

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

TESE

**Avaliação farmacológica das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do
composto híbrido de Diclofenaco**

JOYCE MATTOS DE OLIVEIRA

2022



**FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**Avaliação farmacológica das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do
composto híbrido de Diclofenaco**

JOYCE MATTOS DE OLIVEIRA

Sob a orientação do professor
Dr. Bruno Guimarães Marinho

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de doutora em
Fisiologia e Farmacologia, no Curso de
Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas.

Seropédica, RJ
Março, 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central/Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo (a) autor(a)

Mattos de Oliveira, Joyce, 1985-

MO48aa Avaliação farmacológica das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do composto híbrido Diclofenaco / Joyce Mattos de Oliveira. - Rio de Janeiro, 2022.

133 f.: il.

Orientador: Bruno Guimarães Marinho.

Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2022.

1. Nocicepção. 2. Sistema opioide. 3. Inflamação. 4. Migração leucocitária. I. Guimarães Marinho, Bruno, 1978-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas III. Título.



TERMO N° 265/2022 - DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)

Nº do Protocolo: 23083.016472/2022-21

Seropédica-RJ, 15 de março de 2022.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

JOYCE MATTOS DE OLIVEIRA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor **em Ciências Fisiológicas** no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas área de Concentração em: Fisiologia e Farmacologia.

TESE APROVADA EM 11/03/2022

Membros da Banca:

Prof Dr Bruno Guimarães Marinho (Membro Interno, Orientador - UFRRJ)

Prof Dr Fábio Fagundes da Rocha (Membro Interno - UFRRJ)

Prof Dr Wellington da Silva Côrtes (Membro Interno - UFRRJ)

Profa Dra Beatriz Ferreira de Carvalho Patrício (Membro Externo - UNIRIO)

Prof Dr Thiago Roberto Lima Romero (Membro Externo - UFMG)

Documento não acessível publicamente

(Assinado digitalmente em 15/03/2022 12:20)

BRUNO GUIMARAES MARINHO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)
Matricula: ###740#3

(Assinado digitalmente em 15/03/2022 12:31)

FABIO FAGUNDES DA ROCHA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)
Matricula: ###195#7

(Assinado digitalmente em 16/03/2022 15:25)

WELLINGTON DA SILVA CORTES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)
Matricula: ###69#0

(Assinado digitalmente em 15/03/2022 14:16)

THIAGO ROBERTO LIMA ROMERO

ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.876-##

(Assinado digitalmente em 15/03/2022 13:34)
BEATRIZ FERREIRA DE CARVALHO PATRICIO

ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.057-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **265**, ano: **2022**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **15/03/2022** e o código de verificação: **d8fe65c645**

AGRADECIMENTOS

Antes de quaisquer agradecimentos, expresso minha eterna gratidão a Deus, inteligência suprema, que permitiu que eu chegassem até aqui. Aos meus guias espirituais que iluminaram minhas ideias, me orientaram nos momentos de dúvida e me sustentaram nas dificuldades.

A minha mãe, Penha, que sempre me ajudou a prosseguir, muitas vezes trabalhando a mais para que eu pudesse ter mais tempo de dedicação. Te amo, mãe.

Ao meu pai (*in memoriam*) Beto. Ele não está ao meu lado fisicamente, mas sei que está orgulhoso por eu ter a oportunidade de prosseguir nos estudos, algo que ele não teve. Sei o quanto o senhor gostaria de me ver com esse título. Obrigada por todos os momentos e incentivo. Te amo pra sempre!

Ao meu noivo Pierre, que abraçou comigo essa loucura que é terminar a pós. Por me falar as palavras necessárias quando eu mais precisava. Seja o que eu queria ouvir ou não. Gratidão por isso. Mais uma etapa, amor...

A minha linda irmã coruja Hellen e o meu cunhado Everton, que não escondem o orgulho e felicidade pela minha conquista. Conquista essa que divido com vocês. Obrigada por toda a ajuda desde o início da minha caminhada na pós-graduação.

Ao meu vovô Egydio, que sempre acompanhou a minha correria e sempre torceu por mim.

Ao meu orientador, Prof.^o Dr^o. Bruno Marinho, por toda confiança depositada em mim durante esses anos. Só tenho gratidão por todas as vezes que você me incentivou, ainda no início do doutorado e nesse período atual difícil de pandemia e grandes perdas. Obrigada por me ajudar quando eu desenvolvi uma hiper reação alérgica aos nossos queridos animais de laboratório. Gratidão por tudo isso e principalmente pelos ensinamentos de vida e ensinamentos científicos transmitidos.

A minha família, especialmente a tia Cristina, tia Selma, tia Simone, Érica e Flávia, que sempre perguntavam como estava a loucura do doutorado e sempre tinham uma palavra de ânimo para compartilhar.

Ao pessoal do laboratório, obrigada por toda a ajuda nos experimentos, seja com a mão na massa ou apenas aquela companhia enquanto esperava o tempo dos experimentos. Risadas garantidas e alívio nos momentos mais tensos.

Aos professores do departamento, por compartilharem o conhecimento ímpar de cada um de vocês. Hoje, mais madura academicamente, consigo ver o quanto as broncas e chamadas de atenção eram gestos de carinho e cuidado. Obrigada pelas broncas!

Agradeço a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, minha querida Rural, e a todos os integrantes do Programa de Ciências Fisiológicas.

Por fim, mas não menos importante, aos animais, que tem grande importância para a pesquisa científica e para a conclusão deste trabalho. Toda minha ética profissional e todo meu respeito a vocês.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. E à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte durante os anos de pesquisa.

RESUMO

DE OLIVEIRA, Joyce Mattos. **Avaliação farmacológica das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do composto híbrido: (\pm -cis) (6-etil-tetraidro-2H-pirano-2-il)metil 2-(2-(2,6-diclorofenilamino) fenil acetato.** 2022. 128 p. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas e Farmacologia). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

Os analgésicos estão entre uma das classes de medicamentos mais utilizadas para o tratamento ou alívio de situações dolorosas e inflamatórias. Porém, devido ao grande número de efeitos colaterais e muitas vezes da ineficácia dessas drogas, se faz necessária a busca por novos fármacos. Quando um novo composto apresenta respostas promissoras, a conjugação de estruturas bioativas específicas em uma única molécula pode ser realizada através da hibridação molecular. Uma saída eficaz de planejar racionalmente novos fármacos que tenha ação sinérgica e/ou diminuição de efeitos adversos. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antinociceptiva aguda e crônica e anti-inflamatória do novo composto híbrido: (\pm -cis) (6-etil-tetraidro-2H-pirano-2-il)metil 2-(2-(2,6-diclorofenilamino) fenil acetato (LS26), sintetizado a partir da hibridação do composto $[(\pm)\text{-Cis})(6\text{-etil-Tetrahidro-2H-Pirano-2-il}]\text{Metanol}$ (LS20) e o anti-inflamatório não-esteroidal diclofenaco de sódio. O composto LS26 foi administrado pela via oral em todos os animais e em todos os modelos experimentais. De acordo com os resultados, o composto possui atividade antinociceptiva aguda observada nos modelos de contorções abdominais, formalina (ambas as fases) e imersão da cauda em água quente. O mecanismo de ação do composto envolve o sistema opioide, tendo em vista que a aplicação de antagonistas seletivos opioídes foram capazes de reduzir o efeito antinociceptivo do composto híbrido. A via NO/GMPc/K⁺ATP também é um dos mecanismos de ação do LS26 devido a redução do efeito antinociceptivo com a administração prévia de L-NAME, ODQ e glibenclamida. A atividade antinociceptiva aguda e crônica sobre a alodinia induzida pela constrição crônica do nervo ciático, também foi observada no modelo de dor neuropática devido a inibição da produção de IL-1 β e IL-6 no nervo ciático. O composto não apresenta relação entre o efeito antinociceptivo e um déficit motor, de acordo com os resultados do teste de rota-rod. Quanto a atividade anti-inflamatória, o composto LS26 apresentou atividade anti-edematógena, pois foi capaz de reduzir a migração leucocitária e a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IL-6 e aumentar a síntese da citocina anti-inflamatória IL-10 no modelo da bolsa de ar subcutânea. O composto apresentou seletividade para a inibição da COX-2 observada na avaliação *in vitro*. No teste toxicológico, o composto não apresentou alterações agudas e subcrônica nas avaliações microscópicas e macroscópicas. Esses resultados indicam atividade antinociceptiva através dos receptores opioídes e a via NO/GMPc/K⁺ATP, além de atividade anti-inflamatória com inibição da migração leucocitária, redução dos níveis de IL-1 β , TNF- α e IL-6, aumento de IL-10 e atividade inibitória seletiva sobre a COX-2. Podemos então sugerir que o

composto híbrido LS26 possui efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório além de ser atóxico em modelos animais.

Palavras-chave: nocicepção, sistema opioide, inflamação, migração leucocitária.

ABSTRACT

DE OLIVEIRA, Joyce Mattos. **Pharmacological evaluation of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of the hybrid compound: (\pm -cis) (6-ethyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yl)methyl 2-(2,6-dichlorophenylamino) phenyl acetate.** 2022. 128 p. Thesis (Doctorate of Physiological Sciences, Pharmacology). Institute of Biological Sciences and Health, Departament of Physiological Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Analgesics are among one of the most commonly used drug classes for the treatment or relief of painful and inflammatory conditions. However, due to the large number of side effects and often the ineffectiveness of these drugs, it is necessary to search for new drugs. When a new compound shows promising responses, the conjugation of specific bioactive structures in a single molecule can be performed through molecular hybridization. An effective way to rationally plan new drugs that have synergistic action and/or decrease adverse effects. The aim of this study was to evaluate the acute and chronic antinociceptive and anti-inflammatory activity of the new hybrid compound: (\pm -cis) (6-ethyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yl)methyl 2-(2, 6-dichlorophenylamino) phenyl acetate (LS26), synthesized from the hybridization of the compound $[(\pm\text{-})\text{Cys}](6\text{-ethyl-Tetrahydro-2H-Pyran-2-yl}]\text{Methanol}$ (LS20) and the non-inflammatory anti-inflammatory steroid diclofenac sodium. The compound LS26 was administered orally in all animals and in all experimental models. According to the results, the compound has acute antinociceptive activity observed in the abdominal writhing models, formalin (both phases) and immersion of the tail in hot water. The mechanism of action of the compound involves the opioid system, considering that the application of selective opioid antagonists were able to reduce the antinociceptive effect of the hybrid compound. The NO/cGMP/K⁺ATP pathway is also one of the mechanisms of action of LS26 due to the reduction of the antinociceptive effect with the administration prior L-NAME, ODQ and glibenclamide. Acute and chronic antinociceptive activity on allodynia induced by chronic constriction of the sciatic nerve was also observed in the neuropathic pain model due to inhibition of IL-1 β and IL-6 production in the sciatic nerve. The compound shows no relationship between the antinociceptive effect and a motor deficit, according to the results of the rota-rod test. As for anti-inflammatory activity, the LS26 compound showed anti-edematogenic activity, as it was able to reduce leukocyte migration and the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , TNF- α and IL-6 and increase cytokine synthesis anti-inflammatory IL-10 in the subcutaneous air bag model. The compound showed selectivity for COX-2 inhibition observed in in vitro evaluation. In the toxicological test, the compound did not present acute and subchronic alterations in the microscopic and macroscopic evaluations. These results indicate antinociceptive activity through opioid receptors and the

NO/cGMP/K⁺ATP pathway, in addition to anti-inflammatory activity with inhibition of leukocyte migration, reduction of IL-1 β , TNF- α and IL-6 levels, increase of IL-10 and selective inhibitory activity on COX-2. We can therefore suggest that the hybrid compound LS26 has antinociceptive and anti-inflammatory effects in addition to being non-toxic in animal models.

Keywords: nociception, opioid system, inflammation, leukocyte migration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais componentes da resposta inflamatória.....	22
Figura 2: Componentes da inflamação.....	24
Figura 3: Esquema geral da resposta inflamatória.	25
Figura 4: Mecanismo de migração de leucócitos através dos vasos sanguíneos e o papel das citocinas na inflamação.	28
Figura 5: Tipos de fibras sensoriais.....	31
Figura 6: Via de transmissão da dor.....	35
Figura 7: Mediadores periféricos da inflamação.....	37
Figura 8: Via do óxido nítrico na nocicepção.....	40
Figura 9:Via do óxido nítrico na antinocicepção	41
Figura 10: Figura química do composto (\pm -cis) (6-etyl-tetraidro-2H-pirano-2-il)metil 2-(2-(2,6-diclorofenilamino) fenil acetato (LS26)	45
Figura 11: Modelo Experimental de Contorção Abdominal induzidas por Ácido Acético	51
Figura 12: Protocolo do Modelo experimental de Formalina	51
Figura 13: Modelo experimental de Imersão a água quente	52
Figura 14: Modelo experimental de Nocicepção induzida por Glutamato	53
Figura 15: Constrição crônica do nervo ciático	54
Figura 16: Protocolo experimental do modelo de Von Frey.....	55
Figura 17: Modelo experimental de Rotarod	56
Figura 18: Modelo experimental de Edema de Pata	57
Figura 19: Protocolo experimental do modelo de Permeabilidade Vascular	58
Figura 20: Modelo experimental de bolsa de ar subcutânea	59
Figura 21: Protocolo de avaliação toxicológica e subcrônica	60
Figura 22:Efeito antinociceptivo do composto LS26 no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.	62

Figura 23: Curvas dose-resposta do diclofenaco (A), do composto LS20 (B) e do composto LS26 (C), no modelo contorções abdominais induzidas por ácido acético, e cálculo de DI50. A análise estatística foi feita através da regressão não-linear.	64
Figura 24: : Efeito antinociceptivo do composto LS26 no modelo de formalina.	65
Figura 25: Efeito antinociceptivo do composto LS26 no modelo de imersão da cauda em água quente	66
Figura 26: Influência da administração de naloxona (N),), N-nitro-arginina-L-metil éster (L-NAME), glibenclamida (Gli) e 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one ODQ sobre o efeito antinociceptivo do LS26 (10 μ mol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente	68
Figura 27: Influência da administração prévia de metilnaltrexona (MN), Naltrindol (Nal) e Nor-Binaltorfimina (Nor) sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto LS26 (10 μ mol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente	70
Figura 28: Influência da administração prévia de Mecamilamina (Mec) Atropina (Atro), Ondasetron (Ond) e 4-cloro-DLfenilalanina (PCPA) sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto LS26 (10 μ mol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente	72
Figura 29: Efeitos de LS26 administrado por via oral no tempo de lambedura induzido por glutamato (175 nmol) por via intratecal.	73
Figura 30: Avaliação da atividade antinociceptiva aguda no modelo de constrição crônica do nervo ciático através do modelo de von frey.....	74
Figura 31: Avaliação da atividade antinociceptiva crônica no modelo de constrição crônica do nervo ciático através do modelo de von frey.....	76
Figura 32: Efeito do composto LS26 na quantificação de citocinas (A- IL-1 β e B- IL-6) a partir de segmento do nervo ciático.	77
Figura 33: Avaliação do composto LS26 no teste de rotarod.	78
Figura 34: Avaliação do composto LS26 no modelo de edema de pata	79
Figura 35: Efeito do composto LS26 no modelo de permeabilidade vascular induzido pela administração intradérmica de histamina (A) e serotonina (B).....	81
Figura 36: : Efeito do composto LS26 na quantificação de leucócitos totais.	83
Figura 37: : Efeito do composto LS26 na quantificação de citocinas (A- TNF- α , B- IL-1 β e C- IL-6) a partir do teste bolsa de ar subcutâneo	84

Figura 38: Efeito do LS26 na quantificação de citocinas (A- IL-4, B-INF- γ , C- IL-10) e óxido nítrico (D) a partir do teste bolsa de ar subcutâneo.....	85
Figura 39: - Efeito de concentrações crescentes de LS26 sobre a atividade enzimática de (A) COX-1 e (B) COX-2	88
Figura 40: Análise microscópica dos órgãos.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Subtipos de fibras nervosas A δ e C	32
Tabela 2: Localização dos receptores opioides	42
Tabela 3: Grupos experimentais e seus respectivos tratamentos e procedimentos realizados	54
Tabela 4: Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético	63
Tabela 5: Tempos de lambedura, em segundos, no modelo de formalina	65
Tabela 6: Tempos de latência, em segundos, no modelo de imersão da cauda em água quente.	67
Tabela 7: Avaliação da influência da administração prévia de Naloxona, L-NAME, Glibenclamida e.....	69
Tabela 8: Avaliação da influência da administração prévia de Metilnaltrexona, Natrindol e Nor-Binaltorfimina sobre os tempos de latência induzidos pelo LS26 no modelo de imersão da cauda em água quente.....	70
Tabela 9: Avaliação da influência da administração prévia de Mecamilamina (Mec), Atropina (Atro), Ondansentron (Ond) e PCPA sobre os tempos de latência induzidos pelo LS26 no modelo de imersão da cauda em água quente.	72
Tabela 10: Avaliação da atividade antinociceptiva aguda pelo modelo de Von Frey	75
Tabela 11: Avaliação da atividade antinociceptiva crônica pelo modelo de Von Frey.	76
Tabela 12: Quantificação de citocinas a partir de segmento do nervo ciático.	77
Tabela 13: Avaliação no modelo de rotarod.	78
Tabela 14: Avaliação no modelo de edema de pata induzido por carragenina	80
Tabela 15: Avaliação no modelo de permeabilidade vascular induzido por histamina	82
Tabela 16: Avaliação no modelo de permeabilidade vascular induzido por serotonina	82
Tabela 17: Quantificação de citocinas no modelo de bolha de ar subcutâneo.	84
Tabela 18: Quantificação de citocinas e óxido nítrico no modelo de bolha de ar subcutâneo. 86	86
Tabela 19: Influência de concentrações crescentes do composto sobre a atividade das enzimas COX-1 e COX-2, através do método de imunoensaio enzimático.	87
Tabela 20: Avaliação toxicológica com análise do peso corporal e consumo de ração.....	88
Tabela 21: Análise macroscópica e peso dos órgãos	89

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

μ - Receptor opioide μ
 μ g - Micrograma
 μ L - Microlitro
 μ m - Micrômetro
 μ M - Micromolar
 μ mol - Micromolar
 μ mol/kg - Micromol por quilo
5HT: 5-hidroxitriptamina (serotonina)
5HT1A: Receptor de 5-hidroxitriptamina 1A
5HT2: Receptor de 5-hidroxitriptamina 2
5HT3: Receptor de 5-hidroxitriptamina 3
5HTR - Receptor de serotonina do tipo 5
AAS - Ácido acetilsalicílico
AMPA - α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato
AMPc - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
APCs - Células apresentadoras de antígeno
ASICs - Canais iônicos sensíveis ao ácido
ATP - Adenosina trifosfato
Atro - Atropina
 $A\alpha$ - Fibra nervosa do tipo A-alfa
 $A\beta$ - Fibra nervosa do tipo A-beta
 $A\delta$ - Fibra nervosa do tipo A-delta
B1 - Receptor de bradicinina tipo 1
B2 - Receptor de bradicinina tipo 2
C - Fibra nervosa do tipo C
 Ca^{2+} - Cálcio
CCC - Constrição crônica do nervo ciático
CCL2 - Quimiocina
CGRP - Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CI50 - Concentração inibitória de 50% do efeito
CLR - Receptor de lectina tipo C
cm - centímetro
COX - Ciclooxygenase
COX-1 - Ciclooxygenase 1
COX-2 - Ciclooxygenase 2
CXCL8 - Quimiocina
DI50 - Dose inibitória de 50% do efeito
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DRG - Gânglio da raiz dorsal
e-NOS - Óxido nítrico sintase endotelial
EPM - Erro padrão da média
GABA: ácido gama-aminobutírico
GCs - Guanilato ciclase solúvel
GDP - Guanosina difosfato
Gi - Proteína G inibitória
GMPc - Guanosina monofosfato cíclica

GTP - Guanosina trifosfato
H₁ - Receptor tipo 1 de histamina
HCO₃⁻ - Bicarbonato
i.p. - Intraperitoneal
IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor
ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular-1
IFN- γ – Interferon-gama
IgE – Imunoglobulina E
IgG – Imunoglobulina G
IL-1 - Interleucina 1
IL-10 - Interleucina 10
IL1-R1 – Receptor de interleucina 1
IL-1 β - Interleucina-1 β
IL-4 - Interleucina 4
IL-6 - Interleucina 6
IL-6R – Receptor de interleucina 6
IL-8 – Interleucina 8
i-NOS - Óxido nítrico sintase induzível
IS – Índice de seletividade
K⁺ - Potássio
L - Litro
L-NAME - N-nitro-arginina-L-metil éster
LPS – Lipopolissacarídeo
LS20 - [(\pm)-Cis](6-etyl-Tetrahidro-2H-Pirano-2-il]Metanol
LS26 - (6-etyl-tetraidro-2H-pirano-2-il)metil 2-(2-(2,6-diclorofenilamino) fenil acetato
m/s - Metros por segundo
MCP-1 – Quimiocina
Mec – Mecamilamina
mg/mL - miligrama por mililitro
mL - Mililitro
mL/g – Mililitro por grama
mM – Milimol
mmol/kg – milimol por quilo
MN – Metilnaltrexona
N – Naloxona
Na⁺ - Sódio
Nal – Naltrindol
NC – Nervo ciático
NF- κ B - Fator nuclear kappa B
NK – Células natural killer
NK1R - Receptor de neurocinina 1
NLR -Receptor do tipo Nod
NMDA - N-metil-D-aspartato
nmol - nanomol
n-NOS - Óxido nítrico sintase neuronal
NO - Óxido Nítrico
NO₂⁻ - Nitrito
NO₃⁻ - Nitrato

Nor – Nor-binaltorfimina
NOS - Óxido nítrico sintase
NTS - Núcleo do trato solitário
ODQ - 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
Ond – Ondansentron
PA - Potencial de ação
PAG - Substância cinzenta periaquedatal
PAMP - Padrão Molecular Associado a Patógeno
Pb - Núcleo parabrachial
PCPA - 4-cloro-DL-fenilalanina
PCR - Proteína C reativa
PGD2 - Prostaglandina D2
PGE2 - Prostaglandina E2
PGF2 α – Prostaglandina F2 alfa
PGG2 - Prostaglandina G2
PGH2 - Prostaglandina H2
PGI2 - Prostaglandina I2
PKG - Proteína cinase G
PRR - Receptor de conhecimento padrão
RLR - Receptor do tipo RGI-I
RNA - Ácido ribonucleico
RNAm - Ácido ribonucleico mensageiro
ROS - Espécies reativas de oxigênio
RVM - Bulbo ventromedial rostral
s.c – subcutâneo
SBED - Associação Brasileira de Estudo para a Dor
SNC - Sistema nervoso central
SNP - Sistema nervoso periférico
TLR - Receptores tipo Toll
TNF - Fator de necrose tumoral
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
TNF- γ - Interferon gama
TRP - Receptores de potencial transitório
TRPM8 - Receptor de potencial transitório melastina 8
TRPV1 - Receptor de potencial transitório vaniloide 1
TXA2 - Tramboxano A2
UFPB- Universidade Federal da Paraíba
UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UI – Unidade internacional
v.o - Via oral
v/v - Volume por volume
VCAM-1 - Molécula de adesão celular-vascular-1
WDR - Neurônios de faixa dinâmica ampla
 δ – Receptor opioide δ
 κ – Receptor opioide κ

SUMÁRIO

SUMÁRIO 17

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 Inflamação	21
2.1.1 Anti-inflamatórios Não Esteroidais (AINES)	22
2.1.2 Componentes da Inflamação	23
2.1.3 Indutores da Inflamação	24
2.1.4 Mediadores Inflamatórios	25
2.2 Nocicepção e Dor.....	29
2.2.1 Vias de condução	30
2.2.2 Dor Inflamatória.....	36
2.2.3 Dor Neuropática.....	37
2.2.4 Sistema nitrérgico na dor	38
2.2.5 Sistema opioide na dor	41
2.3 Composto híbrido (\pm -cis) (6-etyl-tetraidro-2H-pirano-2-il)metil 2-(2-(2,6-diclorofenilamino) fenil acetato (LS26).	44
3 objetivos.....	46
3.1 Objetivo Geral.....	46
3.2 Objetivos específicos	46
4 MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 Animais	48
4.2 Tratamentos	48
4.3 Agentes químicos.....	49
4.4 Modelos experimentais	50
4.4.1 Modelo de contorções abnominais induzidas por ácido acético	50
4.4.2 Modelo de formalina	51
4.4.3 Modelo de imersão em água quente.....	51
4.4.4 Modelo de nocicepção induzido por glutamato	53
4.4.5 Modelo de Constrição Crônica do Nervo Ciático (CCC)	53
4.4.6 Modelo de Von Frey	54
4.4.7 Modelo de rotarod	56
4.4.8 Modelo de edema de pata.....	56
4.4.9 Modelo de permeabilidade vascular	57
4.3.8 Modelo da bolsa de ar subcutâneo.....	58
4.3.9. Quantificação de mediadores inflamatórios	59
4.3.10. Avaliação da atividade enzimática de COX-1 e COX-2	59
4.3.11 Avaliação toxicológica oral aguda e subcrônica <i>in vivo</i>	60
4.4.10 Análise estatística.....	60
5 RESULTADOS.....	62

5.1 Modelos de avaliação da atividade antinociceptiva.....	62
5.1.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético	62
5.1.2 Modelo de formalina.....	64
5.1.3 Modelo de imersão da cauda em água quente.....	65
5.1.4 Modelo de nocicepção induzida por glutamato	73
5.1.5 Modelo de Von Frey	73
5.1.6 Modelo de rotarod.....	78
5.2 Modelos de avaliação da atividade anti-inflamatória	78
5.2.1 Modelo de edema de pata.....	78
5.2.2 Modelo de permeabilidade vascular	80
5.2.3 Modelo de bolsa de ar subcutâneo (air pouch)	82
5.2.4 Avaliação da atividade enzimática de Cox-1 e Cox-2	86
5.2.5 Avaliação toxicológica oral aguda e subcrônica <i>in vivo</i>	88
6 Discussão.....	92
7 Conclusão.....	106
8 Referências.....	108

1 INTRODUÇÃO

A dor desempenha um papel fundamental na fisiologia, sendo um dos fatores responsáveis pelo controle da homeostasia do organismo. Por sofrer influências de experiências prévias que determinam a individualidade de cada pessoa, a dor se caracteriza de maneira subjetiva, englobando vivências físicas e psíquicas, tornando difícil sua definição e tratamento.

Segundo a Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED), a dor atinge ao menos 30% da população brasileira, e 10 a 40% dos casos tem duração superior a um dia. A estatística oficial de dor no Brasil ainda é inexistente, mas é possível notar um aumento nos últimos anos. A dor é a principal causa de afastamento do trabalho, limitação e sofrimento, gerando perda de qualidade de vida e consequências importantes psicossociais e econômicas.

Quando presente um dano tecidual, a dor será acompanhada de inflamação. O processo inflamatório é uma resposta adaptativa a estímulos como infecção, trauma, cirurgias, queimaduras, isquemia ou tecido necrótico.

Apesar da inflamação ser um processo complexo e benéfico para o corpo humano ela pode gerar alguns sinais clássicos que podem levar a algum tipo de desconforto ou até mesmo gerar sinais que acabam por interferir na qualidade de vida das pessoas, incluindo a dor. A dor tem um papel protetor importante, pois alerta sobre perigos, permitindo um impulso para a preservação da integridade do corpo. Entretanto em certas situações, como diante de um descontrole inflamatório, ela se torna indesejável e até incapacitante para o indivíduo.

Dessa maneira, muitas vezes é necessário fazer uma intervenção através dos fármacos para o tratamento da dor e da inflamação, embora os medicamentos disponíveis atualmente no mercado apresentem efeitos colaterais significativos que reduzem amplamente seu uso. Sem contar algumas patologias sem tratamento efetivo.

Os efeitos adversos presentes em fármacos usados atualmente limitam grandemente a prática clínica, ampliando a procura por analgésicos mais eficazes e principalmente seguros para o uso. Com um perfil melhor ao desenvolvimento de efeitos adversos. Por isso, a busca por novas moléculas com potenciais farmacológicos se torna imprescindível.

Em 2006, MARINHO e colaboradores evidenciaram atividade antinociceptiva e anti-inflamatória para o composto ácido- \pm -cis-6-etyl-tetrahidropirano-2-il-fórmico após sua síntese. Assim, diante da eminent necessidade de descoberta de novos produtos com atividade analgésica e anti-inflamatória associada com potencial farmacológico, foram sintetizados 10 derivados tetrahidropirânicos (CAPIM *et al.*, 2012). Onde um dos derivados, o composto [\pm]-

Cis)(6-etyl-Tetrahidro-2H-Pirano-2-il]Metanol (LS20), foi hibridizado com o anti-inflamatório não esteroidal diclofenaco, dando origem ao composto químico híbrido (\pm -cis) (6-etyl-tetraidro-2H-pirano-2-il)metil 2-(2,6-diclorofenilamino) fenil acetato (LS26). A fim de produzir um novo composto com características mais promissoras e menor toxicidade.

Os compostos LS20 e LS26 foram fornecidos pelo grupo do Professor Doutor Mário Luiz Araújo de Almeida Vasconcellos do Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), a fim de investigar o potencial terapêutico para o controle da dor e no tratamento das patologias inflamatórias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Inflamação

Há muitos agentes que podem causar diversos danos à saúde dos seres humanos, como bactérias, vírus, fungos, agentes químicos, dentre outros. A fim de diminuir os danos causados por esses agentes, os organismos possuem estruturas e sistemas de defesa. Dessa forma, a inflamação é o mecanismo de defesa natural do corpo para reduzir estímulos prejudiciais, como infecções e/ou lesões teciduais e iniciar o processo de cicatrização (SHEN et al., 2017; AGHASAFARI, 2019).

A reação inflamatória no local da invasão com o objetivo de proteger o indivíduo de um ataque agressivo desenvolve-se rapidamente (MATSUZAWA-ISHIMOTO et al., 2018). Tal processo foi descrito pela primeira vez há mais de dois mil anos por Cornelius Celsius, assim como alguns sinais cardinais da inflamação, usados até hoje, tais como: ***rubor*** (vermelhidão, referente à hiperemia); ***calor*** (relacionado ao aumento do fluxo sanguíneo a atividade metabólica dos mediadores celulares envolvidos); ***tumor*** (inchaço, ocasionado pelo aumento da permeabilidade vascular e do extravasamento de proteínas para o espaço intersticial); ***dor*** (devido à sensibilização das terminações nervosas associadas). E um quinto sinal cardinal foi descrito por Virchow – a ***perda de funções*** (por conta da disfunção dos órgãos envolvidos) – que atualmente também foi inserido para descrever tais sinais (AHMED, 2011; AGHASAFARI et al., 2019).

A inflamação aguda é um processo benéfico que ajuda a isolar a região afetada e permite que o restante do sistema imunológico se mobilize para curar as lesões (VARELA et al., 2018). Já a inflamação crônica, por outro lado, transforma-se em um obstáculo ao invés de solução para os tecidos lesionados. Tecidos cronicamente inflamados normalmente passam a convocar células imunes da corrente sanguínea, podendo destruir tecidos saudáveis ao redor na tentativa mal direcionada de iniciar o processo de cura (KUNNUMAKKARA et al., 2018).

A vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular e a formação do exsudato, observados na região inflamada, ocorrem em consequência da atividade de mediadores inflamatórios (histamina liberada por mastócitos, prostaglandinas e leucotrienos), que promovem o acesso das células imunes responsáveis tanto pela instalação quanto pela resolução do processo inflamatório (Figura 1) (SALMON; HIGGS, 1987; MULLER, 2014).

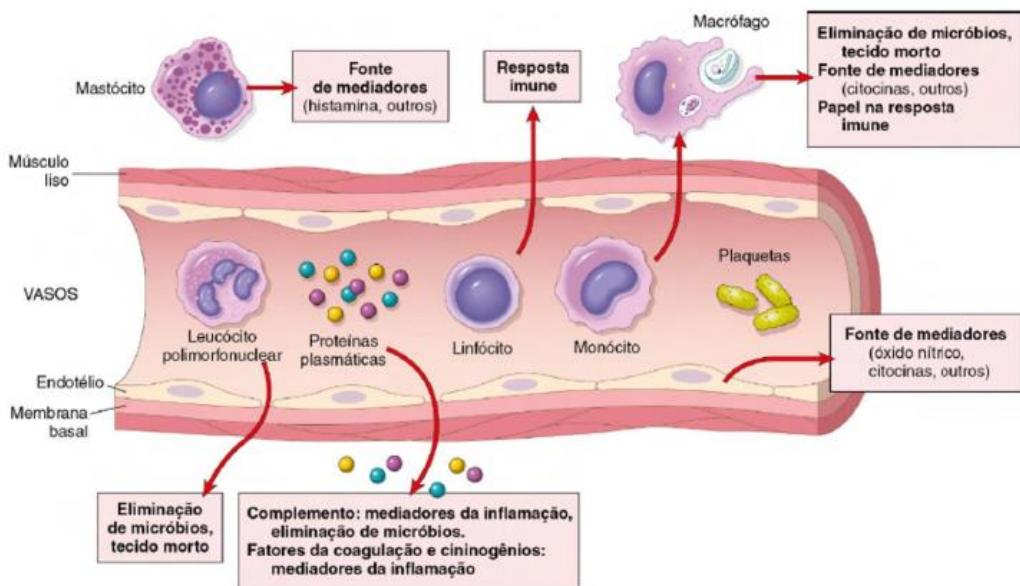


Figura 1: Principais componentes da resposta inflamatória. (Adaptada de Kumar; Abbas; Aster 2013).

2.2 Anti-inflamatórios Não Esteroidais (AINES)

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) constituem uma classe diversificada de medicamentos amplamente utilizados para aliviar a dor, reduzir a inflamação e diminuir a febre. Desde a sua descoberta, esses fármacos têm sido fundamentais no tratamento de uma variedade de condições médicas, incluindo artrite, dores musculares, cólicas menstruais e inflamações decorrentes de lesões (RAAIJMAKERS *et al.*, 2022).

A história dos AINES remonta ao século XIX, quando os pesquisadores começaram a explorar os efeitos terapêuticos dos salicilatos, como a aspirina. A descoberta de que esses compostos podiam aliviar a dor e a inflamação sem os efeitos colaterais associados aos esteroides marcou um avanço significativo na medicina. Desde então, a classe dos AINES expandiu-se para incluir uma variedade de substâncias, como o ibuprofeno, o diclofenaco e o naproxeno, cada uma com suas próprias características farmacológicas e indicações específicas (MONTINARI *et al.*, 2019).

A ação dos AINES baseia-se principalmente na inibição da enzima ciclooxygenase (COX), responsável pela produção de prostaglandinas, substâncias que desencadeiam a inflamação, a dor e a febre. Ao bloquear a COX, esses medicamentos reduzem a síntese de prostaglandinas, aliviando assim os sintomas associados à inflamação. No entanto, é importante destacar que a inibição da COX também pode resultar em efeitos adversos, como irritação gástrica, ulceração e até mesmo complicações cardiovasculares, especialmente em indivíduos predispostos (MONTINARI *et al.*, 2019; RAO *et al.*, 2018).

A escolha do AINE mais adequado para um paciente específico depende de vários fatores, incluindo a gravidade da condição médica, a presença de comorbidades e as preferências individuais do paciente. Enquanto alguns AINES, como o ibuprofeno, são frequentemente utilizados para tratar dores leves a moderadas, outros, como o diclofenaco, podem ser mais eficazes no controle da inflamação aguda. Além disso, a formulação do medicamento, seja oral, tópica ou injetável, também pode influenciar a escolha do tratamento mais apropriado (HARIRFOROOSH *et al.*, 2013).

Embora os AINES sejam amplamente considerados seguros quando usados adequadamente e por curtos períodos, seu uso prolongado ou em doses elevadas pode aumentar o risco de efeitos adversos, especialmente no trato gastrointestinal e no sistema cardiovascular. Portanto, é essencial que os pacientes sigam as orientações do médico quanto à dose e duração do tratamento, além de estar cientes dos sinais de complicações potenciais, como sangramento gastrointestinal ou retenção de líquidos. Os anti-inflamatórios não esteroidais desempenham um papel crucial no manejo da dor, da inflamação e da febre em uma variedade de condições médicas. No entanto, seu uso deve ser cauteloso, considerando os potenciais riscos e benefícios para cada paciente. Uma abordagem individualizada, com base na avaliação completa do histórico médico e das características do paciente, é fundamental para garantir a eficácia e a segurança desses medicamentos (HARIRFOROOSH *et al.*, 2013).

2.3 Componentes da Inflamação

Atualmente sabe-se que a inflamação se apresenta em muitas formas e modalidades que são regidas por diferentes mecanismos de indução, regulação e resolução. Entretanto, de uma forma geral pode-se dividir didaticamente a resposta inflamatória em quatro componentes principais: **os indutores inflamatórios (podem ser organismos infecciosos ou estímulos não infecciosos**, como toxina ou substâncias estranhas ao corpo) (SHIRAZI *et al.*, 2017), os **sensores** que detectam os indutores e acionam a produção de mediadores. Os **mediadores inflamatórios**, por sua vez, são substâncias químicas endógenas que podem produzir a sensação de dor, podem promover ou inibir a inflamação e o reparo de tecidos, no qual são induzidos por sensores, e as **células e tecidos-alvo** que são afetados pelos mediadores inflamatórios (figura 2) (SHIRAZI *et al.*, 2017; VARELLA *et al.*, 2018).

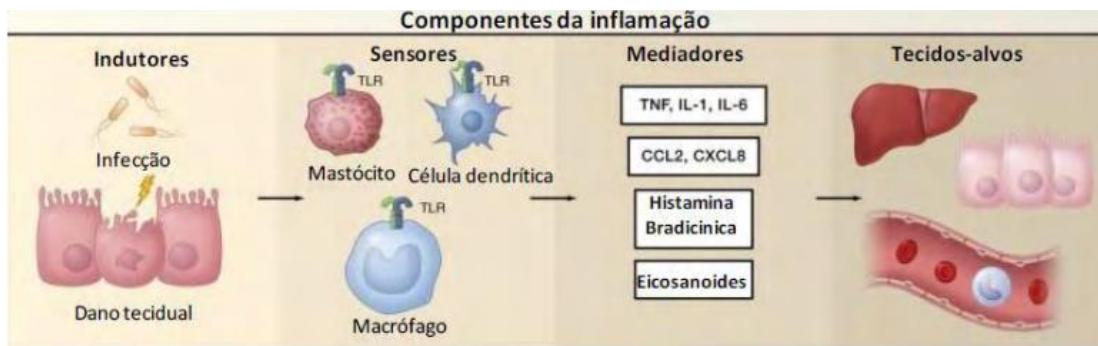


Figura 2: Componentes da inflamação. (Adaptado de MEDZHIMOV, 2010).

