dose de 2,5 µg/kg por via subcutânea (Zoetis Brasil, SP, São Paulo, Brasil);
- Diazepam: Solubilizado em salina e administrado na dose de 5 mg/kg por via subcutânea (Cristália, SP, São Paulo, Brasil);
- Fentanil (Fentanyl): Solubilizado em salina e administrado na dose de 150 µg/kg por via subcutânea (Cristália, SP, São Paulo, Brasil);
- Formalina: Formaldeído a 2,5%, solubilizado em salina e administrado 20 µL por via intraplantar (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA);
- Indometacina (Merck, Sharp & Dohme - São Paulo, Brazil): administrada na dose de 2 mg/kg por via subcutânea;
- Isoflurano: a 2%, por via inalatória;
- Lausona (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA): Administrada na dose de 17,3 mg/kg equimolar ao LQB-118, por via subcutânea;
- Lapachol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA): Administrado na dose de 24 mg/kg equimolar ao LQB-118, por via subcutânea;
- LPS (E. coli 0111:B4, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA): Usado para o estímulo de macrófagos em 5 ng/poço;
- LQB-118: Solubilizado em salina e administrado na dose de 10 ou 30 mg/kg por via subcutânea;
- Zymosan (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA): Administração de 10 µL (15 µg/µL) diluído em solução salina 0,9%, por via intrarticular.

4.3. Avaliação do efeito antinociceptivo do LQB-118

4.3.1. Teste de contorção abdominal

Os animais foram tratados por via subcutânea com veículo (óleo de girassol), LQB-118 (3, 10 e 30 mg/kg) ou indometacina (controle positivo, 2 mg/kg), 1 h antes da administração de ácido acético 0,8% (10 mL/kg). As contorções abdominais foram contabilizadas durante 30 min após a administração do ácido acético (Figura 8) [TEIXEIRA et al, 2020].

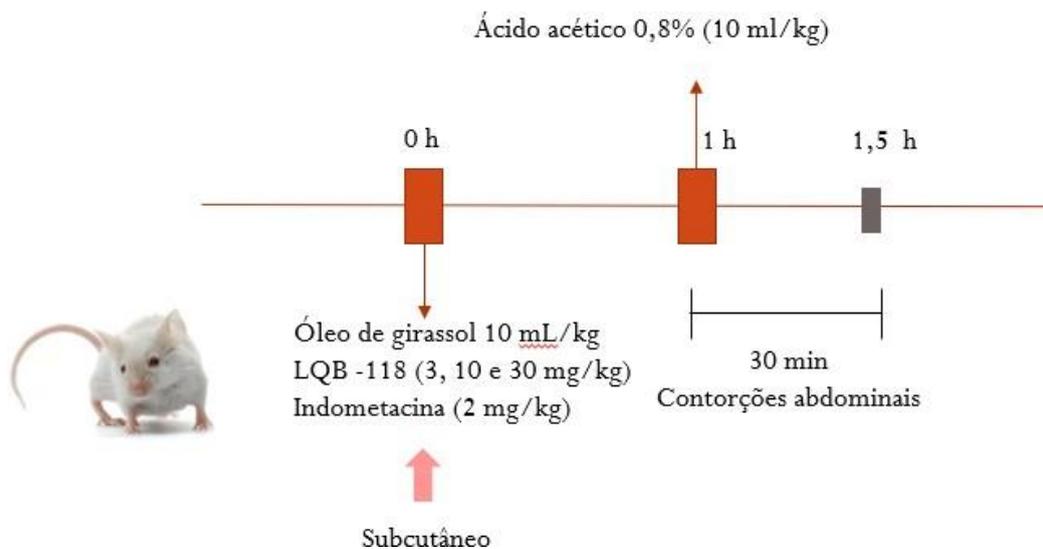


Figura 8. Exemplificação esquemática da metodologia referente ao experimento para avaliação do efeito antinociceptivo do LQB-118 no teste da contorção abdominal.

4.3.2. Teste da Formalina

Os animais foram tratados por via subcutânea com veículo (óleo de girassol, 10 mg/kg), LQB-118 (30 mg/kg) ou indometacina (controle positivo, 2 mg/kg), 1 h antes da administração intraplantar de 20 μ L de formalina (formaldeído a 2,5% em salina) na pata traseira direita (Figura 9). Em seguida, o tempo (em segundos) do comportamento nociceptivo de lamber e balançar a pata traseira direita foi registrado durante as fases de dor neurogênica (Fase I; 0-5 min após injeção de formalina) e a anti-inflamatória (Fase II; 15-30 min após injeção de formalina) [TEIXEIRA et al, 2020].

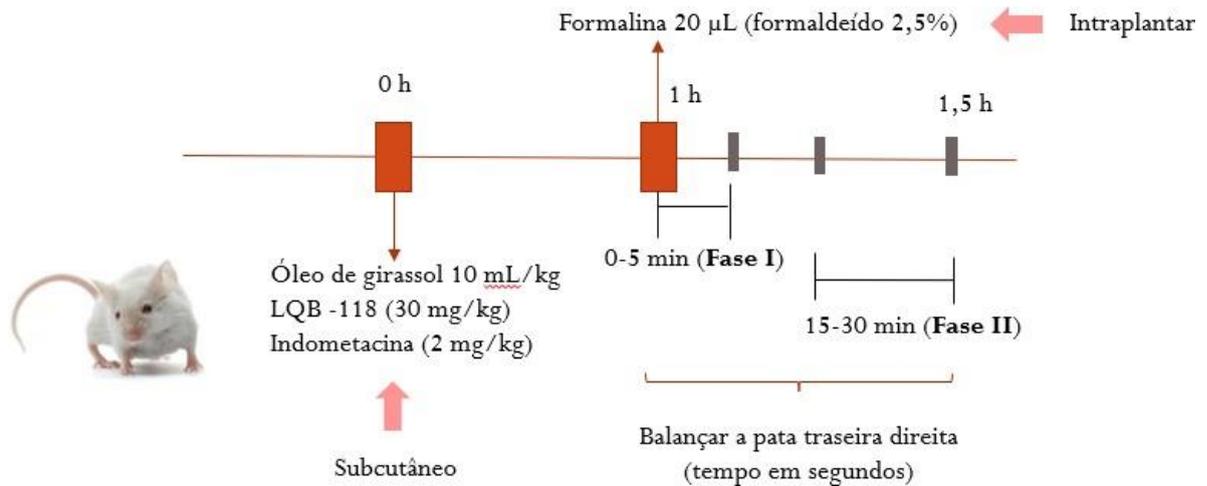


Figura 9. Esquematização da metodologia referente ao teste da formalina, indicando as fases de dor neurogênica (Fase I) e inflamatória (Fase II), usada para avaliar o potencial antinociceptivo do LQB-118.

4.3.3. Teste da Placa Quente

Os animais foram tratados por via subcutânea com veículo (óleo de girassol, 10 mg/kg), LQB-118 (30 mg/kg) ou fentanil (controle positivo, 150 µg/kg), 30 min antes do contato do animal com a placa quente, previamente aquecida a 55°C (Figura10). O tempo de latência (em segundos) para o comportamento nociceptivo do animal (retirada da pata) foi avaliado nos tempos de 30, 60, 90, 120 e 150 min [TEIXEIRA et al, 2020].

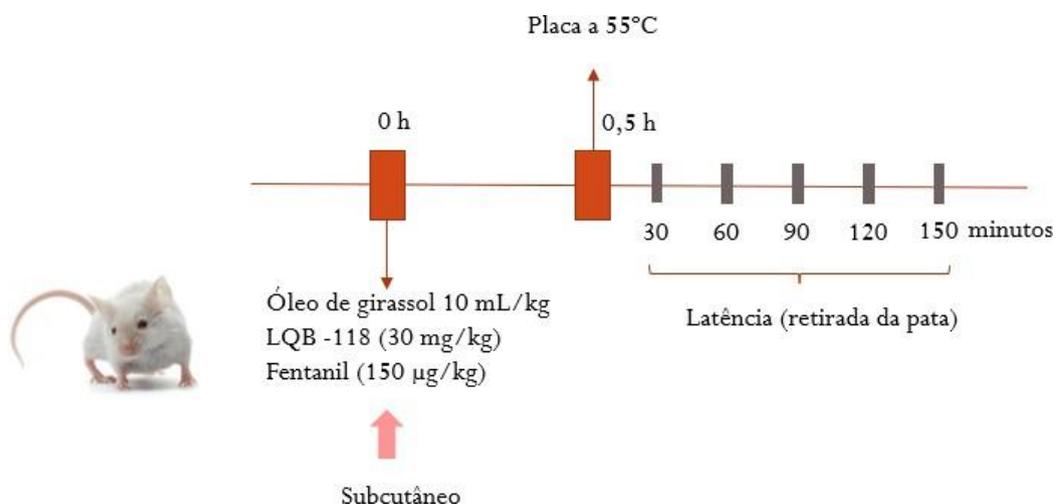


Figura 10. Esquematização da metodologia referente ao teste da placa quente.

4.4. Avaliação da ação do LQB-118 sobre a coordenação motora

4.4.1. Teste rota rod

Foi realizado o teste rota rod descrito por Teixeira et al, 2020. Os animais foram tratados por via subcutânea com veículo (óleo de girassol, 10 mg/kg), diazepam (5 mg/kg) e LQB-118 (30 mg/kg). Após 30 minutos, os animais foram colocados sobre roda giratória na velocidade de 15 rpm e foi avaliado o tempo para a queda da barra giratória por até 3 quedas (Figura 11).

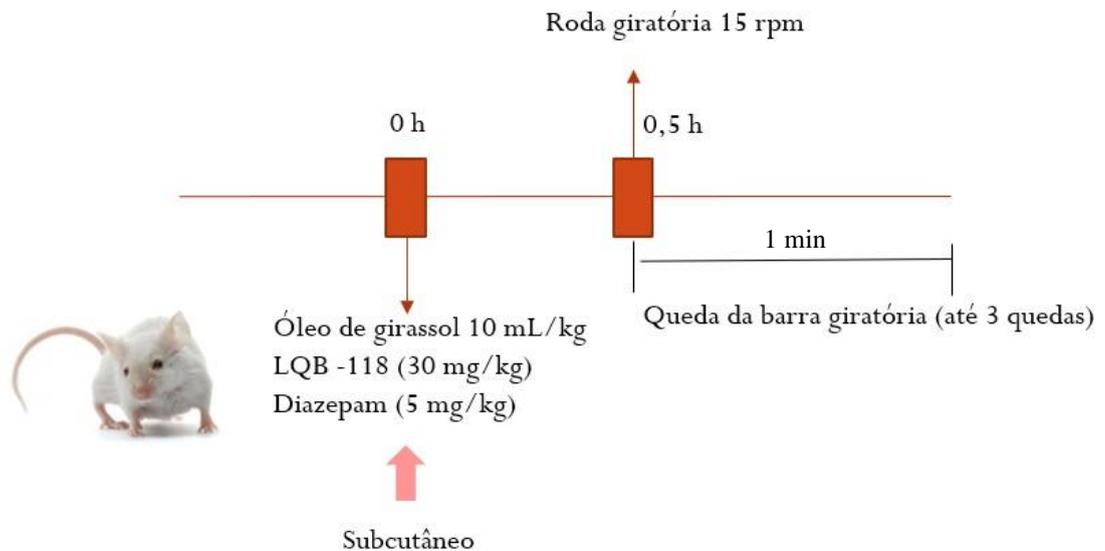


Figura 11. Exemplificação esquemática da metodologia referente ao teste rota rod, para avaliação da coordenação motora após a administração de LQB-118.

4.4.2. Avaliação do efeito anti-inflamatório do LQB-118 na artrite induzida por zimosan

Camundongos machos foram tratados por via subcutânea com veículo (óleo de girassol, 10 mL/kg), LQB-118 (30 mg/kg), lausona (17,3 mg/kg, dose equimolar ao LQB-118) ou lapachol (24 mg/kg, dose equimolar ao LQB-118) (Figura 12). Após 1 h foram administrados 10 µL de zimosan (15 µg/µL) diluído em solução salina 0,9% por via intra-articular no joelho direito dos animais. O efeito antinociceptivo do LQB-118 foi avaliado 5h após a injeção de zimosan utilizando o método modificado de Von Frey conforme descrito por Pinto e colaboradores (2010). O efeito antiedematogênico articular e sobre a migração de neutrófilos para a cavidade articular do LQB-118 foram avaliados 6 h após a injeção de zimosan, conforme descrito por Teixeira et al, 2020. Este protocolo foi repetido para a coleta das articulações no tempo 1,5 h, a fim de verificar a dosagem de TNF- α articular por ELISA.

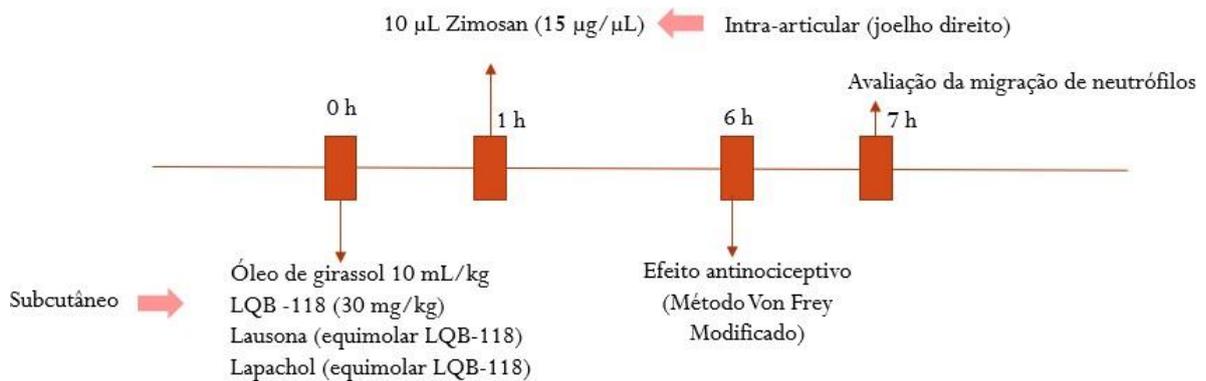


Figura 12. Esquematisação da metodologia usada para avaliar o potencial antiartrite do LQB-118.

4.5. Ovariectomia, avaliação do ciclo estral e análise da massa do útero e da hipófise

Os animais foram anestesiados com isoflurano (2%), por via inalatória a fim de realizar as cirurgias de ovariectomia bilateral (OVX) e a SHAM (animais falso operados), como descrito por Schneider et al, 2019. Sete dias após as cirurgias, os animais receberam tratamentos subcutâneos diários com veículo (óleo vegetal de girassol), cipionato de estradiol (2,5 µg/kg) ou LQB (10 ou 30 mg/kg) por 6 dias seguidos (Figura 13).

O protocolo experimental se seguiu com os seguintes grupos: (1) SHAM/óleo (dividido em proestro/estro e metaestro/diestro, de acordo com a fase do ciclo estral dos animais no último dia do experimento), OVX/óleo; (2) OVX/Cipionato de estradiol 2,5 µg/kg (E₂); (3) OVX/LQB-118 10mg/kg; (4) OVX/LQB-118 30 mg/kg. As doses foram definidas a partir de dados presentes na literatura [SCHNEIDER et al, 2019; RIÇA et al, 2016].