2.3.1 Indutores da Inflamação

Dentre os indutores podemos citar o padrão molecular associado a patógeno (PAMP). Os PAMPs podem ser o fragmento do DNA/RNA de uma bactéria ou seu flagelo (PENG et al.; 2018). O padrão molecular associado ao dano (DAMP) também é um outro tipo de indutor, que são moléculas liberadas de células danificadas do hospedeiro como o DNA mitocondrial por exemplo, como mostra a Figura 3 (PATIDAR et al.; 2018).

Os PAMPs e DAMPs são reconhecidos por uma classe de receptores chamados Receptor de reconhecimento de padrão (PRR) (SAIJO, et al.; 2018). Tais receptores podem estar presentes na superfície de membranas celulares, por exemplo, receptores do tipo “*Toll*” (TLR) e receptor de lectina do tipo C (CLR) (AGHASAFARI et. al.; 2018). Ou, podem estar no citoplasma das células, como por exemplo, o receptor do tipo “*Nod*” (NLR) YANG et al.; 2019) e receptor do tipo RIG-I (RLR) (AGHASAFARI et al.; 2018)

Tais receptores podem ser encontrados em macrófagos e células dendríticas e após sua ligação com os PAMPs e DAMPs vão levar a ativação de fatores de transcrição (AMARANTE-MENDES et. al., 2018). Um dos principais é o NF-κB (fator nuclear kappa B) que ativa a transcrição de diversas proteínas, como citocinas, enzimas e receptores. Estas novas proteínas produzidas vão amplificar a ação de outros mediadores já presentes nas células (como serotonina das plaquetas e histamina dos mastócitos) ou de mediadores formados no plasma (como as proteínas do sistema complemento e as cininas) iniciando os processos de edema, migração celular e dor (ZHANG et al., 2017).

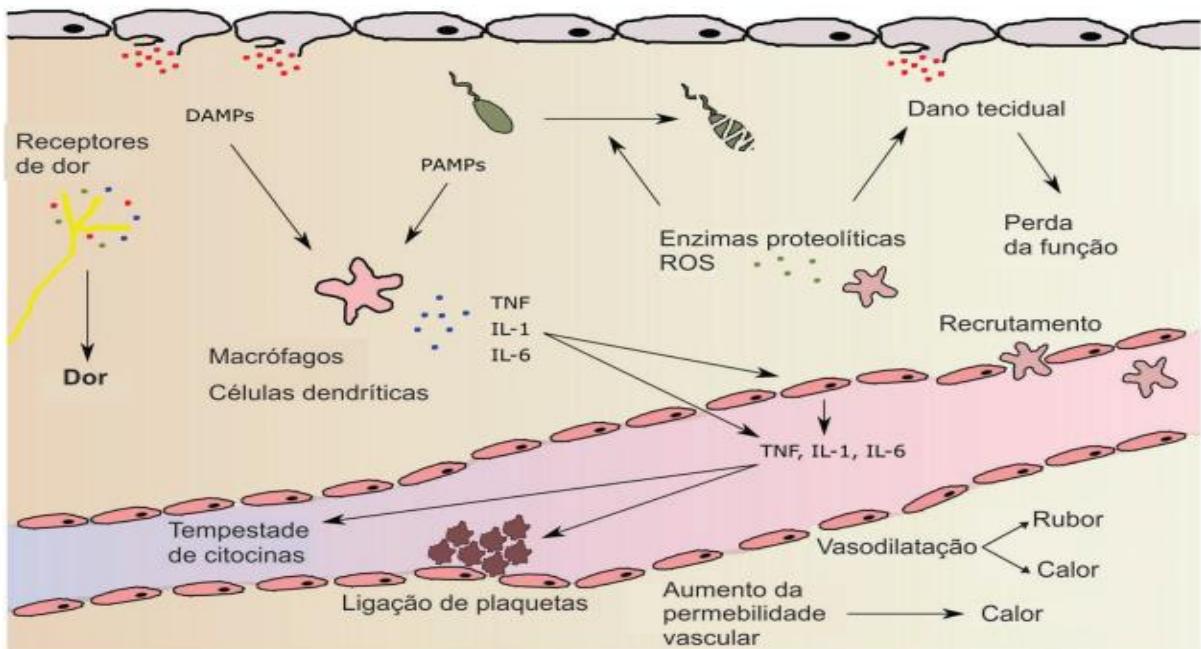


Figura 3: Esquema geral da resposta inflamatória. A resposta do tecido a DAMPs e PAMPs leva a liberação de citocinas e outros mediadores que visam isolar o local e destruir o agente agressor, principalmente através da migração de leucócitos. Estes mediadores levam ao aparecimento dos sinais cardinais da resposta inflamatória, edema, calor, rubor e dor com eventual perda da função decorrente do dano tecidual. DAMPs: padrões moleculares associados a danos; PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos; TNF: fator de necrose tumoral, IL-1: interleucina 1; IL-6: interleucina 6; ROS: espécies reativas de oxigênio. (Modificado de VARELA *et al.*, 2018)

O NF-κB quando é liberado transloca-se para o núcleo, induzindo a produção de citocinas inflamatórias como: Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina - 1 (IL-1), interleucina - 6 (IL-6) e quimiocinas (MCP-1/CCL2 e CXCL8), bem como prostaglandinas. Tais mediadores inflamatórios agem sobre os tecidos-alvo incluindo os vasos sanguíneos locais, para induzir a vasodilatação, extravasamento de neutrófilos e plasma para o tecido infectado (MEDZHITOV, 2008).

2.3.2 Mediadores Inflamatórios

Diversos mediadores inflamatórios são produzidos e/ou liberados pela ação dos indutores do processo inflamatório, com efeito sobre os vasos e sobre o recrutamento de leucócitos. Os mediadores podem ser derivados de proteínas do plasma como o sistema complemento, ou secretados por células como leucócitos (macrófagos especializados e mastócitos) ou pelas células já presentes nos tecidos locais. Alguns mediadores são pré-formados e armazenados em grânulos nos basófilos e mastócitos ou estão livres no plasma como precursores inativos. E, outros mediadores são produzidos diretamente como resposta ao estímulo (MEDZHITOV, 2008).

Os mediadores inflamatórios podem ser classificados em oito grupos de acordo com sua propriedade bioquímica: I – aminas vasoativas; II- peptídeos vasoativos; III- fragmentos

de componentes do complemento; IV- mediadores lipídicos; V- citocinas; VI- quimiocinas; VII- enzimas proteolíticas; VIII- óxido nítrico (MARCINKIEWICZ et al., 2003; MEDZHITOV, 2008).

As primeiras alterações observadas durante a inflamação são decorrentes das alterações no fluxo vascular e no calibre dos pequenos vasos sanguíneos (SHIRAZI, et. al., 2017). Aos poucos, alterações no endotélio facilitam a permeabilidade vascular levando ao extravasamento plasmático. O acúmulo desse fluido no espaço intersticial é caracterizado como edema (REGLERO - REAL et al., 2016; TRAYES et al., 2013). As quimiocinas, ajudam no extravasamento, no qual os leucócitos são atraídos para o espaço intersticial, deixando a corrente sanguínea (Figura 4). Na maioria dos tecidos, a cascata de recrutamento leucocitário envolve comumente as etapas de rolagem, adesão e, finalmente, transmigração de leucócitos através da barreira (ARRIAGADA, et. al., 2019).

A vasodilatação é mediada sobretudo pela ação das aminas vasoativas (histamina e serotonina), conhecidas como fatores edematógenos. A histamina age primordialmente nos receptores H₁ na microcirculação e são liberadas principalmente por mastócitos (BRANCO, et al., 2018). Já a serotonina pode ser liberada pelas plaquetas e células enterocromoafins agindo nos seus receptores próprios, 5-HTR, variando nas isoformas 5-HTR1-7 (SCHOENICHEN et al., 2019; WU et al., 2019).

Os peptídeos vasoativos como a substância P e a bradicinina também ajudam nesse processo. A substância P é liberada pelos neurônios sensoriais onde irá agir no receptor de neurocinina 1 (NK1R) (SCHANK e HEILIG, 2017). Se encontra armazenada em vesículas secretoras e sua ação tem como consequência a liberação de histamina pelo mastócito (SUVAS, 2017). Já a bradicinina pode ser formada no plasma pela ação do sistema calicreína-cinina e vai agir nos seus receptores do tipo B₁ e B₂ (RICCIARDOLLO et. al., 2018; TANG et al., 2018) e além da vasodilatação, ela também está envolvida nos processos de dor (CHOI e HWANG, 2018).

A histamina, serotonina, substância P, entre outras ajudam a mediar as alterações funcionais resultando em aumento da permeabilidade vascular como já citado (JIA, et al., 2019). A expressão e liberação desses mediadores, em partes, são controladas por anafilotoxinas (AJOANA, et, al., 2019).

Essas moléculas em conjunto induzem a liberação do potente vasodilatador óxido nítrico (ON), aumentando o edema por modificar completamente o fluxo sanguíneo local (SU, 2017; ANCION, et al., 2019).

O efeito vasodilatador também é influenciado pela produção de prostanóides formados a partir do ácido araquidônico presente nas membranas celulares (HARA et al., 2019). Esses prostanóides são sintetizados a partir da ação da enzima ciclooxygenase (COX). Já foram elucidadas três isoformas da COX em humanos (CALDER, 2017). Sendo a terceira, uma ciclooxygenase que foi proposta como uma isoforma além da COX-1 e COX-2. No entanto, seu papel e sua existência são temas de debate e investigação contínuos na comunidade científica. Os estudos sugeriram que a COX-3 poderia ser uma forma de ciclooxygenase responsável pelos efeitos analgésicos do paracetamol, separada das isoformas COX-1 e COX-2. No entanto, a identificação e caracterização precisa da COX-3 têm sido desafiadoras (BAPNA, et al., 2015). Tanto a COX-1 quanto a COX-2 transformam o ácido araquidônico em prostaglandina G₂ (PGG₂) e em seguida, após uma peroxidação, reduz a PGG₂ em prostaglandina H₂ (PGH₂) (INNES e CALDER, 2018; WANG, et. al., 2019). Após a formação, a PGH₂ é metabolizada em prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina D₂ (PGD₂), prostaciclina/prostaglandina I₂ (PGI₂) e tramboxano A₂ (TXA₂) por meio de enzimas catalisadoras específicas. Todas as prostaglandinas possuem um papel importante na vasodilatação através de receptores específicos distribuídos no músculo liso vascular das arteríolas (RONCHETTI, et al., 2017).

A COX-1 é a isoforma constitutiva que medeia ações fisiológicas, como manutenção da função gástrica, regulação da função renal, modulação da agregação e função plaquetária, mas em alguns casos pode estar envolvida em processo patológicos (TSUGE et al., 2019). Diante do processo inflamatório, a isoformas COX-2 tem sua produção induzida por citocinas liberadas principalmente por macrófagos ativados pelos PAMPs ou DAMPs, entre elas a interleucina-1 β (IL-1 β), o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), e a interleucina-6 (IL-6) (Figura 3) (SETHI, et al., 2019; DESAI et al., 2018).

A citocina TNF- α produzida por células mononucleares e polimorfonucleares está envolvida na patogênese de muitas doenças e estimula potentes efeitos inflamatórios como: indução de moléculas de adesão no endotélio (ICAM-1 e VCAM-1) (EL ALWANI et al., 2006); aumento da permeabilidade vascular, aumento de fatores de crescimento para angiogênese e ativação de neutrófilos e fagócitos. Quando há liberação sistêmica de TNF- α pode induzir além de febre, a secreção de proteínas de fase aguda pelo fígado, ativar a cascata de coagulação, induzindo vasodilatação sistêmica levando a quadros de hipotensão, e hipoglicemia (SHERWOOD, et al., 2004).

A IL-6 pode ser induzida por infecção ou outros tipos de inflamação. É produzida principalmente por macrófagos e atua como proteína de fase aguda, aumentando a resposta

inflamatória do corpo. Um de seus efeitos é induzir a produção de Proteína C Reativa (PCR) e fibrinogênio, além de reduzir os níveis de albumina, zinco e ferro por meio de vários mecanismos (FRANCO et, al., 2020; TANAKA, et al.; 2014).

A IL-1 β está envolvida em diversas desordens inflamatórias, como patogênese diabética, artrite reumatoide e câncer (GRAY, et al., 2015). É uma citocina produzida na sua forma inativa, (pro-IL-1 β), que é transformada pela ação da caspase-1 em sua forma ativa e liberada no meio extracelular (EDER, 2009). A IL-1 β ativa uma cascata de sinalização que induz a transcrição de outras citocinas e quimiocinas favorecendo o recrutamento e ativação de linfócitos, além de aumentar a expressão de genes para a COX-2; fosfolipase A₂ (enzima importante para a produção de COX) (DESAI, et al., 2018; WITKAMP, 2000).

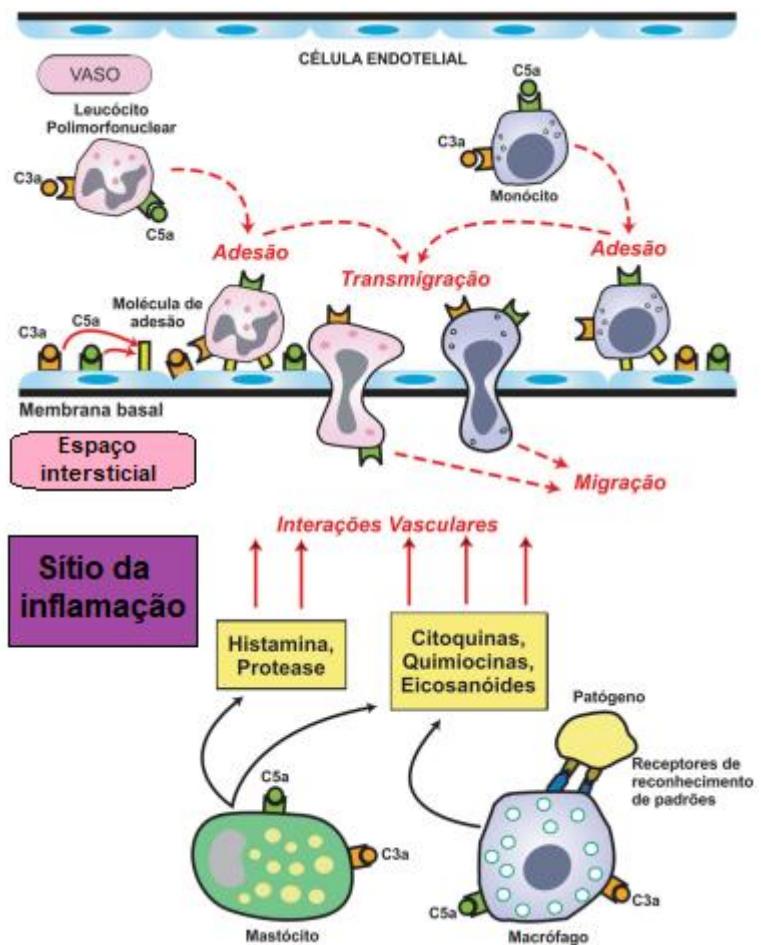


Figura 4: Mecanismo de migração de leucócitos através dos vasos sanguíneos e o papel das citocinas na inflamação. A figura mostra como alguns mediadores inflamatórios (histamina, citocinas, quimiocinas, entre outros) produzidos por células de defesa acabam por interferir na permeabilidade da membrana e atrair leucócitos da corrente sanguínea em direção ao sítio inflamatório (Modificado de MARKIEWSKI e LAMBRIS, 2007).

2.4 Nocicepção e Dor

A definição padrão de dor enfatiza sua subjetividade. A subjetividade por sua vez, implica uma experiência consciente (BALIKI & APKARIAN, 2015). Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 2017), a definição de dor é explicada como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano real ou potencial ao tecido, ou descrita em termos de tal dano”. No entanto, tal definição se mostra útil apenas para definir a dor humana, mas talvez não para muitas espécies para as quais as interferências da experiência de dor devam permanecer fracas, na melhor das hipóteses (WALTERS, 2019).

A avaliação de dor em humanos se baseia no autorrelato, pois há o compartilhamento de uma linguagem comum possibilitando inclusive a classificação dessa dor. Isto se torna problemático na avaliação de dor em animais e bebês humanos, uma vez que não há a comunicação direta com eles (SNEDDON et al., 2014).

Diante de tal problemática, a IASP enfatizou a importância da distinção entre o conceito de dor e a nocicepção, que é definida como “o processo neural de decodificação e processamento do estímulo nocivo”. Dessa forma, diferencia-se a dor como um fenômeno subjetivo, ao passo que a nocicepção é objeto da fisiologia sensorial.

Todos os animais são considerados capazes de apresentar nocicepção, e geralmente é acompanhada por um reflexo de retirada nocifensivo para longe desse estímulo. Para a dor, no entanto, o animal deve demonstrar uma mudança nas futuras decisões comportamentais e mudanças motivacionais (SNEDDON, et. al., 2014).

A nocicepção inicia-se quando um estímulo nocivo que produz ou ameaça produzir uma lesão iminente é transduzida em atividade neural, levando a respostas que defendem o tecido sob ameaça e auxiliam na sua reparação. Além de estímulos mecânicos e térmicos, estímulos químicos, como ácidos, podem ameaçar a integridade do tecido e afetar a homeostase (PATTISON, et. al., 2019).

Com relação a duração, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda é uma resposta fisiológica normal a um estímulo adverso que se manifesta durante um período considerado curto, de minutos a semanas ocasionadas por processos inflamatórios, infecções, traumatismos ou outras causas. Ela é um resultado da ativação de nociceptores, receptores da dor, no local do tecido (PINHO-RIBEIRO et al., 2017; SBED, 2021). Já a dor crônica, apresenta duração de 3 meses ou mais e não resolve em resposta ao tratamento farmacológico (HYLANDS-WHITE et al., 2017; KNEZEVIC et al., 2018). Com o passar do tempo o sistema sensorial se torna mais sensível, hiper-responsivo e capaz de produzir uma

dor intensa, dispersa e incessante. Existem vários tipos de dores crônicas com fisiopatologias distintas e complexas (ARENDT-NIELSEN, *et al.*, 2018; BURKE *et al.*, 2017).

Acerca da fisiopatologia da dor, esta pode ser classificada como nociceptiva ou não-nociceptiva. A dor não-nociceptiva pode ser subdividida em dor neuropática que segundo a IASP “é a dor causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial” e dor idiopática, compreendendo um amplo espectro de estados de dor pouco compreendidos, como a síndrome dolorosa miofascial (ANWAR, 2016).

Já a dor nociceptiva é descrita como “dor que surge de danos reais ou que colocam em perigo o tecido não nervoso e é devida à ativação de nociceptores” (IASP, 2017) se subdividindo em dor visceral e somática (ANWAR, 2016; ORR, 2017). A dor visceral ou também chamada de dor referida tem relação com os tecidos dos órgãos internos. E a dor somática, por sua vez, refere-se a lesões na pele, músculos e ossos (GEBHART e BIELEFELDT, 2016).

2.4.1 Vias de condução

A via nociceptiva é chamada de via ascendente da dor e ela começa com o processo de transdução (WOLLER *et al.*, 2017). Quando os nociceptores localizados nas terminações das fibras nervosas são ativados pela substância P (neuropeptídeo que atua como neurotransmissor excitatório) levando a abertura de canal iônico (sódio, potássio e cálcio) gerando impulsos elétricos (POZSGAI *et al.*, 2019). Tais impulsos são propagados ao longo das fibras aferentes de primeira ordem, que são nociceptivas através do gânglio da raiz dorsal (DRG) até os terminais do axônio no corno dorsal da medula espinhal que por sua vez, ascende ao tronco cerebral, ao tálamo e ao córtex (FERDOUSI e FINN, 2018; GARCIA *et al.*, 2020).

As fibras nervosas periféricas podem ser classificadas pela estrutura, diâmetro, grau de mielinização e velocidade de condução em A α , A β , A δ ou C (Figura 5) (GRASSEL e MUSCHTER, 2017). Sendo as fibras A δ e C as mais importantes em se tratando de processamento da dor (ARMSTRONG e HERR, 2020; XU *et al.*, 2020). Há a descrição de quatro tipos diferentes de nociceptores, sendo eles: mecânicos, que respondem à pressão intensa, os térmicos, que respondem a temperaturas extremas quentes ou frias, polimodais, onde respondem aos estímulos mecânicos, térmicos ou químicos e os nociceptores silenciosos que são ativados por estímulos químicos, mediadores inflamatórios, respondem a estímulos mecânicos e térmicos somente depois de serem ativados. Estes nociceptores

também possuem pequenas fibras C amielinizadas que conduzem impulsos em velocidade menor que 3 m/s (FEIN, 2011).

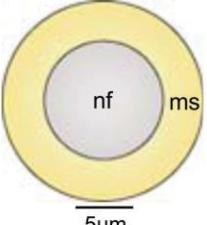
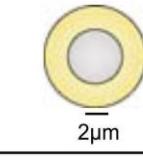
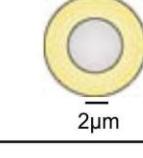
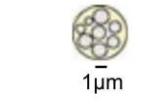
Fibra	Corte tranversal	Tipo de fibra	Sensação	% ^a	CV (m/s)	vFT (mN) ^b	Termo - sensibilidade ^c
A	 	RAM	Toque	10	>10	1.0	
		SAM	Toque	12	>10	1.5	
A δ		D-hair	Toque	6	2-10	<0.5	
		AM	Nocicepção	12	2-10	5	
C		C-polimodal	Nocicepção	30	<1.5	10	
		CM/MH/MC/H	Nocicepção	20	<1.5	6	
		“silent”	Nocicepção ^d	~5	<1.5	N/A	
		CLT β	Toque ^e	~5	<1.5	<0.5	

Figura 5: Tipos de fibras sensoriais. A figura mostra os tipos de fibras sensoriais. Fazendo uma comparação com relação ao diâmetro, o grau de mielinização, a taxa de condução do estímulo e ainda mostrando a quais sensações elas respondem. Fonte: Modificado de (SMITH e LEWIN, 2009). LEGENDA: %: porcentagens (referem-se ao número total de fibras cutâneas); CV (m/s): velocidade de condução (m/s) (Alguns neurônios expressam canais de íons, cuja ativação produz sensações de quente/frio, em vez de dolorosamente quente/frio. É descrito apenas se é possível para uma classe de neurônio transduzir quente (vermelho) / frio (azul) nocivo, mas isso não significa todo neurônio dessa classe); vFT(mN): limiar de vonFrey (mili Newton); nf : fibra nervosa; ms: bainha de mielina; μm: micrômetro; RAM: mecanorreceptor de adaptação rápida; SAM: mecanorreceptor de adaptação lenta; D-hair: fibra não mecano nociceptiva; AM: fibra A δ mecano nociceptiva; CM: fibra do tipo C mecano nociceptiva; MH: fibra do tipo C nociceptiva mecano-quente; MC: fibra do tipo C nociceptiva mecanofrio; H: fibra do tipo C nociceptiva ao quente; “silente”: fibra do tipo C nociceptiva silenciosa; CLT: fibra do tipo C de baixo limiar.

As fibras aferentes A δ são pouco mielinizadas, têm velocidade de transmissão intermediária de 2-10 m/s em direção ao SNC e são capazes de produzir dor aguda e bem definida, que normalmente é estimulada por um corte, um choque elétrico ou um golpe físico (ARCILLA e TADI, 2020). As fibras A δ do tipo I respondem a temperaturas que causam dor aguda e rápida, geralmente acima de 5°C. Ou seja, essas fibras são ativadas quando há uma rápida mudança na temperatura, como tocar em algo quente o suficiente para causar uma queimadura leve, e também é subdividida em A δ tipo II que respondem a temperaturas que causam dor moderada e duradoura, tipicamente acima de 45°C. Essas fibras são ativadas quando o estímulo térmico é suficientemente intenso para causar danos aos tecidos, como

tocar em algo muito quente que resulta em uma queimadura mais grave (ROCHA et al., 2007).

Já as fibras do tipo C, são menores e não mielinizadas (amielinizadas) que compõem a maior parte dos nociceptores periféricos. Mostram uma velocidade de condução de 0,5-2,0 m/s. Possuem um diâmetro de 0,4-1,2 μm (CARRICONDO et al., 2019) sendo responsáveis pela dor de longa duração e difusa (BASBAUM et al., 2009). Como respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos, são chamadas de polimodais e possuem um importante papel na detecção de estímulos nocivos (MILLAN, 2002). Através das fibras C os indivíduos não são capazes de precisar a localização exata da dor, apenas aproximadamente. Isso se dá devido a combinação em forma de rede, aumentando a amplitude da cobertura. Por esse motivo, as fibras C produzem uma dor mais prolongada e difusa (FINSTERER et al., 2017).

As fibras A δ e C podem ser classificadas ainda em duas classes principais conforme a tabela mostrada a seguir (tabela 1).

Tabela 1: Subtipos de fibras nervosas A δ e C

Tipo de fibra	Característica
Fibra A δ tipo I	Respondem a estímulos mecânicos e químicos, mas possuem limiares relativamente altos, $>50^\circ\text{C}$ (FLECKENSTEIN et al. 2017)
Fibra A δ tipo II	Possuem um limiar de resposta ao calor $<43^\circ\text{C}$, mas se ativam com limiar mecânico alto. São sensíveis a capsaicina e ativam via receptores TRPV1 (receptor de potencial transitório vaniloide tipo I), canais catiônicos não seletivos permeáveis a cálcio (DJOUHRI, 2016; ROCHA, 2007)
Fibra C tipo I	Fibras peptidérgicas. Contém substância P e CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e expressam receptores tirocinase A, para o fator de crescimento nervoso. Respondem a capsaicina e prótons (DEMBO et al., 2018; ROCHA, 2007)
Fibra C tipo II	Fibras não peptidérgicas identificadas pela ligação da isoleucina B4. A ativação dessas fibras ativa a micrógglia, que aumentam o estímulo de dor (GAZERANI et al., 2016; ROCHA, 2007)

Para o processo de transdução da dor, várias classes de receptores periféricos podem ser ativadas devido a temperatura, como os receptores de potencial transitório (TRP) (BALEMANS et al., 2017; HOSSAIN et al., 2019). Nos subtipos dessa família, temos o TRP vanilóide 1 (TRPV1), que apresenta um destaque quando se trata de sensação de calor (HILL et al., 2018; BUJAK, et al., 2019). Para respostas nocivas ao frio, há também receptores do tipo TRP melastina 8 (TRPM8), conhecido como receptor do mentol. Tal receptor é ativado numa faixa de temperatura que varia entre 10-15°C (DAI, 2016; GAVVA et al., 2019).

Os nociceptores também podem ser ativados por substâncias químicas. Dentre esses canais temos os iônicos sensíveis ao ácido (ASICs) (HUGHES et al., 2007; KELLENBERGER e SCHILD, 2015), receptores de bradicinina B₁ e B₂, que são acoplados a proteína G (KHAN et al., 2019; MARCEAU et al., 2020), o receptor de substância P, receptor de neurocinina 1 (NK1R) (SCHANK e HEILIG, 2017); receptores ionotrópicos de glutamato (NMDA – N-metil-D-aspartato, AMPA – α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato e cainatos), sem contar os vários receptores de citocinas pró inflamatórias do tipo tirosina quinase ou acoplados a proteína G (COOK et al., 2018; CHOPRA *et al.*, 2019).

Segundo a IASP, é possível reduzir os limiares de dor e dor espontânea caso haja estimulação repetida dos mediadores químicos devido a sensibilização das fibras nervosas periféricas, mecanismo esse que chamamos de hipersensibilidade cutânea. Tal evento pode ser sentido através da hiperalgesia, definida como “aumento da dor por um estímulo que normalmente provoca dor”, ou seja, ocorre a ampliação da sensibilidade a dor e é decorrente de mudanças importantes na periferia e depois no processo central de sensibilização a dor. E alodinia “dor devido a um estímulo que normalmente não provoca dor”. A alodinia ocorre através da ativação periférica de receptores sensíveis ao estímulo mecânico, térmico ou químico que sofrem alterações e começam a ser aptos a estimular o processo nociceptivo central (IASP, 2017).

Após a ativação periférica dos nociceptores e a conversão para o potencial de ação, uma série de eventos ocorre para transmitir o sinal de dor ao sistema nervoso central e gerar uma resposta apropriada. O potencial de ação, uma vez gerado nos nociceptores ativados, é propagado ao longo das fibras nervosas aferentes até os terminais nervosos na medula espinhal. Nos terminais nervosos na medula espinhal, o potencial de ação estimula a liberação de neurotransmissores, incluindo substância P, glutamato e outros peptídeos neuropeptídicos, na área conhecida como substância gelatinosa da medula espinhal. Os neurotransmissores liberados nos terminais nervosos ativam os neurônios de segunda ordem na medula espinhal, que transmitem o sinal de dor ao longo das vias ascendentes até o tálamo e finalmente o sistema límbico. Este é o primeiro passo na percepção consciente da dor (RUSSO, et al., 2019; YAN, et al., 2018). A percepção, que ocorre em seguida é a experiência consciente e real da dor, levando em conta seus aspectos sensoriais e afetivos (Figura 6) (RONCHETTI et al., 2018).

As fibras nervosas aferentes primárias se projetam para o corno dorsal da medula espinhal que é organizado em lâminas distintas. As fibras A δ se projetam para a lâmina I, bem

como para áreas mais profundas do corno dorsal, na lâmina V (YAM, et al., 2018). As fibras C do tipo I se projetam mais superficialmente nas lâminas I e II. Enquanto a maioria das fibras C tipo II ocupam a parte central da lâmina II (OSSIPOV et al., 2010; ABRAIRA et al., 2017).

A via nociceptiva ascendente é constituída pelo trato espinotalâmico quando se trata de dor aguda, e é onde os axônios de neurônios espinhais de segunda ordem cruzam ainda na medula a linha mediana ascendendo pelo quadrante anterolateral da substância branca projetando-se ao tálamo. Há também a projeção pelo trato espinomesenencefálico, (ativado quando há dor do tipo crônica) que termina em algumas regiões do mesencéfalo em que se incluem a formação reticular mesencefálica e a substância cinzenta periaquedatal (AIRES, 2008). Ambos se dirigem ao tálamo passando pela formação reticular, e do tálamo os neurônios de terceira ordem projetam-se para as diferentes áreas do encéfalo (AL-CHALABI et al., 2020).

As projeções incluem o bulbo ventrolateral caudal, o bulbo ventromedial rostral (RVM), núcleo parabrachial (Pb), substância cinza periaquedatal (PAG), núcleo do trato solitário (NTS) e tálamo. Os impulsos são projetados para o córtex somatossensorial para interpretação (LEUNG *et al.*, 2016).

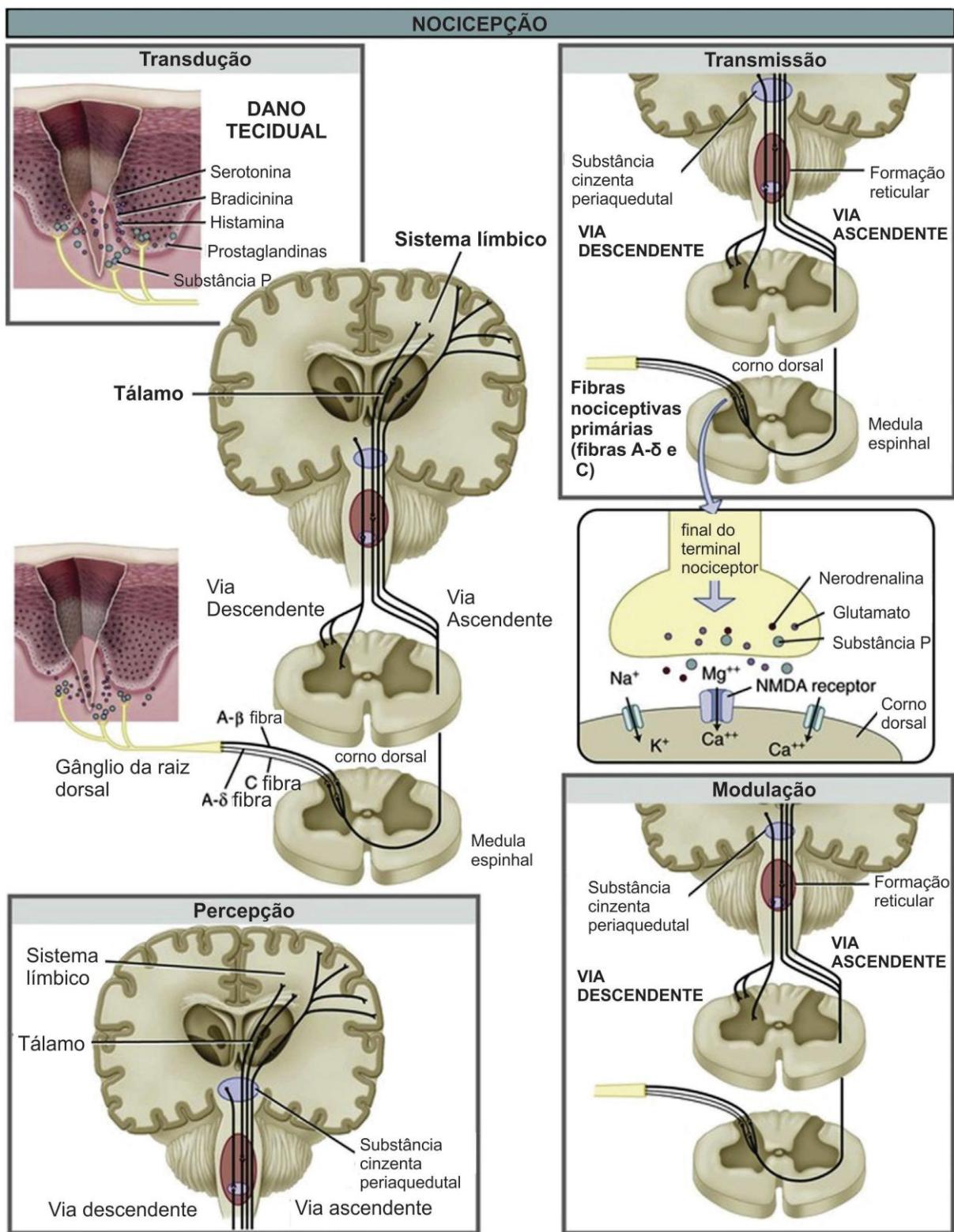


Figura 6: Via de transmissão da dor. A figura mostra o esquema geral da transdução do estímulo doloroso. A transdução compreende a conversão de estímulos periféricos em potencial de ação que atravessa a transmissão atingindo o sistema nervoso central. A percepção é o passo onde a pessoa tem a experiência real tanto sensorial quanto afetiva relacionada a dor e por último temos a modulação que é quando temos uma alteração do estímulo de dor. Fonte: Adaptado de (ELLISON, 2017)

Tais áreas também são relacionadas com o comportamento da dor. Segundo alguns estudos, o tálamo tem sido associado aos aspectos discriminatórios sensoriais da dor devido às suas conexões com o córtex somatossensorial (BLASZCZYK et al., 2018). Sabe-se que o Pb é importante em termos do comportamento afetivo da dor, tendo em vista que sua saída leva a uma conexão rápida com a amígdala e o hipotálamo (THOMPSON et al., 2019).

Por último, há a modulação da nocicepção que acontece devido a projeções descendentes que alcançam neurônios nociceptivos na medula espinhal. De maneira geral, esse mecanismo apresenta um importante efeito analgésico diminuindo a percepção da dor vinda da via ascendente nociceptiva (BANNISTER, et al., 2004). A PAG recebe neurônios de locais corticais e possui conexões com a amígdala (HARPER et al., 2018). A RVM pode facilitar ou inibir as entradas nociceptivas e atua como filtro no controle da facilitação descendente da dor (LI et al., 2017; TOBALTINI, et al., 2019)

2.4.2 Dor Inflamatória

A dor inflamatória pode surgir de diferentes maneiras: seja por meio da ativação direta dos nociceptores, pela ação de mediadores que afetam tipos específicos desses receptores ou por modificações na via nociceptiva central. (ELLISON, 2017).

A sensibilização periférica resulta de mudanças associadas a inflamação no ambiente químico de uma fibra nervosa. Dessa forma, o dano ao tecido é frequentemente acompanhado pelo acúmulo de fatores endógenos liberados de nociceptores ativados ou células não neuronais que residem ou se infiltram na área lesada (BASBAUM, 2009).

A substância P, uma substância endógena produzida após algum tipo de lesão, liberada por neurônios sensoriais induzem um efeito excitatório podendo agir com a bradicinina que por sua vez é produzida no plasma (VIEIRA, 2018). Outras substâncias atuam na via de sensibilização, como algumas citocinas (IL-1 β e TNF- α) ou prostaglandinas (PGE₂), derivadas do ácido araquidônico, ou as aminas simpáticas, como adrenalina e dopamina que são liberadas pelos terminais nervosos (PAULSEN et al., 2017).

Os nociceptores expressam um ou mais receptores de superfície celular capazes de reconhecer e responder a cada um desses agentes pró-inflamatórios ou pró-algésicos e desse modo, diminui o limiar de despolarização destes nociceptores aumentando assim sua sensibilidade à temperatura ou toque. E todos esses mediadores inflamatórios, produzidos

e/ou liberados por diferentes tipos celulares causam a sensibilização periférica mostrado na Figura 7. (ELLISON, 2017; BASBAUM et al., 2009).