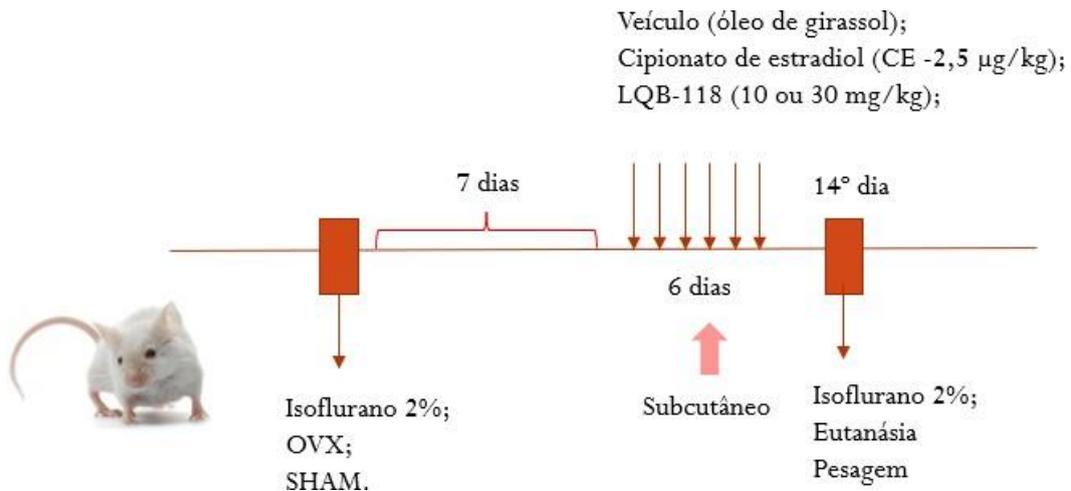


Figura 13. Esquematização da metodologia do experimento usado para avaliar o potencial agonista do LQB-118 em receptores de estrogênio em camundongos fêmeas ovariectomizadas.

Em um segundo set experimental, sete dias após as cirurgias, os animais receberam tratamentos subcutâneos diários com veículo (óleo vegetal de girassol), cipionato de estradiol (2,5 µg/kg) ou cipionato de estradiol (2,5 µg/kg) + LQB (30 mg/kg) por 6 dias seguidos (Figura 14). Neste set experimental, os grupos foram: (1) SHAM/óleo (dividido em proestro/estro e metaestro/diestro, de acordo com a fase do ciclo estral dos animais no último dia do experimento), OVX/óleo; (2) OVX/Cipionato de estradiol 2,5 µg/kg (E₂); (3) OVX/LQB-118 30 mg/kg/Cipionato de estradiol 2,5 µg/kg (E₂).

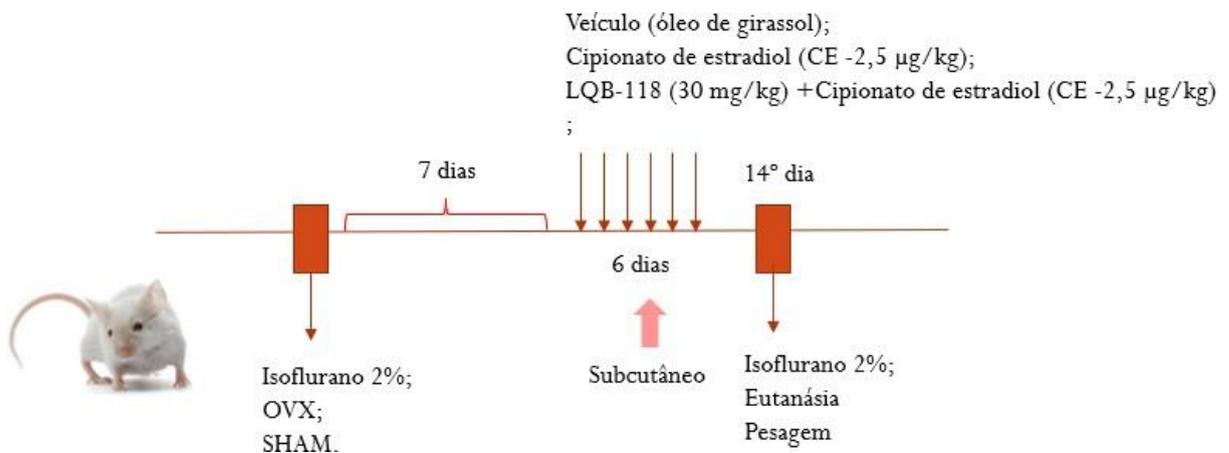


Figura 14. Esquematização da metodologia do experimento usado para avaliar o efeito antagonista do LQB-118 sobre receptores de estrogênio em camundongos fêmeas ovariectomizadas.

Para avaliação do ciclo estral foi coletado, ao longo de todos os dias do experimento (entre 07:00 e 08:00 am), o lavado vaginal para leitura em microscópio. No décimo quarto dia, imediatamente após a coleta do lavado vaginal, os animais foram anestesiados com isoflurano (2%) e eutanasiados por deslocamento cervical para remoção e pesagem do útero e da hipófise [CHANG, 2013].

4.6. Avaliação in vitro do efeito do LQB-118 sobre cultura de macrófagos primários

4.6.1. Efeito do LQB-118 sobre a produção de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-6) e anti-inflamatória (IL-10) por macrófagos estimulados com LPS

As células utilizadas foram derivadas da medula óssea dos camundongos machos e foram cultivadas em meio RPMI 20% FBS e estimuladas com sobrenadante de cultura de células L929, durante 7 dias em estufa (37°C a uma atmosfera 5% de CO₂) para diferenciação a macrófagos conforme descrito por Wanderley et al, 2018. Os macrófagos primários (2 x 10⁶ células/poço) tratados com LQB-118 (1, 3, 10, 30 e 100 μ M), diluídos em meio RPMI 10% FBS, e foram estimulados com LPS (5 ng/poço) durante 24h em estufa (37°C a uma atmosfera 5% de CO₂). Em seguida as placas foram centrifugadas (450 G por 5 min 4°C) e o sobrenadante foi coletado para determinação da concentração de citocinas (IL-6, IL-10 e TNF- α) por ELISA, utilizando kits comerciais (R&D System) (Figura 15).

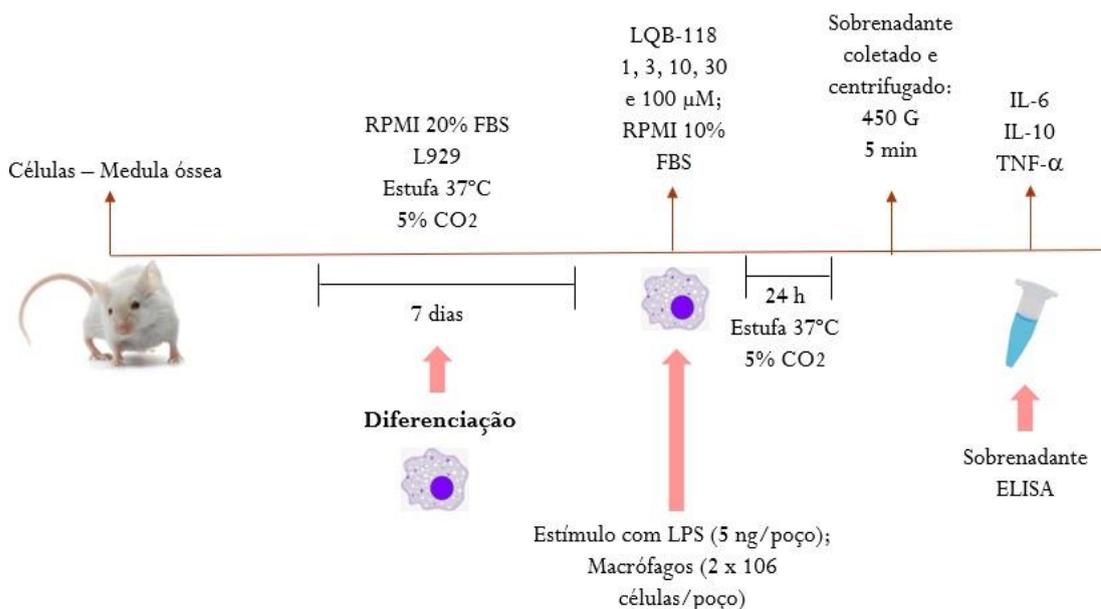


Figura 15. Esquematização da metodologia aplicada para a avaliação do efeito do LQB-118 na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias por macrófagos estimulados com LPS.

4.6.2. Proliferação celular de macrófagos

Os macrófagos (2×10^6 células/poço) foram cultivados da mesma forma descrita anteriormente e esquematizada na figura 12. Em seguida, os macrófagos primários foram incubados com Dye Eflur 670 (eBioscience, San Diego, CA, USA) durante 15 minutos para que a probe seja absorvida e se ligue ao DNA. Após o período de incubação, as placas foram lavadas para retirar o excesso da probe e os macrófagos foram tratados com veículo (DMSO 2% em RPMI 10% FBS) ou LQB-118 (1, 3, 10, 30 e 100 μ M), estimulados com LPS (5 ng/poço) e encubados durante 48h com meio RPMI 10% FBS em estufa (37°C a uma atmosfera 5% de CO_2). Ao fim deste tempo, os macrófagos foram ressuspensos e coletados (Figura 16). A proliferação celular de macrófagos foi determinada a partir das células coletadas utilizando citômetro de fluxo conforme descrito por Peres et al, 2017.

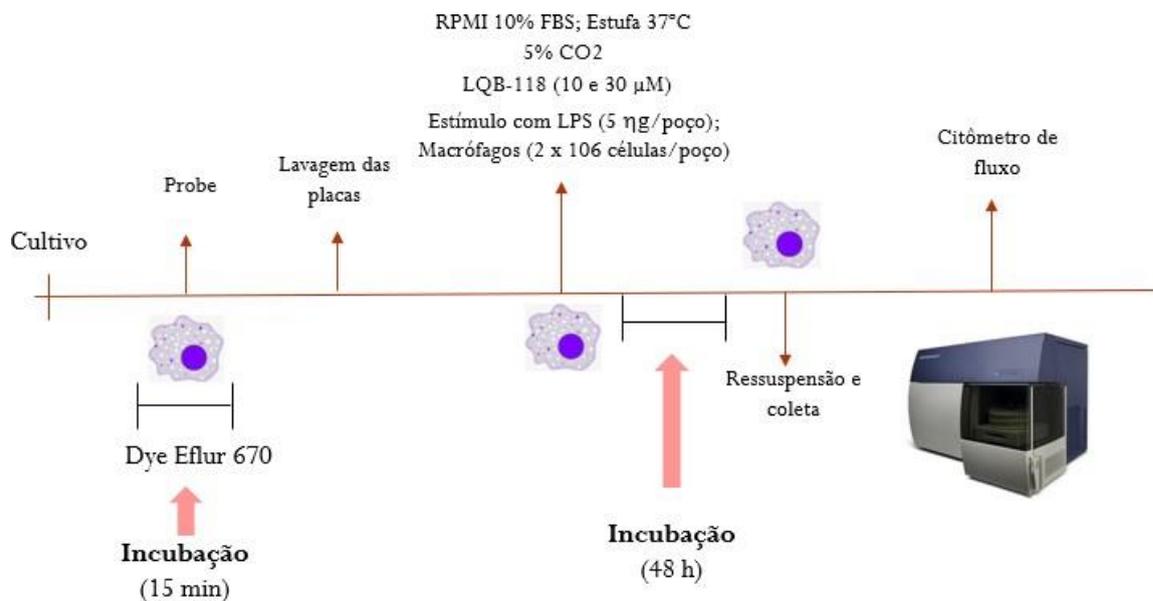


Figura 16. Esquematização da metodologia utilizada para a avaliação do efeito do LQB-118 sobre a proliferação de macrófagos utilizando citômetro de fluxo.

4.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 8. Os resultados foram expressos como a média \pm o erro padrão da média (EPM). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas pela análise de variância (ANOVA), seguido pelos pós-testes Tukey nos testes contorção abdominal, formalina, rota rod e artrite induzida por zimosan e Bonferroni no teste da placa quente. Foram admitidas diferenças significativas a partir de $p < 0,05$ [SOKAL, 1981].

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação do efeito antinociceptivo do LQB-118

5.1.1. Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8%

A administração subcutânea de LQB-118 reduziu o comportamento nociceptivo dos animais, observado pela diminuição do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético de forma dose-dependente em 25,4% ($34,6 \pm 8,2$ contorções); 55,6% ($20,6 \pm 6,4$ contorções) e 68,7% ($14,5 \pm 4,4$ contorções), respectivamente, quando comparado com o grupo tratado com veículo ($46,4 \pm 5,3$ contorções). O grupo tratado com indometacina 10 mg /kg (controle positivo) apresentou redução do número das contorções em 83,3% ($7,8 \pm 2,2$ contorções), quando comparado com o grupo tratado com veículo (Figura 17).

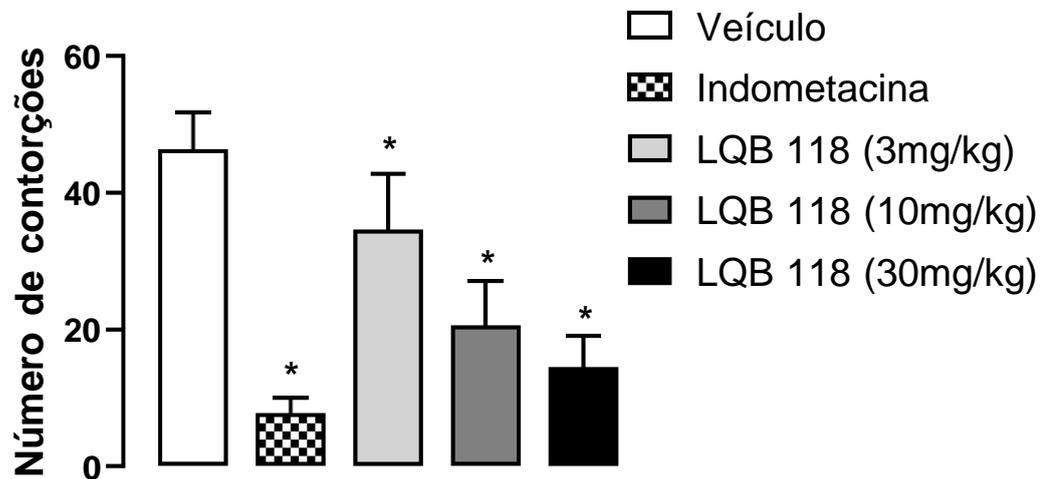


Figura 17. Efeito do LQB-118 sobre o número de contrações abdominais em camundongos machos Swiss. Os animais foram administrados por via subcutânea com óleo (veículo), LQB-118 nas doses de 3, 10 ou 30 mg/kg ou indometacina 1 h antes da administração intraperitoneal de ácido acético 0,8%. Os resultados representam a média \pm EPM do número de contrações abdominais (n = 6), durante 30 min, * (P < 0,05) indica diferença significativa quando comparado com o grupo veículo, no teste de ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey.

5.1.2. *Teste da formalina 2,5%*

Nesse teste, o LQB-118 ($87,9 \pm 5,2$ segundos) e a indometacina ($101,5 \pm 12,8$ segundos) não foram capazes de alterar o tempo de reatividade do comportamento nociceptivo durante a fase 1 de dor neurogênica (0-5 min) quando comparado ao grupo controle ($88,8 \pm 8,1$ segundos). Não obstante, os dois compostos reduziram em 46,6% ($85,4 \pm 12,4$ segundos) o tempo de reatividade do comportamento nociceptivo durante a fase 2 de dor inflamatória (15-30 min) quando comparados ao veículo ($160,0 \pm 20,0$ segundos) (Figura 18).