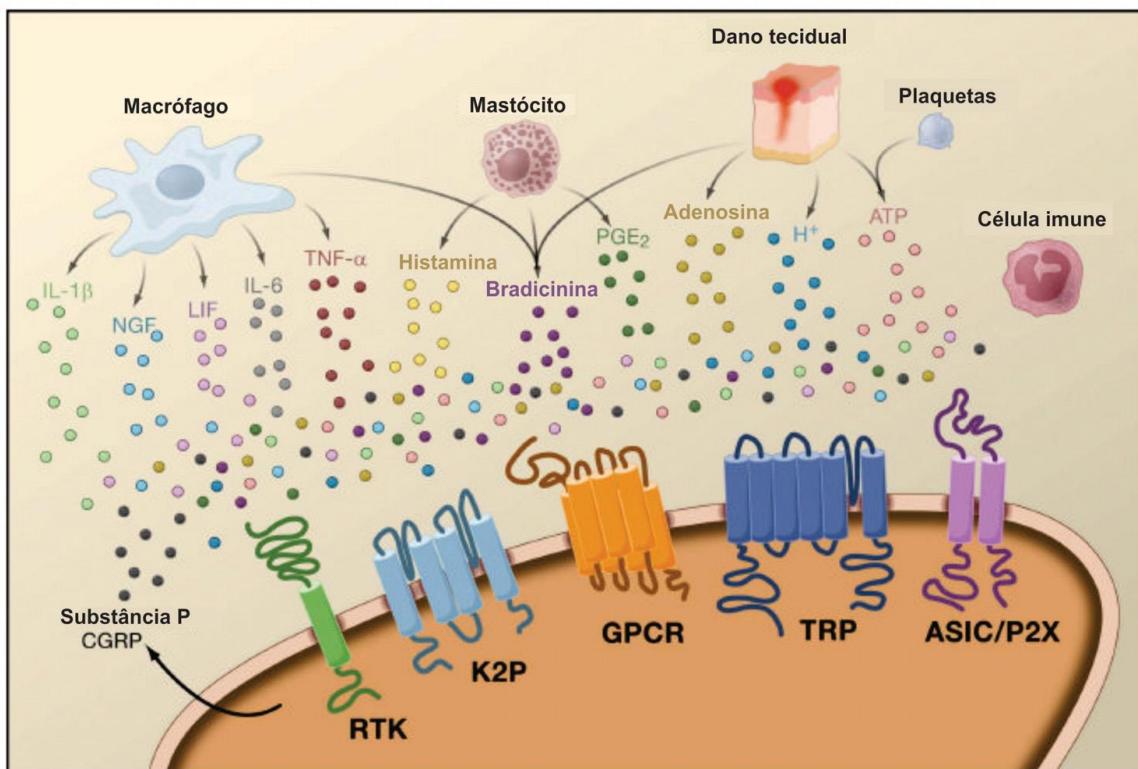


Figura 7: Mediadores periféricos da inflamação. A figura ilustra como um dano tecidual leva a liberação de mediadores inflamatórios por nociceptores ativados ou células não neurais que residem ou se infiltram na área lesada, envolvidos na sensibilização periférica aos estímulos de dor. A figura ainda mostra alguns tipos de receptores onde esses mediadores podem atuar, cada qual ao seu receptor específico. Fonte: Modificado de (BASBAUM et al., 2009).

Legenda: IL-1 β : Interleucina 1 β ; NGF: Fator de crescimento do nervo; LIF: fator inibidor de leucemia; IL-6: Interleucina 6, TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa; PGE2: prostaglandina E2; H $^{+}$: próton; ATP: adenosina trifosfato, CGRP: Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, RTK: receptor de tirosina quinase; K2P: canal de Potássio de dois poros; GPCR: receptor acoplado a proteína G; TRP: receptor de potencial transitório; ASIC: Canais iônicos sensíveis ao ácido; P2X: canais de íons dependentes de ATP.

2.4.3 Dor Neuropática

A dor neuropática pode resultar de lesões no sistema nervoso periférico (SNP) ou no SNC. As lesões no SNP podem ser causadas por trauma mecânico, doenças metabólicas, agentes neurotóxicos, infecção e tumores, enquanto as lesões no SNC podem ser causadas por acidente vascular encefálico ou esclerose múltipla (DRAY, 2008).

Lesões no SNP podem resultar em substancial perda funcional e diminuição da qualidade de vida pelo prejuízo permanente das funções sensório-motoras, tendo como consequências sociais longos períodos de afastamento do trabalho (ROSBERG et al., 2005).

Normalmente são descritas como sensações agudas, de queimação ou choque elétrico, ou até mesmo como formigamento (BARON, 2010).

Propõe-se que a dor neuropática leva a uma transmissão alterada e desordenada de sinais sensoriais para a medula espinhal após lesão periférica (BANNISTER et al., 2020). Essas mudanças resultam de alterações nos canais iônicos dentro do nervo afetado, com aumento da função dos canais de sódio levando ao aumento da excitabilidade, associada a perda dos canais de potássio, que normalmente modulariam a atividade (TSANTOULAS et al., 2014). Há um aumento da expressão e função dos canais de cálcio (Ca^{2+}) levando ao aumento da liberação do transmissor. Também ocorre uma perda sensorial se uma fibra for desconectada da periferia, mas o restante das fibras pode gerar atividade ectópica, resultando em dor em uma área entorpecida. As vias das fibras intactas remanescentes são hiperexcitáveis, e, portanto, um estímulo evoca maior resposta consequente a atividade nos chamados nociceptores irritáveis. No geral, há uma combinação de dor contínua, dormências e dores evocadas (COLLOCA et al., 2017).

2.4.4 Sistema nitrérgico na dor

O óxido nítrico (NO) é uma molécula inorgânica, com período de meia vida baixo, gasosa e que possui um elétron desemparelhado em sua última camada, tornando-a uma molécula altamente reativa se combinando facilmente com o oxigênio e com alguns metais de transição como ferro (BARRETO et al., 2005).

Possui diferentes funções no organismo como, neurotransmissão, controle do tônus vascular, regulação da transcrição e tradução gênica e atua como mediador químico inflamatório. Sua formação se dá através da L-arginina pela ação de formas neuronais e não neuronais específicas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), classificadas como: Isoforma 1 - NOS neuronal (nNOS) - isoforma constitutiva e que está presente principalmente em neurônios e é cálcio-calmodulina dependente e regula a transmissão sináptica no SNC (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002).

A isoforma 2 - NOS induzível (iNOS) é induzida por citocinas e lipopolissacarídeos no endotélio vascular, não é cálcio dependente e é regulada pelo estímulo imunológico, produzindo grandes quantidades de NO para defesa contra patógenos invasores. A síntese de NO pela iNOS não é verificada em condições basais e dura em torno de 24 horas após o estímulo inicial. Requer a síntese de mRNA e pode ser suprimida por outras citocinas e por glicocorticoides. A iNOS é expressa em resposta inflamatória devido a infecção ou dano tecidual (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002).

A isoforma 3 – também constitutiva, é a NOS endotelial (eNOS), que produz o NO continuamente no endotélio em condições basais. Também é cálcio-calmodulina dependente (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002). Atua na regulação da pressão sanguínea e do tônus vascular da musculatura lisa, inibe a proliferação de células da musculatura lisa das artérias, e ainda exerce influência na contratilidade da musculatura cardíaca (BRANDÃO et al., 2007).

A medição da concentração dos níveis de óxido nítrico raramente se dá pela detecção do gás propriamente dito, devido ao seu curto período de meia vida. Em geral essa medição se faz pela quantificação do produto da reação de oxidação do NO, nitratos (NO_3^-) e nitritos (NO_2^-), que são mais estáveis; pelo composto precursor da formação do NO, a L-arginina, ou por seus subprodutos como a L-citrulina ou a guanosina monofosfato cíclica (GMPc) e também pela expressão gênica da enzima NOS (ZUARDI, 2012).

O papel do óxido nítrico é considerado complexo e diversificado, pois contribui tanto para eventos de algesia quanto analgesia no sistema nociceptivo (CURY et al., 2011).

A participação do NO com aumento da nociceção é dependente da ativação de receptores NMDA (Choi et al., 2019; Cury et al., 2011). Quando o potencial de ação (PA) chega ao terminal pré-sináptico das fibras C nociceptivas, estimula a liberação de neurotransmissores excitatórios como substância P (SP), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), neurocinina, e glutamato (Miclescu e Gordh, 2009; Cury et al., 2011). O acoplamento do glutamato a seu receptor estimula a liberação de cálcio intracelular, gerando uma cascata de eventos que inclui a ativação da NOS e, consequentemente, o aumento da síntese de NO no terminal pós-sináptico (Cury et al., 2011). O NO sintetizado no terminal pós-sináptico pode deslocar-se para o meio extracelular, onde atuará como neurotransmissor retrógrado, estimulando a liberação de neurotransmissores excitatórios no terminal pré-sináptico (Cury et al., 2011) (Figura 8).

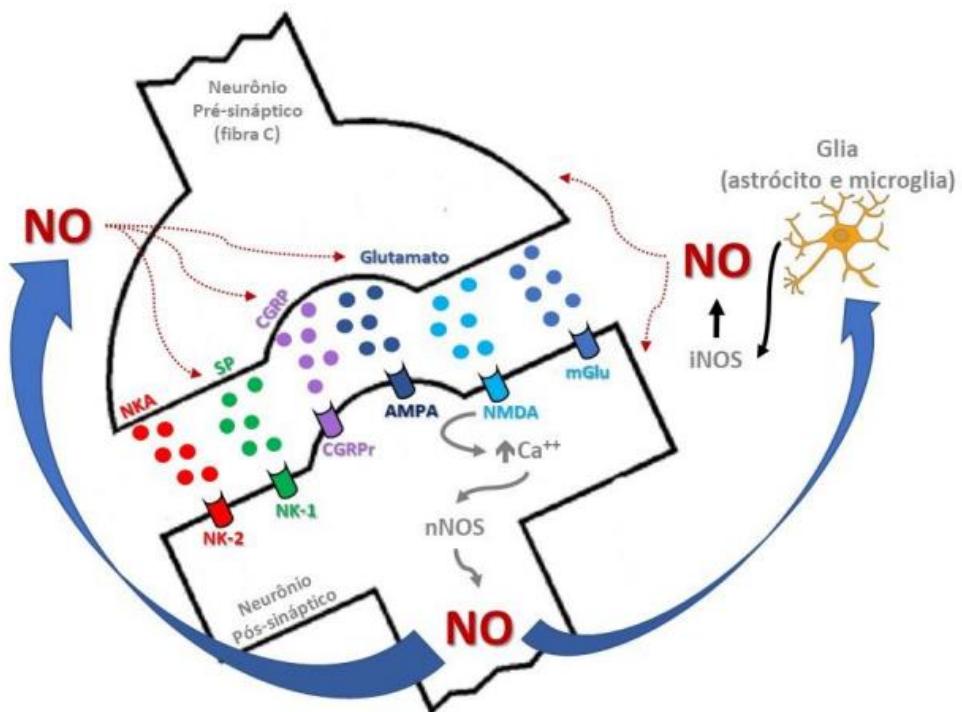


Figura 8: Via do óxido nítrico na nociceção. A ativação de canais NMDA pelo glutamato permite o influxo de cálcio (Ca^{2+}), ativando a enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e, consequentemente, aumentando as concentrações de NO. O NO sintetizado se difunde para o neurônio pré-sináptico e células da glia. No neurônio pré-sináptico, estimulará maior liberação de neurocinina A (NKA), substância P (SP), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e glutamato. Na célula da glia, o NO induz a ativação da óxido nítrico sintase indutível (iNOS). Fonte: Adaptado de CURY et al., 2011).

Na periferia a ação do NO como mediador no processo nociceptivo está relacionado a fatores como citocinas, ciclooxygenases, prostaglandinas e NOS (CURY et al., 2011). E linhas de pesquisas evidenciaram que a inflamação é um fator desencadeante para a formação de óxido nítrico, pois irá estimular a ativação das nNOS nos nervos periféricos e das iNOS pelas células inflamatórias (CURY et al., 2011; OMOTE et al., 2001).

Já os mecanismos pelos quais o NO está envolvido no processo de antinocicepção são dependentes da ativação de uma sinalização intracelular, com participação dos canais de potássio (K^+) sensíveis a adenosina trifosfato (ATP). Após a ligação do NO ao seu receptor intracelular guanilato ciclase solúvel (GCs), há a conversão de guanosina trifosfato (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). Assim, o GMPc pode estimular os canais de K^+ sensíveis ao ATP direta ou indiretamente, via proteína G (PKG) e este induzirem hiperpolarização da fibra (CURY, et al., 2011). (Figura 9).

As evidências mostram que há contribuição do NO no mecanismo antinociceptivo periférico e central de compostos opioides (AMARANTE et al., 2002; JAVANMARDI et al., 2005; HERVERA et al., 2009; NAPIMOOGA et al., 2009), anti-inflamatórios não esteroidais (LOZANO-CUENCA et al., 2005) e produtos naturais (GUJINSKI et al., 2009; GUTIERREZ

et al., 2012). Ademais, a via L-arginina/NO-GMPc possui um papel fundamental na antinocicepção promovida por terapias não farmacológicas como treinos aeróbicos e de resistência (GALDINO et al., 2015).

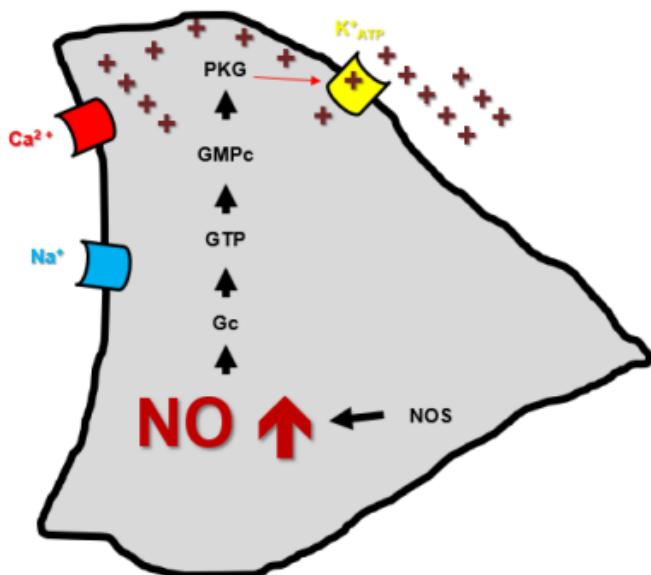


Figura 9: Via do óxido nítrico na antinocicepção. Via do óxido nítrico na antinocicepção. A ativação da óxido nítrico sintase (NOS) dá início a síntese do óxido nítrico (NO), que acopla-se à guanilato ciclase solúvel (GC), seu receptor intracelular. Consequentemente haverá aumento nas concentrações de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), ativando a proteína quinase G (PKG). A PKG irá fosforilar os canais de potássio dependentes de adenosina trifosfato ($K^+ ATP$), promovendo a abertura do canal e consequente hiperpolarização da célula. FONTE: Adaptada de CURY et al., 2011.

2.4.5 Sistema opioide na dor

Opiode é um termo utilizado para referir a compostos derivados do ópio, substância extraída da planta *Papaver somniferum* (conhecidos como opiáceos) quanto a substâncias que interagem no receptor opioide. Estes opioides podem ser divididos quanto à sua origem: endógena, naturais (encontrados na natureza como plantas como a papoula), sintéticos (metadona) e semissintéticos (oxicodona) (PATHAN & WILLIAMS, 2012). Os fármacos sintéticos ou naturais derivados do ópio tem sido amplamente utilizados nos tratamentos contra a dor (AL-HASANI, 2011).

Há séculos o homem descobriu as propriedades de alívio da dor ocasionada pelo ópio, o extrato produzido a partir da seiva da papoula. Porém, apenas no século XIX, as substâncias desse extrato foram identificadas, sendo as principais a morfina e a codeína, o que intensificou o seu uso na medicina (SNYDER & PASTERNAK, 2003).

Além da analgesia, os opioides provocam uma sensação de euforia, relaxamento, hipnose, o que frequentemente tem levado ao uso recreativo pela população, como exemplos o uso da heroína (semissintético) e morfina (SNYDER & PASTERNAK, 2003).

Essa atividade leva a adicção, um dos principais problemas ao uso de opioides, e tem estimulado a pesquisa na busca de novas alternativas sintéticas ou semissintéticas sem este efeito indesejado (BALLANTYNE & SULLIVAN, 2017).

Os opioides endógenos são conhecidos como endorfinas, uma contração da palavra morfina endógena. São três classes de endorfinas: encefalinas, dinorfinas e β -endorfinas (PASTERNAK, 2013). Seu mecanismo de ação depende da interação com receptores opioides. As três classes de endorfinas interagem com diferentes classes de receptores e de forma geral, as encefalinas por exemplo, interagem com receptores δ , dinorfinas com receptores κ e as β -endorfinas com receptores do tipo μ , embora haja exceções descritas, como a ligação de encefalinas a receptores μ e β -endorfinas a receptores δ (PASTERNAK, 2013; AKIL et al., 1998).

Esses receptores são expressos no córtex, sistema límbico e tronco encefálico e estão acoplados a proteína G inibitória (Gi). Sendo algumas estruturas exibindo uma maior expressão de um receptor sobre os outros (MERRER et al., 2009; LAW et al., 2000). No entanto, em alguns estados de dor, os receptores opioides desempenham um papel importante na analgesia, pois também podem ser encontrados em tecidos não neurais, como o epitélio vascular ou queratinócitos (Tabela 2) (LESNIAK & LIPKOWSKI, 2011).

Tabela 2: Localização dos receptores opioides (LESNIAK & LIPKOWSKI, 2011)

Tipo de receptor opióide	Expressão		
	SNC	SNP	Tecidos não neurais
μ	Neocôrtex, caudado-putamén, núcleo accumbens, tálamo, hipocampo, amígdala, núcleo do trato solitário.	Gânglio da raiz dorsal, estômago, duodeno, jejunum, íleo, cólon distal e proximal	Endotélio vascular, epitélio cardíaco, queratinócitos, canais deferentes, células de Sertoli.
κ	Caudado-putamén, núcleo accumbens, lobo posterior da hipófise	Gânglio da raiz dorsal, estômago, duodeno, jejunum, íleo, cólon distal e proximal	-
δ	Neocôrtex, caudado-putamén, núcleo accumbens, amígdala	Gânglio da raiz dorsal	-

A ativação dessa via analgésica endógena ocorre no córtex e hipotálamo, que se comunicam com o tronco encefálico, particularmente, com o mesencéfalo, onde há a

presença de substância cinzenta periaquedatal (SCP). Essa região é essencial para a modulação da nocicepção no organismo. Em ratos, o estímulo elétrico da SCP causa a antinocicepção nos animais evidenciando a importância dessa região na modulação nociceptiva (SNYDER & PASTERNAK, 2003).

Os estímulos chegam ao núcleo da rafe através dos neurônios da SCP onde são conduzidos pela via antinociceptiva descendente através do trato dorsolateral. Em seguida, projeções de neurônios da via descendente interagem com a sinapse entre as fibras C, A δ e o neurônio de 2^a ordem da via ascendente no corno posterior da medula. As projeções neuronais da via descendente contêm neuropeptídos opioides endógenos (endorfinas e encefalinas) que se ligam a receptores opioides presentes nas terminações pré e pós-sinápticas dos neurônios da via ascendente de condução do estímulo da nocicepção (Ballantyne & Sullivan, 2017). A interação entre neuropeptídos endógenos e receptores opioides inibem a liberação de substância P e glutamato, por exemplo, que são os neurotransmissores responsáveis pela condução do estímulo nociceptivo. Portanto, o estímulo endógeno de modulação nociceptiva se origina no sistema nervoso central para atenuar a percepção de nocicepção.

Após o opioide se ligar ao receptor, mudanças conformacionais permitem o acoplamento intracelular da proteína G ι à porção C-terminal dos receptores opioides. Na subunidade G α , GDP é substituído por GTP e ocorre uma dissociação do complexo trimérico proteico em subunidades G α e G $\beta\gamma$. A dissociação entre as subunidades inicia uma cascata de eventos intracelulares que medeiam o efeito antinociceptivo de opioides em neurônios aferentes primários. Essas subunidades da proteína G podem inibir adenilil ciclase e a produção de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc), e/ou interagir diretamente com canais iônicos para K $^+$, Ca $^{2+}$ e outros canais iônicos na membrana. Os três tipos de receptores opioides (μ , δ e κ) modulam vários canais iônicos para Ca $^{2+}$, suprimindo o influxo de cálcio e a liberação de neurotransmissores em muitos sistemas neuronais (STEIN, 2009).

Tal evento leva a inibição da liberação de substância P dos terminais centrais e periféricos dos neurônios sensoriais. Na membrana pós-sinápticas, os receptores opioides medeiam a hiperpolarização abrindo os canais de K $^+$, prevenindo a excitação e/ou propagação do potencial de ação (STEIN, 2009).

Nos dias atuais, os opioides são considerados a melhor escolha quando se trata de controle da dor moderada e grave, embora seus efeitos adversos comprometam a qualidade do manejo da dor. Além dos já citados efeitos de euforia, relaxamento e dependência,

pesquisas clínicas evidenciaram constipação, êmese, náusea, prurido e sonolência, como principal queixa por pacientes com dor crônica, neuropática, dor associada ao câncer e dor pós-operatória. Efeitos como depressão respiratória é bastante comum e o uso prolongado de opioides conduz ao desenvolvimento de tolerância e dependência (ZHENG et al., 2018; CONSTANTINO et al., 2012). No entanto, abordagens específicas para analgesia opioide periférica oferecem uma alternativa relevante para o tratamento da dor por evitarem ou minimizarem os efeitos adversos de fármacos opioides de ação central (STEIN, 2009).

2.5 Composto híbrido (\pm -cis) (6-etil-tetraidro-2H-pirano-2-il)metil 2-(2-(2,6-diclorofenilamino) fenil acetato (LS26).

O tratamento eficaz da dor continua sendo uma necessidade médica não atendida no início do século XXI. Embora a farmacoterapia à base de opioides ainda seja a estratégia mais poderosa para o tratamento da dor moderada a intensa, a relação risco-benefício está abaixo do ideal devido aos efeitos colaterais frequentes e graves (DUMITRASCUTA et al., 2021).

Devido ao aumento do uso médico e uso indevido de opioides somado ao crescimento simultâneo do número de mortes por overdoses e transtornos por uso de opioides, esforços de pesquisas em busca de novas moléculas promissoras são necessários para superar as limitações das terapias atuais com o objetivo de melhorar a eficácia do tratamento e reduzir as complicações (PASTERNAK et al., 2019).

Na tentativa de criar um potencial fármaco que seja promissor, estável e de baixa toxicidade, a química medicinal utiliza diversas estratégias, dentre elas a hibridação molecular (ARAÚJO, 2015).

A hibridação molecular é uma estratégia de planejamento de fármaco que se baseia na junção dos grupamentos farmacofóricos de duas ou mais moléculas, levando ao desenvolvimento de um novo composto híbrido. Tal molécula formada pode apresentar comportamentos diferentes em relação aos seus precursores, como, atividade farmacológica, potência e outros fatores diversos, sendo o aumento da atividade farmacológica o esperado de uma hibridação (ARAÚJO, 2015).

O LS26, um composto híbrido, foi sintetizado a partir de resultados experimentais que tiveram inicio em 2006 com Marinho e colaboradores que evidenciaram atividade antinociceptiva do composto ácido (\pm)-cis-(6-etil-tetrahidropirano-2-il)-fórmico. Tal mecanismo envolvia a participação do sistema opioide.

Na tentativa de melhorar a atividade do composto e reduzir efeitos adversos, foi realizada modificações químicas na molécula dando origem a 10 derivados do ácido (\pm)-cis-(6-etyl-tetrahidropirano-2-il)-fórmico (CAPIM et al., 2012). Uma das moléculas derivadas, o composto [\pm]-Cis)(6-etyl-Tetrahidro-2H-Pirano-2-il]Metanol (LS20), foi então hibridado com o anti-inflamatório não esteroidal diclofenaco de sódio, dando origem ao composto químico híbrido (\pm -cis) (6-etyl-tetraidro-2H-pirano-2-il)metil 2-(2-(2,6-diclorofenilamino) fenil acetato (LS26) objeto de nosso estudo (Figura 10).

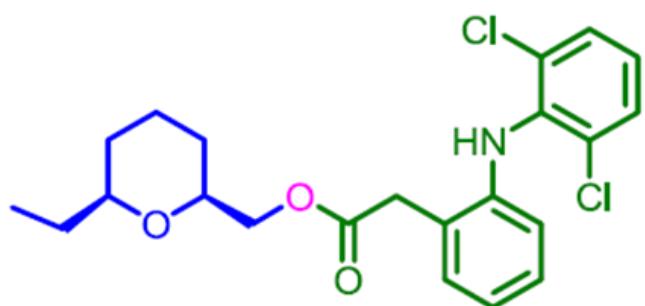


Figura 10: Figura química do composto (\pm -cis) (6-etyl-tetraidro-2H-pirano-2-il)metil 2-(2-(2,6-diclorofenilamino) fenil acetato (LS26)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo investigar a ação antinociceptiva e anti-inflamatória do composto LS26 em condições de dor aguda e inflamação aguda, respectivamente. Primeiramente, será realizada uma avaliação da capacidade do LS26 em reduzir a sensação de dor aguda, utilizando modelos experimentais de dor. Serão analisados os efeitos do composto LS26 na resposta nociceptiva em animais submetidos a estímulos dolorosos, visando determinar sua eficácia como agente antinociceptivo.

Além disso, será investigada a atividade anti-inflamatória do composto LS26 em modelos experimentais de inflamação aguda. Serão avaliados os efeitos do LS26 na redução da resposta inflamatória, incluindo parâmetros como edema, produção de mediadores inflamatórios e infiltração celular. Essa análise permitirá determinar a capacidade do LS26 em modular a resposta inflamatória associada à condição aguda.

Por fim, serão realizados estudos adicionais para elucidar os mecanismos responsáveis pelas atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do composto LS26. Serão investigados os possíveis alvos moleculares e vias de sinalização envolvidas na ação do LS26, visando compreender melhor seu mecanismo de ação e identificar potenciais alvos terapêuticos. Essa abordagem proporcionará insights importantes sobre os fundamentos moleculares subjacentes às propriedades farmacológicas do LS26, contribuindo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da dor e da inflamação agudas.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antinociceptiva do composto LS26 sobre a dor aguda através dos modelos de formalina, contorções abdominais induzidas por ácido acético e retirada da cauda;
- Avaliar a possibilidade de interferência do desempenho motor sobre o efeito antinociceptivo demonstrado pelo composto LS26, através do teste de rotatod;
- Avaliar a participação do sistema opioide sobre o efeito antinociceptivo do composto LS26, através da administração prévia de naloxona e antagonistas seletivos opioides no modelo de retirada da cauda;

- Avaliar a possível participação da via NO/cGMP/KATP no mecanismo de antinociceção do composto LS26 através do pré-tratamento com: L-NAME (inibidor não-seletivo da óxido nítrico sintase); ODQ (inibidor seletivo da guanilil ciclase sensível ao óxido nítrico) e glibenclamida (bloqueador seletivo de canal de K⁺ sensível ao ATP);
- Avaliar o envolvimento da via serotoninérgica na atividade do composto LS26, através da administração diária por 3 dias de 4-cloro-DL-fenilalanina (inibidor da enzima triptofano hidroxilase).
- Avaliar a atividade antiedematogênica do composto LS26 no modelo de edema de pata induzido por carragenina;
- Avaliar a atividade enzimática das enzimas cicloxigenases 1 e 2 frente ao composto LS26;
- Avaliar a ação do LS26 frente a nociceção induzida por Glutamato;
- Avaliar a atividade do composto LS26 no modelo de dor neuropática;
- Avaliar a migração de leucócitos e promover a quantificação de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-4, IL-10, TNF- γ) e óxido nítrico a partir do modelo de bolsa de ar subcutâneo (air pouch);
- Avaliar a toxicidade aguda e subcrônica do composto LS26;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos swiss machos, com peso de 20-25g. Os protocolos experimentais para este estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (CEUA/ICBS- UFRRJ) – sob nº: 23083.018767/2017-74. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ \text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12h. Água e a alimentação *ad libitum*, porém a ração foi retirada 8h antes da administração oral dos tratamentos.

4.2 Tratamentos

- Solução salina: Solução NaCl 0,9%. A solução foi administrada aos animais pertencentes ao grupo controle.
- Veículo: solução salina com dimetilsulfóxido, na concentração de 1,5% (v/v), para a solubilização do composto. Os grupos de animais tratados com veículo foram feitos para demonstrar que este não interfere na atividade antinociceptiva e/ou anti-inflamatória.
- Composto (\pm -cis) (6-etyl-tetraidro-2H-pirano-2-il)metil 2-(2-(2,6-diclorofenilamino)fenil acetato (LS26). Administrado por via oral (v.o) nas doses de 1, 5, 10, 100, 300 e 500 $\mu\text{mol}/\text{kg}$.
- Fentanil: agonista de receptores opioides. Utilizado como controle positivo nos modelos de formalina, imersão da cauda em água quente e indução de dor neuropática administrado por via subcutânea (s.c) na dose de 0,6 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, baseado em GONÇALVES e cols., 2021.
- Diclofenaco: anti-inflamatório não esteroidal. Utilizado como controle positivo nos modelos de contorções abdominais, formalina e edema de pata. Administrado por via oral (v.o) na dose de 500 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, baseado em GONÇALVES e cols., 2021.
- Prometazina: Antagonista seletivo de receptor histaminérgico do tipo H₁. Utilizado como controle positivo no modelo de permeabilidade vascular. Administrado por via subcutânea (s.c) na dose de 17,6 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, baseado em FERREIRA e cols., 2010.
- Dexametasona: anti-inflamatório esteroidal. Utilizado como controle positivo nos modelos de permeabilidade vascular e bolsa de ar subcutânea. Administrado por via subcutânea (s.c) na dose de 5,7 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, baseado em SANTOS e cols., 2015.

- Ácido acetilsalicílico: anti-inflamatório não esteroidal. Utilizado como controle positivo no modelo de nocicepção induzida por glutamato. Administrado por via oral (v.o) na dose de 1,11 mmol/kg, baseado em GONÇALVES e cols., 2016.

4.3 Agentes químicos

- Ácido acético: foi preparado na concentração de 0,8% (v/v) em solução salina e injetado por via intraperitoneal (i.p), 60 minutos após a administração oral dos tratamentos no modelo de contorções abdominais.
- Formalina: foi preparada na concentração de 2,5% (v/v) em solução salina e injetada em uma das patas traseiras dos animais, 60 minutos após a administração oral dos tratamentos no modelo de formalina.
- Carragenina: A carragenina foi preparada na concentração de 10 mg/ml. Administrada em volume de 0,1 mL, 60 minutos após a administração oral dos tratamentos no modelo de edema de pata e de bolsa de ar subcutâneo. No modelo de edema de pata a carragenina foi administrada em uma das patas traseiras dos animais.
- Glutamato: agonista de receptores glutamatérgicos. Utilizado no modelo de nocicepção induzido por glutamato. Administrado por injeção intratecal 175 nmol/local em um volume de 5 μ L, baseado em SIMÕES et al., 2016
- Naloxona: antagonista não-seletivo opioide. Administrado por via intraperitoneal (i.p) na dose de 15 μ mol/kg no modelo de imersão da cauda em água quente, baseado em STEFANO e cols., 2017.
- N-nitro-arginina-L-metil éster (L-NAME): inibidor não-seletivo da óxido nítrico sintase. Administrado por via intraperitoneal (i.p) na dose de 3,7 μ mol/kg no modelo de imersão da cauda em água quente, baseado em GONÇALVES e cols., 2016
- 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ): inibidor da enzima guanilato ciclase. Administrado por via intraperitoneal (i.p) na dose de 10,7 μ mol/kg no modelo de imersão da cauda em água quente, baseado em GONÇALVES e cols., 2016
- Glibenclamida: bloqueador seletivo de canais de potássio sensíveis a ATP. Administrado por via intraperitoneal (i.p) na dose de 2,0 μ mol/kg no modelo de imersão da cauda em água quente, baseado em GONÇALVES e cols., 2016
- Naltrindol: antagonista seletivo de receptor opioide do tipo δ . Administrado por via intraperitoneal (i.p) na dose de 7,2 μ mol/kg no modelo de imersão da cauda em água quente, baseado em GONÇALVES e cols., 2016

- Metilnaltrexona: antagonista seletivo periférico de receptor opioide do tipo μ . Administrado por via intraperitoneal (i.p) na dose de 8,4 $\mu\text{mol/kg}$ no modelo de imersão da cauda em água quente, baseado em GONÇALVES e cols., 2016
- Nor-binaltorfimina: antagonista seletivo de receptor opioide do tipo κ . Administrado por via intraperitoneal (i.p) na dose de 4,5 $\mu\text{mol/kg}$ no modelo de imersão da cauda em água quente, baseado em GONÇALVES e cols., 2016
- Atropina: antagonista não-seletivo de receptor muscarínico colinérgico. Administrado por via intraperitoneal (i.p) na dose de 17,2 $\mu\text{mol/kg}$ no modelo de imersão da cauda em água quente, baseado em ROSAS-BALLINA e cols., 2011.
- Mecamilamina: antagonista não-seletivo de receptor colinérgico nicotínico. Administrado por via intraperitoneal (i.p) na dose de 9,0 $\mu\text{mol/kg}$ no modelo de imersão da cauda em água quente, baseado em ROSAS-BALLINA e cols., 2011.
- Ondansetron: antagonista seletivo de receptor serotoninérgico do tipo 5-HT₃. Administrado por via intraperitoneal (i.p) na dose de 1,7 $\mu\text{mol/kg}$ no modelo de imersão da cauda em água quente, baseado em ROSAS-BALLINA e cols., 2011.
- 4-cloro-DL-fenilalanina (PCPA): Inibidor da síntese de serotonina. Administrado intraperitonealmente por 3 dias consecutivos (0,5 mmol/kg), baseado em HESS e cols., 2010.
- Diazepam – Agonista gabaérgico. Administrado na dose de 1,76 $\mu\text{mol/kg}$ por via subcutânea, baseado em ROSLAND e cols., 1990.

4.4 Modelos experimentais

4.4.1 Modelo de contorções abnôminas induzidas por ácido acético

Este modelo é usado para triagem da atividade antinociceptiva (KOSTER e cols., 1959). Solução salina, veículo, diclofenaco (500 $\mu\text{mol/kg}$) e o composto LS26 (1, 5, 10, 100, 300 e 500 $\mu\text{mg/kg}$) foram administrados por via oral 60 minutos antes da administração do ácido acético. As contorções abdominais são induzidas pela administração intraperitoneal de 0,01 mL/g de ácido acético (0,8%). A contagem do número de contorções é iniciada imediatamente após a injeção e permanece por um período de 30 minutos. O padrão de contorção abdominal estabelecido para contagem é o aparecimento de fortes contrações abdominais, alongamento de todo o corpo do animal, seguido pelo alongamento dos membros posteriores e contato do abdômen com o assoalho do recipiente em que o animal se encontra (Figura 11).

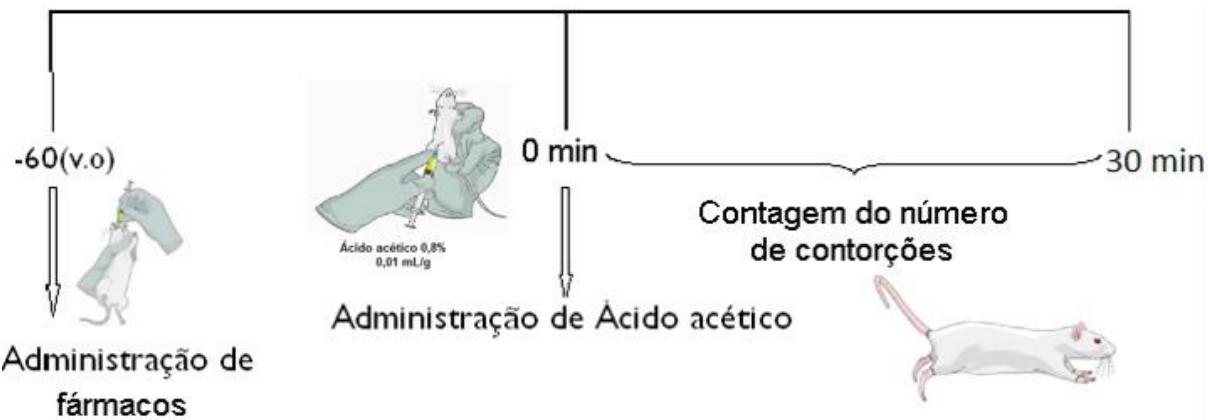


Figura 11: Modelo Experimental de Contorção Abdominal induzidas por Ácido Acético

4.4.2 Modelo de formalina

Este modelo é utilizado para avaliação da dor inflamatória e não-inflamatória (HUNSKAAR e HOLE., 1987). Solução salina, veículo, diclofenaco (500 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) e o composto LS26 (1, 5 e 10 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) foram administrados por via oral 60 minutos antes da administração da solução de formalina. Fentanil (0,6 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) foi administrado por via subcutânea. Injeta-se 0,02 mL de uma solução de formalina à 2,5% em uma das patas traseiras. Posteriormente, mede-se o tempo (em segundos) que o animal permanece lambendo a pata em que foi administrada a solução. A medida do tempo é feita em duas fases: a primeira chamada neurogênica, entre 0 e 5 minutos após a injeção da formalina e a segunda fase chamada inflamatória, entre 15 e 30 minutos após a injeção (Figura 12)

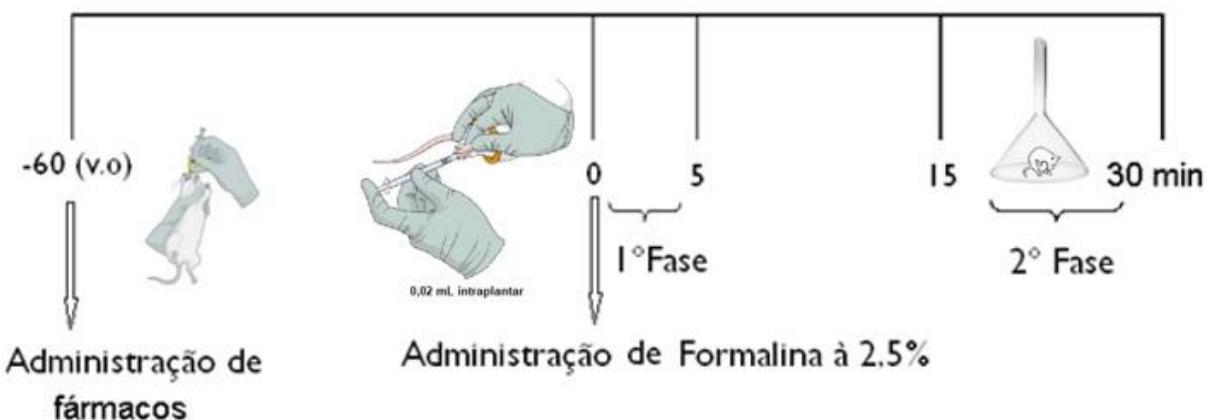


Figura 12: Protocolo do Modelo experimental de Formalina

4.4.3 Modelo de imersão em água quente

Este modelo será utilizado para avaliação da atividade antinociceptiva não-inflamatória envolvendo circuitaria espinhal (BEN-BASSAT e cols., 1959). O modelo foi realizado como previamente descrito (MONCADA e cols., 2003). Solução salina, veículo, e o

composto LS26 (1, 5 e 10 $\mu\text{mol/kg}$) foram administrados por via oral após as 2 medidas controle. Fentanil (0,6 $\mu\text{mol/kg}$) foi administrado por via subcutânea. Neste modelo, o animal foi imobilizado dentro de um recipiente cilíndrico e a cauda foi imersa (aproximadamente 2 cm) em banho-maria com água aquecida a uma temperatura de $50 \pm 1^\circ\text{C}$. Mediu-se o tempo (em segundos) em que o animal demorou a retirar a cauda de dentro da água, tempo este chamado de “tempo de latência”. Foram feitas oito medidas dos tempos de latência com intervalos de 20 minutos entre cada uma delas. As primeiras duas medidas foram realizadas antes da administração dos fármacos (e foram chamadas de medidas controle). A média das medidas controle foi denominada “linha de base”. Para se evitar danos teciduais causados pela temperatura na cauda dos animais, calculamos um “cut-off” de 3 vezes o valor da linha de base. A antinocicepção foi quantificada pelo cálculo do percentual de aumento em relação a linha de base, dado pela fórmula representada na Figura 12b, a partir do protocolo experimental (Figura 12b). Os resultados são expressos como tempo de reatividade em segundos.