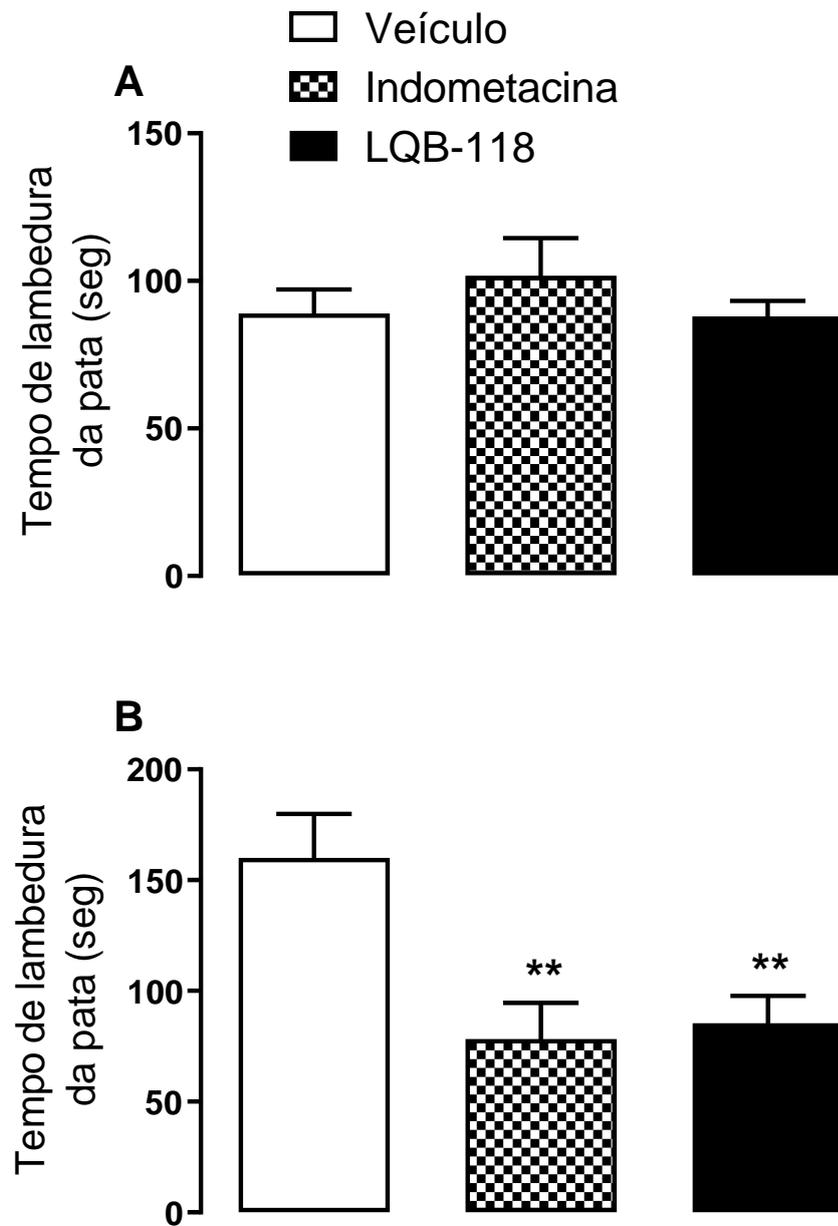


Figura 18. Efeito antinociceptivo do LQB-118 em camundongos machos durante a fase de dor neurogênica (A) e inflamatória (B) no teste da formalina. Para esse fim os animais foram tratados com óleo (veículo), LQB-118 (30 mg/kg) ou indometacina (10 mg/kg) 1h antes da administração intraplantar de formalina 2,5 %. Os resultados representam a média \pm EPM do tempo de lambedura da pata, durante 0-5 min (Fase I, dor neurogênica) e 15-30 min (Fase II, dor inflamatória) após a injeção de formalina (n = 6). * (P < 0,05) indica diferença significativa quando comparado com o grupo veículo, no teste de ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey.

5.1.3. *Teste da placa quente*

A Figura 19 mostra que o LQB-118 (30 mg/kg) não alterou significativamente o tempo de permanência dos animais sobre a placa quente quando comparado ao grupo veículo nos tempos avaliados. Entretanto, como esperado, o fentanil (150 µg/kg), grupo controle positivo) aumentou o tempo de permanência (latência) dos animais sobre a placa quente em 194,6% ($27,5 \pm 1,8$ segundos) no tempo de 30 minutos e 83,3% ($22,2 \pm 2,7$ segundos) no tempo de 60 minutos, quando comparado com o grupo controle ($9,3 \pm 0,8$ e $12,0 \pm 1,4$ segundos, respectivamente).

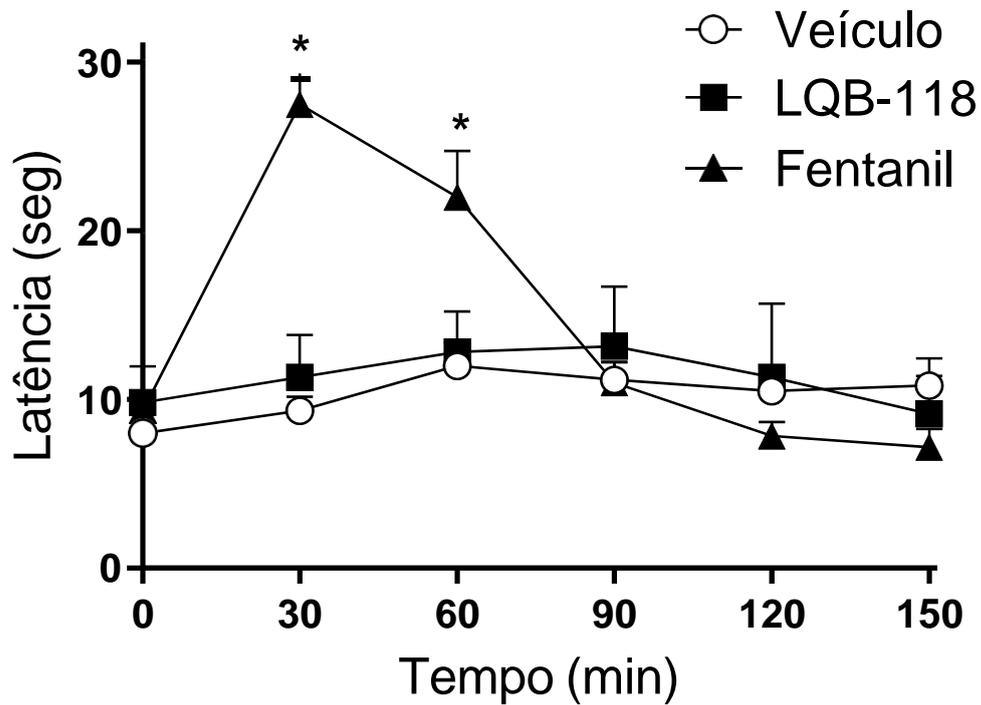


Figura 19. Efeito do LQB-118 sobre o tempo de permanência no teste da Placa Quente. Os animais foram tratados com óleo de girassol (veículo), fentanil (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e LQB-118 (30 mg/kg) por via subcutânea 30 min antes do contato com o estímulo térmico (placa quente, nos tempos 30, 60, 90, 120 e 150 minutos após o tratamento). Cada valor representa a média \pm EPM do tempo de latência para o comportamento nociceptivo ($n = 8$). * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo tratado com fentanil, no teste de ANOVA seguido pelo pós-teste Bonferroni.

5.1.4. *Teste rota rod*

Para esse teste, o LQB-118 (30 mg/kg) não foi capaz de alterar o tempo de permanência dos camundongos ($58,7 \pm 0,6$ segundos) quando comparado ao grupo tratado com veículo ($53,9 \pm 3,6$ segundos). Entretanto, o grupo no qual foi administrado o medicamento diazepam (5 mg/kg, controle positivo) apresentou redução de 92% ($4,1 \pm 1,4$ segundos) no tempo de permanência sobre a barra giratória (Figura 20).

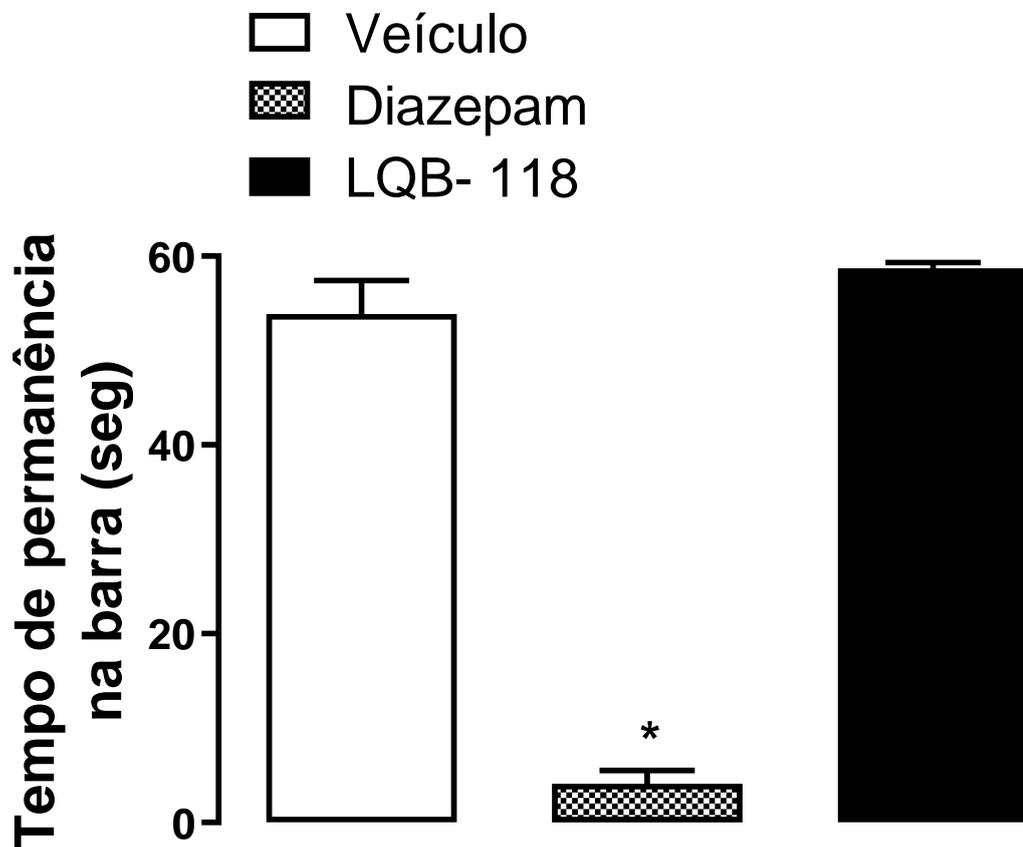


Figura 20. Efeito do LQB-118 sobre a função motora dos camundongos no teste rota rod. Os animais foram tratados com veículo (óleo), diazepam (5 mg/kg) e LQB-118 (30 mg/kg) por via subcutânea, 1 hora antes do início do teste. Os animais foram colocados sobre a barra giratória (12 rpm) para avaliação do tempo de permanência sobre a mesma durante 1 minuto. Cada valor representa a média \pm EPM do tempo de permanência dos animais sobre a barra giratória (n = 8). * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo tratado com veículo, no teste de ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey.

5.2. Avaliação do efeito anti-inflamatório do LQB-118 em um modelo de artrite induzida por zimosan

O limiar nociceptivo do LQB-118 (30mg/kg) foi avaliado pelo método de Von Frey e apresentou aumento de 50,2% ($5,4 \pm 0,2$ g) em relação ao grupo controle ($3,6 \pm 0,2$ g) 5 h após a injeção intra-articular de zimosan. Ademais, os grupos administrados com lausona (17,3 mg/kg; $3,5 \pm 0,5$ g) ou lapachol (24 mg/kg; $4,3 \pm 0,6$ g) não apresentaram alteração significativa do limiar em relação ao grupo controle (Figura 21 A).

Outrossim, a migração de leucócitos foi significativamente reduzida, e de forma similar, pelos tratamentos com LQB-118, lausona e lapachol em 62,3% ($4,0 \pm 0,4$ leucócitos $\times 10^4$), 65,1% ($3,7 \pm 0,6$ leucócitos $\times 10^4$) e 59,8% ($4,3 \pm 0,54$ leucócitos $\times 10^4$), respectivamente, quando comparados com o grupo controle ($10,7 \pm 1,0$ leucócitos $\times 10^4$) (Figura 21 B).

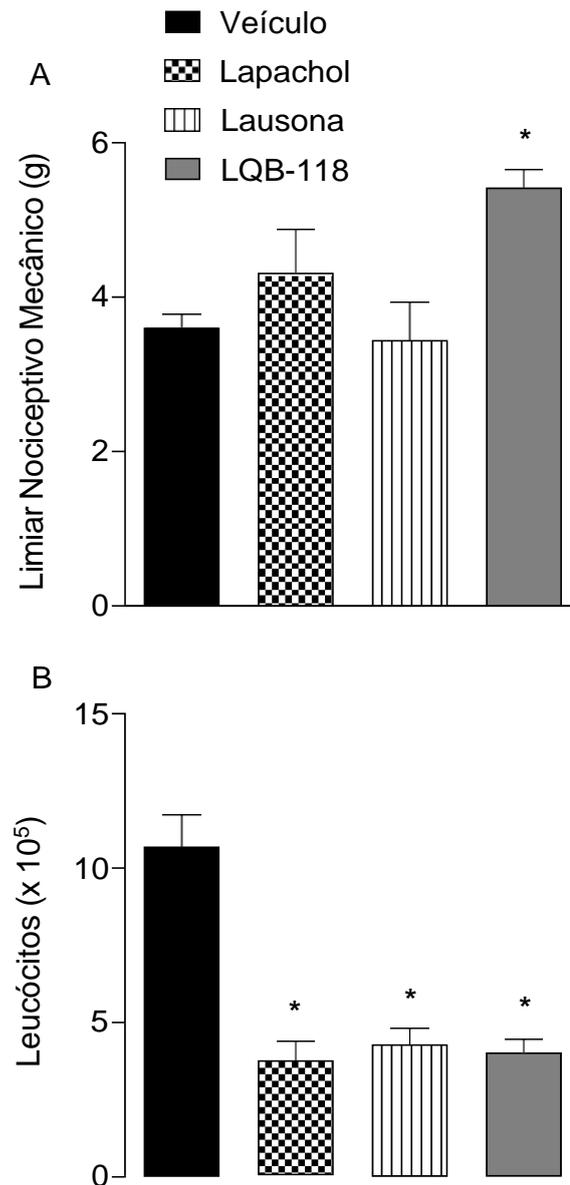


Figura 21. Efeitos antinociceptivo do LQB-118 sobre o limiar nociceptivo na artrite induzida por zimosan através do método de Von Frey modificado (A); e anti-inflamatório do LQB-118 sobre a migração de leucócitos em lavado articular através da contagem leucocitária em Câmara de Neubauer (B). Os animais foram tratados com óleo de girassol 10 mg/kg (veículo), LQB-118 (30 mg/kg), lausona (17,3 mg/kg, dose equimolar ao LQB-118) ou lapachol (24 mg/kg, dose equimolar ao LQB-118). 30 min antes da administração intra-articular de zimosan (150 μ g, 10 μ L) diluído em solução salina 0,9%. O limiar nociceptivo mecânico e o número de leucócitos foi determinado 5 e 6h após a injeção de zimosan, respectivamente. Cada valor representa a média \pm EPM do limiar nociceptivo mecânico (A) e do número de leucócitos na cavidade articular (n = 6). * P < 0,05 quando comparado com o grupo tratado com veículo, no teste ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey.