Antagonistas como: naloxona, metilnaltrexona, nor-binaltorfimina e naltrindol atropina, mecamilamina, glibenclamida, ODQ, ondansetrona e L-NAME foram administrados previamente ao tratamento com o composto, com a finalidade de se avaliar a participação de diferentes sistemas (opioide, serotoninérgico, nitrérgico e colinérgico) sobre a atividade do composto. PCPA (0,5 mmol/kg) foi administrado intraperitonealmente por 3 dias consecutivos (Figura 13).

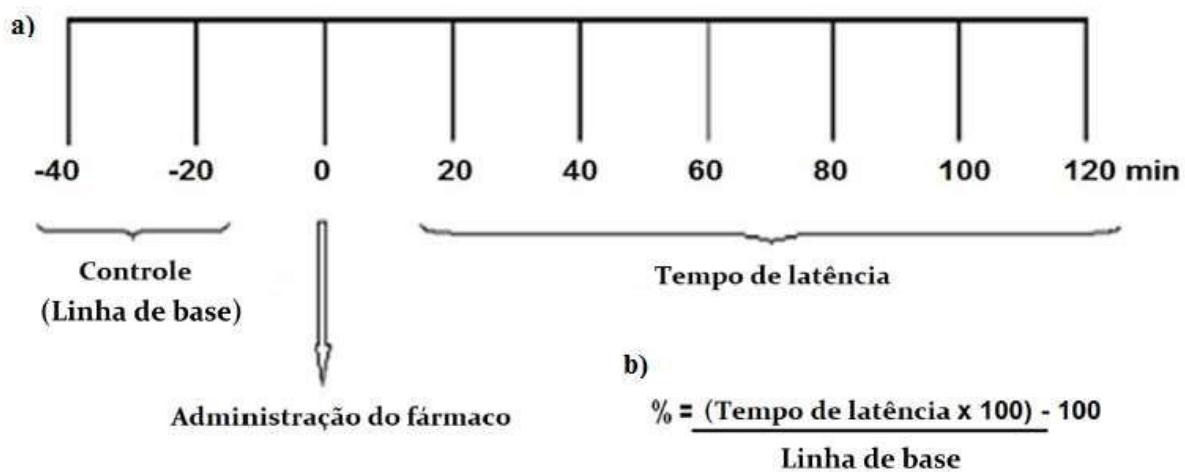


Figura 13: Modelo experimental de Imersão a água quente. a) Protocolo experimental; b) Fórmula utilizada para quantificação da antinocicepção.

4.4.4 Modelo de nocicepção induzido por glutamato

Para avaliar o envolvimento do Glutamato na via de sinalização do LS26, os animais receberam injeção intratecal 175 nmol/local em um volume de 5 μ L. Solução salina, veículo, ácido acetilsalicílico (AAS) (1,11 mmol/kg) e o composto LS26 (1, 5 e 10 μ mol/kg) foram administrados por via oral 60 minutos antes da administração da solução de glutamato. A dose de glutamato foi realizada de acordo com Simões et al., (2016). Em seguida, os camundongos foram imediatamente colocados em uma câmara de observação, onde o tempo que os animais permaneceram lambendo e mordendo na área injetada foi observado por 3 min (Meotti et al., 2006). O tempo de lambida da pata do animal foi medido com cronômetro e considerado indicativo de comportamento nociceptivo (Figura 14).

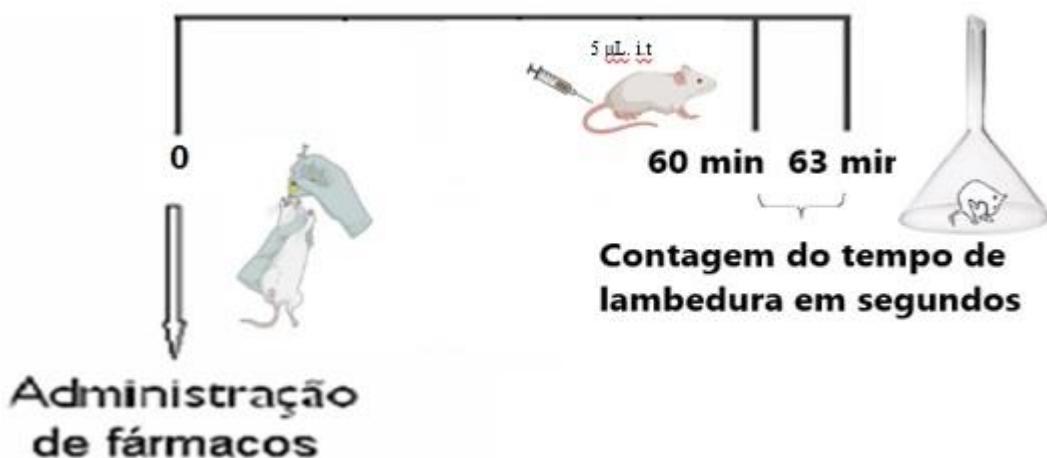


Figura 14: Modelo experimental de Nocicepção induzida por Glutamato

4.4.5 Modelo de Constricção Crônica do Nervo Ciático (CCC)

Este modelo é utilizado para indução de lesão em nervo periférico com consequente indução de dor neuropática (SEITZER *et al.*, 1990). Neste modelo, os camundongos foram anestesiados com quetamina (160 mg/kg; i.p.) e xilazina (32 mg/kg; i.p.), e submetidos à cirurgia, onde realizamos uma incisão na parte lateral da coxa direita e o nervo ciático foi exposto. Foram realizadas 4 ligaduras (com fio mononylon 6.0) ao longo do nervo e realizada sutura da ferida cirúrgica (figura 14). Uma resposta imune a sutura leva a inflamação do nervo ciático (NC). Uma falsa cirurgia (sham) foi realizada em um grupo de animais, onde o nervo foi exposto, mas não foi feita a ligadura. Três semanas após a cirurgia os animais desenvolvem alodinia. Na tabela 3 está representado os grupos experimentais e na

figura 15 está representada o procedimento cirúrgico. Os animais foram tratados por 14 dias e submetidos ao modelo de Von Frey, conforme descrito na seção correspondente.

Tabela 3: Grupos experimentais e seus respectivos tratamentos e procedimentos realizados

Grupos n=6	Tratamento	Condições experimentais
Controle	Solução salina	Ligadura do NC e tratamento com solução salina
SHAM	Solução salina	Sem ligadura do NC e tratamento com solução salina
Fentanil	Fentanil 0,6 μ mol/kg	Submetido a constrição do NC e tratamento com fentanil
LS26	LS26 10 μ mol/kg	Submetido a constrição do NC e tratamento com LS26

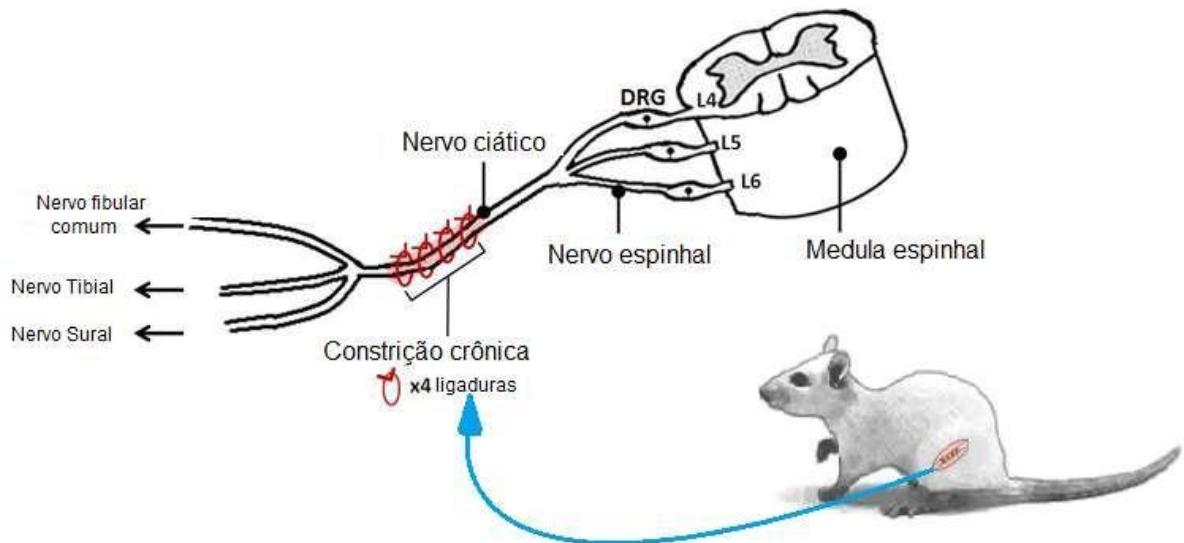


Figura 15: Constrição crônica do nervo ciático. São realizadas 4 ligaduras no nervo ciático animal, induzindo dor neuropática. (Fonte: adaptado de AUSTIN E MOALEM, 2012)

4.4.6 Modelo de Von Frey

A fim de avaliar a alodinia causada pela constrição crônica do nervo ciático utilizamos o modelo de Von Frey. Este método avalia a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico através de um estesiômetro eletrônico composto de um transdutor de pressão ligado por um cabo a um detector digital de força, a qual é expressa em gramas (CUNHA *et al*, 2004; JENSEN *et al.*, 1986). Ao transdutor foi adaptada uma ponteira descartável de 0,5 mm² com ponta abaulada para estimular diretamente a pata do animal com um estímulo não nocivo. Os animais foram colocados em caixas de acrílico, cujo assoalho é uma rede de malha igual a 5 mm² constituída de arame de 1 mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. Espelhos foram posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização das plantas das patas dos animais. A pressão foi exercida no meio da área plantar posterior da pata traseira operada até que o animal realizasse o movimento de retirada da pata (AUSTIN E MOALEM, 2012). O estímulo foi então

interrompido e a força exercida para promover a resposta característica, foi registrada pelo aparelho. A área da região plantar estimulada foi desafiada 3 vezes consecutivas em intervalos de 5-10 segundos e foi considerada como resultado a média aritmética desses 3 registros. Após 21 dias da cirurgia de CCC foram realizadas administrações diárias de LS26 10 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ v.o., fentanil 0,6 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ subcutâneo (s.c.) (ZULAZMI, 2015) e solução salina durante 14 dias. No primeiro dia iniciamos a administração das substâncias e submetemos os animais ao modelo de Von Frey nos tempos de 1, 2, 3 e 4h após a administração das substâncias. Nos dias 3, 6, 9, 12 e 14 submetemos os animais ao modelo com a estimulação da pata antes da administração das substâncias, a fim de verificar a atividade antinociceptiva crônica (Figura 16).

Após a última avaliação no modelo de Von Frey no 14º dia, os níveis de IL-1 β e IL-6 foram estimados (SAFIEH-GARABEDIAN et al., 1995). Os animais foram eutanasiados, e os segmentos do NC foram coletados e homogeneizados em solução salina fosfato tamponada (PBS) contendo NaCl 0,4 M, Tween 20 0,05%, 0,5% albumina de soro bovino (BSA), 0,1 mmol fenilmetilsulfonil fluoreto, 0,1 mmol de cloreto de benzetônio, 10 mmol de EDTA e 0,001% de aprotinina (37,6 mg por 100 ml de PBS com EDTA). Então as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 min a 4 °C. Os níveis de IL-1 β e IL-6 foram estimados usando um kit ELISA (ligado à enzima ensaio imunoabsorvente), seguindo as instruções do fabricante.

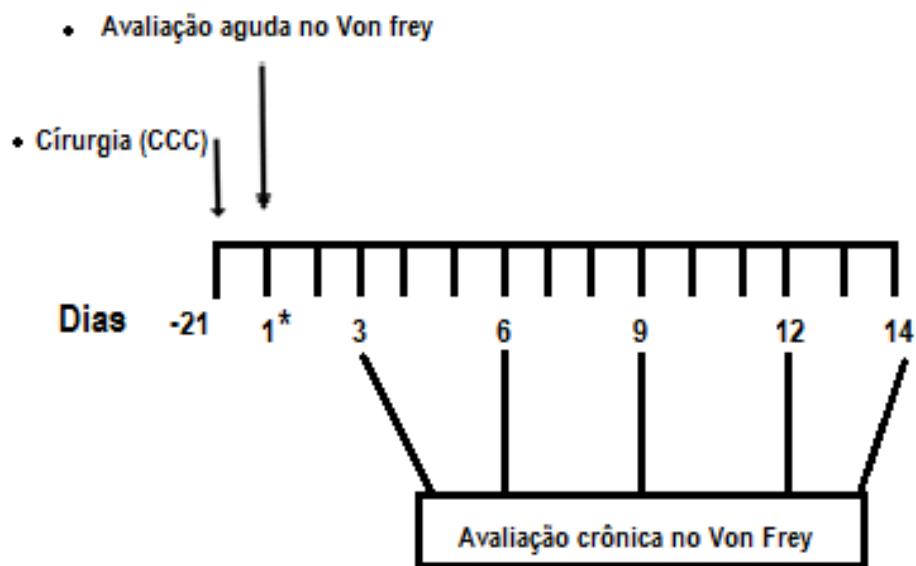


Figura 16: Protocolo experimental do modelo de Von Frey. CCC= constrição crônica do nervo ciático; 1*= início da administração das substâncias (LS26 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ v.o., Fentanil 0,6 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ i.p. e solução salina). Tratamento realizado durante 14 dias.

4.4.7 Modelo de rotarod

Este modelo é realizado para avaliar a integridade do sistema motor dos animais. Solução salina, veículo, Diazepam (1,76 $\mu\text{mol/kg}$; s.c.) e o composto LS26 (10 $\mu\text{mol/kg}$) foram administrados por via oral. O procedimento da barra giratória, descrito por DUNHAM E MIYA (1957), é capaz de detectar prejuízos neurológicos como ataxia, sedação e hiperexcitabilidade e é executado em um aparelho composto por uma barra plástica rugosa de 3 cm de diâmetro e de 50 cm de comprimento. O procedimento consiste na avaliação da capacidade do animal em se manter sobre uma barra que gira a uma velocidade de 20 rpm, permitindo-se até três reconduções após queda, durante o período de avaliação que é de 1 minuto. Considerando que uma parcela dos animais pode não ser naturalmente apta a se manter sobre a barra giratória, procedeu-se a uma pré-seleção na qual foram descartados de todo o procedimento os animais não-aptos. No dia anterior ao experimento os animais selecionados foram submetidos ao modelo para treinamento na barra giratória. A avaliação consiste na contagem do número de quedas no intervalo de 1 minuto (Figura 17).

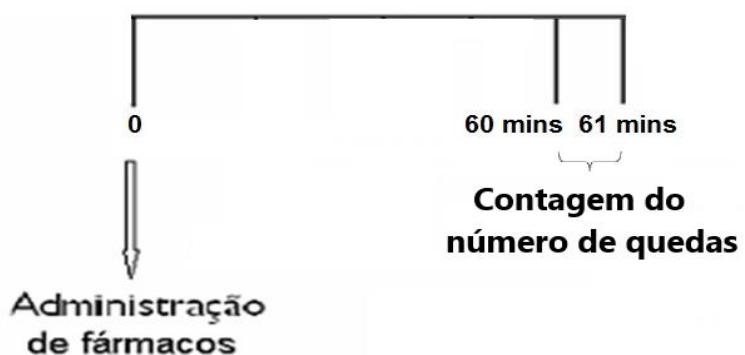


Figura 17: Modelo experimental de Rotarod

4.4.8 Modelo de edema de pata

Este modelo de avaliação edemato-gênica utiliza a técnica de pletismografia (FERREIRA, 1979), que consiste na utilização do pletismômetro, um equipamento capaz de registrar pequenas variações no volume de líquido deslocado pela inserção da pata, até a articulação tibio-társica. Veículo e o composto LS26 (10, 100,300 e 500 $\mu\text{mol/kg}$) foram administrados por via oral. O edema foi induzido pela injeção intraplantar de 0,02 mL de carragenina (1%, p/v) em uma das patas traseiras do animal. Na outra pata injeta-se o mesmo volume de soro fisiológico. O edema é avaliado nos tempos de 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção da carragenina (Figura 18).

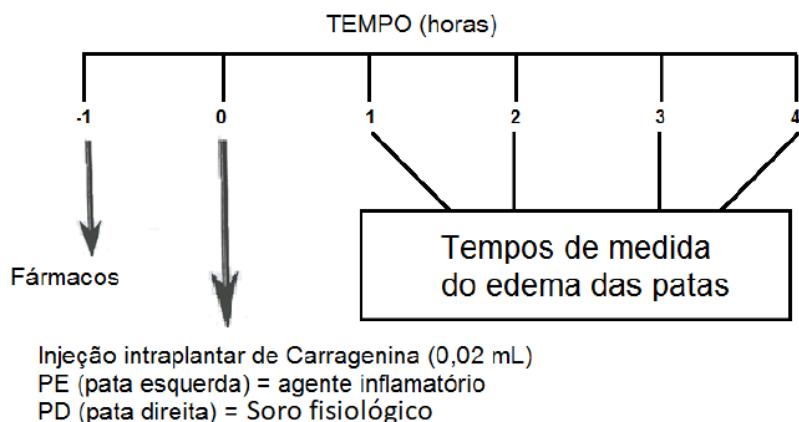


Figura 18: Modelo experimental de Edema de Pata

4.4.9 Modelo de permeabilidade vascular

Neste modelo avaliou-se o aumento na permeabilidade vascular como descrito por (MILES e MILES, 1952). O dorso dos animais foi tricotomizado e dividido em seis quadrantes, após foi injetado azul de Evans (1%) por via intravenosa (0,2 mL), acompanhado pela administração oral de solução salina, prometazina (17,6 μ mol/kg; s.c.) dexametasona (5,7 μ mol/kg; s.c.) ou LS26 (5 μ mol/kg). Posteriormente foi aplicado solução salina e concentrações crescentes de serotonina (0,1; 0,25 e 0,5 μ g/sítio) ou histamina (30, 100 e 300 μ g/sítio), por via intradérmica, 60 minutos após a administração de azul de Evans e de solução salina, prometazina, dexametasona ou LS26. Uma hora após a aplicação das substâncias no dorso dos animais estes foram eutanasiados e a pele do dorso foi removida. O extravasamento de líquidos causado pelo aumento na permeabilidade vascular foi caracterizado por regiões circulares azuis. A densidade óptica de cada uma dessas regiões foi quantificada após as regiões circulares terem sido removidas, cortadas em pequenos pedaços e incubadas em solução aquosa de formamida (1/1, v/v) por 48 h a 37°C. Foi retirado 50 μ L dessa solução e colocada na placa para a análise da absorvância das amostras que foi medida a 600 nm em leitor de elisa (Figura 19).

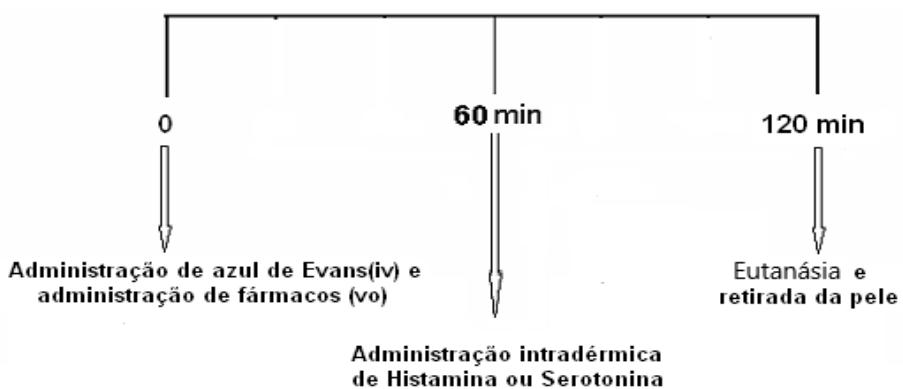


Figura 19: Protocolo experimental do modelo de Permeabilidade Vascular

4.3.8 Modelo da bolsa de ar subcutâneo

A bolsa de ar subcutâneo foi realizada como descrito por VIGIL e cols., 2008. Solução salina, veículo e o composto LS26 (100, 300 e 500 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) foram administrados por via oral, e a dexametasona (5,7 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) foi administrada por via subcutânea. Uma área do dorso dos animais (3cm x 2,5 cm) foi desinfetada. 7 mL de ar estéril foi injetado subcutaneamente em um único ponto. As bolsas de ar foram injetadas com ar estéril em dias alternados por 3 dias. Durante este período, eritema, inchaço, exsudação e vazamento de ar não sendo observados sugerem que o modelo foi estabelecido com sucesso. No quarto dia, os animais receberam carragenina (1%) administrada por via subcutânea no interior da bolsa de ar subcutâneo e 4 horas depois foram eutanasiados com uma sobredose de pentobarbital. Os animais foram então fixados em uma mesa cirúrgica e uma incisão na pele foi feita para perfurar a bolsa de ar. A cavidade subcutânea foi lavada com 1 ml de tampão fosfato salina estéril (pH 7,6 contendo NaCl (130 mM), Na₂PO₄ (5 mM) e KH₂PO₄ (1 mM) e heparina (20 UI/mL) em água destilada. Após a eutanásia, as amostras de lavado subcutâneo foram coletadas (Figura 20).

Uma alíquota de 20 μL do lavado subcutâneo de cada animal foi transferida para um Eppendorf® contendo 380 μL de líquido de Türk, possibilitando assim a coloração dos leucócitos e sua posterior contagem em câmara de Neubauer sob microscopia óptica.

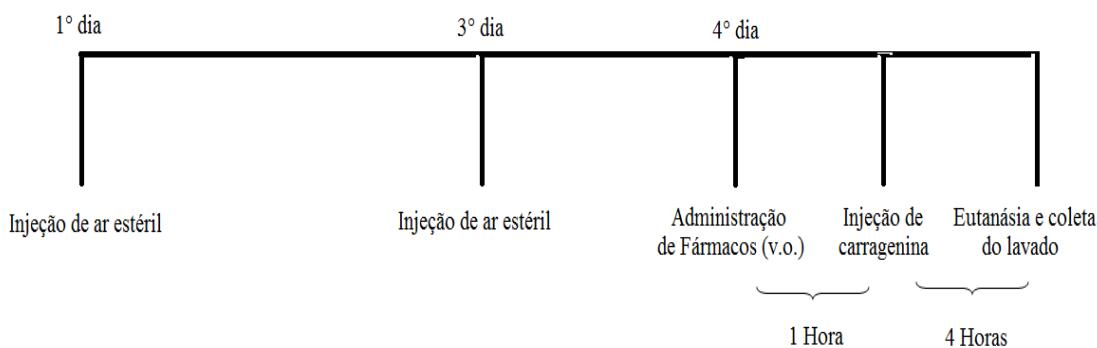


Figura 20: Modelo experimental de bolsa de ar subcutânea

4.3.9. Quantificação de mediadores inflamatórios

Objetivando quantificar as citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-4, IL-10 e IFN- γ , além de óxido nítrico presentes nos exsudatos, estes foram centrifugados a 170 x g por 10 min à 4° C, os sobrenadantes foram coletados 4 horas após a realização do modelo de bolsa de ar subcutâneo. Procedeu-se então a determinação da concentração destas citocinas em alíquotas (50 μ L) do lavado subcutâneo. Para isto, foram utilizados kit's de imunoensaio enzimático (ELISA Kit Mouse, Cayman Chemical®), os quais mensuram as concentrações de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-4, IL-10 e IFN- γ na amostra através do método de ELISA, semelhante ao estudo de RAMANA e cols. (2007). Já o conteúdo de nitrito foi mensurado utilizando o reagente de Griess, para analisar o nível de óxido nítrico. A análise dos mediadores inflamatórios foi realizada no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), do professor Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes.

4.3.10. Avaliação da atividade enzimática de COX-1 e COX-2

Foi utilizado um kit de imunoensaio enzimático (COX INHIBITOR SCREENING ASSAY KIT – 96 WELLS, Cayman Chemical®), que determina a produção de prostaglandina a partir da atividade das enzimas COX-1 e COX-2. A partir dos dados obtidos com a utilização do kit, foi construída uma curva padrão através do percentual da razão entre a taxa de ligação de uma amostra e a taxa de ligação máxima (%B/B₀) e do log da concentração de prostaglandina em pg/mL. Este gráfico permitiu a obtenção de valores

referentes à concentração de prostaglandina (pg/mL) obtida pela ação das enzimas COX-1 e COX-2 e a porcentagem de inibição de ambas as enzimas frente à utilização de doses crescentes do LS26.

4.3.11 Avaliação toxicológica oral aguda e subcrônica *in vivo*

Foi realizado modelo de toxicidade aguda, ou chamado também de dose fixa de acordo com o modelo experimental descrito por LORKE (1983) a fim de determinar os valores de DL_{50} . Uma única dose oral de LS26 (5 mmol/kg) foi administrada a um grupo de animais. Foi considerada a dose de acordo com os critérios de classificação da comunidade Europeia (OGA, 2003). Os animais foram colocados posteriormente em uma câmara de observação.

A avaliação da toxicidade subcrônica foi realizada através da exposição repetida de LS26 na dose de 100 μ mol/kg por 14 dias v.o. (adaptado de OGA 2003) a fim de verificar se o tratamento subcrônico produziria algum efeito tóxico não observado no modelo agudo. Um grupo controle foi administrado com solução salina e foi exposto ao mesmo protocolo (Figura 21).

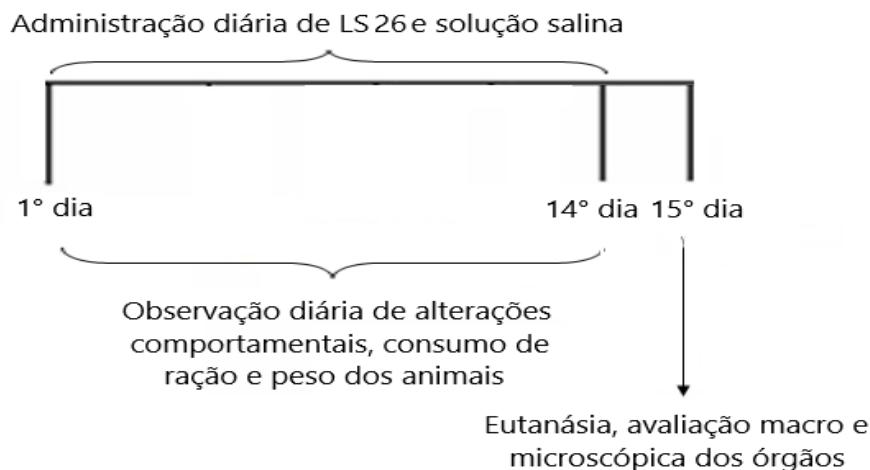


Figura 21: Protocolo de avaliação toxicológica e subcrônica

4.4.10 Análise estatística

Os grupos experimentais foram constituídos por 6 animais. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). A significância estatística entre os grupos foi realizada pela aplicação de análise de variância (One-Way ANOVA) acompanhada pelo teste de Bonferroni para os testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético formalina, permeabilidade vascular, rotarod, nocicepção induzida por glutamato, quantificação de leucócitos e citocinas. E foi realizada pela aplicação de análise

de variância (Two-Way ANOVA) acompanhada pelo teste de Bonferroni para os testes de imersão da cauda em água quente cauda, Von Frey e edema de pata. Os valores de *p* menor que 0,05; 0,01 e 0,001 foram usados como nível de significância. O método de regressão não-linear foi usado para o cálculo de DI50 do composto LS26 e seus precursores no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético e cálculo de CI50 na avaliação da atividade COX.

5 RESULTADOS

5.1 Modelos de avaliação da atividade antinociceptiva

A administração intraperitoneal (i.p) de ácido acético 0,8% produziu $56,0 \pm 3,6$ contorções dentro do tempo de 30 minutos (no grupo controle). A administração por via oral do composto LS26 nas doses de 5, 10, 100, 300 e 500 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ e o diclofenaco na dose de 500 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ foram capazes de inibir o número de contorções abdominais em relação ao grupo controle. Todas as doses do LS26 se mostraram eficazes no modelo de antinocicepção, (Figura 22) indicando atividade antinociceptiva do composto. Os percentuais de inibição do número de contorções abdominais obtidos foram: 4,6%, ($53,4 \pm 4,6$ contorções) na dose de 1 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, 56,1% ($24,6 \pm 2,0$ contorções) na dose de 5 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, 43,6% ($31,6 \pm 4,1$ contorções) na dose de 10 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, 64,6% ($19,8 \pm 4,4$ contorções) na dose de 100 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, 71,1% ($16,2 \pm 2,8$ contorções) na dose de 300 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ e 68,9% ($17,4 \pm 1,6$ contorções) na dose de 500 $\mu\text{mol}/\text{kg}$. A administração oral de diclofenaco (500 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) inibiu o número de contorções abdominais em 65,0%, quando comparada ao veículo, conforme mostrado na Tabela 4.

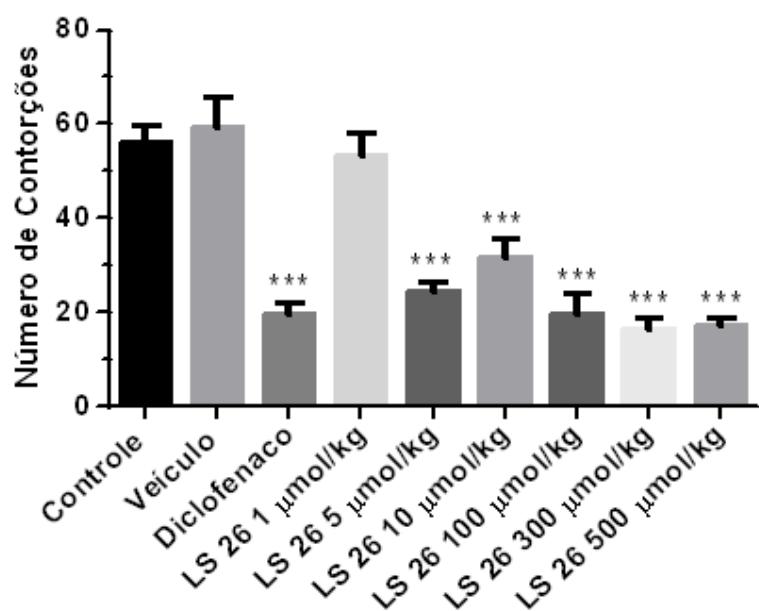


Figura 22: Efeito antinociceptivo do composto LS26 no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os animais foram tratados por via oral com solução salina, veículo, diclofenaco (500 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) e LS26 – 1, 5, 10, 100, 300 e 500 $\mu\text{mol}/\text{kg}$. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. ($n = 6$) do número de contorções. A significância estatística (**p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com diclofenaco, veículo e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

Tabela 4: Modelo de contorções adbominais induzidas por ácido acético

Tratamentos	Número de contorções (Média \pm EPM)	Inibição (%)
Controle	56,0 \pm 3,6	---
Veículo	59,6 \pm 6,3	---
Diclofenaco 500 μ mol/kg	19,6 \pm 2,6***	65,0%
LS26 1 μ mol/kg	53,4 \pm 4,6	4,6%
LS26 5 μ mol/kg	24,6 \pm 2,0***	56,1%
LS26 10 μ mol/kg	31,6 \pm 4,1***	43,6%
LS26 100 μ mol/kg	19,8 \pm 4,4***	64,6%
LS26 300 μ mol/kg	16,2 \pm 2,8***	71,1%
LS26 500 μ mol/kg	17,4 \pm 1,6***	68,9%

***p < 0,001 entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, diclofenaco e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

A partir dos dados acima, construiu-se os gráficos para a determinação do DI₅₀ (Dose inibitória 50%) a fim de verificar a dose do fármaco responsável por inibir 50% das contorções (Figura 23). O composto híbrido se mostrou mais potente que seus precursores por ter apresentado um DI₅₀ inferior.

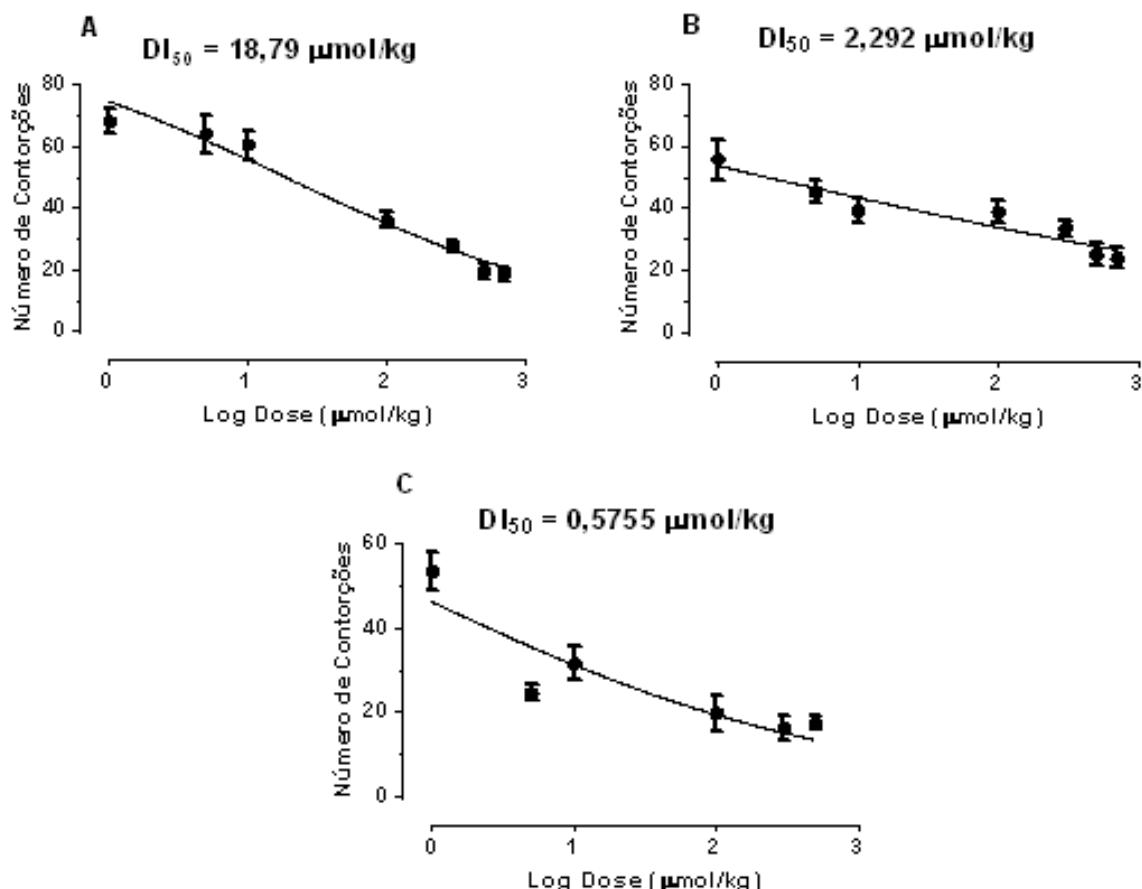


Figura 23: Curvas dose-resposta do diclofenaco (A), do composto LS20 (B) e do composto LS26 (C), no modelo contorções abdominais induzidas por ácido acético, e cálculo de DI_{50} . A análise estatística foi feita através da regressão não-linear.

5.1.2 Modelo de formalina

Os animais foram tratados com LS26 nas doses de 1, 5 e 10 $\mu\text{mol/kg}$, pois as doses mais baixas não tiveram diferença significativa em relação as mais altas. Como controle positivo foi utilizado fentanil (0,6 $\mu\text{mol/kg}$). O grupo controle apresentou na 1^a fase o tempo de lambedura de $50,8 \pm 3,6$ segundos e na 2^a fase foi de $173,9 \pm 7,8$ segundos. O tratamento com o composto LS26 reduziu significativamente o tempo em que os animais permaneceram lambendo as patas após injeção de formalina. Na 1^a fase, o efeito inibitório somente foi observado na maior dose, 10 $\mu\text{mol/kg}$ (inibição de 51,6% - $24,6 \pm 3,9$ segundos). E já na 2^a fase, o efeito inibitório foi observado nas doses de 5 e 10 $\mu\text{mol/kg}$ (inibição de 41,2% - $102,3 \pm 15,2$ segundos e inibição de 52,4% - $82,8 \pm 18,7$ segundos) respectivamente conforme a Figura 24 e Tabela 5. Fentanil reduziu o tempo de lambedura em 56,1% ($22,3 \pm 3,6$ segundos) e 75,7% ($42,3 \pm 4,2$ segundos), na 1^a e 2^a fases, respectivamente; enquanto diclofenaco inibiu o tempo de lambedura somente na 2^a fase em 54,6% ($79,0 \pm 8,0$ segundos).