5.3. Avaliação do LQB-118 como agonista de receptores de estrogênio: Análise das fases do ciclo estral

As fases que compõem o ciclo estral são: proestro, estro, metaestro e diestro. Após a cirurgia, o ciclo estral permaneceu regular para os animais SHAM. Conforme o esperado, todos os animais OVX tratados com veículo se mantiveram em metaestro ou diestro e todos os animais OVX tratados com cipionato de estradiol se mantiveram em proestro e estro. Todos os animais tratados com LQB-118, nas doses de 10 e 30 mg/kg, se mantiveram em metaestro ou diestro (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito do tratamento com cipionato de estradiol ou LQB-118 sobre o ciclo estral de camundongos fêmeas.

Grupos	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14
Experimentais								
SHAM	Metaestro	Meastro	Metaestro	Proestro	Estro	Estro	Proesto	Proestro
Proesto/Estro	Proestro	Metaestro	Estro	Estro	Estro	Estro	Proestro	Proestro
	Diestro	Metaestro	Diestro	Proestro	Estro	Diestro	Diestro	Estro
	Metaestro	Estro	Metaestro	Estro	Diestro	Metaestro	Estro	Estro
	Proestro	Diestro	Metaestro	Proestro	Estro	Estro	Estro	Estro
SHAM	Metaestro	Diestro	Metaestro	Estro	Estro	Estro	Estro	Diestro
Metaestro/Diestro	Metaestro	Diestro	Diestro	Estro	Estro	Estro	Estro	Diestro
	Estro	Estro	Metaestro	Diestro	Diestro	Prostro	Estro	Metaestro
	Proestro	Metaestro	Estro	Metaestro	Estro	Estro	Diestro	Diestro
	Metaestro	Metaestro	Metaestro	Estro	Estro	Estro	Diestro	Diestro
OVX – Óleo	Diestro	Diestro	Metaestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro
	Diestro	Diestro	Metaestro	Diestro	Metaestro	Diestro	Diestro	Diestro
	Diestro	Diestro	Metaestro	Metaestro	Metaestro	Metaestro	Diestro	Metaestro
	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Diestro	Diestro	Diestro
	Diestro	Diestro	Metaestro	Metaestro	Metaestro	Metaestro	Metaestro	Diestro
	Metaestro	Metaestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Diestro
OVX – E2 (2,5 µg/Kg)	Diestro	Metaestro	Diestro	Proestro	Estro	Estro	Estro	Estro
	Diestro	Diestro	Diestro	Estro	Estro	Estro	Estro	Estro
	Diestro	Diestro	Diestro	Proestro	Estro	Estro	Estro	Estro
	Diestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Estro	Estro	Estro	Estro
	Diestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Estro	Estro	Estro	Estro
OVX – LQB 118 (10 mg/Kg)	Metaestro	Diestro						
	Diestro	Metaestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro
	Diestro	Metaestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro
	Diestro							
	Diestro							
OVX – LQB 118 (30 mg/Kg)	Diestro	Metaestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro
	Diestro	Diestro	Metaestro	Diestro	Metaestro	Diestro	Diestro	Diestro
	Diestro	Metaestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Diestro	Diestro	Diestro
	Diestro							
	Diestro	Metaestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Diestro	Diestro	Diestro
Metaestro	Diestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Diestro	Diestro	Metaestro	

O D7 representa o dia anterior aos tratamentos. Cipionato de estradiol (E2).

5.4. Avaliação do LQB-118 como agonista de receptores de estrogênio: Análise do peso da hipófise e do útero

Os animais Sham-Metaestro/diestro apresentaram uma redução de 59,4% ($68,38 \pm 7,7$ mg) do peso uterino quando comparado com o grupo Sham-Proestro/estro ($168,3 \pm 27,4$ mg). O tratamento de animais OVX com cipionato de estradiol ($2,5 \mu\text{g}/\text{kg}$) aumentou o peso do útero em 476,1% ($227,1 \pm 23,7$ mg) quando comparado com o grupo OVX-óleo ($39,4 \pm 2,6$ mg). O grupo tratado com LQB-118 (10 e 30 mg/kg) apresentou peso do útero reduzido em 31,1% ($27,2 \pm 1,3$ mg) e 47,4 % ($20,7 \pm 3,1$ mg), respectivamente, quando comparado com o grupo OVX-óleo (Figura 22 B). Não houve evidências de alteração de peso entre os diferentes grupos de animais avaliados.

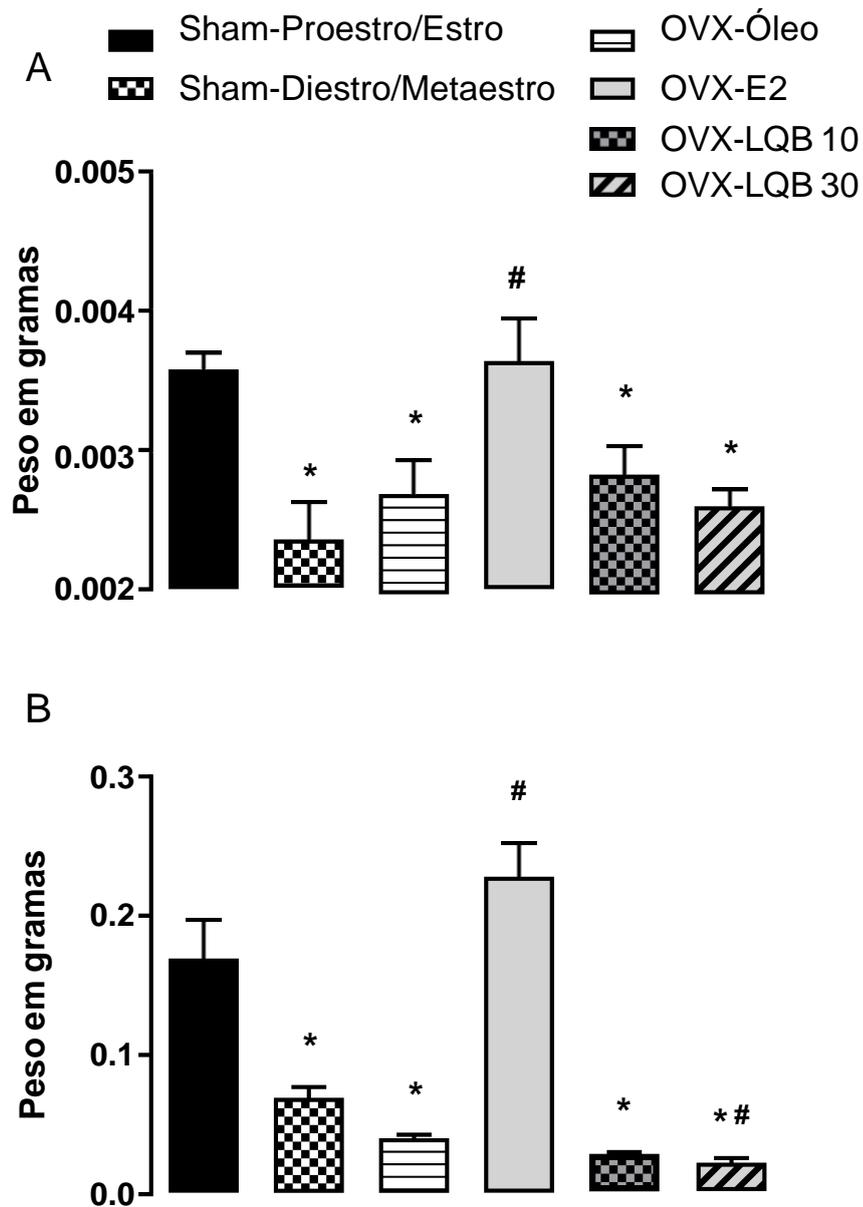


Figura 22. Efeito do tratamento com cipionato de estradiol (E2) e LQB-118 sobre o peso da hipófise (A) e do útero (B) em animais ovariectomizados. Uma semana após a cirurgia, os animais foram tratados com óleo (veículo), cipionato de estradiol (2,5 µg/kg) e LQB-118 (10 e 30 mg/kg), durante 6 dias consecutivos. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados e o peso da hipófise e do útero foram analisados. Os resultados representam a média ± EPM de 6 animais. * ($P < 0,05$) indica diferença significativa quando comparado com o grupo Sham-proestro/estro, # ($P < 0,05$) indica diferença significativa quando comparado com o grupo OVX-óleo.

5.5. Avaliação do LQB-118 como antagonista de receptores de estrogênio: Análise das fases do ciclo estral

Todos os animais SHAM apresentaram ciclo estral regular, já no grupo OVX tratado com veículo todos os animais se mantiveram em metaestro ou diestro. Nos grupos tratados com veículo + cipionato de estradiol todos os animais se mantiveram em proestro ou estro no último dia do experimento. Entre os animais ovariectomizados tratados com LQB-118 + cipionato de estradiol (n=8) 75% dos camundongos fêmeas se mantiveram nas fases metaestro ou diestro (6 animais) e 25% se apresentaram na fase estro (2 animais) (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito do tratamento com cipionato de estradiol e LQB-118 sobre o ciclo estral de camundongos fêmeas.

Grupos	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14
Experimentais								
SHAM Proestro/estro	Proestro	Estro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Estro	Estro
	Estro	Metaestro	Diestro	Diestro	Diestro	Proestro	Estro	Estro
	Diestro	Diestro	Estro	Estro	Diestro	Diestro	Diestro	Proestro
	Diestro	Diestro	Metaestro	Diestro	Diestro	Proestro	Estro	Estro
	Metaestro	Metaestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Estro	Estro
	Diestro	Diestro	Metaestro	Estro	Estro	Diestro	Estro	Estro
	Metaestro	Metaestro	Estro	Estro	Diestro	Diestro	Diestro	Proestro
SHAM Metaestro/diestro	Estro	Diestro	Diestro	Metaestro	Proestro	Estro	Diestro	Diestro
	Diestro	Diestro	Diestro	Estro	Estro	Diestro	Diestro	Metaestro
	Diestro	Meastro	Proestro	Estro	Estro	Metaestro	Diestro	Diestro
	Diestro	Diestro	Proestro	Estro	Estro	Diestro	Diestro	Diestro
	Estro	Metaestro	Metaestro	Diestro	Estro	Estro	Metaestro	Diestro
	Diestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Proestro	Estro	Diestro	Diestro
	Metaestro	Diestro	Proestro	Estro	Diestro	Estro	Diestro	Diestro
OVX – Óleo	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Diestro	Metaestro
	Diestro	Metaestro						
	Diestro	Metaestro	Diestro	Metaestro	Diestro	Estro	Diestro	Metaestro
	Diestro							
	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Diestro
	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Metaestro
	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Diestro	Metaestro	Metaestro
OVX – E2 (2,5 µg/Kg)	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Estro	Estro	Estro
	Metaestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Estro	Estro
	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Diestro	Estro	Estro
	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Proestro	Proestro
	Diestro	Estro						
	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Diestro	Metaestro	Estro
	Destro	Diestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Diestro	Metaestro	Estro
OVX – E2 (2,5 µg/Kg) + LQB- 118 (30 mg/Kg)	Metaestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Metaestro	Metaestro	Metaestro	Metaestro
	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Metaestro	Estro	Metaestro
	Metaestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Metaestro	Metaestro	Estro	Estro
	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Estro	Metaestro
	Diestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Diestro	Metaestro	Diestro	Metaestro
	Diestro							
	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Diestro	Metaestro	Estro
Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro	Metaestro	Estro	Metaestro	

O dia D7 representa o dia anterior aos tratamentos com cipionato de estradiol (E2)

5.6. Análise do peso da hipófise e do útero após tratamento com veículo (óleo), cipionato de estradiol ou LQB-118

Os animais OVX tratados com cipionato de estradiol (2,5 µg/kg) tiveram o peso do útero aumentado em 115,4% ($143,7 \pm 10,5$ mg), quando comparado com o grupo OVX-óleo ($66,7 \pm 16,5$ mg). Já o grupo de animais tratados com cipionato de estradiol (2,5 µg/kg) + LQB-118 (30 mg/kg) teve o peso do útero reduzido em 29,4% ($101,4 \pm 8,4$ mg), quando comparado com o grupo OVX-E2 (Figura 23 B).

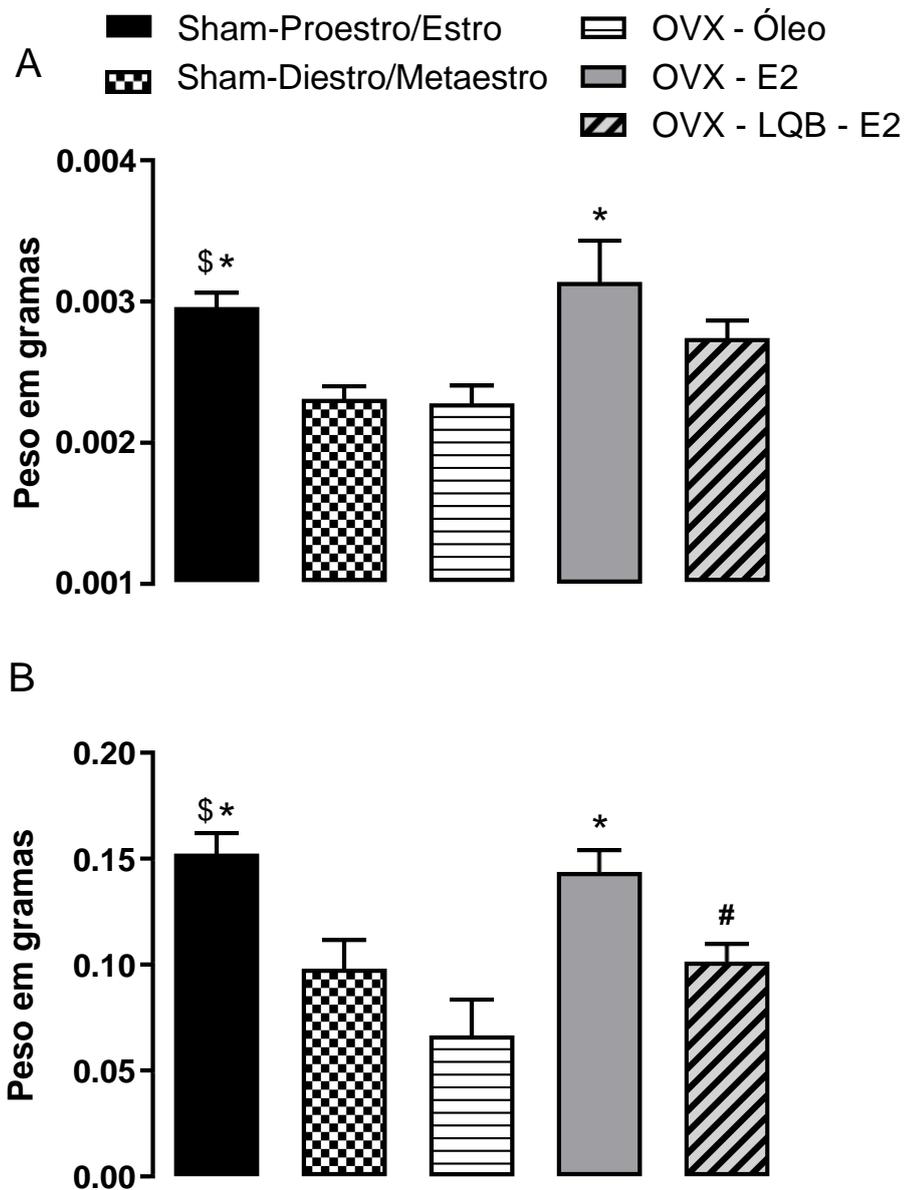


Figura 23. Efeito do tratamento com cipionato de estradiol (E2) e LQB-118 sobre o peso da hipófise (A) e sobre o peso do útero (B) em animais ovariectomizados. Uma semana após as cirurgias, animais falso operados (SHAM - divididos conforme ciclo estral) e ovariectomizados (OVX) foram tratados diariamente durante seis dias consecutivos com veículo (óleo), cipionato de estradiol (2,5 µg/kg) ou cipionato de estradiol (2,5 µg/kg) + LQB-118 (30 mg/kg). No sétimo dia após os tratamentos os animais foram eutanasiados e a hipófise e o útero foram coletados e pesados. Cada valor representa a média ± EPM (n = 6-7 animais por grupo). \$ (P < 0,05) indica diferença significativa quando comparado com o grupo Sham-Diestro/Metaestro. * (P < 0,05) indica diferença significativa quando comparado com o grupo OVX-Óleo. # (P < 0,05) indica diferença significativa quando comparado com o grupo OVX-E2, respectivamente.

5.7. Análise da toxicidade do LQB-118 na dose de 30 mg/kg

Após a coleta e pesagem do fígado, coração e rins direito e esquerdo, os animais OVX se apresentaram mais pesados que os SHAM, porém não houve diferenças entre os animais OVX tratados com óleo, cipionato de estradiol ou LQB-118 (Figura 24 A). Quanto ao peso do coração, fígado e rins (Figura 24 B, 24 C, 24 D e 24 E), não houve alteração significativa no peso corporal com o uso de LQB-118 de forma crônica.

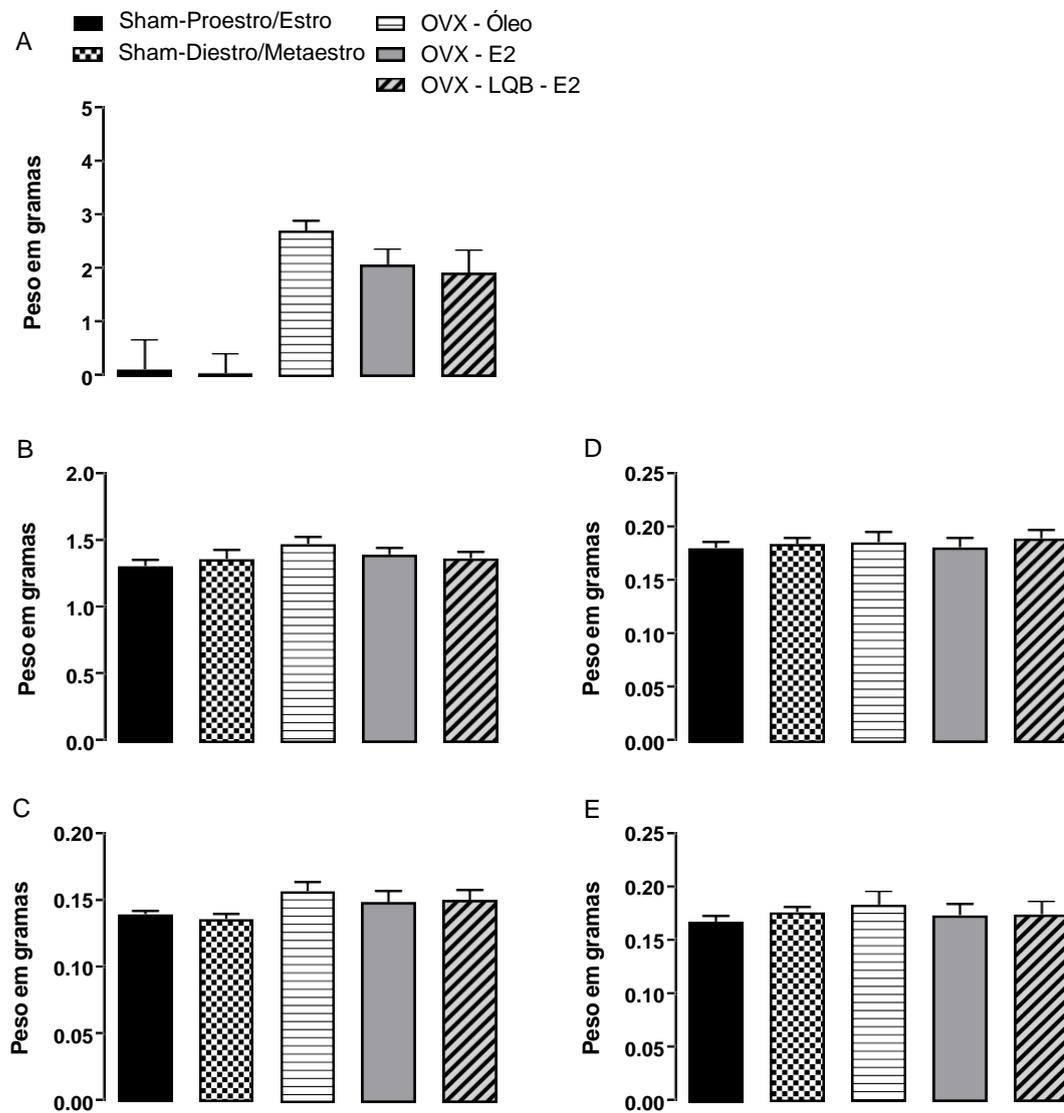


Figura 24. Efeito do tratamento com LQB-118 sobre o peso dos animais (A), fígado (B), coração (C), rim direito (D) e esquerdo (E) em camundongos ovariectomizados. Os animais foram tratados por 6 dias com veículo (óleo), cipionato de estradiol (E2; 2,5 µg/kg) e LQB-118 (30 mg/kg). Cada valor representa a média ± EPM do peso em gramas dos animais ou dos tecidos coletados (n = 6-7 animais por grupo).

5.8. Efeito do LQB-118 sobre a produção de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10) por macrófagos primários estimulados com LPS

Em cultura de macrófagos primários, o tratamento com LQB-118 em diferentes concentrações (1, 3, 10, 30 e 100 μ M) não induziu produção significativa de IL-6, TNF- α ou IL-10 quando comparados com o grupo veículo (Vei; DMSO 2% em RPMI 10% FBS). A estimulação desses macrófagos com LPS (5 ng/poço) induziu intensa produção das três citocinas avaliadas (Tabelas 4-6 e Figura 25).

A administração de concentrações crescentes de LQB-118 (1, 3, 10, 30 e 100 μ M) em cultura de macrófagos primários reduziu de forma concentração dependente a produção de IL-6 estimulada por LPS em 10,7% (1 μ M), 12,2% (3 μ M), 20,6% (10 μ M), 84,6% (30 μ M) e 99,0% (100 μ M), com diferença estatística a partir da concentração de 10 μ M de LQB-118, quando comparado ao grupo tratado com veículo e estimulado com LPS (Tabela 4 e Figura 25A).

Apenas a administração de LQB-118 na concentração de 100 μ M em cultura de macrófagos primários foi capaz de reduzir significativamente a produção de TNF- α estimulada por LPS em 72,6% quando comparado ao grupo tratado com veículo e estimulado com LPS (Tabela 5 e Figura 25B).

De forma semelhante ao observado para a IL-6, a administração de concentrações crescentes de LQB-118 (1, 3, 10, 30 e 100 μ M) em cultura de macrófagos primários também reduziu de forma concentração dependente a produção de IL-10 estimulada por LPS em 20,3% (1 μ M), 21,4% (3 μ M), 84,9% (10 μ M), 99,1% (30 μ M) e 97,6% (100 μ M), com diferença estatística em todas as concentrações de LQB-118 avaliadas, quando comparado ao grupo tratado com veículo e estimulado com LPS (Tabela 6 e Figura 25C).

Tabela 4. Valores referentes a dosagem de IL-6 nas diferentes concentrações utilizadas.

Grupos	Média	EPM	Valor de <i>p</i>	% de inibição
Veículo/Meio	ND	----	----	----
LQB-118 1 µM	83.03	83.03	>0,9999	----
LQB-118 3 µM	109.9	109.9	>0,9999	----
LQB-118 10 µM	ND	----	>0,9999	----
LQB-118 30 µM	ND	----	>0,9999	----
LQB-118 100 µM	ND	----	>0,9999	----
Veículo/LPS	1211	42.17	<0,0001*	----
LPS/LQB-118 1µM	1081	42.69	0,7252	10.7
LPS/LQB-118 3 µM	1063	15.2	0,5038	12.2
LPS/LQB-118 10 µM	961.6	118.1	0,0466 [#]	20.6
LPS/LQB-118 30 µM	186.8	65.26	<0,0001 [#]	84.6
LPS/LQB-118 100 µM	ND	----	<0,0001 [#]	99.0

ND (Não detectado)

* Diferente estatisticamente quando comparado ao grupo veículo/meio

[#] Diferente estatisticamente quando comparado ao grupo veículo/LPS

Tabela 5. Valores referentes a dosagem de TNF- α nas diferentes concentrações utilizadas.

Grupos	Média	EPM	Valor de <i>p</i>	% de inibição
Veículo/Meio	3.093	1.885	----	----
LQB-118 1 μM	10.88	4.187	>0,9999	----
LQB-118 3 μM	7.885	4.038	>0,9999	----
LQB-118 10 μM	2.44	1.207	>0,9999	----
LQB-118 30 μM	18.44	7.846	>0,9999	----
LQB-118 100 μM	41.67	25.25	0,1213	----
Veículo/LPS	223.3	19.67	<0,0001*	----
LPS/LQB-118 1μM	236.8	17.74	>0,9999	-5.9
LPS/LQB-118 3 μM	218.2	12.45	>0,9999	-2.4
LPS/LQB-118 10 μM	261.5	11.5	>0,9999	-16.9
LPS/LQB-118 30 μM	275.8	43.81	0,5731	-23.3
LPS/LQB-118 100 μM	61.34	7.54	0,0003#	72.6

ND (Não detectado)

* *Diferente estatisticamente quando comparado ao grupo veículo/meio*

Diferente estatisticamente quando comparado ao grupo veículo/LPS

Tabela 6. Valores referentes a dosagem de IL-10 nas diferentes concentrações utilizadas.

Grupos	Média	EPM	Valor de <i>p</i>	% de inibição
Veículo/Meio	218.4	93.62	----	----
LQB-118 1 μM	421.9	134.2	0,3122	----
LQB-118 3 μM	226.6	23.06	>0,9999	----
LQB-118 10 μM	20.2	15.2	0,3449	----
LQB-118 30 μM	ND	----	0,2592	----
LQB-118 100 μM	127.2	62.93	>0,9999	----
Veículo/LPS	2123	116.9	<0,0001*	----
LPS/LQB-118 1μM	1691	110.1	0,0036 [#]	20.3
LPS/LQB-118 3 μM	1669	75.05	0,0023 [#]	21.4
LPS/LQB-118 10 μM	320.5	46.27	<0,0001 [#]	84.9
LPS/LQB-118 30 μM	18.94	8.148	<0,0001 [#]	99.1
LPS/LQB-118 100 μM	51.63	14.46	<0,0001 [#]	97,6

ND (Não detectado)

* Diferente estatisticamente quando comparado ao grupo veículo/meio

[#] Diferente estatisticamente quando comparado ao grupo veículo/LPS

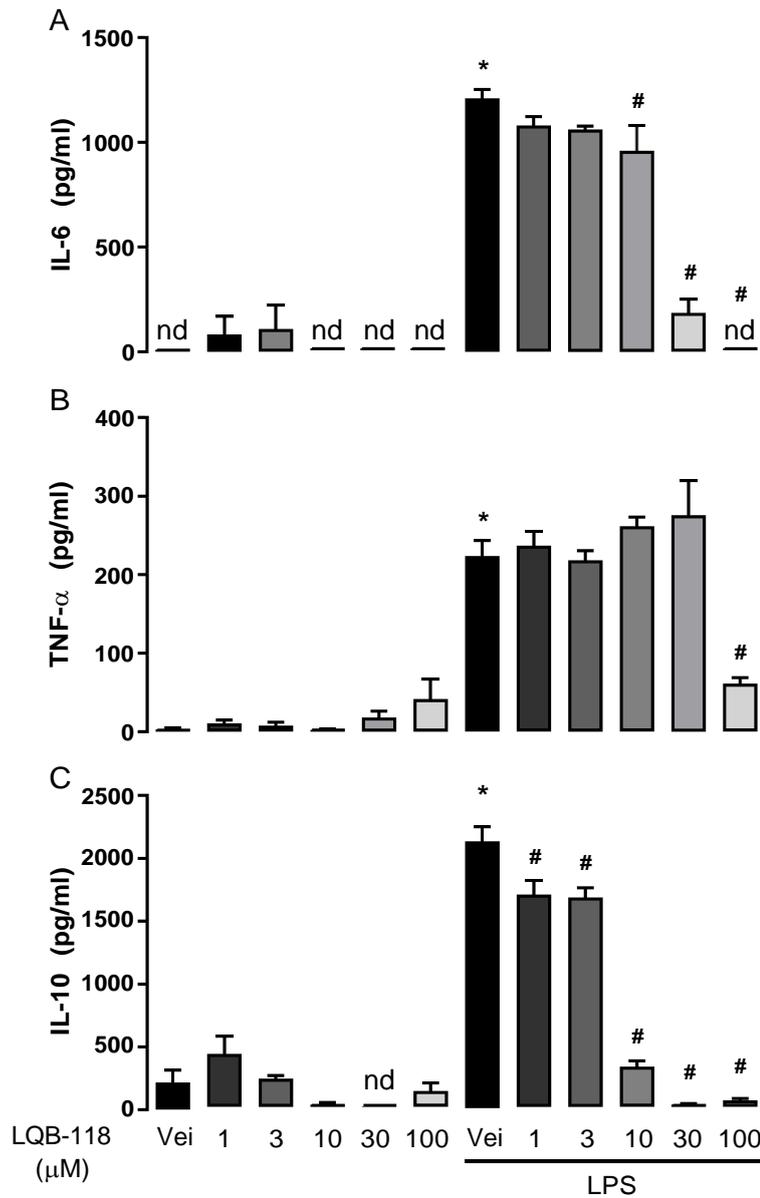


Figura 25. Efeito *in vitro* do LQB-118 sobre a produção das citocinas IL-6 (A), TNF- α (B) e IL-10 (C) em macrófagos primários estimulados com LPS. Os macrófagos primários (2×10^6 células/poço) foram tratados com veículo (Vei; DMSO 2% em meio RPMI 10% FBS) ou LQB-118 (1, 3, 10, 30 e 100 μ M) e estimulados com LPS (5 ng/poço) durante 24h. Em seguida o meio de cultura foi coletado para determinação da concentração das citocinas (IL-6, IL-10 e TNF- α) por ELISA. Cada valor representa a média \pm EPM da concentração de IL-6 (A), TNF- α (B) e IL-10 (C) no meio de cultura ($n = 4$). * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo tratado com veículo e estimulado com meio de cultura e # ($P < 0,05$) indica diferença significativa quando comparado com o grupo tratado com veículo e estimulado com LPS, no teste ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey.