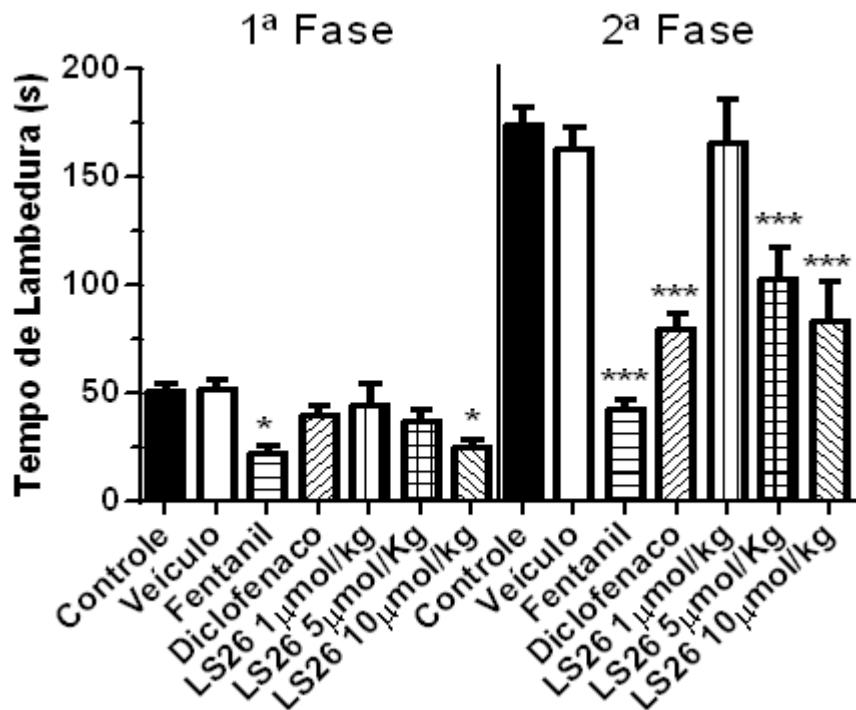


Figura 24: Efeito antinociceptivo do composto LS26 no modelo de formalina. Os animais foram tratados por via oral com solução salina, veículo, fentanil (0,6 µmol/kg; s.c.), Diclofenaco (500 µmol/kg) e LS26 – 1, 5 e 10 µmol/kg. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) do tempo de lamedura. A significância estatística (* p < 0,05 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, fentanil, diclofenaco e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Tabela 5: Tempos de lamedura, em segundos, no modelo de formalina

Tratamentos	Tempo de Lamedura (segundos – Média ± EPM)	
	1ª Fase	2ª Fase
Controle	50,8 ± 3,6	173,9 ± 7,8
Veículo	51,7 ± 4,3	162,4 ± 10,7
Fentanil	22,3 ± 3,6*	42,3 ± 4,2***
Diclofenaco 500 µmol/kg	40,0 ± 4,0	79,0 ± 8,0***
LS26 1 µmol/kg	44,6 ± 9,6	165,2 ± 21,0
LS26 5 µmol/kg	36,9 ± 5,6	102,3 ± 15,2***
LS26 10 µmol/kg	24,6 ± 3,9*	82,8 ± 18,7***

* p < 0,05 e ***p < 0,001 entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, fentanil, diclofenaco e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

5.1.3 Modelo de imersão da cauda em água quente

No modelo de retirada de cauda, os animais receberam por via oral o composto LS26 nas doses de 1, 5 e 10 µmol/kg. O fentanil (0,6 µmol/kg) foi padronizado como controle positivo do experimento. A figura 25 (A) evidencia que somente a maior dose de LS26 testada foi capaz de aumentar o tempo de resposta em relação ao grupo controle, confirmando assim seu efeito antinociceptivo neurogênico, iniciando no tempo 80 min com o composto

LS26, enquanto com o fentanil o efeito se manifestou em todos os tempos de medida. Em B, o composto LS26 na maior dose apresentou 82,2% de aumento na área sob a curva, enquanto o fentanil apresentou 158,1% de aumento. Na Tabela 6, os tempos de latência em segundos no experimento são apresentados.

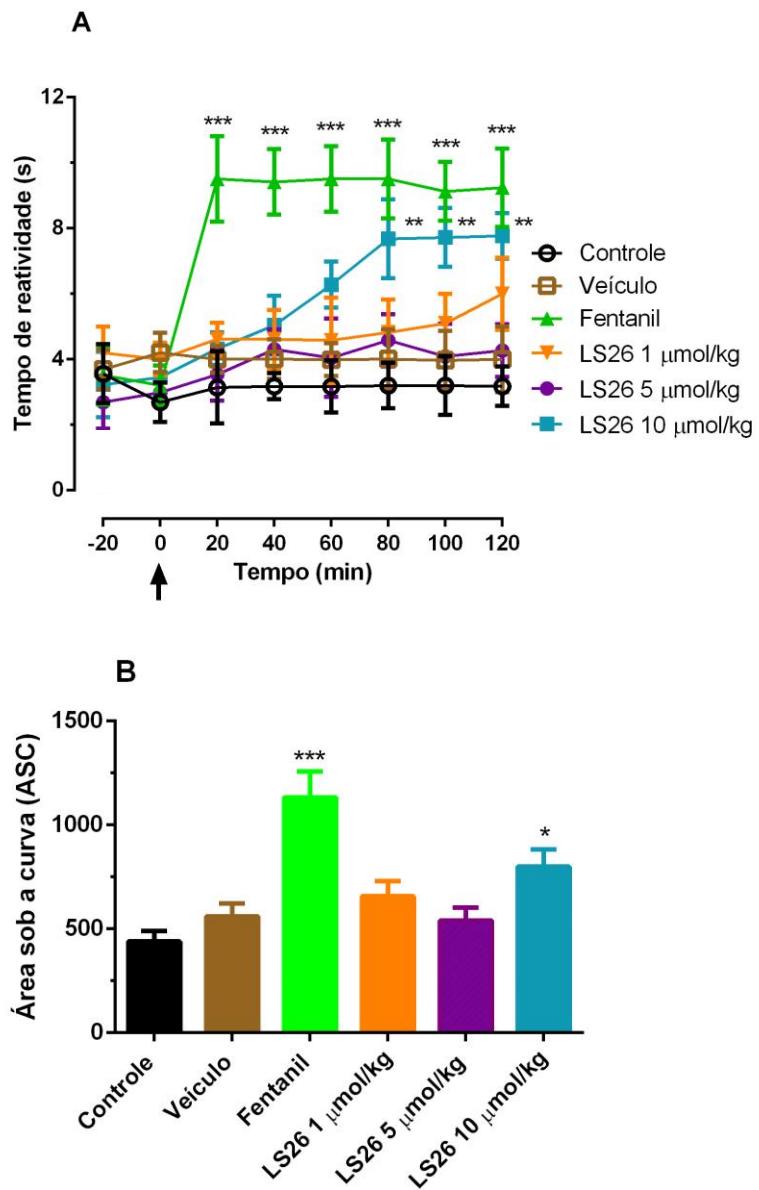


Figura 25: Efeito antinociceptivo do composto LS26 no modelo de imersão da cauda em água quente. Em A, os animais foram tratados por via oral com solução salina, veículo, fentanil (0,6 $\mu\text{mol/kg}$; s.c.) e doses crescentes do composto (1, 5 e 10 $\mu\text{mol/kg}$). Em B, representação do cálculo da área sob a curva. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. ($n = 6$) do tempo de reatividade. Em A, a significância estatística (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, fentanil e doses crescentes do composto, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Em B, a significância estatística (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, fentanil e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Tabela 6: Tempos de latência, em segundos, no modelo de imersão da cauda em água quente.

Tratamentos	Linha de Base	Tempo de Latência (segundos – Média ± EPM)					
		20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
Controle	3,13 ± 0,5	3,14 ± 1,1	3,18 ± 0,4	3,17 ± 0,8	3,20 ± 0,7	3,20 ± 0,9	3,18 ± 0,6
Veículo	3,95 ± 0,6	4,00 ± 0,4	4,01 ± 0,6	3,99 ± 0,5	4,01 ± 0,9	3,97 ± 0,9	4,00 ± 1,0
Fentanil	3,37 ± 0,7	9,51 ± 1,3***	9,42 ± 1,0***	9,51 ± 1,0***	9,51 ± 1,2***	9,13 ± 0,9***	9,24 ± 1,2***
LS26 1µmol/kg	4,10 ± 0,6	4,62 ± 0,5	4,61 ± 0,9	4,58 ± 1,3	4,82 ± 1,0	5,10 ± 0,9	6,00 ± 1,1
LS26 5 µmol/kg	2,84 ± 0,6	3,54 ± 0,8	4,31 ± 0,6	4,05 ± 1,2	4,58 ± 0,8	4,09 ± 1,0	4,27 ± 0,8
LS26 10 µmol/kg	3,34 ± 0,4	4,32 ± 0,5	5,04 ± 0,9	6,28 ± 0,7	7,68 ± 1,2**	7,72 ± 0,9**	7,77 ± 0,7**

** p < 0,01 e ***p < 0,001 entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, fentanil e doses crescentes do composto, por Two-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

O mesmo modelo também foi utilizado para investigar a participação das vias opioide, nitrérgica, envolvimento dos canais de K⁺ regulados por ATP e a participação da guanilato ciclase sensíveis ao óxido nítrico no controle antinociceptivo. Para isso, foi realizado administração prévia de naloxona, L-NAME, glibenclamida e ODQ respectivamente como demonstrado na Figura 26. A fim de se avaliar o envolvimento dos receptores opioides no mecanismo de ação do LS26, administramos naloxona (N), um antagonista não-seletivo de receptor opioide (15 µmol/kg i.p.), 15 minutos antes da administração do composto, enquanto a dose do LS26 usada foi aquela que obteve o melhor resultado no modelo de retirada de cauda (10 µmol/kg). A naloxona foi capaz de inibir o efeito antinociceptivo do LS26 de forma significativa a partir de 80 minutos, reduzindo em 27,7% a área sob a curva, após a administração conjunta de LS26 + N, de modo a demonstrar uma possível participação do sistema opioide na ação do composto.

Para a avaliação da participação da via nitrérgica, os animais foram pré tratados com L-NAME (3,7 µmol/kg i.p., inibidor não-seletivo da óxido nítrico sintase). Os resultados demonstram uma queda na ação antinociceptiva do LS26 após a inibição na síntese de óxido nítrico nos tempos 80, 100 e 120 minutos, sugerindo uma provável participação da via L-arginina-NO no mecanismo do LS26 (Figura 26). A prévia administração de L-NAME reduziu em 32,6% a área sob a curva.

Avaliou-se da mesma forma o envolvimento dos canais de potássio regulados por ATP no mecanismo de ação do composto LS26 administrando-se glibenclamida previamente após a administração do composto. A glibenclamida na dose de 2 μ mol/kg (i.p.) reduziu o efeito antinociceptivo do composto, levantando uma possível participação desses canais para o mecanismo de ação do LS26. Posteriormente, também foi avaliado a influência do pré-tratamento dos animais com ODQ (10,7 μ mol/kg i.p., inibidor da guanilato ciclase sensível ao óxido nítrico). O tratamento prévio com ODQ foi capaz de reduzir o efeito de antinocicepção induzido pelo composto LS26, igualmente nos tempos de 80, 100 e 120 minutos após a administração do medicamento (Figura 26) e (Tabela 7). A prévia administração de glibenclamida e ODQ reduziu em 28,7% e 36,5%, respectivamente, a área sob a curva.

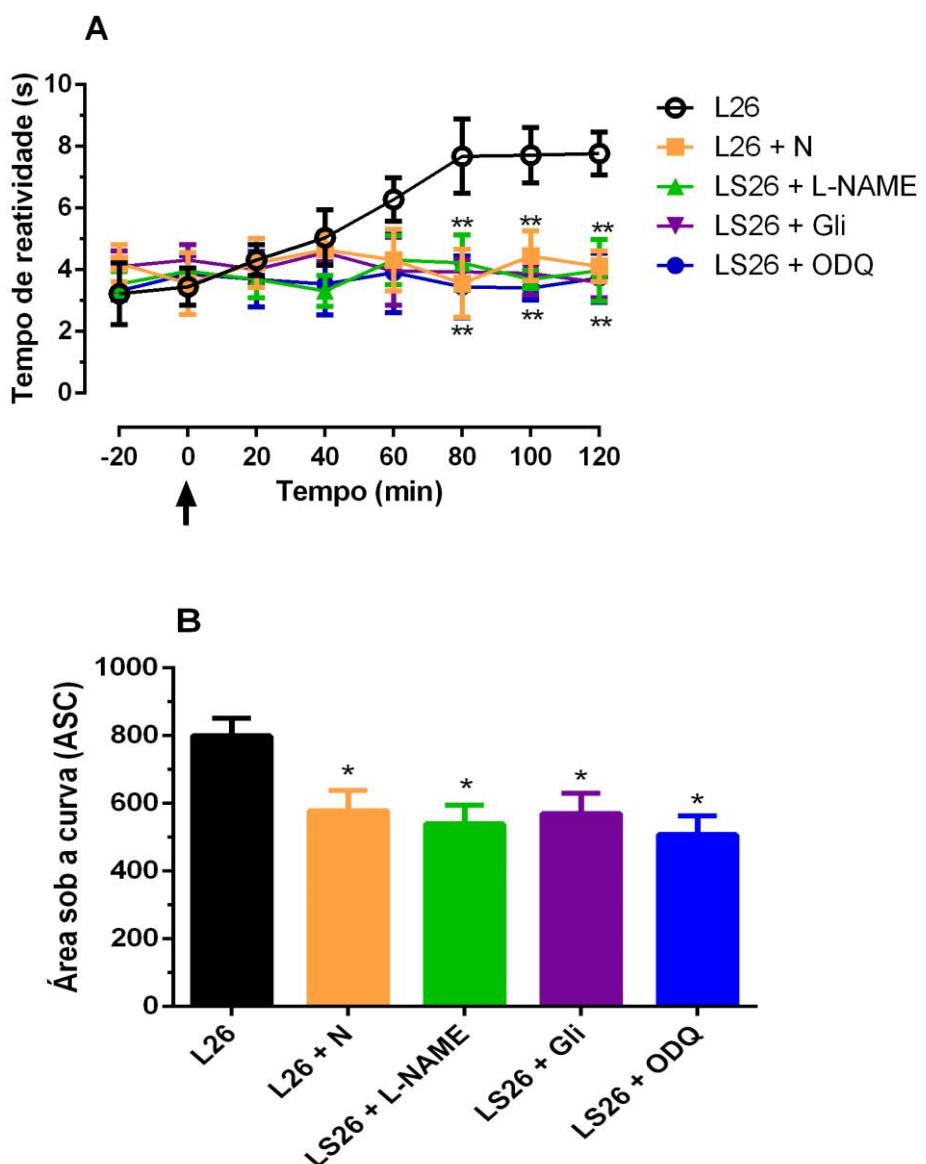


Figura 26: Influência da administração de naloxona (N), N-nitro-arginina-L-metil éster (L-NAME), glibenclamida (Gli) e 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one ODQ sobre o efeito antinociceptivo do

LS26 (10 $\mu\text{mol/kg}$) no modelo de imersão da cauda em água quente. Em A, Os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com naloxona (15 $\mu\text{mol/kg}$), L-NAME (3,7 $\mu\text{mol/kg}$), Glibenclamida (2 $\mu\text{mol/kg}$) e ODQ (10,7 $\mu\text{mol/kg}$) 15 minutos antes da administração do composto. Em B, representação do cálculo da área sob a curva. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. (n = 6) do tempo de reatividade. Em A, a significância estatística (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$) foi calculada entre o composto isolado e o composto combinado a naloxona, L-NAME, glibenclamida e ODQ por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Em B, a significância estatística ($p < 0,001$) foi calculada entre o composto isolado e o composto combinado a naloxona, L-NAME, glibenclamida e ODQ por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.**

Tabela 7: Avaliação da influência da administração prévia de Naloxona, L-NAME, Glibenclamida e ODQ sobre os tempos de latência induzidos pelo LS26 no modelo de imersão da cauda em água quente.

Tratamentos	Linha de Base	Tempo de Latência (segundos - Média \pm EPM)						
		20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min	
LS26	3,34 \pm 0,4	4,32 \pm 0,5	5,04 \pm 0,9	6,28 \pm 0,7	7,68 \pm 1,2	7,72 \pm 0,9	7,77 \pm 0,7	
LS26 + N	3,89 \pm 0,6	4,22 \pm 0,8	4,65 \pm 0,5	4,32 \pm 1,0	3,56 \pm 1,1**	4,45 \pm 0,8**	4,11 \pm 0,5**	
LS26 + L-NAME	3,80 \pm 0,6	3,69 \pm 0,6	3,32 \pm 0,5	4,32 \pm 0,8	4,23 \pm 0,9**	3,69 \pm 0,3**	3,98 \pm 1,0**	
LS26 + Gli	4,22 \pm 0,7	4,01 \pm 0,5	4,56 \pm 0,3	3,96 \pm 1,1	3,94 \pm 0,4**	3,88 \pm 0,7**	3,98 \pm 1,0**	
LS26 + ODQ	3,80 \pm 0,6	3,69 \pm 0,6	3,32 \pm 0,5	4,32 \pm 0,8	4,23 \pm 0,9**	3,69 \pm 0,3**	3,60 \pm 0,5**	

** $p < 0,01$ entre o composto isolado e o composto associado a naloxona, L-NAME, glibenclamida e ODQ por Two-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

Considerando uma possível participação do sistema opioide no mecanismo de ação do LS26, avaliamos a participação seletiva dos receptores opioides (μ , κ e δ). Na Figura 27 foi avaliada a interferência da administração prévia de metilnaltrexona (antagonista seletivo periférico do receptor μ opioide) na dose de 8,4 $\mu\text{mol/kg}$ i.p., demonstrando uma diminuição no efeito antinociceptivo do LS26, com a redução de 34,7% na área sob a curva. Também foi analisada o envolvimento do receptor δ opioide através da administração de naltrindol na dose de 7,2 $\mu\text{mol/kg}$ (antagonista seletivo do receptor δ opioide) sobre o efeito antinociceptivo do composto, sendo observado uma redução na ação do LS26 a partir de 60 minutos após a administração intraperitoneal, com a redução de 29% na área sob a curva. A administração prévia de nor-binaltorfimina (antagonista seletivo do receptor κ opioide) reduziu o efeito antinociceptivo do composto a partir de 80 minutos após a administração do fármaco até 120 minutos, com a redução de 36,3% na área sob a curva. Estes resultados mostram o envolvimento de receptores opioides μ , κ e δ no mecanismo de ação do composto LS26 (Tabela 8).

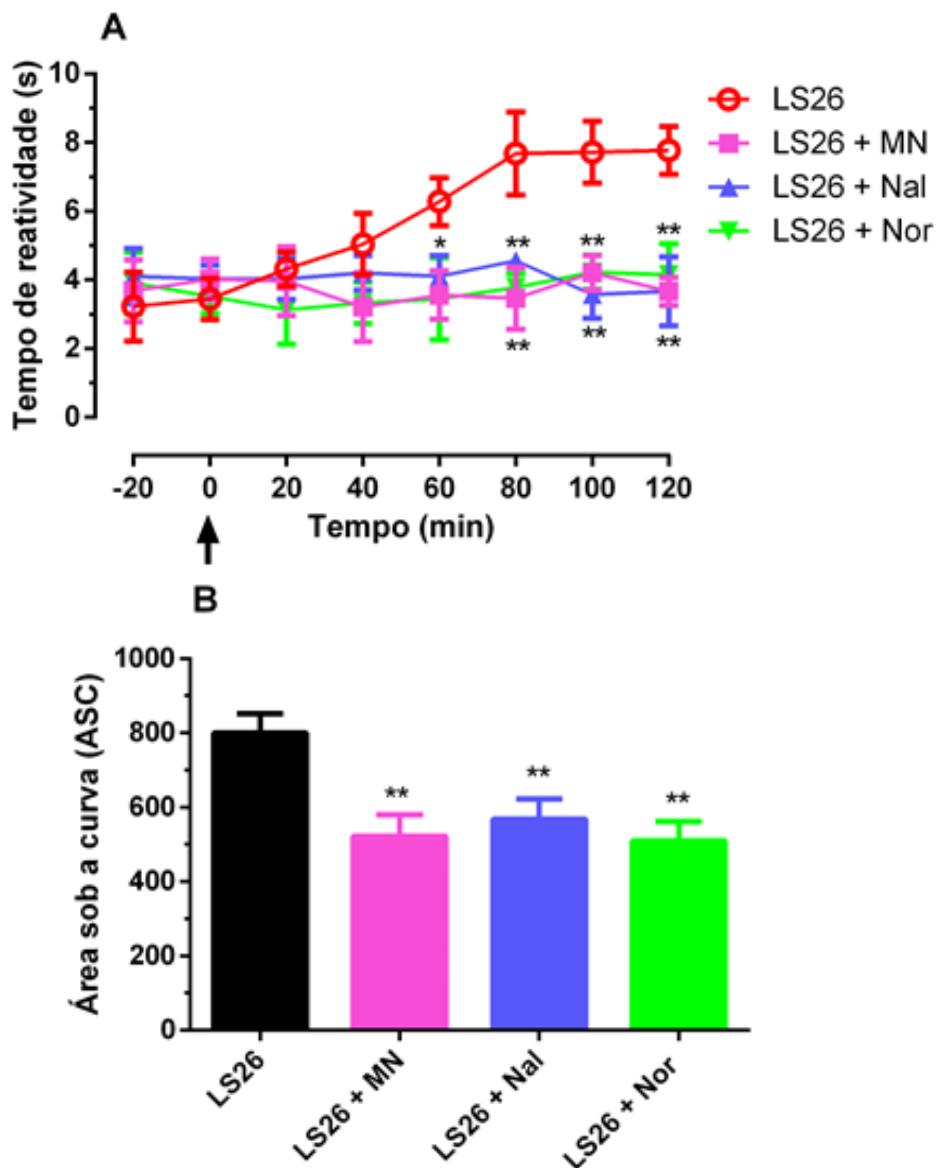


Figura 27: Influência da administração prévia de metilnaltrexona (MN), Naltrindol (Nal) e Nor-Binaltorfimina (Nor) sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto LS26 (10 µmol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente. Em A, Os animais foram pré-tratados intraperitonealmente (i.p.) com metilnaltrexona (8,4 µmol/kg), Naltrindol (7,2 µmol/kg) e Nor-Binaltorfimina (4,5 µmol/kg) 15 minutos antes da administração do composto. Em B, representação do cálculo da área sob a curva. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. (n = 6) do tempo de reatividade. Em A, a significância estatística (p < 0,01) foi calculada entre o composto isolado e o composto combinado a metilnaltrexona, Naltrindol e Nor-Binaltorfimina por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Em B, a significância estatística (**p < 0,01) foi calculada entre o composto isolado e o composto combinado a metilnaltrexona, Naltrindol e Nor-Binaltorfimina por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni**

Tabela 8: Avaliação da influência da administração prévia de Metilnaltrexona, Naltrindol e Nor-Binaltorfimina sobre os tempos de latência induzidos pelo LS26 no modelo de imersão da cauda em água quente.

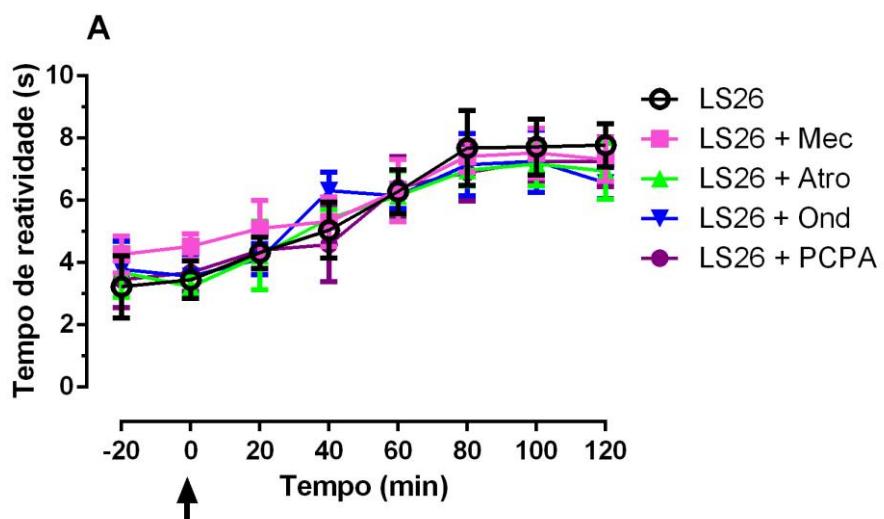
Tratamentos	Linha de Base	Tempo de Latência (segundos - Média ± EPM)					
		20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
LS26	3,34 ± 0,4	4,32 ± 0,5	5,04 ± 0,9	6,28 ± 0,7	7,68 ± 1,2	7,72 ± 0,9	7,77 ± 0,7

LS26 + MN	3,85 ± 0,3	3,97 ± 1,0	3,21 ± 1,0	3,56 ± 0,7	3,47 ± 0,9**	4,21 ± 0,5**	3,67 ± 0,4**
LS26 + Nal	4,07 ± 0,7	4,03 ± 0,6	4,21 ± 0,5	4,11 ± 0,6	4,56 ± 0,2**	3,58 ± 0,7**	3,67 ± 1,0**
LS26 + Nor	3,72 ± 0,5	3,13 ± 1,0	3,33 ± 0,6	3,45 ± 1,2	3,78 ± 0,4**	4,23 ± 0,5**	4,15 ± 0,9**

** p < 0,01 entre o composto isolado e o composto associado a Metilnaltrexona, Naltrindol e Nor-Binaltorfimina por Two-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

Para avaliar a possível participação do sistema colinérgico no mecanismo de ação do LS26, foi administrado o antagonista não-seletivo de receptores nicotínicos, mecamilamina (9 μ mol/kg), antagonista colinérgico muscarínico não-seletivo, atropina na dose de 17,2 μ mol/kg, ambos pela via intraperitoneal. Os resultados, como vemos na Figura 28, não foram capazes de inibir os efeitos antinociceptivo do composto LS26.

O antagonista seletivo de receptor serotoninérgico 5HT₃, ondansentron, também foi administrado para avaliar o envolvimento da via serotoninérgica, além do inibidor da enzima triptofano hidroxilase, 4-cloro-DL-fenilalanina (PCPA), um inibidor da síntese de serotonina. As doses utilizadas para ambos os fármacos foi de 1,7 μ mol/kg e 0,5 mmol/kg, por via intraperitoneal. Nenhuma alteração no efeito antinociceptivo do LS26 foi observada (Figura 28).



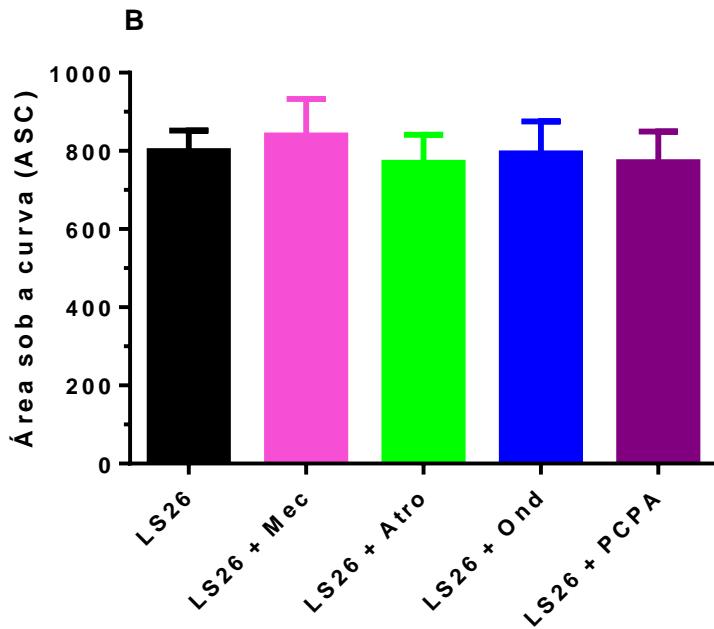


Figura 28: Influência da administração prévia de Mecamilamina (Mec) Atropina (Atro), Ondasetron (Ond) e 4-cloro-DLfenilalanina (PCPA) sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto LS26 (10 $\mu\text{mol/kg}$) no modelo de imersão da cauda em água quente. Em A, os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com Mecamilamina (9 $\mu\text{mol/kg}$), Atropina (17,2 $\mu\text{mol/kg}$) e Ondasetron (1,7 $\mu\text{mol/kg}$) 15 minutos antes da administração do composto. PCPA (0,5 mmol/kg) foi administrado intraperitonealmente por 3 dias consecutivos. Em B, representação do cálculo da área sob a curva. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. ($n = 6$) do tempo de reatividade. Em A, a significância estatística ($*p < 0,05$) foi calculada entre o composto isolado e o composto combinado a Mecamilamina, Atropina, Ondasetron e PCPA por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Em B, a significância estatística ($*p < 0,05$) foi calculada entre o composto isolado e o composto combinado a Mecamilamina, Atropina, Ondasetron e PCPA por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Tabela 9: Avaliação da influência da administração prévia de Mecamilamina (Mec), Atropina (Atro), Ondansentron (Ond) e PCPA sobre os tempos de latência induzidos pelo LS26 no modelo de imersão da cauda em água quente.

Tratamentos	Linha de Base	Tempo de Latência (segundos - Média + EPM)						
		20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min	
LS26	3,34 \pm 0,4	4,32 \pm 0,5	5,04 \pm 0,9	6,28 \pm 0,7	7,68 \pm 1,2	7,72 \pm 0,9	7,77 \pm 0,7	
LS26 + Mec	4,39 \pm 0,3	5,10 \pm 0,9	5,32 \pm 0,8	6,32 \pm 1,0	7,41 \pm 0,5	7,52 \pm 0,8	7,31 \pm 0,7	
LS26 + Atro	3,46 \pm 0,7	4,23 \pm 1,1	5,41 \pm 0,3	6,14 \pm 0,8	6,97 \pm 0,5	7,17 \pm 0,7	6,94 \pm 0,9	
LS26 + Ond	3,67 \pm 0,5	4,12 \pm 0,5	6,31 \pm 0,6	6,14 \pm 0,4	7,14 \pm 1,0	7,25 \pm 1,0	6,56 \pm 0,5	
LS26 + PCPA	3,57 \pm 0,5	4,39 \pm 0,6	4,58 \pm 1,2	6,41 \pm 1,0	6,89 \pm 0,9	7,25 \pm 0,7	7,24 \pm 0,8	

* $p < 0,05$ entre o composto isolado e o composto associado a Mecamilamina, Atropina, Ondasetron e PCPA por Two-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

5.1.4 Modelo de nocicepção induzida por glutamato

Os efeitos do LS26 sobre a nocicepção induzida por glutamato é mostrado na Figura 29. A injeção intratecal de glutamato provocou uma reação de lambedura de $168,0 \pm 21,0$ segundos no grupo controle, e nenhuma dose de LS26 foi capaz de atenuar o efeito nociceptivo nos animais (Tabela 7).

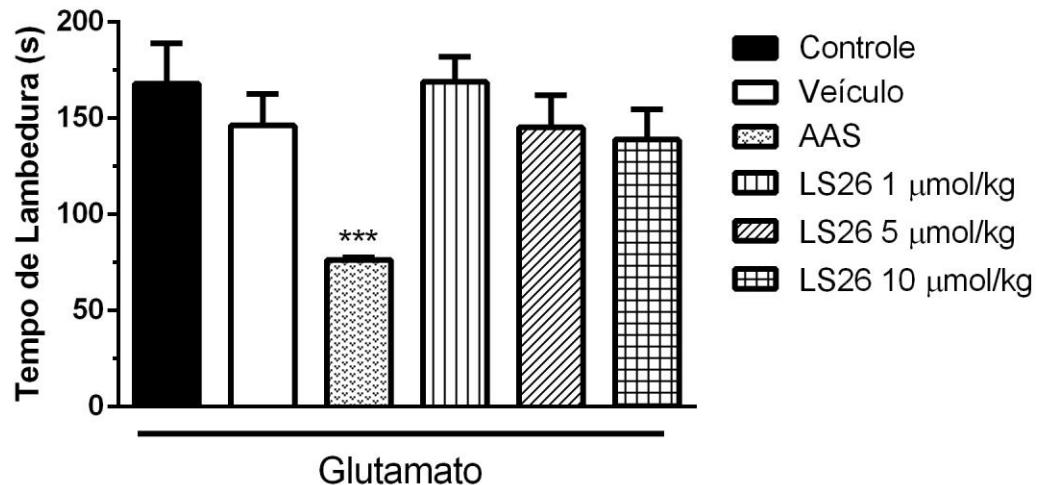


Figura 29: Efeitos de LS26 administrado por via oral no tempo de lambedura induzido por glutamato (175 nmol) por via intratecal. Os animais foram tratados com solução salina, veículo, ácido acetilsalicílico (AAS - 1,11 mmol/kg) e LS26 (1, 5 e 10 μ mol/kg). Os resultados são apresentados como a média \pm SEM ($n = 6-8$). A significância estatística foi calculada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ ao comparar os grupos tratados com AAS, LS26 e veículo com o grupo de controle.

Tabela 7 – Modelo de nocicepção induzido por glutamato.

Tratamentos	Tempo de Lambedura (segundos – Média \pm EPM)	Inibição (%)
Controle	168,0 \pm 21,0	---
Veículo	146,3 \pm 16,3	13,0%
Ácido acetilsalicílico	76,4 \pm 1,1 ***	54,5%
LS26 1 μ mol/kg	168,9 \pm 13,2	---
LS26 5 μ mol/kg	145,2 \pm 16,8	13,6%
LS26 10 μ mol/kg	138,9 \pm 15,8	17,3%

*** $p < 0,001$ entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, ácido acetilsalicílico e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

5.1.5 Modelo de Von Frey

Este modelo foi realizado com o objetivo de analisar a atividade antinociceptiva do composto LS26 em um modelo de indução de dor neuropática. Como podemos observar na Figura 30 e Tabela 10, o composto foi capaz de reduzir a alodinia nos tempos de 2, 3 e 4

horas, pós-tratamento quando comparado ao grupo controle, aumentando em 89,6% a área sob a curva, enquanto o fentanil aumentou em 116% a área sob a curva.

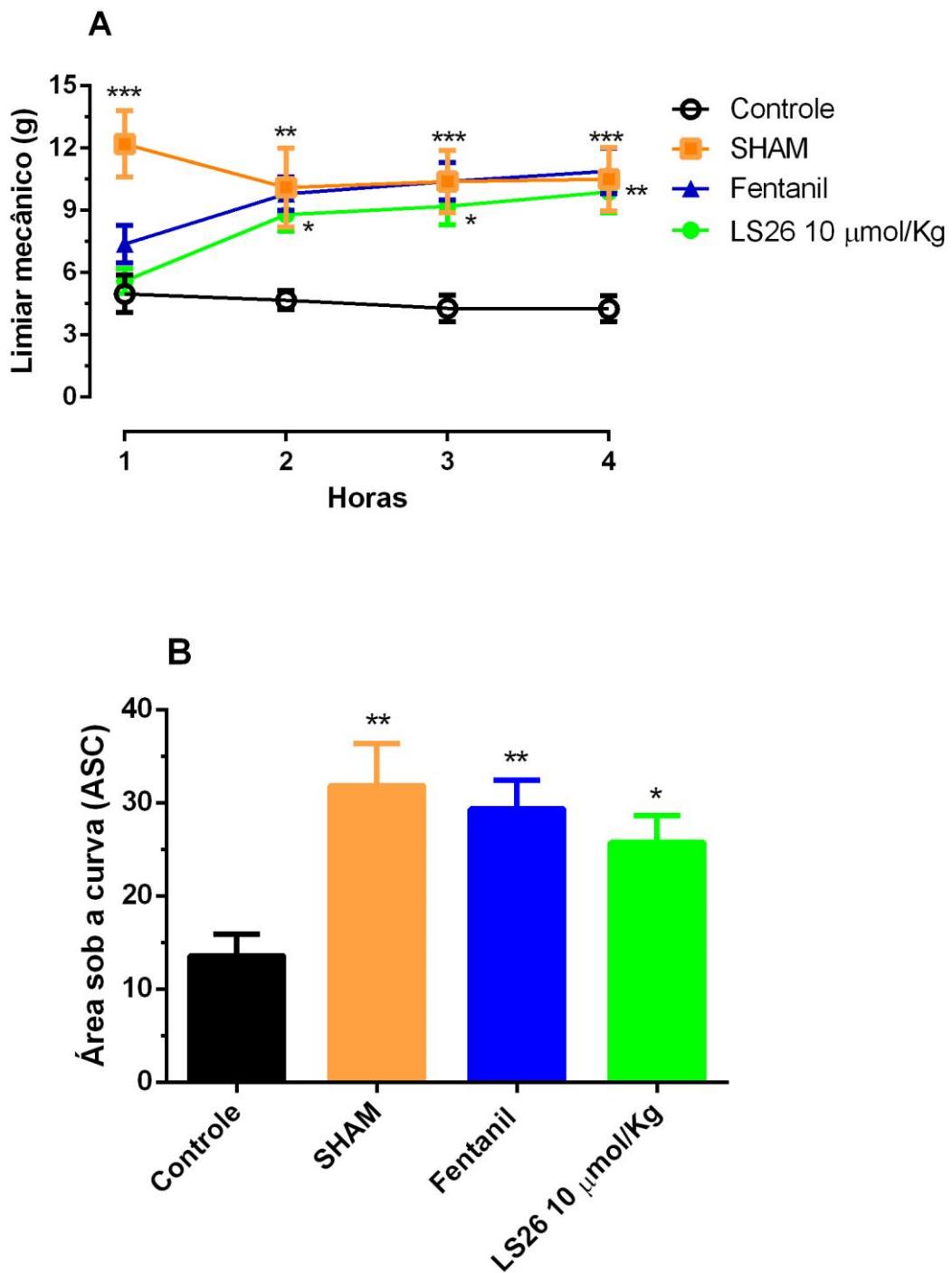


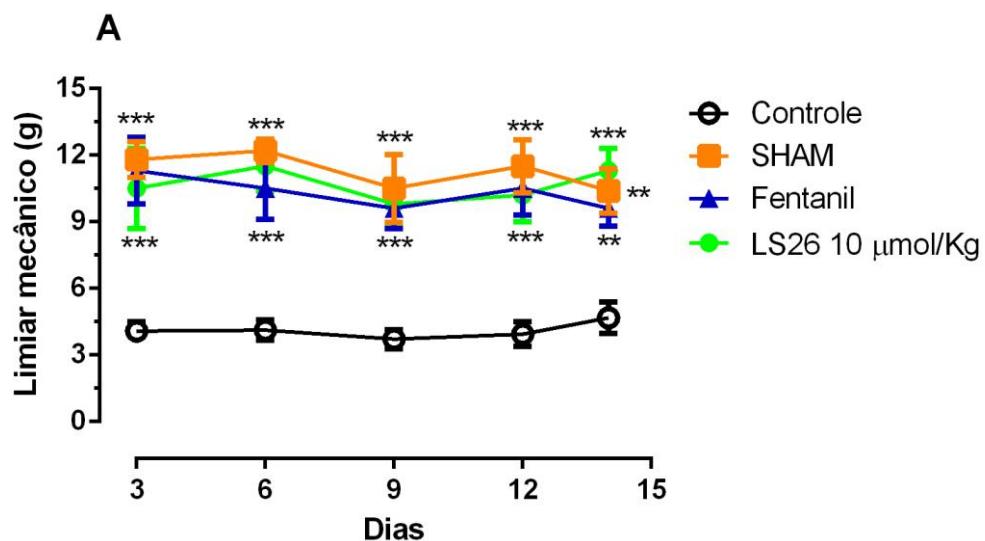
Figura 30: Avaliação da atividade antinociceptiva aguda no modelo de constrição crônica do nervo ciático através do modelo de von frey. Foram realizadas 3 estimulações com intervalo de 5 a 10 segundos em cada animal. Os resultados são expressos como média + E.P.M (n = 6) do limiar mecânico em gramas. Em A, a significância estatística (* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados fentanil (0,6 $\mu\text{mol}/\text{kg}$; s.c.), LS26 (10 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ v.o.) e grupo sham (falso operado), por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Em B, representação do cálculo da área sob a curva, onde a significância estatística (* p < 0,05 e **p < 0,01) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados fentanil, LS26 e grupo sham, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Tabela 10: Avaliação da atividade antinociceptiva aguda pelo modelo de Von Frey

Tratamentos	Limiar Mecânico (g)			
	1 H	2 H	3 H	4 H
Controle	4,9 \pm 0,9	4,7 \pm 0,5	4,3 \pm 0,7	4,26 \pm 0,6
SHAM	12,2 \pm 1,6**	10,1 \pm 1,9**	10,4 \pm 1,5***	10,5 \pm 1,5***
Fentanil	7,4 \pm 0,9	9,8 \pm 0,8**	10,4 \pm 0,9***	10,9 \pm 1,1***
LS26 – 10 μ mol/kg	5,6 \pm 0,6	8,8 \pm 0,8*	9,2 \pm 0,9*	9,9 \pm 1,0**

* p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados fentanil, LS26 e grupo sham), por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni

Na avaliação do uso crônico de LS26 no modelo de indução de dor neuropática, o composto foi capaz de diminuir a alodinia em todos os dias de avaliação, como podemos observar na Figura 31 e Tabela 11, aumentando em 163,8% a área sob a curva, enquanto o fentanil aumentou em 156,1% a área sob a curva.