5.9. Efeito do LQB-118 sobre a proliferação celular de macrófagos

Em cultura de macrófagos primários estimulados com LPS, o grupo tratado com veículo (DMSO 2% em RPMI 10% FBS) apresentou uma taxa de proliferação de macrófagos de $23,8 \pm 1,5\%$. O tratamento com LQB-118 (10 e 30 μM) reduziu a proliferação dos macrófagos em 41,1% ($14,0 \pm 0,9\%$) e 48,5% ($12,2 \pm 0,8\%$), respectivamente, quando comparado ao grupo tratado com veículo (Figura 26).

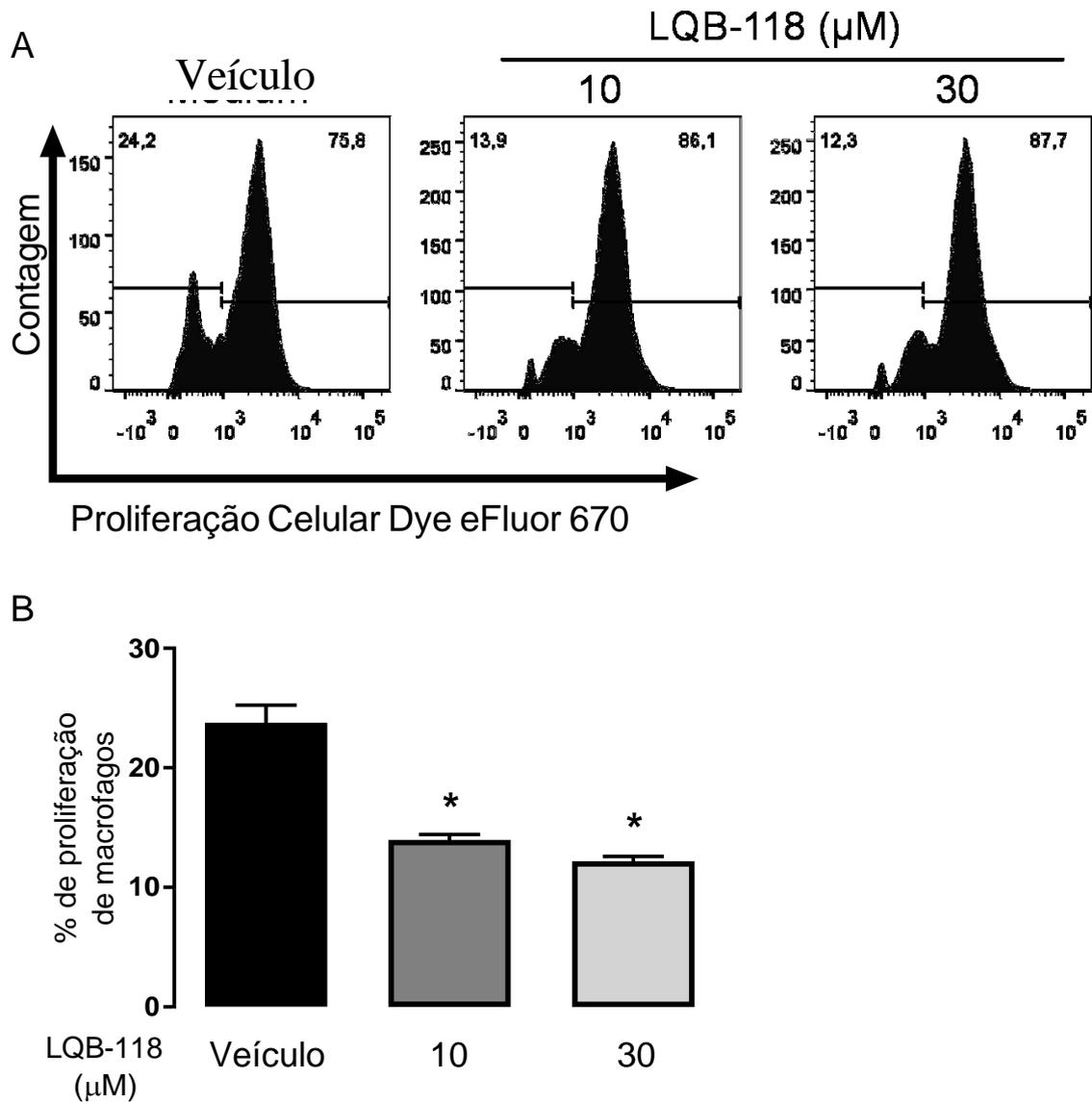


Figura 26. Efeito *in vitro* do LQB-118 sobre a proliferação de macrófagos primários estimulados com LPS. Os macrófagos primários (2×10^6 células/poço) foram marcados com Dye Eflur 670 por 15 min a 37°C . Em seguida, os macrófagos foram lavados, para retirar o excesso da probe, tratados com veículo (DMSO 2% em RPMI 10% FBS) ou LQB-118 (1, 3, 10, 30 e $100 \mu\text{M}$), estimulados com LPS (5 ng/poço) e encubados durante 48h com meio RPMI 10% FBS. A proliferação celular de macrófagos foi determinada por citômetro de fluxo. (A) Histograma representativo da proliferação de macrófagos primários nos grupos avaliados. (B) Média \pm EPM da porcentagem de proliferação de macrófagos ($n = 4$). * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo tratado com veículo e estimulado com LPS, no teste ANOVA seguido pelo pós-teste Tukey.

6. DISCUSSÃO

O potencial antineoplásico e antileishmania do LQB-118 já foi descrito na literatura [PERES et al, 2017] e, por ser proveniente da lausona, molécula que possui semelhanças estruturais com o lapachol, o potencial anti-inflamatório também tem sido investigado nos últimos anos [RIÇA et al, 2016; LIMA et al, 2020].

Além disso, pterocarpanos, como o precursor LQB-79, são isoflavonoides encontrados em muitas espécies da planta *Fabaceae* e possuem atividades biológicas antimicrobianas, anticancerígenas, anti-inflamatórias e antimalárias já reportadas na literatura, que poderiam contribuir para as atividades biológicas do LQB-118 [KIM et al, 2020].

Diante disso, o presente estudo analisou o perfil antinociceptivo e anti-inflamatório do LQB-118 em modelos experimentais de dor clássicos e de inflamação articular induzida por zimosan, bem como a sua relação com os receptores de estrogênio e seu possível mecanismo de ação analgésico e anti-inflamatório.

Doenças inflamatórias, como a artrite reumatoide, podem impactar de forma negativa a qualidade de vida dos indivíduos, uma vez que afeta o bem-estar físico e emocional. Nesses casos, há a presença de um quadro inflamatório progressivo com presença de intensas dores podendo causar danos às articulações. O tratamento utilizado tem como abjetivo principal preservar as articulações, através da redução da dor e da inflamação, porém não é totalmente eficaz e muitos são os efeitos adversos que podem levar a danos maiores. Dessa forma, é justificável a busca por novas moléculas que possam reverter esse quadro [LIN et al, 2020; WESTHOFF et al, 2008].

O conceito de dor pode ser definido através de experimentações sensitivas e emocionais desagradáveis associadas a uma lesão tecidual real ou potencial. Além disso, a dor é interpretada pelo sistema nervoso central mediante a mecanismos neurais que conduzem estímulos nocivos periféricos, detectados por nociceptores ali presentes (fibras amielinizadas do tipo C), até o cérebro, conferindo o termo nocicepção [TEIXEIRA, 2004; LE BARS et al, 2001].

O modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético é utilizado como ferramenta de triagem na avaliação de efeitos antinociceptivos de compostos por ser de fácil execução e possuir alta sensibilidade. Por esse motivo, esse modelo foi escolhido para avaliar o potencial antinociceptivo do LQB-118 [TEIXEIRA, 2004]. A administração de ácido acético por via intraperitoneal provoca um quadro de peritonite química aguda ao induzir a liberação

de mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α), prostaglandias, bradicinina e substância P, levando o animal a apresentar um comportamento nociceptivo motor estereotipado (contorção abdominal) caracterizado pelo estiramento abdominal acompanhado da extensão total de pelo menos uma das patas traseiras [LE BARS et al, 2001; PINHEIRO et al, 2011].

No presente estudo, a administração de LQB-118 (3, 10 e 30 mg/Kg) reduziu de forma dose-dependente o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético, sugerindo que esse composto possui um efeito antinociceptivo (Figura 17). Como esperado, a indometacina (controle positivo) também reduziu o número de contorções abdominais, validando o protocolo experimental.

Segundo Teixeira e colaboradores (2020), o modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético pode levar a resultados falso positivos em relação a drogas antinociceptivas e apresenta baixa especificidade, apesar de sua alta sensibilidade já comentada anteriormente. Dessa forma, o QLB-118 precisa ser avaliado por outros protocolos experimentais que evidenciem efeito antinociceptivo para confirmar este efeito.

Sendo assim, o efeito antinociceptivo do LQB-118 também foi avaliado teste da formalina. Nesse teste, o comportamento nociceptivo motor, caracterizado por lambe ou balançar a pata estimulada, é induzido no animal após a administração intraplantar de formalina (2,5%), uma solução aquosa de formaldeído diluído em salina 0,9% se divide em duas fases. Nos primeiros 5 minutos após a administração de formalina, ocorre a dor neurogênica (Fase 1), caracterizada pela ativação de fibras aferentes nociceptivas mielinizadas e não mielinizadas pela formalina [ABBOTT et al, 1995]. Já a dor inflamatória (Fase 2) ocorre entre o período de 15 a 30 minutos e está relacionada à sensibilização dos nociceptores através da produção e liberação de agentes inflamatórios (histamina, bradicinina, serotonina e prostaglandinas. Entre essas duas fases existe o período de quiescência, com 10 minutos, caracterizado pela ausência do comportamento nociceptivo motor [LE BARS et al, 2001].

Nesse modelo, os analgésicos opioides com ações centrais e periféricas agem na supressão do comportamento nociceptivo provocado pela administração intraplantar de formalina nas duas fases supracitadas. No entanto, fármacos anti-inflamatórios não esteroidais, como a indometacina, ou esteroidais, como a dexametasona, inibem apenas a dor inflamatória (fase 2) nesse experimento [BATISTA et al, 2016; GONÇALVES et al, 2008].

No teste da formalina, o LQB-118 não alterou o tempo de reatividade do comportamento nociceptivo durante a dor neurogênica (0-5 min), entretanto, reduziu a reatividade dos animais durante a dor inflamatória (15-30 min) (Figura 18). Esse conjunto de resultados corroboram com o indicativo de efeito antinociceptivo do LQB-118, evidenciado anteriormente pelo modelo das contorções abdominais, e sugerem o envolvimento de mecanismos anti-inflamatórios neste efeito. Corroborando com nossos dados, o LQB-118 foi capaz de reduzir a migração leucocitária e a síntese de mediadores inflamatórios em modelo murino de inflamação pulmonar induzida por LPS, evidenciando efeito anti-inflamatório deste composto [RIÇA et al, 2016]. Além disso, o LQB-118 inibiu o processo inflamatório induzido por zimosan em modelos in vivo [LIMA et al, 2020]. Como esperado, a indometacina (controle positivo) também reduziu apenas o comportamento nociceptivo durante a dor inflamatória, validando o protocolo experimental.

Para avaliar se há envolvimento de mecanismos centrais no efeito antinociceptivo do LQB-118, foi utilizado o teste da placa quente. Nesse modelo, a imposição de um estímulo térmico (55°C) sob as patas dos animais provoca uma resposta comportamental nociceptiva motora, caracterizada pelo reflexo de retirada das patas traseiras. Essa resposta reflexa é regulada por mecanismos espinais e supraespinhais e, por esse motivo, se tornou um modelo específico para a detecção de substâncias analgésicas com mecanismo central, como os opioides [LE BARS et al, 2001; SAHLEY et al, 1979].

No teste da placa quente, o LQB-118 não alterou de forma significativa o tempo de permanência dos animais sobre a placa quente quando comparado ao grupo veículo, indicando que o efeito antinociceptivo deste composto, evidenciado em experimentos anteriores, não envolve mecanismos centrais (Figura 19).

Em modelos experimentais que avaliam nocicepção, tais como os usados no presente estudo, a intensidade da nocicepção é determinada através da avaliação de comportamentos nociceptivos motores dos animais e, desta forma, drogas que alterem a coordenação motora dos animais podem apresentar resultados falso positivos nos modelos de nocicepção [DUNHAM et al, 1957; BOCCA et al, 2012].

Dessa forma, para avaliar a função motora dos animais tratados com LQB-118 foi utilizado o teste rota rod, uma ferramenta antiga empregada em estudos pré-clínicos que avaliam a função motora de roedores [LE BARS et al, 2001]. O teste rota rod avalia a permanência dos animais sobre uma barra rotatória, permitindo avaliar os parâmetros

envolvidos na função motora, tais como equilíbrio dinâmico, coordenação motora, planejamento motor, aprendizagem motora, condições físicas e neuromusculares gerais. Neste modelo, a alteração na coordenação motora é caracterizada por quedas mais rápidas que levam à diminuição do tempo de permanência sobre a barra rotatória [BOCCA et al, 2012].

Os dados obtidos para o teste rota rod sugerem que o LQB-118 não altera a coordenação motora dos animais. Como esperado, o grupo de controle positivo tratado com o Diazepam reduziu de forma significativa o tempo de permanência sobre a barra giratória, validando o experimento (Figura 20).

Diante dos resultados apresentados que evidenciam o efeito antinociceptivo do LQB-118 por mecanismos anti-inflamatórios, bem como dados na literatura que propõem um efeito anti-inflamatório para o LQB-118 em diferentes modelos experimentais [RIÇA et al, 2016; LIMA et al, 2020], foi investigado o efeito desse composto, em um modelo de artrite induzida por zimosan, sobre a hipernocicepção mecânica e a migração de leucócitos articulares.

Para avaliar o limiar nociceptivo do LQB-118 foi utilizado o método de Von Frey modificado por Pinto e colaboradores (2010). Esse método é utilizado para avaliar a hiperalgesia e a sensibilidade em estudos sobre tato e pressão para determinar parâmetros como limiar tátil e mecânico nociceptivo, e possui eficácia na detecção de efeito anti-hiperalgésico de compostos [LEAL, 2014]. Já a migração leucocitária foi avaliada a partir da contagem de leucócitos do lavado articular dos animais estimulados com zimosan.

Tendo em vista que o LQB-118 é uma molécula sintética, proposta a partir da hibridação entre uma porção pterocarpano e 1,4-naftoquinona lapachol, onde a lausona foi utilizada como precursor, estes compostos foram utilizados em doses equimolares a dose do LQB-118 neste protocolo experimental para avaliar se o LQB-118 apresentou potencial anti-inflamatório diferente da lausona ou do lapachol.

No modelo de artrite induzida por zimosan, os grupos tratados com lausona (17,3 mg/kg) ou lapachol (24 mg/kg) não apresentaram alteração significativa do limiar nociceptivo, porém o grupo tratado com LQB-118 (30 mg/kg) aumentou em 50,2% o limiar nociceptivo dos animais (Figura 21A), sugerindo que a pterocarpanquinona LB-118 possui ação antinociceptiva. Além disso, a migração de leucócitos foi significativamente reduzida pelos três compostos (LQB-118 em 62,3%; lapachol em 65,1% e lausona em 59,8%) em intensidades

similares (Figura 21A), o que sugere que os três compostos também possuem ação anti-inflamatória.

Entretanto, ainda é preciso utilizar modelos experimentais mais robustos de artrite, como o modelo experimental de artrite induzida por antígeno ou colágeno, para melhor avaliar o comportamento anti-inflamatório do LQB-118. Por questões de custo esses modelos não foram utilizados para o início da pesquisa.

Posteriormente, as fases do ciclo estral dos camundongos fêmeas foram analisadas. O ciclo estral divide-se nas fases proestro, estro, metaestro e diestro. Nas fases proestro e estro os níveis de estrógenos estão elevados, ocasionando aumento da parede uterina, diminuição da ingestão de alimentos e, conseqüentemente, perda de peso corporal. Nessa fase, também ocorre a inibição da liberação de LH e FSH pela hipófise, entretanto, há aumento da produção de prolactina devido à hipertrofia dos lactotrofos e aumento do peso da adenohipófise. Em contrapartida, o inverso é visto para animais que estão nas fases metaestro e diestro, ou que tiveram os ovários retirados (ovariectomia) [INOUE, 2021; AJAYI et al, 2020; MARCONDES, 2002].

Em nossos experimentos, como não houve mudança da fase estral de metaestro ou diestro para proestro ou estro, e não houve aumento do peso da hipófise e do útero, entende-se que o LQB-118 não foi capaz de ativar os receptores nucleares de estrógeno no útero dos animais (Tabela 2 e Figura 22, respectivamente).

Em contrapartida, para os animais OVX administrados com cipionato de estradiol (E2) juntamente com LQB-118 na dose de 30 mg/Kg, foi visto que as fases diestro proporcionadas pela presença do E2 foram revertidas a metaestero em 75% dos animais, o que sugere que o LQB-118 possa atuar como antagonista dos receptores de estrogênio no útero (Tabela 3). A redução do peso do útero vista na Figura 23 corrobora essa sugestão, porém esse estudo necessita de mais testes para melhor avaliar a interação do LQB-118 com os receptores de estrogênio.

O fígado é o órgão responsável pelo metabolismo de fármacos através de reação de biotransformação envolvendo enzimas que os convertem em moléculas menos ativas para que possam ser excretadas através da urina. Entretanto, as reações de biotransformação podem gerar metabólitos ativos ou tóxicos, por isso, essas reações são de extrema importância para entender a toxicidade das moléculas [KULKARNI, 2001].

Nesse contexto, a análise da toxicidade crônica do LQB-118 na dose de 30 mg/kg evidenciada na figura 24 não demonstrou mudanças no peso do fígado, rins e coração, bem como do peso corporal dos animais, sugerindo que a dose utilizada desse composto não provocou nenhum efeito tóxico nos animais estudados, contribuindo para a segurança do composto na dose utilizada.

Como já dito anteriormente, durante a progressão da artrite reumatoide as articulações sofrem o acúmulo de macrófagos, células T e células B, intensificando o processo inflamatório através da liberação de citocinas e autoanticorpos. Os macrófagos, quando assumem o fenótipo inflamatório M1, passam a produzir citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-10 constantemente. Entretanto, ao assumirem o fenótipo anti-inflamatório M2, produzem citocinas, com caráter anti-inflamatório, como a IL-10. Além disso, a presença cumulativa de macrófagos na região das articulações leva à gravidade da destruição óssea presente na doença [MORAIS et al, 2014; GIERUT et al, 2010].

Em nossos experimentos, a Figura 25 demonstra que a adição de LQB-118 em diferentes molaridades ao meio de cultura celular contendo macrófagos (2×10^6 células/poço) estimulados por LPS (5 ng/poço) que foram obtidos da medula óssea dos camundongos resultou na diminuição das concentrações da citocina inflamatória IL-6 na concentração de 30 μ M (Figura 25A) e diminuiu as concentrações da citocina anti-inflamatória IL-10 de forma dose-dependente (Figura 25C). De acordo com a Figura 25B, a adição do LQB-118 à cultura celular de macrófagos não diminuiu as concentrações de TNF- α de forma significativa. Entretanto, se o efeito redutor das concentrações de todas as citocinas avaliadas na concentração de 100 μ M de LQB-118 se deve à morte celular ainda precisa ser avaliado.

A viabilidade celular pode ser definida como a quantidade de células vivas em uma determinada população celular. A análise da proliferação celular é usada como indicador da sobrevivência ou morte celular em resposta a agentes químicos ou drogas. Assim, um agente químico é citotóxico quando apresenta toxicidade e provoca morte celular, e é citostático quando tem a propriedade de inibir o crescimento celular [ADAM et al, 2016].

Diante disso, o teste de proliferação celular é utilizado no desenvolvimento de novas moléculas. O efeito antiproliferativo do LQB-118 pode ser visto na Figura 26 A e B, onde houve redução da proliferação celular de macrófagos nas concentrações de 10 μ M (13,9 %) e 30 μ M (12,3 %) quando comparadas o controle positivo (24,2%). Para esse experimento foram utilizados macrófagos primários retirados da medula óssea dos animais. Esse tipo celular de

macrófago possui baixa taxa de proliferação, o que explicaria a baixa proliferação observada no grupo veículo (24,4%).

Dessa forma, é necessário que haja repetição do experimento em questão utilizando macrófagos de linhagens que possuam maiores taxas de proliferação, a fim de confirmar o possível efeito antiproliferativo do LQB-118 sobre os macrófagos.

7. CONCLUSÕES

No presente estudo, foi demonstrado que o LQB-118 possui efeito antinociceptivo em modelos experimentais murinos de nocicepção. Os resultados sugerem que o efeito antinociceptivo do LQB-118 envolve mecanismos anti-inflamatórios.

O presente estudo não evidenciou mudança nas fases do ciclo estral dos animais através da ativação dos receptores de estrogênio pelo LQB-118, nem toxicidade nas doses utilizadas. Além disso, demonstramos que o composto deve possuir efeito antiartrite, uma vez que foi capaz de reduzir a dor articular e a migração de leucócitos no modelo de artrite induzida por zimosan. Esses resultados estão alinhados a dados publicados na literatura que evidenciaram o efeito anti-inflamatório do LQB-118 em diferentes modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* [RIÇA et al., 2016; LIMA et al., 2020].

O LQB-118 foi capaz de diminuir a proliferação celular de macrófagos primários estimulados com LPS nas concentrações de 30 μ M e 100 μ M. Porém se o efeito de redução da proliferação celular do LQB-118 na concentração de 100 μ M se dá por morte celular ou pela inibição da enzima dihidroorato desidrogenase ainda precisa ser avaliado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT FV, FRANKLIN KBJ, WESTBROOK FR. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain**. 60(1):91-102, 1995. doi: 10.1016/0304-3959(94)00095-V;
- ADAN A, KIRAZ Y, BARAN Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Curr Pharm Biotechnol**. 17(14):1213-1221, 2016. doi: 10.2174/1389201017666160808160513;
- AJAYI AF, AKHIGBE RE. Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. **Fertil Res Pract**. 14;6:5, 2020. doi: 10.1186/s40738-020-00074-3;
- ALETAHA D, SMOLEN JS. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. **JAMA**. 2;320(13):1360-1372, 2018. doi: 10.1001/jama.2018.13103;
- AL-SALMAN H. 17 β -Estradiol hormone and interleukin 1- β change related to menopause in women with rheumatoid arthritis. **Asian J Pharm**. 13(2):110-118, 2019. doi: 10.22377/ajp.v13i02.3106;
- AREND WP, DAYER JM. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**. 38(2):151-60, 1995. doi: 10.1002/art.1780380202;
- ATTAR E, BULUN SE. Aromatase and Other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects. **Hum Reprod Update**. 12(1):49-56, 2006. doi: 10.1093/humupd/dmi034;
- BAUER ME. Accelerated immunosenescence in rheumatoid arthritis: impact on clinical progression. **Immun Ageing**. 9;17:6, 2020. doi: 10.1186/s12979-020-00178-w;
- BATISTA EKF, TRINDADE HI, LIRA SRS, MULLER JBBS, SILVA LLB, BATISTA MCS. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de *Luehea divaricata*. **Rev. Bras. Plantas Med**. 18(2):433–441, 2016. doi:10.1590/1983-084X/15_140;
- BARAKAT R, OAKLEY O, KIM H, JIN J, KO CJ. Extra-gonadal sites of estrogen biosynthesis and function. **BMB Rep**. 49(9):488-96, 2016. doi: 10.5483/bmbrep.2016.49.9.141;

- BOCCA W, RESENDE V, KO G. Teste De Rotarod : Contribuições No Estudo Das Doenças Neuromusculares , Das Síndromes Extrapiramidais e das ataxias cerebelares. **RESBCAL**. 1(2): 202–212, 2012;
- BRENNAN FM, MCINNES IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. **J Clin Invest**. 118(11):3537-45, 2008. doi: 10.1172/JCI36389;
- BRUNE K, PATRIGNANI P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drus. **J Pain Res**. 20(8):105-18, 2015. doi: 10.2147/JPR.S75160;
- BOISSIER MC, SEMERANO L, CHALLAL S, SAIDENBERG-KERMANACH N, FALGARONE G. Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction. **J Autoimmun**. 39(3):222-8, 2012. doi: 10.1016/j.jaut.2012.05.021;
- BURMESTER GR, POPE JE. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. **Lancet**. 10;389(10086):2338-2348, 2017. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31491-5;
- CALIGIONE SC. Assessing reproductive status/stages in mice. **Curr Protoc Neurosci**. A.4I.1-A.4I.8, 2009. doi: 10.1002/0471142301.nsa04is48;
- CAÑETE JD, PABLOS JL. Immunopathology of heumatoid arthritis. **Curr Top Med Chem**.13(6):705-11, 2013. doi: 10.2174/1568026611313060003;
- CHANG VC. Análise de marcadores de células/progenitoras em hipófises de modelos animais com hipopituitarismo. **USP/FM/DBD-347/13**. São Paulo. 1-135, 2013. doi: 10.11606/T.5.2013.tde-03122013-115816;
- COSTA CO. Estudos bieletroquímicos de quinonas. **Tese** (doutorado em Química e Biotecnologia) - Universidade Federal de Alagoas, p.53, 2011;
- CUI J, SHEN Y, LI R. Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain. **Trends Mol Med**, 19(3): 197-209, 2013. doi: 10.1016/j.molmed.2012.12.007;
- CUNNINGHAM M, GILKESON G. Estrogen receptors in immunity and autoimmunity. **Clin Rev Allergy Immunol**. 40(1): 66-73, 2011. doi: 10.1007/s12016-010-8203-5;

CURTIS JR, WESTFALL AO, ALLISON J, BIJLSMA JW, FREEMAN A, GEORGE V, KOVAC SH, SPETTELL CM, SAAG KG. Population-based assessment of adverse events associated with long-term glucocorticoid use. **Arthritis Rheum.** 15;55(3):420-6, 2006. doi: 10.1002/art.21984;

CUTOLO M. Macrophages as effectors of the immunoendocrinologic interactions in autoimmune rheumatic disease. **Ann NY Acad Sci.** 876: 32-41, 1999. doi: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb07620.x;

CUTOLO M, SULLI A, GHIORZO P, PIZZORNI C, CRAVIOTTO C, VILLAGGIO B. Anti-inflammatory effects of lefunomide on cultured synovial macrophages from patients with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis.** 62(4):297-302, 2003. doi: 10.1136/ard.62.4.297;

CUTOLO, M. LAHITA, GR. Estrogens and arthritis. **Rheum Dis Clin North Am.** 31(1): 19-27, 2005. doi: 10.1016/j.rdc.2004.10.001;

DEANE KD, DEMORUELLE MK, KELMENSEN LB, KUHN KA, NORRIS JM, HOLERS VM. Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis. **Best Pract Res Clin Rheumatol.** 31(1):3-18, 2017. doi: 10.1016/j.berh.2017.08.003;

DE SÁ BACELAR T, SILVA JA, COSTA RRP, RUMJANEK MV. The pterocarpanquinone LQB-118 induces apoptosis in tumor cells through the intrinsic pathway and the endoplasmic reticulum stress pathway. **Anti-cancer drugs.** 24(1): 73-83, 2013. doi: 10.1097/CAD.0b013e3283592da8;

DICK B, KOLLER C, HERZOG B, GREENBERG J, HELLSTROM GJW. The role of hormones in male sexual function. **Current Sexual Health Reports.** 12(4):1-12, 2020. doi:10.1007/s11930-020-00271-7;

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J Am Pharm Assoc.** 46(3):208-209, 1957. doi: 10.1002/jps.3030460322;

ELDER, RT; XU, X; GONG, H; FINNEGAN A; CHONG, ASF. The immunosuppressive metabolite of leflunomide A771726 affects murine T cells through two biochemical mechanisms. **J Immunol;** 159(1): 22-7, 1997. doi: 10.1021/bi952168g;

ENGLAND RB, THIELE MG, ANDERSON RD, MIKULS RT. Increased cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: mechanisms and implications. **The BMJ**. 361: 1-17, 2018. doi: 10.1136/bmj.k1036;

FRIES, J. Current treatment paradigms in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**. 39: 30-35, 2000. doi: 10.1093/oxfordjournals.rheumatology.a031492;

FRESNEDA, AM; MACLAREN, Z; WRIGHT, HL. Neutrophils in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lúpus erythematosus: same foe different M.O. **Frontiers in Immunology**. 12:649-693, 2021. doi: 10.3389/fimmu.2021.649693;

FUENTES, N; SILVEYRA, P. Estrogen receptor signaling mechanisms. **Adv Protein Chem Struct Biol**. 116:135-170, 2019. doi: 10.1016/bs.apcsb.2019.01.001.