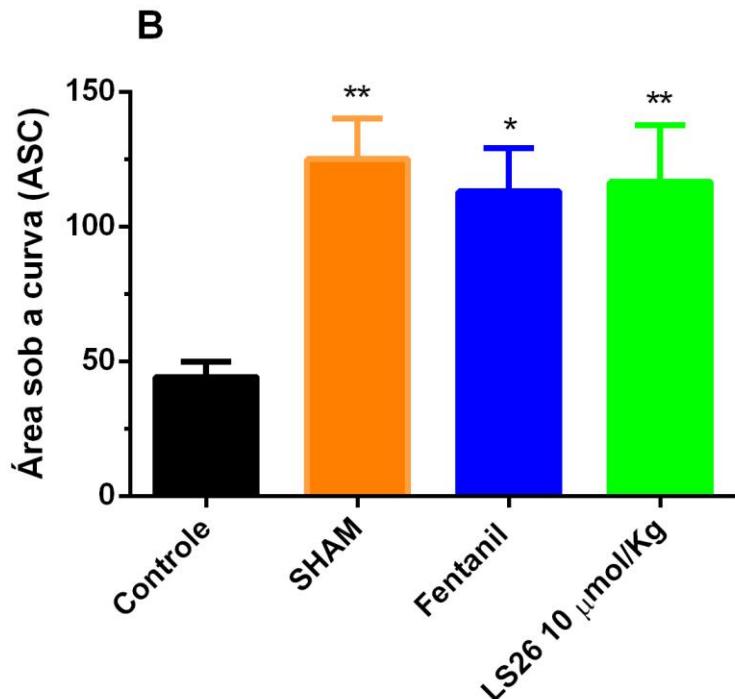


Figura 31: Avaliação da atividade antinociceptiva crônica no modelo de constrição crônica do nervo ciático através do modelo de von frey. Foram realizadas 3 estimulações com intervalo de 5 a 10 segundos em cada animal. Os resultados são expressos como média + E. P.M. ($n = 6$) do limiar mecânico em gramas. Em A, a significância estatística ($^{**}p < 0,01$ e $^{***}p < 0,001$) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados fentanil ($0,6 \mu\text{mol}/\text{kg}$; s.c.), LS26 ($10 \mu\text{mol}/\text{kg}$ v.o.) e grupo sham (falso operado), por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Em B, representação do cálculo da área sob a curva, onde a significância estatística ($^{*}p < 0,05$ e $^{**}p < 0,01$) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados fentanil, LS26 e grupo sham, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Tabela 11: Avaliação da atividade antinociceptiva crônica pelo modelo de Von Frey.

Tratamentos	Limiar Mecânico (g)				
	3º dia	6º dia	9º dia	12º dia	14º dia
Controle	$4,1 \pm 0,4$	$4,1 \pm 0,5$	$3,7 \pm 0,4$	$3,9 \pm 0,6$	$4,7 \pm 0,7$
SHAM	$11,8 \pm 0,8^{***}$	$12,2 \pm 0,5^{***}$	$10,5 \pm 1,5^{***}$	$11,5 \pm 1,2^{***}$	$10,4 \pm 1,0^{**}$
Fentanil	$11,3 \pm 1,5^{***}$	$10,5 \pm 1,4^{***}$	$9,6 \pm 0,9^{***}$	$10,5 \pm 1,2^{***}$	$9,6 \pm 0,8^{**}$
LS26 – 10 $\mu\text{mol}/\text{kg}$	$10,5 \pm 1,8^{***}$	$11,5 \pm 1,1^{***}$	$9,8 \pm 0,9^{***}$	$10,2 \pm 1,2^{***}$	$11,3 \pm 1,0^{***}$

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados fentanil, LS26 e grupo sham, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni

Para verificar o mecanismo anti-inflamatório do LS26 no modelo de dor neuropática, foi mensurado as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 no segmento do nervo ciático, e observamos na Figura 32 e Tabela 12 que o LS26 na dose de $10 \mu\text{mol}/\text{kg}$ foi capaz de reduzir a produção/liberação em 42,1% e 30,3%, respectivamente, no nervo analisado.

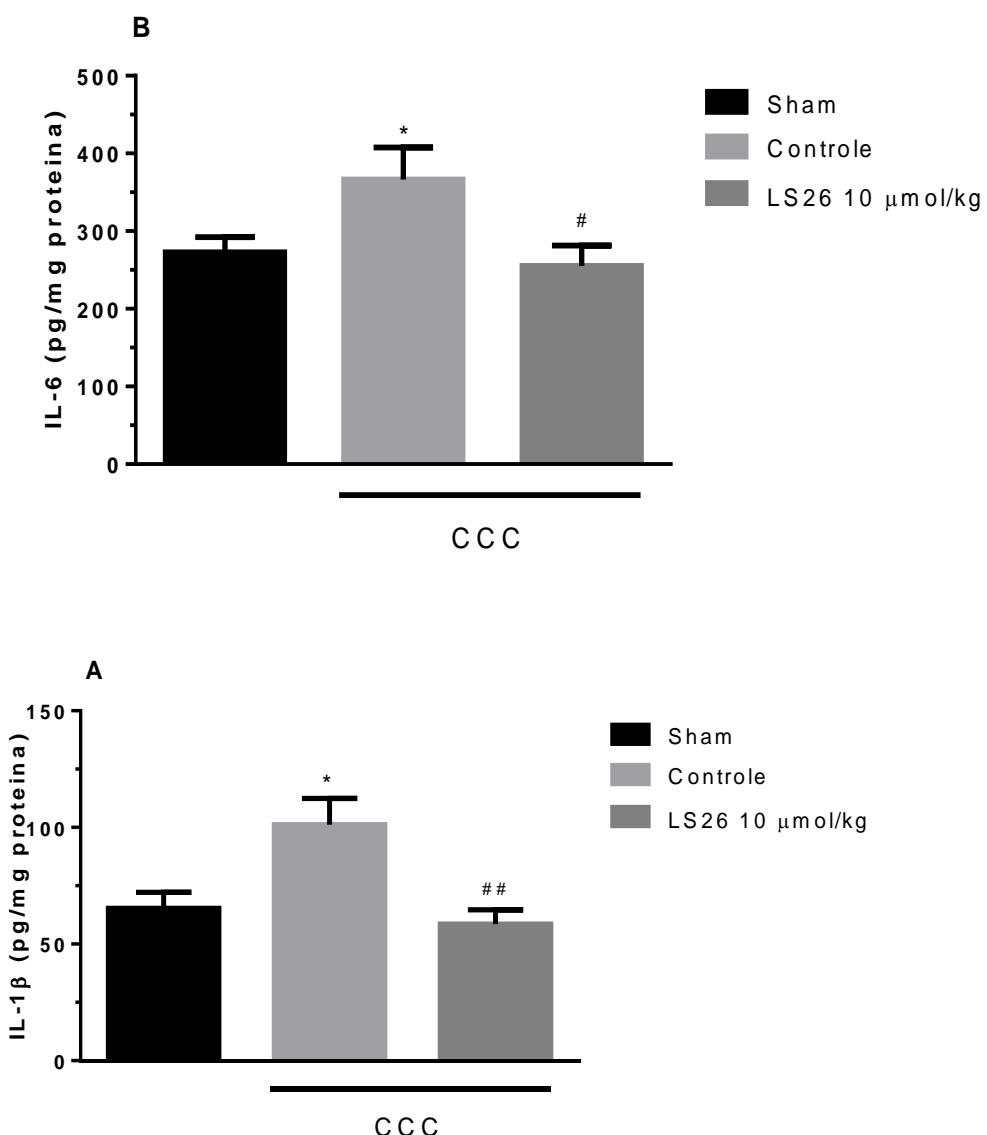


Figura 32: Efeito do composto LS26 na quantificação de citocinas (A- IL-1 β e B- IL-6) a partir de segmento do nervo ciático. Os animais foram pré-tratados com solução salina e LS26 (10 $\mu\text{mol/kg}$). Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. ($n = 6$) da quantidade de citocinas. A significância estatística (* $p < 0,05$) foi calculada entre o grupo Sham e os demais grupos (CCC – Constrição crônica do nervo ciático), por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. A significância estatística (## $p < 0,01$ e # $p < 0,05$) foi calculada entre o grupo controle e LS26 (CCC – Constrição crônica do nervo ciático), por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Tabela 12: Quantificação de citocinas a partir de segmento do nervo ciático.

Tratamentos	IL-1 β (pg/mg protein) (Média \pm EPM)	IL-6 (pg/mg protein) (Média \pm EPM)
Sham	$65,3 \pm 6,9$	$272,5 \pm 19,6$
Controle	$101,2 \pm 11,2^*$	$366,5 \pm 41,2^*$
LS26 10 $\mu\text{mol/kg}$	$58,6 \pm 6,1$	$255,3 \pm 26,3$

* $p < 0,05$ entre o grupo sham e os grupos controle e LS26 por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

5.1.6 Modelo de rotarod

Neste modelo, os animais foram tratados por via oral com LS26 na dose de 10 μ mol/kg, veículo, água destilada e diazepam (1,76 μ mol/kg). A Figura 33 demonstra que esta dose, 10 μ mol/kg não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, e que o efeito antinociceptivo não está relacionada a déficit na coordenação motora dos camundongos. O grupo do diazepam apresentou diferença de 500% em relação ao grupo controle (tratado com salina), pois apresenta atividade sedativa e miorrelaxante, possivelmente responsável pelo efeito observado (Tabela 13).

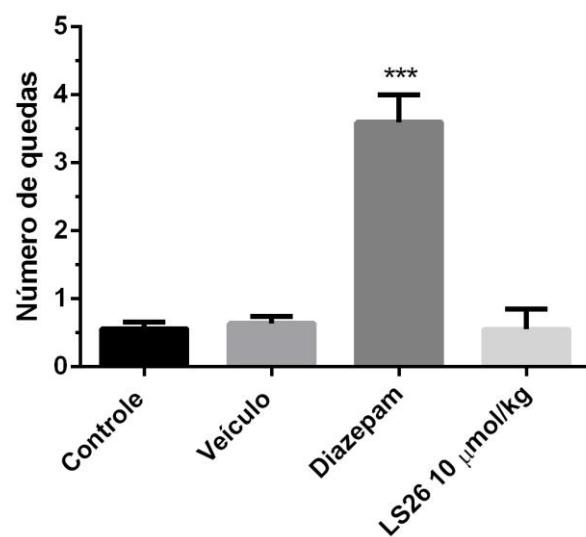


Figura 33: Avaliação do composto LS26 no teste de rotarod. Os tratamentos com solução salina, veículo e LS26 (10 μ mol/kg) foram realizados por via oral e Diazepam (1,76 μ mol/kg) por via subcutânea. A significância estatística (**p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, diazepam e LS26, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Tabela 13: Avaliação no modelo de rotarod.

Tratamentos	Número de quedas (Média ± EPM)	Aumento (%)
Controle	0,6 ± 0,1	---
Veículo	0,6 ± 0,1	---
Diazepam	3,6 ± 0,4***	500
LS26 10 μ mol/kg	0,6 ± 0,3	---

***p < 0,001 entre os grupos veículo, diazepam (1,76 μ mol/kg) e LS26 (10 μ mol/kg) com o grupo controle, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

5.2 Modelos de avaliação da atividade anti-inflamatória

5.2.1 Modelo de edema de pata

Neste teste, os animais foram tratados com o composto LS26 (1, 5, 10, 100, 300 e 500 μ mol/kg; v.o). O fármaco diclofenaco (500 μ mol/kg) foi usado como controle positivo. Os

animais receberam carragenina 1% (0,02mL; intraplantar). A Figura 34 demonstra que todas as doses do composto LS26 com exceção da dose de 1 μ mol/kg, apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle, em todos os tempos de medida, indicando assim o efeito antiedemogênico do composto (Tabela 14). O composto LS26 induziu as seguintes reduções na área sob a curva: 13,3%, 58,9%, 62,6%, 60,1%, 60% e 67% respectivamente para as doses de 1, 5, 10, 100, 300 e 500 μ mol/kg; enquanto diclofenaco induziu uma redução de 67,6%.

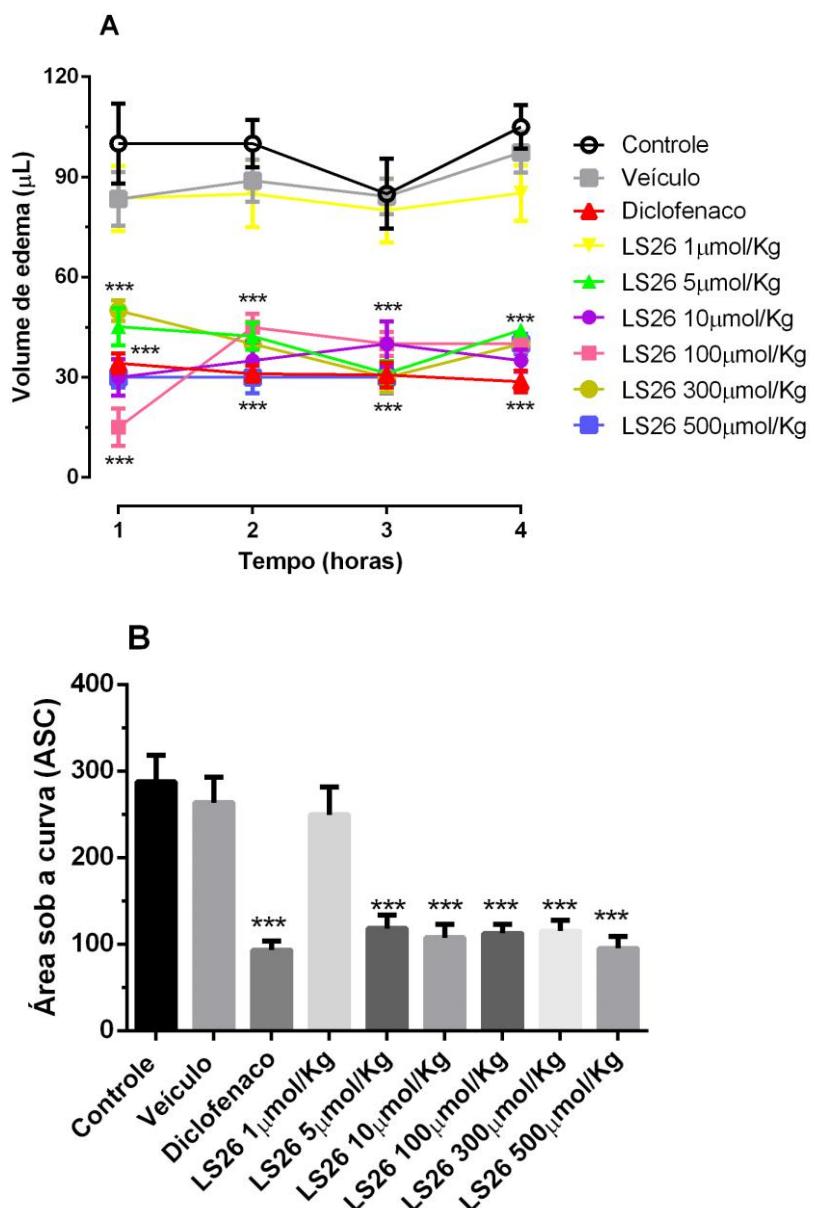


Figura 34: Avaliação do composto LS26 no modelo de edema de pata. Em A, os tratamentos com solução salina, veículo, diclofenaco (500 μ mol/kg) e doses crescentes de LS26 (1, 5, 10, 100, 300 e 500 μ mol/kg) foram realizados por via oral. Em B, representação do cálculo da área sob a curva. A solução de carragenina (1%) foi aplicada nas patas dos animais em todos os grupos. Em A, a significância estatística (** p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes do composto, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Em B, a significância estatística (** p < 0,001) foi calculada entre o grupo

controle e os grupos tratados com veículo, diclofenaco e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Tabela 14: Avaliação no modelo de edema de pata induzido por carragenina

Tratamentos	Volume de edema (μL)			
	1 Hora	2 Horas	3 Horas	4 Horas
Controle	102,3 \pm 11,9	101,7 \pm 7,0	85,0 \pm 10,5	105,0 \pm 6,5
Veículo	83,4 \pm 8,0	88,9 \pm 6,3	84,2 \pm 5,3	97,4 \pm 6,1
Diclofenaco	34,2 \pm 3,0***	31,1 \pm 2,4***	30,7 \pm 3,7***	28,7 \pm 3,2***
LS26 1 μmol/kg	83,6 \pm 9,8	85,0 \pm 10,0	80,0 \pm 9,6	85,2 \pm 8,3
LS26 5 μmol/kg	45,2 \pm 5,6***	42,3 \pm 4,0***	31,2 \pm 3,7***	44,2 \pm 2,1***
LS26 10 μmol/kg	30,0 \pm 5,4***	35,0 \pm 5,6***	40,0 \pm 6,7***	35,0 \pm 3,3***
LS26 100 μmol/kg	15,0 \pm 5,6***	45,0 \pm 4,0***	40,0 \pm 3,7***	40,0 \pm 2,1***
LS26 300 μmol/kg	50,0 \pm 3,1***	40,0 \pm 5,2***	30,0 \pm 4,5***	40,3 \pm 1,7***
LS26 500 μmol/kg	31,3 \pm 3,1***	32,3 \pm 4,8***	30,4 \pm 4,8***	42,4 \pm 3,1***

*P < 0,05, **P < 0,01 e ***p < 0,001 entre os grupos veículo, diclofenaco e doses crescentes do composto com o grupo controle, por Two-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

5.2.2 Modelo de permeabilidade vascular

Na figura 35 observamos que o aumento na concentração de histamina e serotonina administradas induziram aumento na concentração de azul de Evans, e a administração prévia do composto LS26 não foi capaz de reduzir esse aumento observado com ambas. Já a administração prévia de prometazina e dexametasona conseguiu evitar o aumento na concentração de azul de Evans, significando que estas são capazes de inibir a indução de permeabilidade vascular provocadas respectivamente pela histamina e serotonina (Tabelas 15 e 16).

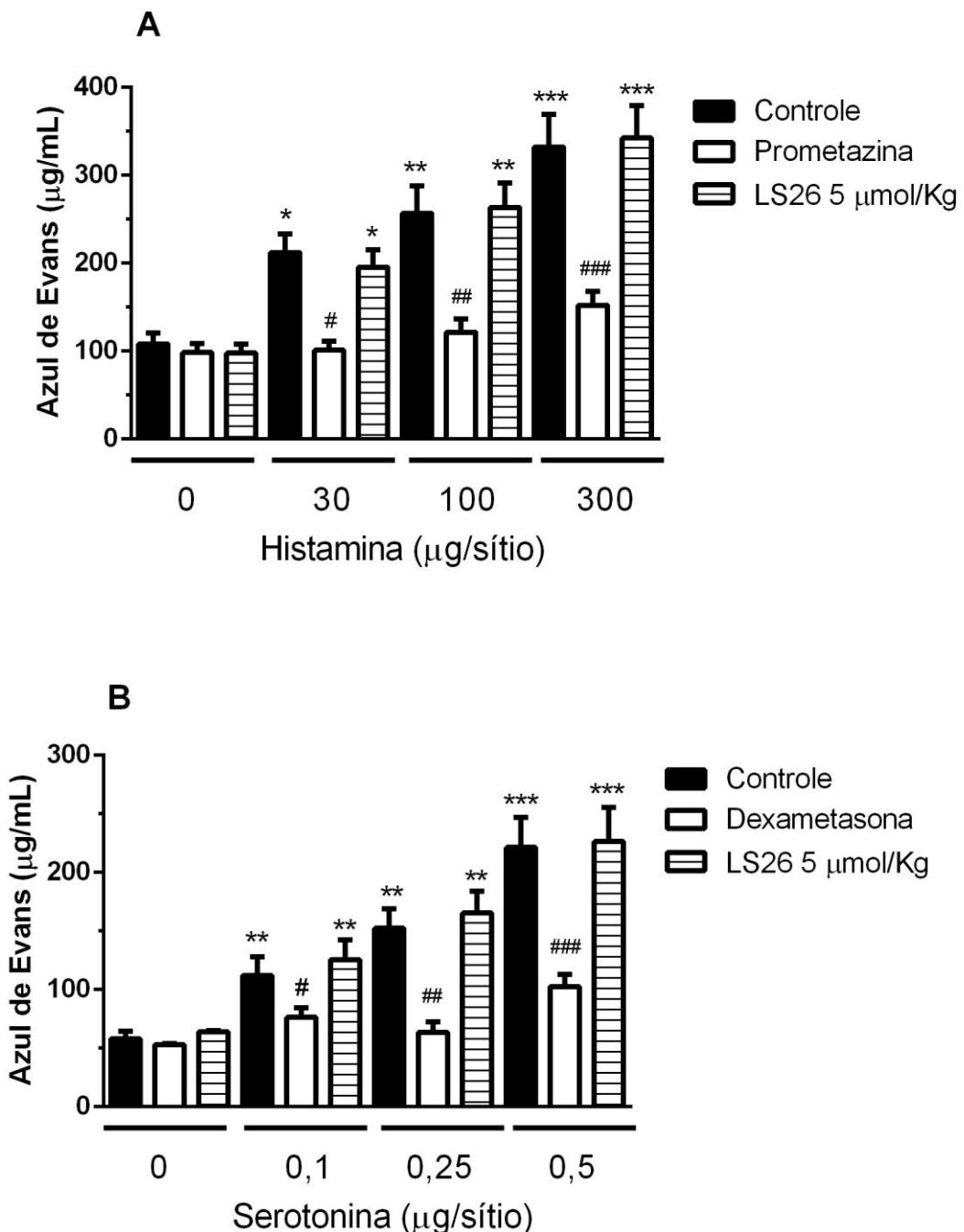


Figura 35: Efeito do composto LS26 no modelo de permeabilidade vascular induzido pela administração intradérmica de histamina (A) e serotonina (B). Os animais foram pré-tratados (v.o.) com solução salina, Prometazina (17,6 µmol/kg; s.c.) dexametasona (5,7 µmol/kg, s.c.) e LS26 (5 µmol/kg). Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. ($n = 6$) da concentração de azul de Evans. A significância estatística (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) foi calculada entre as concentrações crescentes de histamina (30 µg, 100 µg e 300 µg) e/ou serotonina (0,1 µg, 0,25 µg e 0,5 µg) com a concentração zero de histamina e/ou serotonina (solução salina) dentro dos seus respectivos grupos. A significância estatística (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$) foi calculada entre os grupos tratados com o composto ou Prometazina ou Dexametasona e seus respectivos controles, por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Bonferroni.

Tabela 15: Avaliação no modelo de permeabilidade vascular induzido por histamina

Tratamentos	Concentração histamina (µg/sítio)			
	0	30	100	300
Controle	108,1 ± 13,9	212,3 ± 21,2*	256,9 ± 31,2**	332,1 ± 36,9***
Prometazina	98,5 ± 10,2	101,2 ± 10,2#	121,6 ± 15,2##	152,3 ± 15,9###
LS26 5 µmol/kg	97,8 ± 10,1	195,6 ± 19,4*	263,5 ± 27,8**	342,5 ± 36,8***

*P < 0,05, **P < 0,01 e ***p < 0,001 foi calculada entre o grupo que não recebeu injeção de histamina tratado com solução salina e os demais grupos. # p < 0,05; ##p < 0,01 e ###p < 0,001 foi calculada entre os grupos tratados com o composto ou Prometazina e seus respectivos controles, por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Bonferroni.

Tabela 16: Avaliação no modelo de permeabilidade vascular induzido por serotonina

Tratamentos	Concentração serotonina (µg/sítio)			
	0	0,1	0,25	0,5
Controle	58,7 ± 7,1	112,2 ± 15,6**	152,3 ± 16,9**	221,4 ± 25,6***
Dexametasona	53,2 ± 0,9	76,3 ± 8,4#	63,6 ± 9,1##	102,5 ± 10,6###
LS26 5 µmol/kg	64,2 ± 0,9	125,6 ± 16,9**	165,3 ± 18,9**	226,3 ± 29,4***

*P < 0,05, **P < 0,01 e ***p < 0,001 foi calculada entre o grupo que não recebeu injeção de serotonina tratado com solução salina e os demais grupos. # p < 0,05; ##p < 0,01 e ###p < 0,001 foi calculada entre os grupos tratados com o composto ou Dexametasona e seus respectivos controles, por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Bonferroni.

5.2.3 Modelo de bolsa de ar subcutâneo (air pouch)

O tratamento foi realizado com LS26 nas doses de 100, 300 e 500 µmol/kg, via oral.

A dexametasona 5,7 µmol/kg foi administrada por via subcutânea e usada como controle positivo do experimento. E o grupo controle foi tratado com solução salina ou com carragenina 1% (0,1 mL; s.c). Observamos que houve uma diminuição na quantidade de leucócitos totais em todas as doses administradas de LS26 (redução do número de leucócitos em 66,7%, 68,4% e 72,9% respectivamente para 100, 300 e 500 µmol/kg) e dexametasona (redução do número de leucócitos em 54,6%), indicando que o composto foi capaz de reduzir a migração leucocitária na inflamação existente na bolha de ar subcutânea (Figura 36).

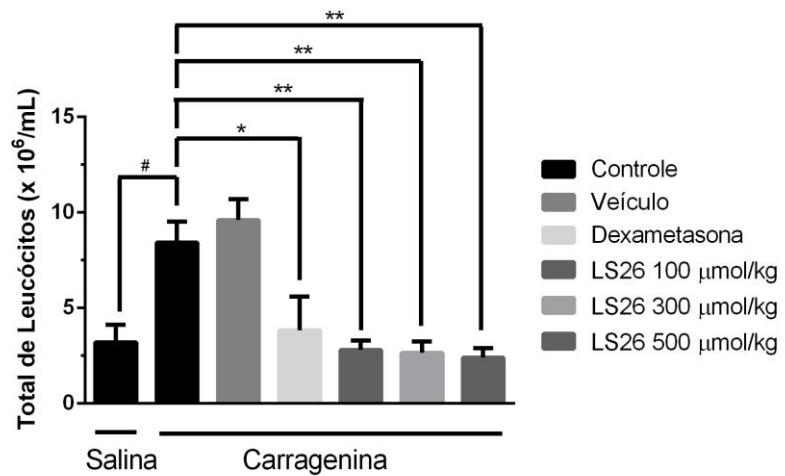


Figura 36: Efeito do composto LS26 na quantificação de leucócitos totais. Os animais foram pré-tratados com solução salina, veículo, dexametasona (5,7 μ mol/kg; s.c.) e o LS26 (100, 300 e 500 μ mol/kg). Na bolsa de ar subcutâneo foram aplicadas solução salina e e carragenina. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. (n = 6). A significância estatística (* p < 0,05; ** p < 0,01 e *** p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle que recebeu solução carragenina por via subcutânea e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes do composto e a significância estatística (### p < 0,001) foi calculada entre o grupo que recebeu solução salina e o grupo controle que recebeu solução carragenina por via subcutânea, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

5.2.3.1 Quantificação de citocinas

Na determinação da produção de TNF- α e IL-6, notamos que a administração do composto LS26 foi capaz de inibir a produção destas citocinas nas doses de 300 (57,9% - TNF- α e 52,5% - IL-6) e 500 μ mol/kg (70,3% - TNF- α e 69% - IL-6) em relação ao grupo controle; enquanto para a inibição da citocina IL-1 β somente a maior dose de LS26, 500 μ mol/kg (47,5%), foi capaz de demonstrar efeito no exsudato inflamatório (Figura 37 e Tabela 17). A administração subcutânea de dexametasona reduziu a concentração de ambas as citocinas (71% - TNF- α , 45,6% - IL-1 β e 74,2% - IL-6).

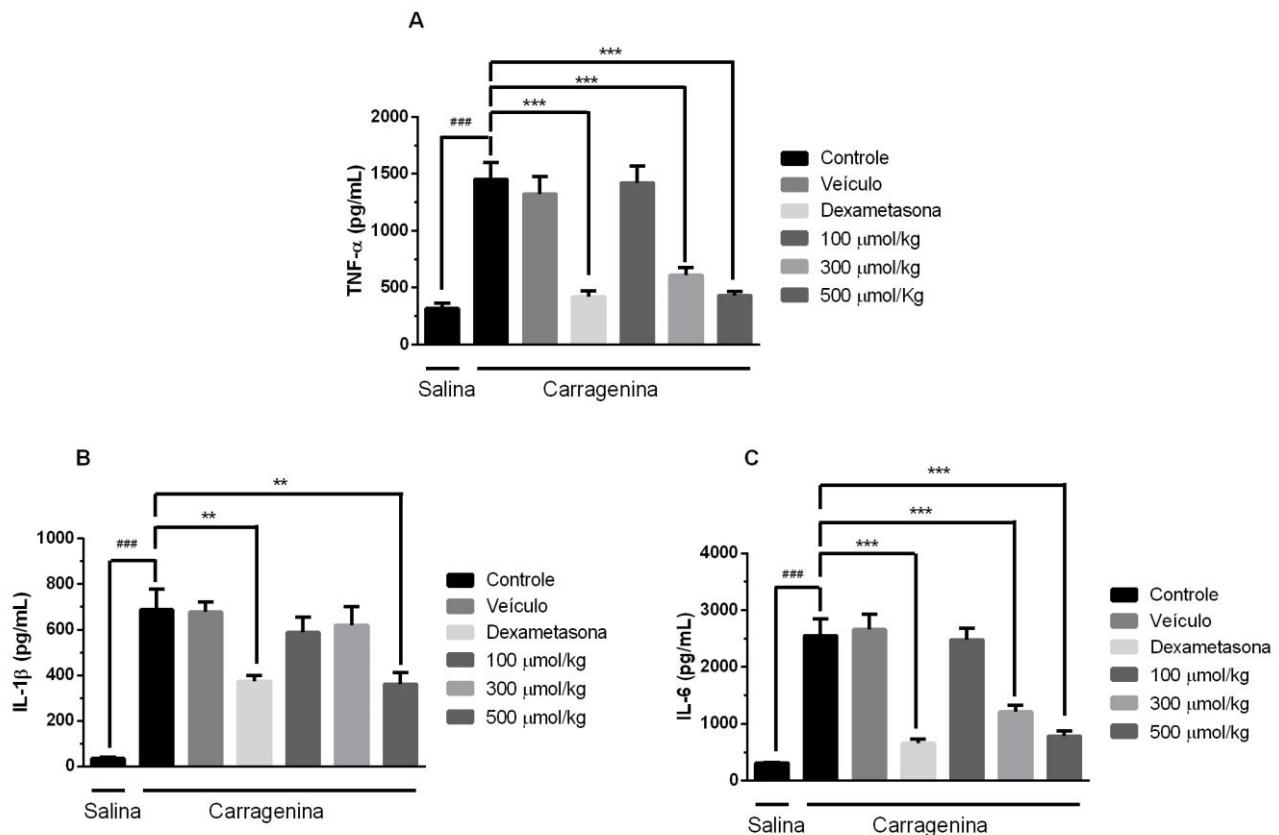


Figura 37: Efeito do composto LS26 na quantificação de citocinas (A- TNF- α , B- IL-1 β e C- IL-6) a partir do teste bolsa de ar subcutâneo. Os animais foram pré-tratados com solução salina, veículo, dexametasona (5,7 μ mol/kg; s.c.) e o LS26 (100, 300 e 500 μ mol/kg). Na bolsa de ar subcutâneo foram aplicadas solução salina e carragenina. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. ($n = 6$) da concentração de leucócitos ou de citocinas. A significância estatística ($^*p < 0,05$; $^{**}p < 0,01$ e $^{***}p < 0,001$) foi calculada entre o grupo controle que recebeu solução carragenina por via subcutânea e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes do composto e a significância estatística ($^{###}p < 0,001$) foi calculada entre o grupo que recebeu solução salina e o grupo controle que recebeu solução carragenina por via subcutânea, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni

Tabela 17: Quantificação de citocinas no modelo de bolha de ar subcutâneo.

Tratamentos	Nº de leucócitos totais ($\times 10^6/mL$) (Média \pm EPM)	IL-1 β (pg/mL) (Média \pm EPM)	TNF- α (pg/mL) (Média \pm EPM)	IL-6 (pg/mL) (Média \pm EPM)
Controle solução salina	$3,2 \pm 0,9$	$34,2 \pm 6,0$	$315,2 \pm 50,6$	$314,6 \pm 6,1$
Controle solução carragenina	$8,4 \pm 1,1\#$	$688,2 \pm 90,6^{###}$	$1450,7 \pm 150,6^{###}$	$2550,5 \pm 300,9^{###}$
Veículo	$9,6 \pm 1,1$	$678,3 \pm 43,4$	$1324,1 \pm 152,7$	$2658,2 \pm 270,4$
Dexametasona	$3,8 \pm 1,8^*$	$374,5 \pm 25,7^{**}$	$420,5 \pm 50,5^{***}$	$658,7 \pm 70,4^{***}$

LS26 100 $\mu\text{mol/kg}$	$2,8 \pm 0,5^{**}$	$588,8 \pm 68,5$	$1420,4 \pm 150,8$	$2480,3 \pm 200,1$
LS26 300 $\mu\text{mol/kg}$	$2,7 \pm 0,6^{**}$	$620,4 \pm 80,1$	$610,3 \pm 65,4^{***}$	$1210,1 \pm 120,1^{***}$
LS26 500 $\mu\text{mol/kg}$	$2,4 \pm 0,5^{**}$	$361,4 \pm 50,3^{**}$	$430,2 \pm 38,4^{***}$	$789,2 \pm 85,5^{***}$

*p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 entre os grupos veículo, dexametasona e doses crescentes do composto com o grupo controle solução carragenina, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni. ###p < 0,001 entre os grupos controle solução salina e o grupo controle carragenina, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

Na quantificação das citocinas Interferon Gama (INF- γ) e IL-4, não foi observado nenhuma alteração quando comparado ao grupo controle. O mesmo aconteceu com os resultados do Óxido Nítrico, onde nenhuma das doses testadas do LS26 foi capaz de reduzir a produção. No entanto, observamos um crescimento na produção da citocina IL-10 quando administrado a dose de 500 $\mu\text{mol/kg}$ (aumento de 404%), (Figura 38) indicando um possível efeito anti-inflamatório. Tabela 18.