GOMES SKR, PIRES AF, NOBRE CRM, MARCHI SFM, RICKLI KCJ. Impacto da artrite reumatoide no sistema público de saúde em Santa Catarina, Brasil: análise descritiva e de tendência temporal de 1996 a 2009; **Rev Bras Reumatol**. 57(3): 204-209, 2017. doi: 10.1016/j.rbre.2016.07.003;

GUÉRY JC. Estrogens and inflammatory autoimmune diseases. **Joint Bone Spine**. 79(6): 560-562, 2012. doi: 10.1016/j.jbspin.2012.09.010;

GIERUT A, PERLMAN H, POPE R. Innate Immunity and Rheumatoid Arthritis. **Rheum Dis Clin North Am**. 36(2):271-96, 2010. doi: 10.1016/j.rdc.2010.03.004;

GONÇALVES JC, OLIVEIRA FS, BENEDITO R, SOUSA DD, ALMEIDA DR, ARAUJO DMD. Antinociceptive activity of (-)-carvone: Evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. 31(5):1017–1020, 2008. doi:10.1248/BPB.31.1017;

INOUE S. Neural basis for estrous cycle-dependent control of female behaviors. **Neuroscience research**. 176: 1-8, 2022. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neures.2021.07.001>;

ISLANDER U, JOCHEMS C, LAGERQUIST KM, ELIA FH, CARLSTEN H. Estrogens in rheumatoid arthritis: the immune system and bone. **Mol and Cell Endocrinology**. 335:14-29, 2011. Doi: 10.1016/j.mce.2010.05.018;

JANSSON L, HOLMDAHL R. Estrogen-mediated immunosuppression in autoimmune diseases. **Inflammation Research**. 47(7):290-301. 1998. doi: 10.1007/s000110050332;

DA CUNHA-JÚNIOR EF, PACIENZA-LIMA W, RIBEIRO GA, NETTO CD, DO CANTO-CAVALHEIRO MM, DA SILVA AJ, COSTA PR, ROSSI-BERGMANN B, TORRES-SANTOS EC. Effectiveness of the local or oral delivery of the novel naphthopterocarpanquinone LQB-118 against cutaneous leishmaniasis. **J Antimicrob Chemother**. 66(7): 1555-9, 2011. doi: 10.1093/jac/dkr158;

LE BARS D, GOZARIU M, CADDEN SW. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev**. 53(4):597-652, 2001. doi: 10.4236/ss.2022.1312067;

KANASHIRO A, PESSINI AC, MACHADO RR, MALVAR DC, AGUIAR FA, SOARES DM, VALE ML, SOUZA GE. Characterization and pharmacological evaluation of febrile response on zymosan-induced arthritis in rats. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. 296(5):1631-1640, 2009. doi: 10.1152/ajpregu.90527.2008;

KAPLAN MJ. Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases. **Arthritis Research and Therapy**. 15(5): 219, 2013. doi: 10.1186/ar4325;

KEYSTONE EC, SCHORLEMMER HU, POPE C, ALLISON AC. Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement. **Arthritis rheumatology**. 20(7):1396-1401, 1977. doi: 10.1002/art.1780200714;

KIM S, JEONG YJ, PARK SH, PARK SC, LEE SB, LEE J, KIM SW, HA BK, KIM HS, KIM H, RYU YB, JEONG JC, KIM CY. The synergistic effect of co-treatment of methyl jasmonate and cyclodextrins on pterocarpan production in *Saphora flavescens* cell cultures. **Int. J. Mol. Sci**. 21:3944, 2020. doi:10.3390/ijms21113944;

KRAAN MC, REECE RJ, BARG EC, SMEETS TJM, FARNELL J, ROSENBERG R, VEALE DJ, BREEDVELD CF, EMERY P, TAK PP. Modulation of inflammation and metalloproteinase expression in synovial tissue by leflunomide and methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**. 4:1820-30, 2000. doi: 10.1002/1529-0131(200008)43:8<1820::AID-ANR18>3.0.CO;2-D;

KROTH FAE, FRANCO RR, BERLEZI ME, BERTOLO E. Association of rheumatoid arthritis and musculoskeletal discomforts in women in post-menopause. **Revista contexto & saúde**. 9(18):19-27, 2010.

KULKARNI PA. Role of biotransformation in conceptual toxicity of drugs and other chemicals. **Current Pharmaceutical Design**. 7(9): 833-857, 2011. doi: 10.2174/1381612013397735;

LEAL CP, SAKATA KR. Methods for the assessment of opioid-induced hyperalgesia in the perioperative period. **Rev Dor**. 15(4): 296-299, 2014. doi: 10.5935/1806-0013.20140064;

LIANG J, SHANG Y. Estrogen and cancer. **Annual Rev Physiol**. 75:225-240, 2013. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183708;

LIMA ÉA, CAVALCANTE-SILVA LHA, CARVALHO DCM, NETTO CD, COSTA PRR, RODRIGUES-MASCARENHAS S. The pterocarpanquinone LQB-118 inhibits inflammation triggered by zymosan in vivo and in vitro. **Int Immunopharmacol**. 83:106399, 2020. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106399;

LIN Y, ANZAGHE M, SCHULKE S. Update on the pathomechanism, diagnosis and treatment options for rheumatoid arthritis. **Cells**. 9(4): 880, 2020. doi: 10.3390/cells9040880;

LONG JA, EVANS HM. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. **Memories of University of California**. 6:1–148, 1922;

MARCONDES FK, BIANCHI JF, TANNO PA. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz J Biol**. 62(4A): 609-14, 2002. doi: 10.1590/s1519-69842002000400008;

MARTINO T, MAGALHÃES JCF, JUSTO AG, COELHO PGM, NETTO DC, COSTA RRP, SABINO CCK. The pterocarpanquinone LQB-118 inhibits tumor cell proliferation by downregulation of c-Myc and cyclins D1 and B1 mRNA and upregulation of p21 cell cycle inhibitor expression. **Bioorg Med Chem**. 22(12):3115-22, 2014. doi: 10.1016/j.bmc.2014.04.025;

MESQUITA JR, CRUVINEL MW, CAMARA SON, KALLAS GE, ANDRADE CEL. Autoimmune diseases in the TH17 era. **Braz J Med. Biol. Res**. 42(6):476-86, 2009. doi: 10.1590/s0100-879x2009000600002;

NESTAL DE MORAES G, CASTRO CP, SALUSTIANO EJ, DUMAS ML, COSTAS F, LAM EW, COSTA PR, MAIA RC. The pterocarpanquinone LQB-118 induces apoptosis in acute myeloid leukemia cell of distinct molecular subtypes and targets FoxO3a and FoxM1 transcription factors. **Int J Oncol.** 45(5): 1949-58, 2014. doi: 10.3892/ijo.2014.2615;

MURPHY et al. *Imunobiologia de Janeway*; tradução Ana Paula Franco Lambert, et al. 7. Ed. p. 1-800. Porto Alegre: **Artmed**, 2010;

NIELEN MM, VAN SCHAARDENBURG D, REESINK HW, VAN DE STADT RJ, VAN DER HORST-BRUINSMA IE, DE KONING MH, HABIBUW MR, VANDENBROUCKE JP, DIJKMANS BA. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. **Arthritis Rheum.** 50(2):380-6, 2004. doi: 10.1002/art.20018.

OLIVER SJ, BRAHN E. Combination therapy in rheumatoid arthritis: the animal model perspective. **J Rheumatol Suppl.** 44:56-60, 1996. doi: 10.1097/00002281-199505000-00008;

ORAY M, ABU SAMRA K, EBRAHIMIADIB N, MEESE H, FOSTER CS. Long-term side effects of glucocorticoids. **Expert Opinion on Drug Safety.** 15(4):457-465, 2016. doi: 10.1517/14740338.2016.1140743;

PERES RS, SANTOS GB, CECILIO NT, JABOR VA, NIEHUES M, TORRES BG, BUQUI G, SILVA CH, COSTA TD, LOPES NP, NONATO MC, RAMALHO FS, LOUZADA-JÚNIOR P, CUNHA TM, CUNHA FQ, EMERY FS, ALVES-FILHO JC. Lapachol, a compound targeting pyrimidine metabolism, ameliorates experimental autoimmune arthritis. **Arthritis Res Ther.** 19(1): 47, 2017. doi: 10.1186/s13075-017-1236-x;

PINHEIRO BG, SILVA AS, SOUZA GE, FIGUEIREDO JG, CUNHA FQ, LAHLOU S, DA SILVA JK, MAIA JG, SOUSA PJ. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. **J Ethnopharmacol.** 18;138(2):479-86, 2011. doi: 10.1016/j.jep.2011.09.037;

PINTO LG, CUNHA TM, VIEIRA SM, LEMOS HP, VERRI WA JR, CUNHA FQ, FERREIRA SH. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. **Pain.** 148(2):247-256, 2010. doi: 10.1016/j.pain.2009.11.006;

PINTO RV. Teste de rotarod: contribuições no estudo das doenças neuromusculares, das síndromes extrapiramidais e das ataxias cerebelares. **RESBCAL**. 1(2): 202-212, 2012. doi: vti-1919;

RIÇA IG, NETTO CD, RENNÓ MN, ABREU PA, COSTA PRR, DA SILVA AJM, CAVALCANTE MCM. Anti-inflammatory properties of pterocarpanquinone LQB-118 in mice. **Bioorg Med Chem**. 24(18): 4415-4423, 2016. doi: 10.1016/j.bmc.2016.07.046;

SATO M, VEIR JK, LEGARE M, LAPPIN RM. A retrospective study on the safety and efficacy of leflunomide in dogs. **J Vet Intern Med**. 31(5):1502-1507, 2017. doi: 10.1111/jvim.14810;

SAHLEY TL, BERNTSON GG. Antinociceptive effects of central and systemic administrations of nicotine in the rat. **Psychopharmacology (Berl)**. 65(3):279-83, 1979. doi: 10.1007/BF00492216;

SAMAVAT H, KURZER MS. Estrogen metabolism and breast cancer. **Cancer lett**, 356(2 Pt A): 231-243, 2015. doi: 10.1016/j.canlet.2014.04.018;

SATO M, SANO H, IWAKI D, KUDO K, KONISHI M, TAKAHASHI H, TAKAHASHI T, IMAIZUMI H, ASAI Y, KUROKI Y. Direct binding of Toll-Likereceptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF- κ B activation and TNF- α secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. **Journal of Immunology**, 171(1):417-425, 2003. doi: 10.4049/jimmunol.171.1.417;

SCHNEIDER AH, KANASHIRO A, DUTRA SGV, SOUZA RDN, VERAS FP, CUNHA FQ, ULLOA L, MECAWI AS, REIS LC, MALVAR DDC. Estradiol replacement therapy regulates innate immune response in ovariectomized arthritic mice. **Int Immunopharmacol**. 72:504-510, 2019. doi: 10.1016/j.intimp.2019.04.048;

SCOTT IC, STEER S, LEWIS CM, COPE AP. Precipitating and perpetuating factors of rheumatoid arthritis immunopathology: linking the triad of genetic predisposition, environmental risk factors and autoimmunity to disease pathogenesis. **Best Pract. Res. Clin. Rheumatol**. 25(4):447-68, 2011. doi: 10.1016/j.berh.2011.10.010;

SHAH L, ELSHAIKH AO, LEE R, JOY MATHEW C, JOSE MT, CANCAREVIC I. Do menopause and aging affect the onset and progression of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus? **Cureus**. 14;12(10):e10944, 2020. doi: 10.7759/cureus.10944;

SILMAN A, KAY A, BRENNAN P. Timing of pregnancy in relation to the onset of rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatology**. 35(2): 152-155, 1992. doi: 10.1002/art.1780350205;

SILVA GD, ANDRADE EIG, CHERCHIGLIA ML, ALMEIDA AM, JUNIOR AAG, ACURCIO FAA. Perfil de gastos com o tratamento da artrite reumatoide para pacientes do sistema único de saúde em Minas Gerais, Brasil, de 2008 a 2013. **Ciênc saúde coletiva**. 23(4): 1241-1253, 2018. doi: 10.1590/1413-81232018234.16352016;

SILVA AMP, PAIVA SRP, FIGUEIREDO MR, KAPLAN MAC. Atividade biológicas de naftoquinonas de espécies de bignomiaceae. **Revista Fitos** (7): 207-215, 2012. doi: 10.32712/2446-4775.2012.154;

SIMPSON ER, SUSAN RD. Minireview: Aromatase and the regulation os estrogen biosynthesis – some new perspectives. **Endocrinology**. 12(11): 14589-14594, 2001. doi: 10.1210/endo.142.11.8547;

SOKAL RR, ROHIF FI. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. **San Francisco: W.H. Freeman**, p. 776, 1981. doi: doi.org/10.1002/iroh.19710560218;

SMOLEN JS, ALETAHA D, MCINNES IB. Rheumatoid arthritis. **Lancet**. 388(10055): 2023-2038, 2016. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30173-8;

TEIXEIRA FM, COELHO MN, JOSÉ-CHAGAS FDN, MALVAR DDC, KANASHIRO A, CUNHA FQ, MACHADO VIANNA-FILHO MD, DA CUNHA PINTO A, VANDERLINDE FA, COSTA SS. Oral treatments with a favonoid-enriched fraction from *Cecropia hololeuca* and with rutin reduce articular pain and inflammation in murine zymosan-induced arthritis. **J Ethnopharmacol**. 5:112841, 2020. doi: 10.1016/j.jep.2020.112841;

TEIXEIRA MJ. Mecanismos de Ocorrência de Dor. Mechanisms of Pain. **Revista de Medicina (FMUSP)**. 83(3–4):69–113, 2004.;

THURLINGS RM, VOS K, WIJBRANDTS CA, ZWINDERMAN AH, GERLAG DM, TAK PP. Synovial tissue response to rituximab: mechanism of action and identification of biomarkers of response. **Ann Rheum Dis.** 67(7):917-25, 2008. doi: 10.1136/ard.2007.080960;

VAN DER WOUDE D, RANTAPÄÄ-DAHLQVIST S, IOAN-FACSINAY A, ONNEKINK C, SCHWARTE CM, VERPOORT KN, DRIJFHOUT JW, HUIZINGA TW, TOES RE, PRUIJN GJ. Epitope spreading of the anti-citrullinated protein anti-body response occurs before disease onset and is associated with the disease course of early arthritis. **Ann Rheum Dis.** 69(8):1554-61, 2010. doi: 10.1136/ard.2009.124537;

YOSHIDA Y, TANAKA T. Interleukin 6 and rheumatoid arthritis. **Biomed Res. Int.** 2014: 698313, 2014. doi: 10.1155/2014/698313;

WALMER DK, WRONA MA, GUGHES CL, NELSON KG. Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. **Endocrinol.** 131:1457-1466, 1992. doi: 10.1210/endo.131.3.1505477

WANDERLEY CW, COLÓN DF, LUIZ JPM, OLIVEIRA FF, VIACAVA PR, LEITE CA, PEREIRA JA, SILVA CM, SILVA CR, SILVA RL, SPECK-HERNANDEZ CA, MOTA JM, ALVES-FILHO JC, LIMA-JUNIOR RC, CUNHA TM, CUNHA FQ. Paclitaxel reduces tumor growth by reprogramming tumor-associated macrophages to an M profile in a TLR4-dependent manner. **Cancer Res.** 78(20): 5891-5900, 2018. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3480;

WANG W, ZHOU H, LIU L. The role of chinese herbal medicine in the management of adverse drug reactions of leflunomide in treating rheumatoid arthritis. **Phytomedicine.** 68:153136, 2019. doi: 10.1016/j.phymed.2019.153136;

WEINSTEIN RS. Glucocorticoid-induced osteoporosis and osteonecrosis. **Endocrinol Metab Clin North Am.** 41(3):595-611, 2012. doi: 10.1016/j.ecl.2012.04.004;

WESTHOFF G, BUTTGEREIT F, GROMNICA-IHLE E, ZINK A. Morning stiffness and its influence on early retirement in patients with recent onset rheumatoid arthritis. **Rheumatology.** 47: 980-984, 2008. doi: 10.1093/rheumatology/ken137;

WEYAND CM, GORONZY JJ. The immunology of rheumatoid arthritis. **Nature immunology.** 22(1): 10-18, 2021. doi: 10.1038/s41590-020-00816-x;

ZIMMERMANN M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**. 16(2): 109-10,1983. doi: 10.1016/0304-3959(83)90201-4.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA/IB

Certificamos que o projeto Intitulado “Avaliação da ação agonista do LQB-118 sobre receptores nucleares de estrógeno α e β e seu potencial anti-inflamatório em modelo murino de artrite induzida por zimosan.” protocolo CEUA nº 019/2017 processo nº 23083.32290/2017-31 sob responsabilidade de David do Carmo Malvar que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfiloVertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei no. 11794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto no. 6899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA-ICBS-UFRRJ), em reunião de 18 de abril de 2018.

Vigência do Projeto	18.04.2018 a 18.04.2020
Espécie/linhagem	<i>Mus musculus/Swiss</i>
Peso/idade	30-40g/60-90 dias
No. De animais	132
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas/ICBS/UFRRJ

We certify that the protocol CEUA no. 019/2017, entitled “Evaluation of the agonist action of LQB-118 on nuclear estrogen receptors α and β and its anti-inflammatory potential in a murine model of zymosan-induced arthritis” is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Nacional Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Institute of Biological Sciences and Heathy of Federal Rural University of Rio de Janeiro in 18 of April of 2018.

Antonia Kecya França Moita
Costa Coordenador CEUA-ICBS-
UFRRJ