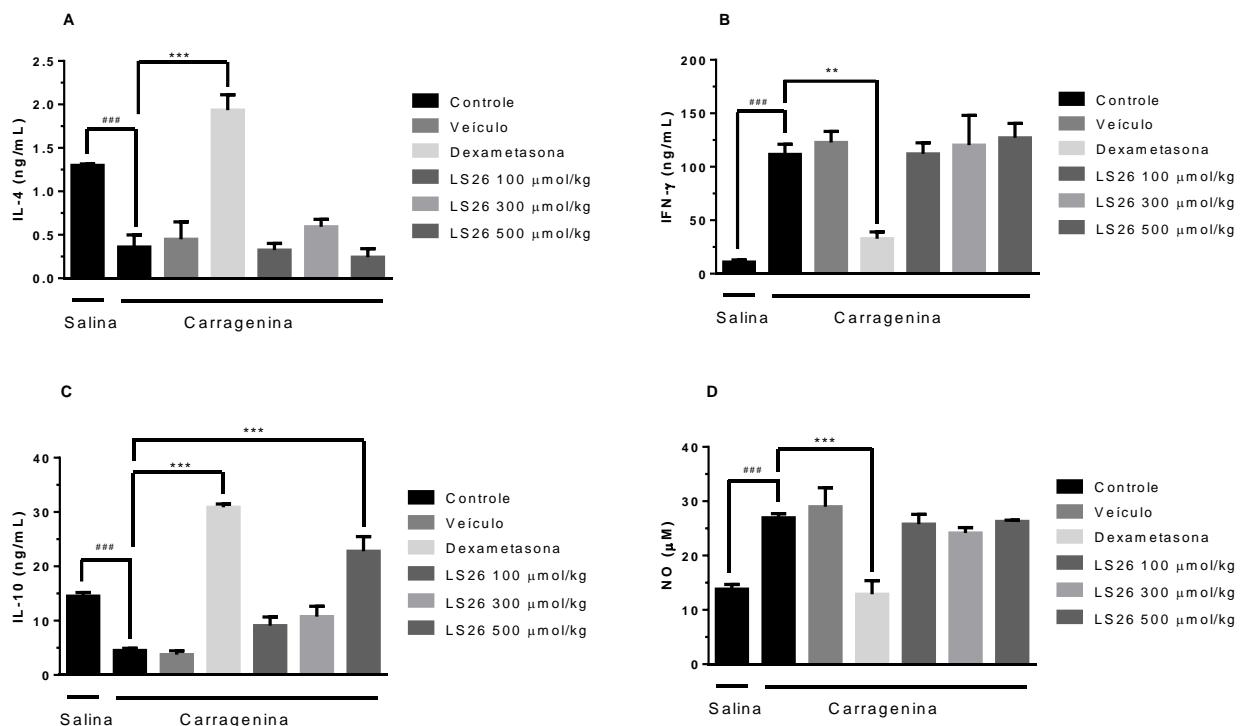


Figura 38: Efeito do LS26 na quantificação de citocinas (A- IL-4, B- INF- γ , C- IL-10) e óxido nítrico (D) a partir do teste bolsa de ar subcutâneo. Os animais foram pré-tratados com solução salina, veículo, dexametasona (5,7 $\mu\text{mol/kg}$; s.c.) e LS26 (100, 300 e 500 $\mu\text{mol/kg}$). Na bolsa de ar subcutâneo foram aplicadas solução salina e carragenina. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. (n = 6) da concentração de citocinas e óxido nítrico. A significância estatística (p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle que recebeu solução carragenina por via subcutânea e os grupos tratados**

com veículo, dexametasona e doses crescentes do composto e a significância estatística (###p < 0,001) foi calculada entre o grupo que recebeu solução salina e o grupo controle que recebeu solução carragenina por via subcutânea, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

Tabela 18: Quantificação de citocinas e óxido nítrico no modelo de bolha de ar subcutâneo

Tratamentos	IL-10 (ng/mL) (Média \pm EPM)	IL-4 (ng/mL) (Média \pm EPM)	IFN- γ (ng/mL) (Média \pm EPM)	NO (μ M) (Média \pm EPM)
Controle solução salina	14,5 \pm 0,7	1,3 \pm 0,1	10,9 \pm 2,1	13,8 \pm 0,9
Controle solução carragenina	4,5 \pm 0,4###	0,4 \pm 0,1###	111,5 \pm 9,6###	26,9 \pm 0,8###
Veículo	3,7 \pm 0,7	0,5 \pm 0,2	122,7 \pm 10,4	29,0 \pm 3,5
Dexametasona	30,9 \pm 0,6***	1,9 \pm 0,2***	32,7 \pm 6,4**	12,9 \pm 2,5***
LS26 100 μ mol/kg	9,1 \pm 1,6	0,3 \pm 0,1	112,1 \pm 10,1	25,8 \pm 1,8
LS26 300 μ mol/kg	10,8 \pm 1,9	0,6 \pm 0,2	120,2 \pm 27,9	24,1 \pm 1,0
LS26 500 μ mol/kg	22,8 \pm 2,7***	0,2 \pm 0,1	127,1 \pm 13,4	26,3 \pm 0,2

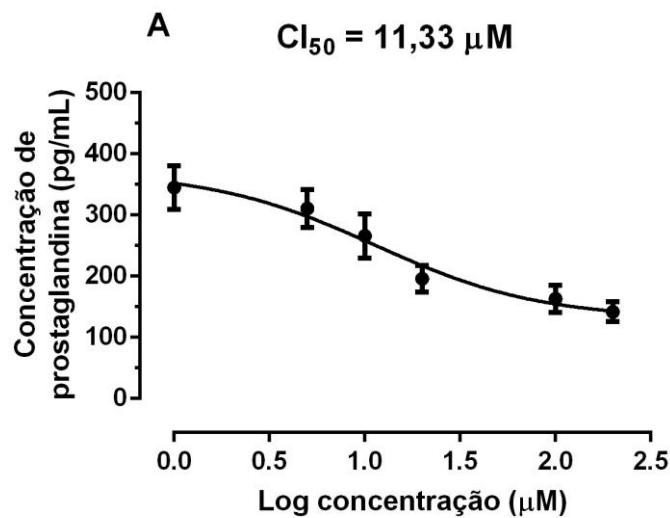
*p < 0,05 e ***p < 0,001 entre os grupos veículo, dexametasona e doses crescentes do composto com o grupo controle solução carragenina, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni. ## p < 0,01 e ###p < 0,001 entre os grupos controle solução salina e o grupo controle carragenina, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

5.2.4 Avaliação da atividade enzimática de Cox-1 e Cox-2

A Tabela 19 foi construída com o auxílio da curva padrão de prostaglandina (não demonstrada). Constatamos a capacidade do LS26 em diretamente inibir a enzima ciclooxygenase (COX), tendo como consequência uma redução na síntese, de prostaglandina. A partir do cálculo dos percentuais de inibição enzimática, obtidos a partir da concentração de prostaglandina sintetizada, construiu-se os gráficos para a determinação do CI_{50} (concentração inibitória de 50%). A CI_{50} do composto LS26 frente a COX-1 foi de 11,33 μ M e a CI_{50} do composto frente a COX-2 foi de 4,57 μ M. Esta inibição enzimática exercida pelo LS26 indica que a inibição ocorreu de forma mais seletiva para isoforma COX-2, pois apresenta um CI_{50} inferior para a COX-2, ou seja, o composto conseguiu inibir 50% da atividade enzimática de COX-2 com a utilização de uma concentração mais baixa do LS26 (Figura 39). O índice de seletividade (IS) obtido para o composto foi de 2,48; sendo que $IS = CI_{50}COX-1/CI_{50}COX-2$; IS>1-seletividade para COX-2, IS<1-seletividade para COX-1.

Tabela 19: Influência de concentrações crescentes do composto sobre a atividade das enzimas COX-1 e COX-2, através do método de imunoensaio enzimático.

Concentração do composto ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração de prostaglandina (pg/mL) obtida pela COX-1	Concentração de prostaglandina (pg/mL) obtida pela COX-2	Inibição enzimática da COX-1(%)	Inibição enzimática da COX-2(%)
0	$345,1 \pm 36,0$	$325,3 \pm 32,0$	0	0
12,5	$311,3 \pm 31,1$	$265,5 \pm 24,7$	9,8	18,4
25	$266,6 \pm 36,4$	$202,3 \pm 22,1$	22,7	37,8
50	$196,4 \pm 22,0$	$176,7 \pm 21,7$	43,1	45,7
100	$163,3 \pm 22,8$	$166,6 \pm 16,8$	52,7	48,8
200	$142,5 \pm 16,4$	$141,3 \pm 17,6$	58,7	56,6



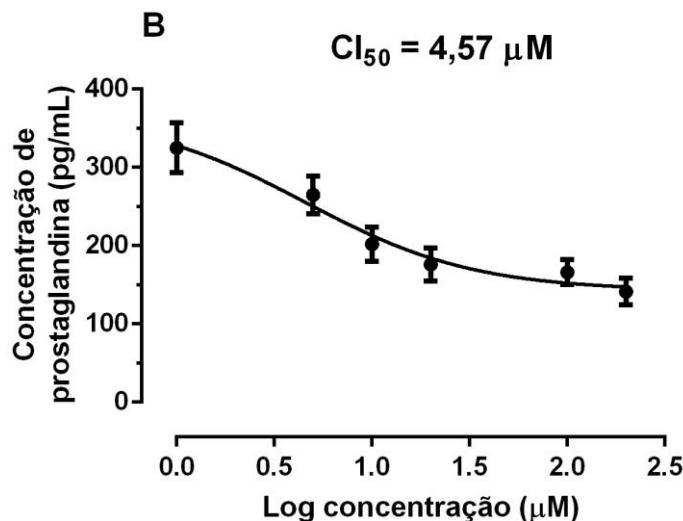


Figura 39: - Efeito de concentrações crescentes de LS26 sobre a atividade enzimática de (A) COX-1 e (B) COX-2. Os resultados são expressos como concentração de prostaglandina. Foi utilizado o método de regressão não-linear para o cálculo de IC_{50} . O índice de seletividade (IS) obtido para o composto foi de 2,48; sendo que $IS > 1$ – seletividade para COX-2, $IS < 1$ – seletividade para COX-1.

5.2.5 Avaliação toxicológica oral aguda e subcrônica *in vivo*

O LS26 não produziu toxicidade após administração oral aguda, demonstrando que a DL_{50} é maior que 100 $\mu mol/kg$ ($DL_{50} > 100 \mu mol/kg$). Todos os animais foram observados por 14 dias e nenhum sintoma de intoxicação (convulsão, hiperatividade, perda de reflexo, alteração da frequência respiratória e sedação) foi apresentado em nenhum dos grupos analisados. O LS26 também não produziu toxicidade após administração oral subcrônica, demonstrando que a DL_{50} é maior que 100 $\mu mol/kg$ ($DL_{50} > 100 \mu mol/kg$). Foram observados ganho de peso e consumo de ração, mas não houve diferença significativa entre o grupo controle e grupo tratado como podemos observar na Tabela 20.

Tabela 20: Avaliação toxicológica com análise do peso corporal e consumo de ração

Grupos N=6	Média de massa corporal inicial \pm EPM / final \pm EPM (g)	Ganho ponderal de peso em 14 dias (g) \pm EPM	Média do consumo diário de ração/animal \pm EPM (g)	Alterações comportamentais	Morte Natural
Controle	$37,3 \pm 2,4 / 38,6 \pm 2,6$	$1,3 \pm 0,2$	$6,7 \pm 0,4$	Ausentes	0
LS26 100 $\mu mol/kg$	$25,3 \pm 1,3 / 27,3 \pm 0,6$	$2,0 \pm 0,6$	$8,4 \pm 0,6$	Ausentes	0

A análise macroscópica e peso dos órgãos: fígado, pulmões, rim direito, estômago e coração não apresentou alterações no grupo tratado com a dose de 100 µmol/kg por 14 dias (v.o) quando comparado ao controle, como observamos na Tabela 21.

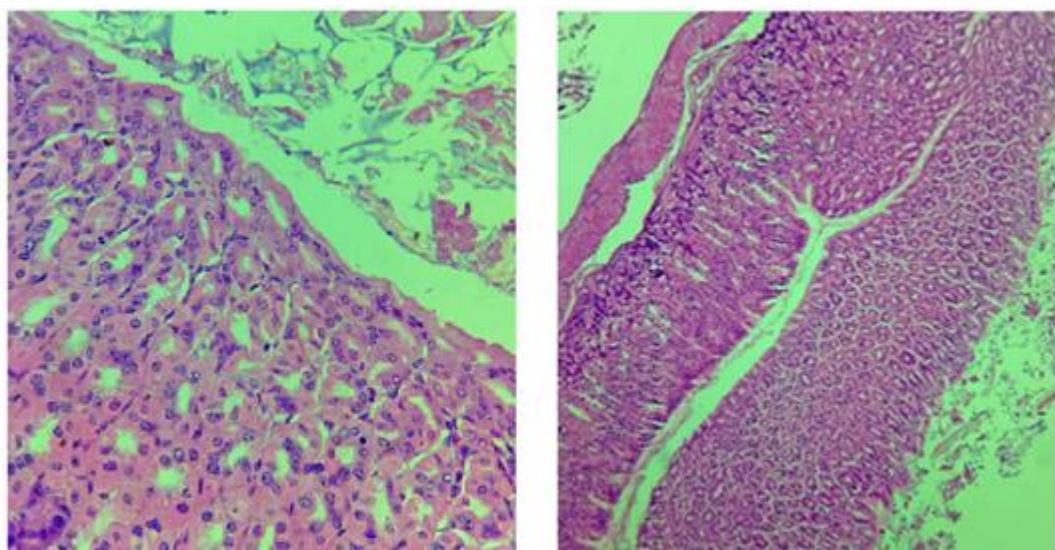
Tabela 21: Análise macroscópica e peso dos órgãos

ÓRGÃOS	GRUPOS (N=6) /Pesos dos órgãos (g) ± EPM	
	CONTROLE	LS26 100 µmol/kg
Fígado	1,52±0,14	1,25±0,05
Pulmões	0,22±0,01	0,16±0,01
Rim (D)	0,52±0,05	0,37±0,01
Estômago	0,8±0,05	0,51±0,04
Intestino	0,24±0,06	0,16±0,01
Alterações Macroscópicas	Ausente	Ausente

Os órgãos citados anteriormente foram devidamente coletados e analisados microscopicamente em parceria com o Laboratório da Prof^a Dra Vivian de Assunção Nogueira Carvalho, e analisada pela doutoranda Gabriela de Carvalho Cid, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e não foram observadas alterações significativas em nenhum órgão analisado do grupo tratado com o composto quando comparado ao grupo controle, conforme Figura 40.

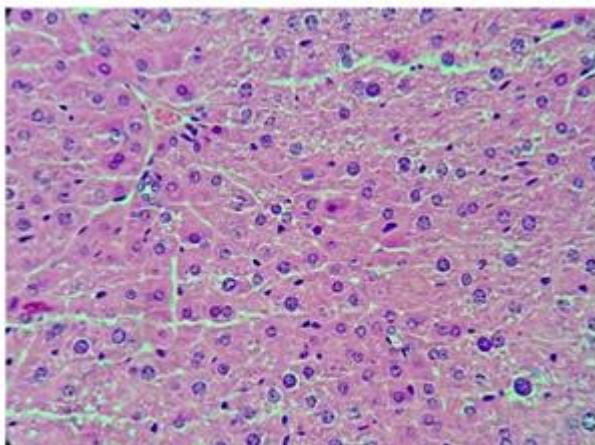
Figura 40: Análise microscópica dos órgãos

A1 – Estômago do animal controle (HE, objetiva de 10x) A2 - Estômago do animal tratado com LS26 (HE, objetiva de 10x)

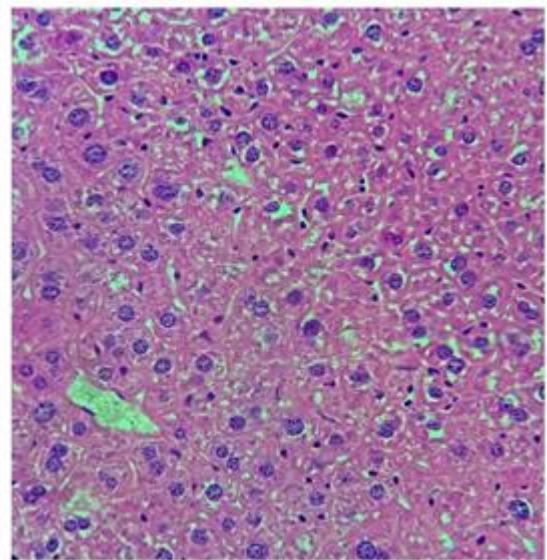


A1 e A2 - Corte histológico de estômago: camada mucosa, submucosa e muscular apresentando morfologia usual.

B1 – Fígado do animal controle (HE, objetiva de 40x)

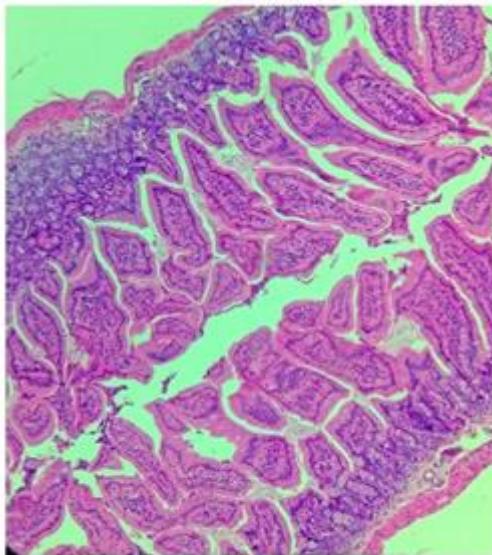


B2 – Fígado do animal tratado com LS26 (HE, objetiva de 40x)

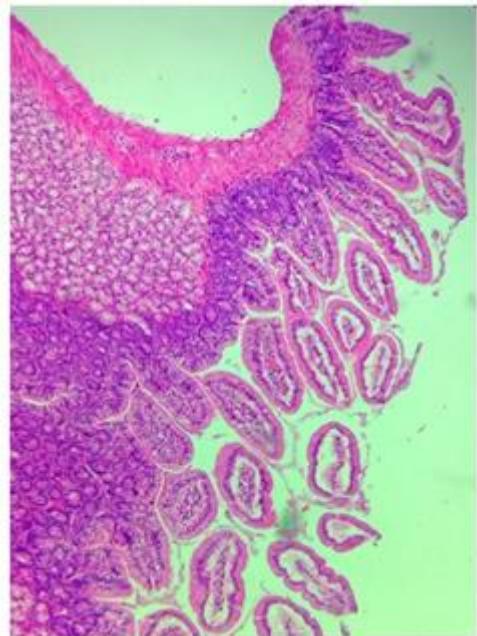


B1 e B2 - Corte histológico de fígado: placas de hepatócitos em meio a capilares sinusóides apresentando morfologia usual.

C1 – Intestino no animal controle (HE, objetiva de 10x)

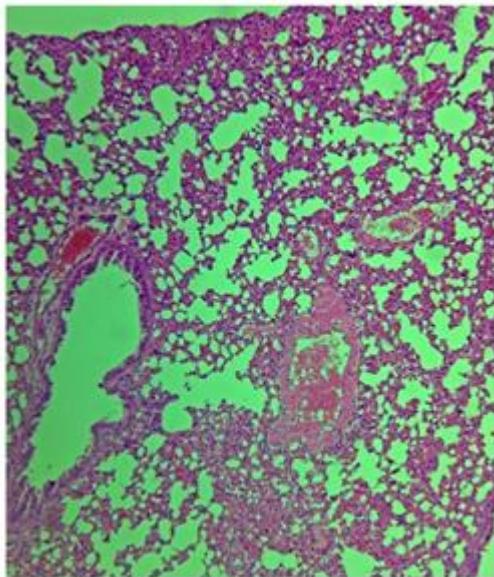


C2 – Intestino do animal tratado com LS26 (HE, objetiva de 10x)

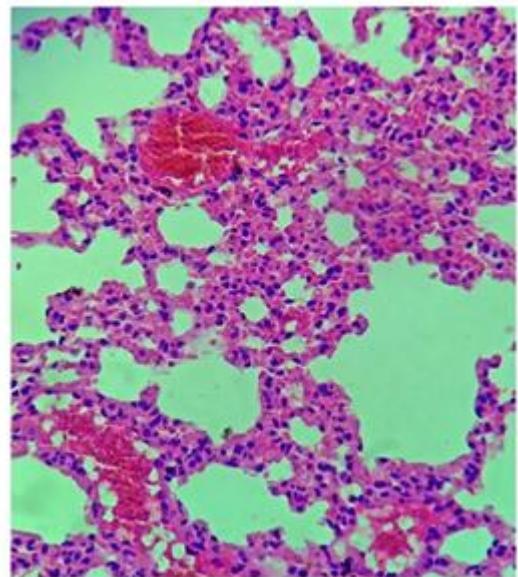


C1 e C2 - Corte histológico de intestino: camada mucosa exibindo vilosidades intestinais, submucosa e camada muscular de morfologia usual.

D1 – Pulmão do animal controle (HE, objetiva de 10x)



D2 – Pulmão do animal tratado com LS26 (HE, objetiva de 10x)



D1 – Corte histológico de pulmão: mostrando bronquiólos, alvéolos e capilares sanguíneos com áreas discretas de atelectasia; D2 – Corte histológico de pulmão: mostrando alvéolos e capilares sanguíneos com leve quantidade de sangue entre septos interalveolares e em grandes vasos

6 DISCUSSÃO

A descoberta e o desenvolvimento de um medicamento é um processo complexo e caro. Devido ao crescimento de dados moleculares e rápido avanço nas tecnologias, os esforços na descoberta de medicamentos foram tremendamente ampliados ao longo dos anos (REDDY et al., 2013).

A pesquisa de novos fármacos está cada vez sendo mais direcionada a encontrar um único medicamento que tenha vários alvos farmacológicos e menos efeitos adversos, para reduzir a polifarmacoterapia. A filosofia do design de drogas foi transformada de “um medicamento, um alvo” para “um medicamento, vários alvos”, chamado de polifarmacologia. Aliás, a polifarmacologia está emergindo como o próximo paradigma na descoberta de medicamentos (XIE, et al., 2012; HOPKINS, 2008)

Fenômenos polifarmacológicos incluem um único fármaco agindo em múltiplos alvos de uma única via de doença ou um único medicamento agindo em múltiplos alvos pertencentes a múltiplas vias de doença. Além disso, a polifarmacologia para processos complexos, como o controle da dor e inflamação, costuma fazer uso de múltiplos medicamentos atuando em alvos distintos, que fazem parte de uma rede que regula várias respostas fisiológicas.(HOPKINS, 2008)

As abordagens polifarmacológicas visam descobrir o desconhecido fora dos alvos para os medicamentos existentes, conhecidos como reaproveitamento de drogas. (OPREA, et al., 2012; ACHENBACH et al., 2011; OPREA et al., 2011).

Embora não tenham sido projetados propositalmente, vários medicamentos são conhecidos por seus múltiplos alvos. Um exemplo é o ácido acetilsalicílico, um anti-inflamatório não esteroidal, muitas vezes utilizado como analgésico para aliviar dores leves ou antipirético para reduzir a febre (KNOX, et al., 2011), combatendo a inflamação em doenças como artrite reumatoide (SIMPSON et al., 1966), além de ser usada na prevenção de isquemias transitórias (GRUNDMANN et al., 2003), ataques cardíacos, dentre outras (AMORY, 2007).

Por outro lado, a polifarmacologia pode ser considerada perigosa e causar problemas clínicos quando não é totalmente compreendida. Na Austrália, dados mostram o cancelamento do medicamento lumiracoxib, um anti-inflamatório não esteroidal atuando como inibidor seletivo da COX-2, devido a preocupações envolvendo insuficiência hepática. Outro caso, envolvendo o anti-inflamatório rofecoxib, também foi retirado do mercado devido ao aumento

do risco de ataque cardíaco e acidente vascular cerebral associada ao tratamento a longo prazo ou alta dosagem (REDDY et al., 2013).

Além da necessidade de associação de fármacos para controle de doenças, há também uma alta demanda para descoberta de novos fármacos voltados ao tratamento de patologias ditas incuráveis e/ou que tenham um impacto direto na área socioeconômica da população. Nos últimos anos, mesmo com avanços científicos notáveis e um aumento significativo dos gastos globais em pesquisa e desenvolvimento, os medicamentos são frequentemente retirados dos mercados. Isto é principalmente devido aos seus efeitos colaterais ou toxicidades (REDDY et al., 2013)

Ademais, doenças negligenciadas, autoimunes ou doenças envolvendo microorganismos resistentes, ainda representam grande obstáculo para a indústria farmacêutica no que tange ao desenvolvimento de novos fármacos que sejam eficientes, seguros e com baixo custo (VIEGAS-JUNIOR et al., 2007)

Um dos processos que podem ser executados para a realização desta problemática é a hibridação de moléculas biologicamente ativas. Uma ferramenta poderosa da química medicinal farmacêutica que compreende a incorporação de dois fármacos ou farmacóforos numa única molécula, com o objetivo de exercer dupla ação e/ou contrabalançar os efeitos secundários conhecidos da outra parte do híbrido (ARAUJO, 2015; NEPALLI et al., 2014).

Após a síntese desses candidatos a fármacos híbridos, há a necessidade de comprovação quanto a farmacocinética e farmacodinâmica, além da toxicidade. Ainda que tais híbridos sejam sintetizados a partir de moléculas com comportamento biológico já conhecido, o novo composto deve ser capaz de combater as doenças de maneira mais eficiente, segura e que responda ao tratamento com uma dose menor quando comparado aos precursores (GONÇALVES, 2021).

Nosso trabalho avaliou a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do composto híbrido LS26, um protótipo, através de diferentes modelos de nocicepção e inflamação em animais de laboratório. Embora os animais submetidos a um estímulo nociceptivo não tenham a capacidade de se comunicar verbalmente quanto da ocorrência de dor, são capazes de exibir respostas comportamentais, motoras e fisiológicas semelhantes às observadas em humanos. Essas respostas comportamentais são estudadas e comparadas na presença de fármacos reconhecidamente analgésicos que interferem no processo fisiológico da dor, o que nos permite inferir que um animal está experimentando uma resposta algica (JÚNIOR et al., 2013; PERAZA et al., 2007).

Os modelos de nocicepção baseiam-se na observação da resposta do animal frente à utilização de estímulos mecânicos, térmicos ou químicos. Neste trabalho, para a avaliação da atividade antinociceptiva foram realizados estímulos químicos nos ensaios de contorção abdominal por ácido acético, nocicepção induzida por formalina, nocicepção induzida por glutamato. E nocicepção através do modelo de imersão da cauda em água quente, bem como o modelo de Von Frey. Para a avaliação da atividade anti-inflamatória foram utilizados os modelos de edema de pata induzida por carragenina, modelo de permeabilidade vascular induzida por serotonina e histamina, modelo de bolsa de ar subcutânea e posterior análise das citocinas e óxido nítrico, além da avaliação das enzimas ciclooxigenases. Também foi analisada o potencial toxicológico do composto híbrido e seu mecanismo de ação.

A fim de fazermos uma triagem na resposta antinociceptiva do LS26, iniciamos com o modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético. O ácido acético age liberando mediadores endógenos que estimulam de maneira direta e indireta os neurônios nociceptivos. Em camundongos provoca, em nível peritoneal, um aumento dos níveis de PGE₂, PGF_{2 α} , PGI₂, serotonina e histamina (DERAEDT et al., 1980), liberação de bradicinina e citocinas como TNF- α , IL-8 e IL-1 β (VERRI et al., 2006; RIBEIRO et al., 2000). Deste modo provoca mudanças no comportamento que são caracterizados por contorções abdominais, redução e incoordenação da atividade motora (LE BARS et al., 2001).

A redução no número de contorções observadas no grupo tratado com LS26 em praticamente todas as doses testadas (5, 10, 100, 300 e 500 μ mol/kg) sugere que este composto híbrido atue reduzindo a nocicepção nos animais. Porém, por se tratar de um modelo inespecífico e, portanto, não podermos elucidar a ação periférica ou central (NESS & GEBHART, 1990) do composto, verificamos a atividade do LS26 no modelo nociceptivo induzido por formalina, a fim de discriminar o processo nociceptivo.

O modelo de nocicepção induzida por formalina é um método químico de nocicepção que fornece uma resposta mais específica quando comparado ao modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético (SHIBATA, et al., 1989). Tal modelo é padronizado em duas fases distintas, onde há a possibilidade de diferenciar a ação do composto sobre dois tipos de dor, a dor neurogênica e inflamatória. A fase neurogênica é a primeira fase no qual se inicia logo após a injeção intraplantar de formalina, e se estende por 5 minutos. Resulta do efeito irritante direto sobre os nociceptores ativando as fibras aferentes primárias principalmente em fibras do tipo C, envolvendo também em parte as fibras do tipo A δ , e substância P (FISCHER et al., 2014; SILVA et al.; 2013; HUNSKAAR e HOLE, 1987). A segunda fase do experimento, que ocorre após 15-30 minutos da injeção de formalina é

denominada fase inflamatória, pois está relacionada a liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios como a bradicinina, histamina, substância P, serotonina e prostaglandinas, TNF- α , e interleucinas (FISCHER et al.; 2008. Ainda nesta etapa, ocorre o aumento do nível dos mediadores excitatórios na medula espinhal, como o ON e o glutamato (TJOLSEN et al., 1992). Fármacos de ação central, como a morfina e fentanil que são fármacos analgésicos opioides de ação central conhecida, reduzem o tempo no qual os animais permanecem lambendo a pata em ambas as fases, demonstrado então que o resultado da inibição nas duas fases caracteriza uma ação antinociceptiva neurogênica. Já os anti-inflamatórios do tipo AINEs, como o ácido acetilsalicílico (AAS), inibem somente a fase II, sugerindo atividade antinociceptiva inflamatória (FISCHER et al.; 2008).

Os resultados obtidos através deste modelo de experimento sugerem que o composto LS26 provavelmente possui atividade sobre ambos os tipos de nocicepção, tendo em vista que o composto foi capaz de reduzir o tempo de lambedura nas duas fases com a dose de 10 μ mol/kg, semelhante ao fentanil, enquanto a dose de 5 μ mol/kg inibiu apenas na 2^a fase, indicando ação sobre a dor inflamatória, de forma semelhante ao diclofenaco.

O teste de imersão da cauda em água quente permite avaliar a atividade de substâncias cujos mecanismos antinociceptivos assemelham-se aos promovidos pelos analgésicos opioides. Este teste é considerado um reflexo espinal, mas também pode envolver estruturas neurais superiores e periféricas, portanto, (LE BARS et al., 2001) o aumento do tempo de reação é considerado como um importante parâmetro sugestivo de atividade neurogênica, caracterizada por nocicepção aguda não-inflamatória (SILVA et al., 2013). Em nossos experimentos, a administração de LS26 aumentou a latência de retirada da cauda dos animais na dose de 10 μ mol/kg, assim como o fentanil. Tal resultado indica que nosso composto foi eficaz em diminuir a nocicepção térmica nos animais. E como dito anteriormente, ainda que este teste envolva processos de reflexo espinal, pode também envolver estruturas neurais superiores ou periféricas, apontando analgésicos com alguma ação central e/ou periférica (LE BARS et al., 2001). Sendo assim, na tentativa de investigar as vias responsáveis pela atividade de LS26, realizamos o uso de fármacos antagonistas ainda no modelo de retirada de cauda.

Para a investigação do envolvimento de diferentes sistemas, utilizamos a naloxona (antagonista não seletivo opioide), na tentativa de investigar uma suposta participação dos receptores opioides. Os resultados evidenciaram uma redução na resposta antinociceptiva do LS26, revelando a participação do sistema opioide no mecanismo de ação do composto estudado. Dessa forma, para elucidar quais receptores opioides (μ , δ e κ) estariam envolvidos

no mecanismo de ação do LS26 e apontar uma participação mais seletiva, administramos seus respectivos antagonistas seletivos (metilnaltrexona, naltrindol e nor-binaltorfimina). Os resultados apontam para o possível envolvimento de todos os receptores opioides, tendo em vista que todos os antagonistas seletivos foram capazes de reduzir a ação antinociceptiva do LS26. Essa resposta ao modelo testado, propõe que o composto pode ser um agonista direto não seletivo opioide ou até mesmo um liberador de opioides endógenos, ou seja, um agonista indireto opioide.

Todos os três receptores opioides são acoplados a proteína G e estão amplamente distribuídos no SNC e nos terminais nervosos sensoriais periféricos, além de serem capazes de produzir analgesia central e periférica clinicamente relevantes (LENIASK et al., 2011)

O sistema opioide endógeno inibe a transmissão nociceptiva da via ascendente que inerva o tálamo. Projeções talâmicas para o córtex também estão sob controle do sistema opioide endógeno. Além disso, os receptores opioides são abundantemente expressos no sistema límbico, inibindo a percepção emocional da dor (NADAL et al., 2013; GUYTON, 1991). O sistema opioide endógeno também desempenha um papel crucial na modulação das vias inibitórias descendentes onde inibe as células “on” e ativa as células “off” (FIELDS, 2004). Na substância cinzenta periaquedatal (PAG), os neurônios encefalinérgicos fazem sinapse com os neurônios serotoninérgicos na medula ventral rostral, que por sua vez se projetam para o corno dorsal da medula espinhal. As projeções serotoninérgicas atuam nos neurônios encefalinérgicos no corno dorsal da medula que liberam encefalinas produzindo uma inibição da atividade das fibras A δ e C que entram na medula espinhal. Além disso, os terminais noradrenérgicos que partem do *locus coeruleus* e se projetam no corno dorsal também são regulados pelo sistema opioide endógeno (FIELDS, 2004).

Sinais nociceptivos também podem ser inibidos por interneurônios GABAérgicos que ativam receptores GABA na membrana pré e pós-sináptica, reduzindo a liberação de neurotransmissores excitatórios. Tanto opioides quanto GABA inibem o potencial de ação através da abertura dos canais de K $^{+}$ ou Cl $^{-}$ pós-sinápticos, levando a hiperpolarização da membrana nos neurônios na região dorsal (STEIN et al., 2016).

O mecanismo de ação dos opioides já é bem estabelecido. Após a ligação aos seus receptores específicos, são capazes de induzir mudanças conformacionais ativando proteínas G α /G β . Na subunidade G α , GDP é substituído por GTP e ocorre uma separação das subunidades G α e G $\beta\gamma$. Levando a uma diminuição do AMPc no interior dos neurônios desencadeando uma cascata de eventos (STEIN, 2016). O fechamento de canais de Ca $^{2+}$ voltagem dependentes no neurônio pré-sináptico e com isso inibindo a liberação de

neurotransmissores. Além do estímulo ao efluxo de K^+ resultando em hiperpolarização celular. Assim, o efeito final é a redução da excitabilidade neuronal, e com isso diminuição da neurotransmissão de impulsos nociceptivos (MARTINEZ et al., 2014). Dessa maneira, esses fármacos são bastante eficientes na diminuição da transmissão da nocicepção e reduz de forma significativa a dor.

A fim de elucidar se o efeito antinociceptivo do LS26 é proveniente da ação analgésica do óxido nítrico, realizamos a administração de L-NAME (inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase) no modelo de imersão da cauda em água quente, tendo em vista que diversos estudos apontam para esse papel analgésico atrelado ao óxido nítrico (CURY et al., 2011; PICOLO et al., 2004; LI et al., 2001; KAWABATA et al., 1992). Os resultados apontam para uma provável participação desse sistema no efeito antinociceptivo do composto, já que a associação de L-NAME e o LS26 fez com que o efeito do composto híbrido diminuísse.

O óxido nítrico possui um papel importante na transmissão e o controle da dor (CURY et al., 2011). Estudos apontam que além de induzir analgesia, também medeia efeito antinociceptivo periférico e central de compostos analgésicos, como opioides, anti-inflamatórios não esteroides e anti-inflamatórios naturais (PICOLO, 2004; KAWABATA et al., 1992). E dados também sugerem inclusive um efeito potencializador das ações da morfina administrada sistemicamente (CHEN e PAN, 2003). A morfina quando se liga aos receptores opioides induz uma estimulação da biossíntese de NOS, elevando os níveis de mRNA de NOS e expressão de nNOS (TODA et al., 2005). A modulação da transmissão de sinais inibitórios da dor opioide no SNC também são produzidos a partir da formação de ON supraespinhal (CURY, et al., 2011; JAVANMARDI, et al., 2005).

Os mecanismos envolvendo a nocicepção bem como a antinocicepção no ON são complexos. O efeito nociceptivo envolve a estimulação da guanilil ciclase solúvel resultando na conversão de trifosfato de guanosina em GMPc, uma vez que modula a atividade de muitos alvos nas células incluindo proteína quinase G (PKG), canais iônicos, e fosfodiesterases. O ON pode interagir com muitos sistemas, como os receptores NMDA e COXs para induzir efeito hiperalgésico. Já em relação ao efeito analgésico do ON, depende da ativação de uma sinalização via intracelular, envolvendo a abertura dos canais de K^+ sensíveis a GMPc-PKG-ATP. Pois, após ativação da guanilato ciclase, aumenta os níveis de GMPc, posteriormente ocorre a abertura dos canais de K^+ ATP gerando hiperpolarização nos neurônios aferentes primários e, finalmente resultando na antinocicepção (CURY et al., 2011).

Os canais de K⁺ podem ser ativados pelo ON e o GMPc em diferentes tecidos do organismo (SOARES et al., 2000; SOARES et al., 2001). Estudos sugerem também que a morfina induz em neurônios nociceptivos um aumento de canais de K⁺ sensíveis ao ATP seguido de hiperpolarização do neurônio (CUNHA et al., 2010). Esses estudos sugerem que o ON ou drogas capazes de ativar a via NO-GMPc, causa antinocicepção via abertura dos canais de K⁺ATP com consequente aumento da corrente de K⁺.

A glibenclamida, um bloqueador seletivo dos canais de K⁺ATP e ODQ, um inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase foram testados frente ao LS26 no modelo de imersão da cauda quente, e os dois foram capazes de reduzir a atividade antinociceptiva do composto. Sendo assim, após estes resultados, sugere-se que a via NO/GMPc/K⁺ATP está diretamente envolvida no mecanismo de ação antinociceptiva do composto.

Diversas substâncias endógenas podem estar envolvidas na nocicepção de forma direta ou indireta.

A antinocicepção pode ser influenciada pela participação do sistema colinérgico, tendo em vista que alguns estudos mostram que a administração de acetilcolina bloqueia diretamente a hiperalgesia inflamatória induzida por PGE₂, um efeito que é bloqueado pelo uso de L-NAME (DUARTE et al., 1990). Esses experimentos forneceram a primeira evidência de que o ON induz analgesia e está envolvido no efeito antinociceptivo periférico de fármacos analgésicos. Os resultados deste estudo indicam que o ON medeia também a ação analgésica periférica de acetilcolina e também que o ON induz, por si só, o efeito analgésico. Além disso, estes dados sugerem que a ação analgésica de ON depende de uma via de sinalização intracelular envolvendo a formação de GMP cíclico.

O sistema serotoninérgico também é uma das vias que tem papel relevante na modulação da nocicepção. A serotonina tem sido associada com o processamento e modulação da dor tanto no SNC quanto SNP. É liberada das plaquetas e mastócitos após lesão, sendo o efeito algésico ou analgésico dependente do sítio de ação e do subtipo de receptor ativado. Existem vários receptores para serotonina e estudos mostram que os receptores 5HT_{1A}, 5HT₂ e 5HT₃ estão presentes nas fibras aferentes do tipo C. A administração de agonistas colinérgicos aumenta a liberação de neurotransmissores inibitórios, como o GABA e a glicina, demonstrando que o sistema colinérgico é essencial no controle endógeno da dor (SHI e cols., 2011).

A serotonina atua em combinação com outros mediadores inflamatórios e pode estimular e sensibilizar as fibras aferentes, contribuindo para uma sensibilização periférica e hiperalgesia inflamatória (SOMMER, 2004).

Sendo assim, investigamos a possível participação dessas vias a fim de elucidar o mecanismo de ação do LS26 através do modelo de imersão da cauda em água quente. Administramos atropina (antagonista não-seletivo de receptores colinérgicos muscarínicos), mecamilamina (antagonista não-seletivo de receptores colinérgicos nicotínicos), ondansentron (antagonista seletivo de receptores serotoninérgicos 5-HT₃) e PCPA, um inibidor da síntese de serotonina, e a ação desses fármacos não influenciou na atividade do composto, sugerindo desta maneira que essas vias não estão envolvidas no processo de antinocicepção do LS26.

Dentre a diversidade de mediadores e neurotransmissores que participam da nocicepção, o glutamato sem dúvida ocupa um papel de destaque (SLUKA & WILLIS, 1998; OMOTE et al., 1998). Por isso, investigamos a participação deste neurotransmissor excitatório. Mas, o LS26 nas doses testadas não foi capaz de reduzir a nocicepção dos animais.

Com o intuito de avaliar a antinocicepção do LS26 em modelo de dor crônica, submetemos os animais a constrição crônica do nervo ciático. Este modelo simula a lesão mecânica traumática nos nervos periféricos de seres humanos e é um dos modelos mais comuns de dor neuropática. Os sinais clássicos de dor neuropática incluem anormalidades sensoriais tais como sensação desagradável, anormal (disestesia), hiperalgesia e alodinia (WOOLF et al., 1999). A partir disto, realizamos o modelo de Von Frey, a fim de avaliar a alodinia desenvolvida 21 dias após a cirurgia. No modelo agudo, onde avaliamos a nocicepção dos animais 2, 3 e 4 horas após a administração de 10 µmol/kg de LS26, notamos que houve um aumento do limiar mecânico necessário para produzir nocicepção. O composto LS26 também foi igualmente eficaz no modelo crônico, quando testamos a mesma dose de 10 µmol/kg. Esses resultados indicam que nosso composto é capaz de atenuar a sensação de dor neuropática. Para investigar o mecanismo anti-inflamatório do composto no modelo de dor neuropática, mensuramos as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 a partir do segmento do nervo ciático e observamos uma redução na produção/liberação de ambas as citocinas. Os resultados em conjunto sugerem que o LS26 possui uma ação no tratamento da dor neuropática aguda e crônica.

A IL-1 β é uma potente citocina pró-inflamatória regulada para cima após lesão nervosa periférica (SCHAFERS et al., 2001) Ativa diretamente a sinalização de p38 MAPK após se ligar no seu receptor IL1-R1 expressos em neurônios do GRD contribuindo diretamente para a hipersensibilidade (BINSHTOK et al., 2008). Também é conhecido que a diminuição da expressão de IL-1 β reduz a hiperalgesia e a alodinia associadas a lesão nervosa (CHESSEL et al., 2005). Estudos mostram que tanto o comprometimento genético de IL-1

quanto o bloqueio crônico de IL-1 atenuaram os sintomas de dor neuropática e a atividade neuronal ectópica espontânea após lesão do nervo periférico em camundongos (GABAY et al., 2001; WOLF et al., 2006).

Em animais, diversos estudos mostraram o potencial envolvimento de IL-6 na dor neuropática. Em um nervo ciático normal, os níveis de IL-6 e mRNA para IL-6 é pouco expresso ou possui níveis indetectáveis (KUREK et al., 1996; BOLIN et al., 1995) mas após lesão nervosa, essa expressão é alterada. Níveis aumentados de mRNA para IL-6 (MARTUCCI et al., 2008) e mRNA para receptores de IL-6 (IL-6R) foram detectados (ITO, et al., 1998).

Quanto ao tratamento com uso de opioide para o controle da dor neuropática, estudos apontam uma menor eficácia dessa classe, ficando como tratamento de terceira linha (WATKINS et al., 2005; WATKINS et al., 2007). Assim, sugere-se que a resposta do LS26 apresentada nesse modelo, esteja relacionada a diminuição da produção/liberação dessas citocinas no local da lesão.

A fim de excluir a possibilidade da ação antinociceptiva do composto LS26 estar relacionada a um comprometimento na atividade locomotora dos animais, realizamos o teste de rotarod. O emprego desse modelo é uma prática comum nos testes farmacológicos para identificação de compostos com propriedades antinociceptivas, uma vez que estes testes são baseados em respostas comportamentais que dependem de atividade motora. Dessa forma, drogas que reduzem a atividade motora podem reduzir o comportamento nociceptivo sem produzir efeito antinociceptivo (PINTO et al., 2012).

No teste do rotarod, o pré-tratamento dos animais com LS26 na dose de 10 $\mu\text{mol/kg}$, não modificou o número de quedas e nem o tempo de permanência dos camundongos no rotarod, fazendo um contraponto ao controle positivo do diazepam (1,76 $\mu\text{mol/kg}$). Esse resultado exclui efeitos depressores sobre o sistema motor e/ou SNC, reforçando os dados que sugerem um efeito antinociceptivo do LS26.

É conhecido que os mediadores endógenos com efeitos pró-inflamatórios contribuem para o desenvolvimento de dor inflamatória, neuropática e hiperalgesia em muitos modelos *in vivo*. Dentre esses mediadores, as prostaglandinas, bradicinina e citocinas, como IL-1 β e o TNF- α (OPREE et al., 2000). Diante de tal contexto, testamos o LS26 no modelo de edema de pata induzido por carragenina para verificar a atividade anti-inflamatória do composto.

A carragenina por ser tratar de um agente flogístico, possui ação irritante. É membro da família de polissacarídeos naturais derivados de certas espécies de algas vermelhas (Rhodophyta). Foi extraída pela primeira vez em 1837 e há muito tempo é utilizado pela

indústria alimentícia como agente formador de gel para processamento de alimentos. Essa classe de polissacarídeo pode causar efeitos biológicos adversos para o organismo, como iniciar resposta imune indesejada e inibir a coagulação sanguínea (LIU et al., 2015).

A inflamação gerada pela aplicação de carragenina intraplantar promove intensa vasodilatação e extravasamento plasmático com liberação de mediadores que contribuem também para a intensa migração celular ao sítio inflamatório. Assim, se constitui como um modelo interessante para triagem de novos fármacos anti-inflamatórios (TOMAZZI et al., 2010; HENRIQUES et al., 1987).

Após a administração de carragenina, a inflamação induzida é bifásica, ou seja, na primeira fase, que compreende a 1 a 2 horas após a administração, ocorre a liberação de mediadores inflamatórios como a serotonina, histamina e bradicinina; na 2^a fase ocorre aumento na produção de prostaglandinas, liberação de radicais livres derivados de neutrófilos e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β (CHYAD et al., 2016; ZHU et al., 2011; HALICI et al., 2007).

Os resultados apresentados do LS26 no modelo de edema de pata induzido pela carragenina, foram satisfatórios em praticamente todas as doses testadas, com exceção da dose de 1 μ mol/kg, em todos os tempos avaliados. Configurando assim uma atividade antiedematógena envolvendo diferentes mediadores inflamatórios.

SCHOLER e colaboradores em 1986 demonstraram atividade antiedematógena do diclofenaco de sódio com uma dose oral única entre 0,3 a 10 mg/kg, inibição esta exibida de forma dose dependente. Esta resposta é esperada de anti-inflamatórios não-esteroidais e tal fármaco é um dos precursores do LS26.

O extravasamento vascular foi estudado através da quantificação do corante azul de Evans. Este corante é muito utilizado em experimentos relativos à inflamação pela sua propriedade de ligar-se a albumina plasmática. O aumento da permeabilidade vascular e consequente extravasamento do exsudato (líquido rico em proteínas) é uma das principais características da inflamação aguda (MONTENEGRO et al., 1992). Testamos a capacidade do LS26 em reduzir o processo inflamatório causado após a administração de histamina e serotonina. Duas aminas vasoativas que são capazes de aumentar a permeabilidade vascular e consequentemente o aumento do fluxo sanguíneo, ajudando no recrutamento de leucócitos (inicialmente neutrófilos) e produção de prostaglandinas (KUMMAR, 2013). Mas, o composto na dose de 5 μ mol/kg não foi capaz de reduzir tais efeitos induzidos pela administração dessas duas substâncias, sugerindo que sua ação anti-inflamatória não é capaz de reduzir o extravasamento do exsudato provocado pela histamina e serotonina, ao menos

frente a dose de LS26 testada. Diante de tal resultado e em conjunto com as demais informações provenientes de testes anti-inflamatórios anteriores, a dose de 5 $\mu\text{mol/kg}$ pode não ser suficiente para o aparecimento de tal efeito, já que as doses que apresentam efeito nos testes de inflamação são superiores a 10 $\mu\text{mol/kg}$.

Desse modo, a fim de melhor caracterizar o efeito anti-inflamatório demonstrado no modelo de edema de pata, realizamos o modelo da bolsa de ar subcutâneo, pois a injeção de carragenina nesse modelo produz uma reação inflamatória não imunológica, caracterizada pela alta produção de mediadores inflamatórios, incluindo prostaglandinas, leucotrienos e citocinas e aumento do influxo de leucócitos, como neutrófilos. Tais indicadores podem ser quantificados e utilizados para interpretar o grau de inflamação, a resolução da inflamação ou a atividade anti-inflamatória de fármacos (DUARTE et al., 2012; JAIN et al., 2011).

A administração de LS26 por via oral diminuiu significativamente a migração de leucócitos decorrentes da ação do agente carragenina no teste de bolsa de ar subcutâneo, em todas as doses utilizadas (100, 300 e 500 $\mu\text{mol/kg}$), demonstrando que o composto possui a capacidade de reduzir o recrutamento de leucócitos para o local da inflamação.

MILLE e colaboradores, em 2009, evidenciaram que a função da resposta inflamatória na geração da nocicepção não é especificamente feita pela migração de leucócitos. As citocinas pró-inflamatórias podem ter sua origem em células imunológicas neuronais e gliais (micróglia e astrócitos), tanto no SNP quanto no SNC. Através das respostas dessas citocinas, pode haver hiperexcitabilidade crônica e um aumento da dor.

As citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 são citocinas pró-inflamatórias e seu envolvimento no processo da inflamação já são bem estabelecidos (ZHANG, et al., 2007).

O composto LS26 diminuiu a produção de IL-1 β com a maior dose testada (500 $\mu\text{mol/kg}$). A IL-1 β promove a expressão de moléculas de adesão endotelial, migração de leucócitos, aumento da permeabilidade vascular, produção de óxido nítrico e substância P, indicando assim que a IL-1 β é um importante mediador pró-inflamatório. Também há evidências de que a IL-1 β participa da inflamação sistêmica através da expressão de COX-2, levando a formação de prostaglandinas E₂ e consequentemente a febre (ZHANG, et al., 2007; WOLF et al., 2008).

O composto também foi verificado frente a IL-6 e TNF- α , e ambos foram reduzidos com as doses de 300 e 500 $\mu\text{mol/kg}$. A IL-6 está relacionada à síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado, febre e leucócitos na medula óssea (LIN, et al., 2000). É produzida principalmente por macrófagos e ajuda a aumentar a resposta inflamatória do corpo

(FRANCO et al., 2020). Nossos resultados, portanto, indicam a diminuição da IL-6 e a redução do processo inflamatório mediante esse mecanismo.

O TNF- α é uma citocina que representa um papel chave na resposta inata e está presente principalmente em monócitos, macrófagos e linfócitos T, além de exercer uma variedade de atividades biológicas incluindo inflamação, proliferação, diferenciação, apoptose e imunomodulação, promovendo a liberação de outras citocinas pro-inflamatórias (AGGARWAL, 2015) bem como respostas patológicas como choque séptico (DEROUICH, 2001). E como dito anteriormente, o composto híbrido LS26 demonstrou envolvimento do TNF- α em sua atividade anti-inflamatória e esses resultados em conjunto, envolvendo tais citocinas acima citadas, explicaria a redução da migração leucocitária observada assim como a redução do processo inflamatório.

O LS26 também foi testado a partir da análise de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-4 e IL-10, apresentando um aumento apenas da IL-10 com a maior dose de 500 μ mol/kg. A IL-4 é uma citocina que pode ser secretada por mastócitos, células TCD4, eosinófilos e basófilos, está envolvida na diferenciação de linfócitos B para produzir imunoglobulinas (IgG e IgE), inibe a produção de radicais livres e citocinas como TNF- α e IL-1 β . Logo, sua participação no reparo tecidual e ajuda na recuperação da homeostase é de extrema importância (GADANI et al., 2012; SOMMER et al., 2010). A IL-10 é produzida por muitas células do sistema imunológico, como células T e células B, NK, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos e células dendríticas (O'GARRA et al., 2007). Sabe-se também que é responsável pela inibição de citocinas inflamatórias importantes como IL-6, IL-1 β e TNF- α , além de aumentar a proliferação de mastócitos e inibição da produção de IFN- γ pelas células NK (ZHANG et al., 2007; O'GARRA et al., 2007).

O IFN- γ tem papel crucial na imunidade contra patógenos. É uma proteína solúvel produzida predominantemente por NK, linfócitos Th1, linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+ citotóxicos como parte da resposta imune (JAIME et al., 2007). O IFN- γ estimula o aumento da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade 1 e 2 (MHC, classe I e II), moléculas de adesão e receptores para a região Fc de anticorpos IgG na superfície de células apresentadoras de抗ígenos (APCs) (ARAÚJO-SOUZA et al., 2015). Porém o composto LS26 não alterou a produção de INF- γ de forma significativa comparando ao grupo controle.

Ainda com a análise do exsudato inflamatório proveniente do modelo da bolsa de ar subcutâneo, dosamos as concentrações de óxido nítrico periférico, no entanto, não foi observado nenhuma redução em sua concentração.

O composto LS26 demonstrou envolvimento da via NO/GMPc/K⁺ATP no seu provável mecanismo de ação sugerindo assim que o ON é importante no efeito da redução da nociceção.

Além do papel do ON nas vias nociceptivas, várias linhas de evidências indicaram que o ON também é capaz de induzir analgesia (CURY et al., 2011; DUARTE et al., 1990; CHUNG, et al., 2006). Dados já descritos na literatura mostram o efeito analgésico do NO através da analgesia provocada pela acetilcolina, tendo em vista que o uso de L-NAME levou a redução do efeito antinociceptivo (DUARTE et al., 1990).

Desde as observações pioneiras de DUARTE e colaboradores (1990) indicando que o NO induz analgesia e também medeia o efeito analgésico, vários trabalhos experimentais foram realizados indicando o NO como mediador do efeito antinociceptivo periférico e central de compostos analgésicos, como opioides, anti-inflamatórios não esteroidais e produtos naturais (CURY, et al., 2011; PICOLO et al., 2004; KAWABATA et al., 1992). Baseado na demonstração de que o NO medeia a ação analgésica periférica da Ach, semelhança da ação local da Ach e dos opioides, e mostrando que os opioides induzem a produção de GMPc em neurônios (CURY et al., 2011; MINNEMAN et al., 1976). Assim, há indícios que sugerem o envolvimento do sistema opioide e da via NO/GMPc/K⁺ATP no controle da nociceção de alguns fármacos, incluindo o LS26.

Nossos resultados também ressaltaram a atividade inibitória mais seletiva do composto LS26 sobre a enzima COX-2. Hoje, é bem documentado a existência de três isoformas da COX. A isoforma COX-1 é expressa constitutivamente em altos níveis em células do endotélio, monócitos, plaquetas, túbulos coletores renais, vesículas seminais (RAO et al., 2008; SMITH & DEWITT, 1996).

PGs como PGE₂ e PGI₂ produzidos pela COX-1 são conhecidos por exibir efeitos citoprotetores na mucosa gastrointestinal, reduzindo a secreção de ácido gástrico pelas células parietais no estômago. Também influencia na atividade antiplaquetária, além da produção de tampão biológico como bicarbonato (HCO₃⁻) (BATLOUNI et al., 2010; RAO et al., 2008; SMITH & DEWITT, 1996).

A enzima COX-2 é induzida por moléculas como lipopolissacárido (LPS) e mediadores da inflamação como IL-1 e TNF- α em uma ampla variedade de células e tecidos como endotélio vascular, osteoclastos, células endoteliais sinoviais reumatóides, monócitos e macrófagos (RAO et al., 2006). Durante um processo inflamatório ocorre um aumento nos níveis de COX-2, levando ao aumento de PGs pró-inflamatórias, aumentando dessa forma a permeabilidade vascular, edema, hiperalgesia e febre (RAO et al., 2008).

A COX-2 também é expressa constitutivamente na mácula densa, células epiteliais que revestem a alça ascendente de Henle e células intersticiais medulares das papilas renais (FITZGERALD & PATRONO, 2001). Possui funções fisiológicas principalmente nos rins, células vasculares endoteliais, medula espinal e ovários (DA SILVA et al., 2014).

A terceira isoforma da COX, a COX-3 foi descoberta em 2002 (CHANDRASEKHARAN et al., 2002) e pode ser encontrada no córtex cerebral, medula espinhal e coração. Por ser uma variante da COX-1 também possui efeitos anti-inflamatórios (MOSQUINI et al., 2001; RAO et al., 2008).

A COX-2 passou a ser alvo dos novos fármacos devido a sua ação inflamatória, e diminuição dos efeitos adversos quanto a problemas relacionados ao trato gastrointestinal. Com isto, surgiram então os inibidores seletivos para COX-2, porém, preocupações sobre seus efeitos adversos cardiovasculares começaram a mostrar-se muito relevantes. Esses inibidores seletivos alteram o equilíbrio natural entre tromboxano A₂ (TXA₂) e PGI₂, aumentando potencialmente a possibilidade de um evento cardiovascular trombótico (SOLOMON et al., 2004). A PGI₂ é importante no controle da homeostase do sistema cardiovascular, pois inibe a agregação plaquetária e funciona como vasodilatador, já o TXA₂ é oposto, responsável por um efeito vasoconstritor e induz a agregação plaquetária (MENDES e cols., 2012).

Tais efeitos adversos apresentados por esses fármacos inibidores seletivos para COX-2, nos levou a avaliar a toxicidade aguda e subcrônica do composto LS26, já que ele mostrou uma determinada seletividade para tal enzima. Os animais não apresentaram nenhum sintoma clínico tóxico tanto na análise aguda quanto subcrônica. Demonstrando segurança na utilização em camundongos nas doses testadas e tempo avaliado. O ganho de peso corporal, consumo de ração e peso dos órgãos avaliados também não apresentaram mudanças significativas quando comparado ao grupo controle do experimento. E através da análise macroscópica e microscópica também podemos verificar que os órgãos (rins, estômago, intestino, fígado e pulmões) não foram comprometidos pelo composto. Com esses achados, podemos sugerir que o uso do LS26 é seguro no tratamento de patologias relacionadas ao processo de dor e inflamação.

7 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que:

- O composto: (\pm -cis) (6-etyl-tetraidro-2H-pirano-2-il)metil 2-(2,6 diclorofenilamino) fenil acetato (LS26) possui atividade antinociceptiva aguda sob estímulos químico e térmico de acordo com os resultados nos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, formalina e imersão da cauda em água quente;
- Participação do sistema opioide e da via NO/GMPc/K⁺ATP no mecanismo de ação do composto LS26;
- O composto na dose testada não demonstrou atividade antinociceptiva frente ao glutamato no modelo de nociceção induzida diretamente pelo glutamato;
- Não há envolvimento da via serotoninérgica, colinérgica e nicotínica no mecanismo de ação do composto LS26.
- O composto LS26 possui atividade antinociceptiva sobre a alodinia induzida pela constrição crônica do nervo ciático, na avaliação aguda e crônica no modelo de dor neuropática;
- O composto LS26 tem sua ação antinociceptiva no modelo de dor neuropática relacionada a sua capacidade em inibir a produção de IL-1 β e IL-6 no nervo ciático submetido a constrição crônica;
- As doses testadas de LS26 não apresentou déficit motor nos animais no modelo de rotarod, demonstrando que a atividade antinociceptiva não resulta de um efeito incapacitante motor;
- O edema de pata induzido por carragenina foi reduzido com a administração prévia do LS26, confirmando um efeito antiedemogênico do composto;
- O composto LS26 possui atividade anti-inflamatória, conforme constatado pela sua capacidade de reduzir a migração leucocitária e a produção IL-1 β , TNF- α , IL-6 na inflamação induzida por carragenina no modelo de bolsa de ar subcutâneo. Também foi capaz de aumentar os níveis de citocina anti-inflamatória IL-10;

- Não foi observado aumento nos níveis da citocina anti-inflamatória IL-4, assim como também não houve reduções nos níveis de ON no modelo de bolsa de ar subcutâneo;
- O composto inibiu de forma seletiva a atividade da enzima COX-2, conforme avaliação *in vitro* da atividade enzimática de COX;
- Nos protocolos avaliados, o LS26 não apresentou alterações toxicológicas aguda e subcrônica a nível macroscópico e microscópico. Demonstrando assim segurança terapêutica na dosagem testada;

8 REFERENCIAS

- ABRAIRA, V. E.; KUEHN, E. D.; CHIRILA, A. M.; HEINTZ, N.; HUGHES, D. I.; GINTY, D. D. The Cellular and Synaptic Architecture of the Mechanosensory Dorsal Horn. **Cell**, v. 168, n. 1-2, p. 295-310 e19, Jan 12 2017.
- ACHENBACH, J.; TIIKKAINEN, P.; FRANKE, L.; PROSCHAK, E. **Computational tools for polypharmacology and repurposing**. Future Med. Chem. 3(8), 961–968; 2011.
- AGGARWAL, D.; LINDI, J.K. **Anti-TNF therapy is associated with a reduction in radiation exposure in patients with Crohn´s disease**. European Journal of gastroenterology & hepatology, v.27, p.13-19, 2015.
- AGHASAFARI, P.; GEORGE, U.; PIDAPARTI, R. **A review of inflammatory mechanism in airway diseases**. Inflamm Res, v. 68, n. 1, p. 59-74, Jan 2019.
- AHMED, A. U. **An overview of inflammation: mechanism and consequences**. Frontiers in Biology, v. 6, n. 4, p. 274, July 29. 2011.
- AIRES, M. M. **Fisiologia**. 5^a ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1376p. 2018.
- AJONA, D.; ORTIZ-ESPINOSA, S.; PIO, R. **Complement anaphylatoxins C3a and C5a: Emerging roles in cancer progression and treatment**. Semin Cell Dev Biol, v. 85, p. 153-163, Jan 2019
- AKIL, H.; OWENS, C.; GUTSTEIN, H.; TAYLOR, L.; CURRAN, E.; WATSON, S. **Endogenous opioids: overview and current issues**. Drug Alcohol Depend, v. 51, n. 1-2, p. 127-40, 1998.
- AL-CHALABI, M.; REDDY, V.; GUPTA, S. Neuroanatomy, Spinothalamic Tract. In: (Ed.). **StatPearls**. Treasure Island (FL), 2020.
- AL-HASANI, R.; BRUCHAS, M. R. **Molecular mechanisms of opioid receptordependent signaling and behavior**. Anesthesiology, v. 115, n. 6, p. 1363-81, 2011.

AMARANTE-MENDES, G. P. et al. **Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery**. *Front Immunol*, v. 9, p. 2379, 2018.

AMARANTE, L.H.; DUARTE, I.D. **The Kappa-opioid agonist (+/-)-bremazocine elicits peripheral antinociception by activation of the L-arginine/nitric oxide/ cyclic GMP pathway**, *Eur. J. Pharmacol.* 454: 19–23, 2002

AMORY, J.K.; AMORY, D.W. **Dosing frequency of aspirin and prevention of heart attacks and strokes**. *Am. J. Med.* 120(4); 2007.

ANCION, A., TRIDETTI, J., TRUNG, M.L.N., OURY, C., LANCELLOTTI, P. **A Review of the Role of Bradykinin and Nitric Oxide in the Cardioprotective Action of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors: Focus on Perindopril**. *Cardiol Ther*, v. 8, n. 2, p. 179-191, Dec 2019.

ANWAR, K. **Pathophysiology of pain**. *Dis Mon*, v. 62, n. 9, p. 324-9, Sep 2016.

ARAÚJO, C.; FILHO, C.; SANTOS, V.; MAIA, G.; GONÇALVES, A. **Desenvolvimento De Fármacos Por Hibridação Molecular: Uma Aula Prática de Química Medicinal Usando Comprimidos de Paracetamol e Sulfadiazina e a Ferramenta Virtual Scifinder®**. *Química Nova*, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 51-59, 2015.

ARAÚJO-SOUZA, P. S.; HANSCHKE, S. C. H.; VIOLA, J. P. B. **Epigenetic Control of Interferon-Gamma Expression in CD8+ T Cells**. *Journal of Immunology Research*, p. 849573, 2015.

ARCILLA, C. K.; TADI, P. **Neuroanatomy, Unmyelinated Nerve Fibers**. In: (Ed.). *StatPearls*. Treasure Island (FL), 2020.

ARENDT-NIELSEN, L.; MORLION, B.; PERROT, S.; DAGAN, A.; DICKENSON, A.; KRESS, H.G.; WELLS, C.; BOUHASSIRA, D.; DREWES, A.M. **Assessment and manifestation of central sensitisation across different chronic pain conditions**. *Eur J Pain*, v. 22, n. 2, p. 216-241, Feb 2018.

ARMSTRONG, S. A.; HERR, M. J. Physiology, Nociception. In: (Ed.). **StatPearls**. Treasure Island (FL), 2020.

ARRIAGADA, C.; SILVA, P.; TORRES, V. A. **Role of glycosylation in hypoxia-driven cell migration and invasion**. *Cell Adh Migr*, v. 13, n. 1, p. 13-22, Dec 2019

BALEMANS, D.; BOECKXSTAENS, G. E.; TALAVERA, K.; WOUTERS, M. M. **Transient receptor potential ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades underlying visceral hypersensitivity**. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v. 312, n. 6, p. G635-G648, Jun 1 2017.

BALIKI, M.; APKARIAN, A. Nociception, pain, negative moods, and behavior selection. Elsevier Inc. *Neuron* 87, Aug., 5, 2015.

BALLANTYNE, Jane C.; SULLIVAN, Mark D. **The discovery of endogenous opioid systems: what it has meant for the clinician's understanding of pain and its treatment**. *Pain*, 2017.

BAPNA, M.; CHAUHAN, L.S. **The ambidextrous cyclooxygenase: an enduring target**. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 13(6):387-92. 2015.

BATLOUNI, M. **Anti-inflamatórios não esteroides: efeitos cardiovasculares, cérebro-vasculares e renais**. *Arq Bras Cardiol*, v. 94, n. 4, p. 556-63, 2010.

BAUSBAUM, A. I., BAUTISTA, D. M., SCHERRER, G., & JULIUS, D. **Cellular and Molecular Mechanisms of Pain**. *Cell*, 139(2), 267–284. 2009.

BASBAUM, A. I.; JESSELL, T. The Perception of Pain. In: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J.; JESSELL, T. **Principles of Neuroscience**. New York: Appleton and Lange; p. 472-491, 2000.

BARRETO, R.L.; CORREIA, C.R.; MUSCARÁ, M.N. **Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos**. *Quim. Nova*, vol. 28, n.6, p.1046-1054, 2005.

BARON R, BINDER A, WASNER G. **Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment.** Lancet Neurol;9:807–19. 2010.

BLASZCZYK, L.; MAITRÊ, M.; LASSEURRE, T. L.; CLARK, S.; COTA, D.; OLIET, S. H. R.; FENELON, V. S. **Sequential alteration of microglia and astrocytes in the rat thalamus following spinal nerve ligation.** J Neuroinflammation, v. 15, n. 1, p. 349, Dec 20 2018

BINSHTOK, A.M.; WANG, H.; ZIMMERMMANN, K.; AMAYA, F.; VARDEH, D.; SGHI, L.; BRENNER, G.J.; JI, R.R.; BEAN, B.P.B.; WOOLF, C.J.; SAMAD, T.A. **Nociceptors are interleukin- 1beta sensors.** J Neurosci v. 28 p. 14062–14073, 2008.

BOLIN, L.M.; VERITY, A.N.; SILVER, J.E.; SHOOTER, E.M.; ABRAMS, J.S. **Interleukin-6 production by Schwann cells and induction in sciatic nerve injury.** J Neurochem; v. 64 p.850–858. 1995

BRANCO, A. et al. **Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation.**

Mediators Inflamm, v. 2018, p. 9524075, 2018.

BRANDÃO, A.F.; MARTINS- PINGE, C.M. **Nitric oxide alteration in the cardiovascular function by exercise training.** Semina: Ciências Biológicas e da Saúde. V.28, n.1, p. 53-68, jan, 2007.

BURKE, N. N.; FINN, D. P.; MCGUIRE, B.E., ROCHE, M. **Psychological stress in early life as a predisposing factor for the development of chronic pain: Clinical and preclinical evidence and neurobiological mechanisms.** J Neurosci Res, v. 95, n. 6, p. 1257-1270, Jun 2017.

CALDER, P. C. **Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man.** Biochem SocTrans, v. 45, n. 5, p. 1105-1115, Oct 15 2017.

CALLERA, G., TOSTES, R., SAVOIA, C., **Vasoactive peptides in cardiovascular (patho)physiology**. Expert Rev. Cardiovasc Ther. 5(3):531-52, 2007.

CÂMARA, C. C. **Estudo dos efeitos antinociceptivos, comportamentais e regenerativos do tratamento com gabapentina em modelo experimental de dor neuropática**. 220f. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia / UFC, Fortaleza, Ceará, 2009.

CAPIM, S.L; CARNEIRO, P.H.P; CASTRO, P.C; BARROS, M.R.M; MARINHO, B.G; VASCONCELLOS, M.L.A.A. **Design, Prins-cyclization, reaction promoting diastereoselective synthesis of 10 new tetrahydropyran derivatives and in vivo antinociceptive evaluations**. European Journal of Medicinal Chemistry. 58:1-11, 2012

CERQUEIRA, N. F. / YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. Acta Cir Bras [serial online] Nov-Dez;17(6), 2002.

CHANDRASEKHARAN, N.V.; DAI, H.; ROOS, K L.; EVANSON, N.K.; TOMSIK, J.; ELTON, T.S.; SIMMONS, L.D. **COX-3, a cyclooxygenase-1 variantinhibited by acetaminophen and otheranalgesic/antipyretic drugs: cloning, structureand expression**. Proc Natl Acad Sci USA, v.99 p.13926-13931, 2002.

CHEN S.R., PAN, H.L. **Antinociceptive effect of morphine, but not mu opioid receptor number, is attenuated in the spinal cord of diabetic rats**. Anesthesiology v.99: p.1409–1414, 2003

CHESSELL, I.P.; HATCHER, J.P.; BOUNTRA, C.; MICHEL, A.D.; HUGHES, J.P.; GREEN, P.; EGERTON, J.; MURFIN, M.; et al: **Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain**. Pain v. 114 p. 386–396, 2005.

CHOI, S. I.; HWANG, S. W. **Depolarizing Effectors of Bradykinin Signaling in Nociceptor Excitation in Pain Perception**. Biomol Ther (Seoul), v. 26, n. 3, p. 255-267, May 1 2018.

CHOI, S.-R. et al. **Astrocyte D-serine modulates the activation of neuronal NOS leading to the development of mechanical allodynia in peripheral neuropathy**. Molecular Pain, v. 15, p. 1744806919843046, dez. 2019.

CHOPRA, S.; GIOVANELLI, P.; VASQUEZ, P. A. A.; ALONSO, S.; SONG, M.; SANDOVAL, T. A.; CHAE, C. T.; FONSECA, M. M.; GUTIERREZ, S.; JIMENEZ, L.; SUBBARAMAIAH, K.; IWAWAKI, T.; KINGSLEY, P. J.; MARNETT, L. J.; KOSSENKOV, A. V.; CRESPO, M. S.; DANNENBERG, A. J., GLIMCHER, L. H.; SANDOVAL, E. A. R.; RUIZ, J. R. C. **IRE1alpha-XBP1 signaling in leukocytes controls prostaglandin biosynthesis and pain**. *Science*, v. 365, n. 6450, Jul 19 2019.

CHUNG, E.; BURKE, B.; BIEBER, A.J.; DOSS, J.C.; OHGAMI, Y.; QUOCK, R.M. **Dynorphinmediated antinociceptive effects of L-arginine and SIN-1 (an NO donor) in mice**. *Brain Res. Bull.* v.70 p. 245–250, 2006.

CHYAD A H; OMAR S I; AHMMED H; Study The Analgesic And Anti-Inflammatory Activity Of Zingiber Officinale Rhizome Extract Comparison With Ibuprofen In Male Mice. *Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences* Vol. (7) No. (1) 2016

CONCEIÇÃO, M.J. **Desafios na pesquisa da dor**. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. v.62, nº 3 p. 287-288; 2012.

COSTANTINO, C. M; GOMES, I.; STOCKTON, S.D; LIM, M.P; DEVI, L.A. **Opioid receptor heteromers in analgesia**. *Expert Rev Mol Med*, v. 14, p. e9, 2012.

COOK, A. D.; CHRISYENSEN, A. D.; TEWARI, D.; MCMAHON, S. B.; HAMILTON. Immune Cytokines and Their Receptors in Inflammatory Pain. **Trends Immunol**, v. 39, n. 3, p. 240-255, Mar 2018.

COLLOCA, L.; LUDMAN, T.; BOUHASSIRA, D.; BARON, R.; DIECKENSON, A.H. et al. **Neuropathic pain**. *Nat. Rev. Dis. Primers* 3:17002, 2017

CUNHA, T.M.; ROMAN-CAMPOS, D.; LOTUFO, C.M.; DUARTE, H.J.; SOUZA, W.A.; VERRI, J.R.; FUNES, M.I.; DIAS, Q.M.; SCHIVO, I.R.; DOMINGUES, A.C.; SACHS, D.;

CHIAVEGATTO, S.; TEIXEIRA, J.S., HOTHERSALL, J.S.; CUNHA, Q.F.; FERREIRA, S.H. **Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kgamma/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA v.107 p. 4442–4447; 2010.

CURY, Y.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, V.P.; FERREIRA, S.H. **Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system**. Elsevier, v. 25, p. 243-254, 2011.

DAI, Y. **TRPs and pain**. Semin Immunopathol, v. 38, n. 3, p. 277-91, May 2016

DA SILVA, J. M. **Antiinflamatórios não esteróides e suas propriedades gerais**. Revista Científica do ITPAC, Araguaína, v.7, n.4, 2014.

DEMBO, T.; BRAZ, J. M.; HAMEL, K. A.; KUHN, J. A.; BASBAUM, A. I. **Primary Afferent-Derived BDNF Contributes Minimally to the Processing of Pain and Itch**. eNeuro, v. 5, n. 6, Nov-Dec 2018.

DERAEDT, R.; JOUQUEY, S.; DELEVALLEE, F.; FLAHAUT, M. **Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition**. European Journal of Pharmacology, v. 61, n. 1, p. 17-24, 1980.

DEROUICH-GUERGOUR, D.; BRENIER-PINCHART, M. P.; AMBROISE-THOMAS, P.; PELLOUX, H. **Tumor necrosis factor α receptors: role in the physiopathology of protozoan parasite infections**. International Journal for Parasitology, v.31, p. 763-769, 2001.

DESAI, S. J.; PRICKRIL, B.; RASOOLY, A. **Mechanisms of Phytonutrient Modulation of Cyclooxygenase-2 (COX-2) and Inflammation Related to Cancer**. Nutr Cancer, v. 70, n. 3, p. 350-375, Apr 2018.

DJOUHRI, L. **Electrophysiological evidence for the existence of a rare population of C-fiber low threshold mechanoreceptive (C-LTM) neurons in glabrous skin of the rat hindpaw**. Neurosci Lett, v. 613, p. 25-9, Feb 2 2016.

DRAY, A. **Neuropathic pain: emerging treatments.** British Journal of Anesthesia 101 (1): 48-58, 2008.

DRUMITRASCUTA, M.; BERMUDEZ, M.; TROVATO, O.; DE NEVE, J.; BALLET, S.; WOLBER, G.; SPETEA, M. **Antinociceptive efficacy of the μ -opioid/Nociceptin Peptid-Based Hybrid KGNOP1 in inflammatory pain without rewarding effects in mice: An experimental assessment and molecular docking.** Molecules., 26, 3267, 2021

DUARTE, D.B.; VASKO, M.R.; FEHRENBACHER, J.C. **Models of inflammation: carrageenan air pouch.** Current protocols in pharmacology. v. 56, p. 561-568, 2012.

DUARTE, I.D.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. **Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide–cyclic GMP pathway.** Eur. J. Pharmacol. v. 186 p. 289– 293, 1990.

DUBIN, A.E.; Patapoutian, A. **Nociceptors: The sensors of the pain pathway.** J. Clin. Investig., 120, 3760–3772, 2010.

EDER, C. **Mechanism of interleukin-1 beta release.** Immunobiology, 214(7):543-53,2009.

EL ALWANI, M.; WU, B. X.; OBEID, L. M.; HANNUN, Y. A. **Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response.** Pharmacol Ther. 112(1):171-83, 2006.

ELLISON, D. L. Physiology of Pain. **Crit Care Nurs Clin North Am**, v. 29, n. 4, p. 397-406, Dec 2017.

FEIN, A. **Nociceptores: As células que sentem dor.** Petrov P, Francischi JN, Ferreira SH, et al. tradutores. Ribeirão Preto – SP: Dor On Line; 2011. 106 p. Disponível em: <http://www.dol.inf.br/nociceptores>. Acessado em 14 de dezembro de 2021.

FERDOUSI, M.; FINN, D. P. **Stress-induced modulation of pain: Role of the endogenous opioid system.** Prog Brain Res, v. 239, p. 121-177, 2018.

FERREIRA, A.A.; AMARAL, F.A.; DUARTE, I.D.G.; OLIVEIRA, P.M.; ALVES, R.B.; SILVEIRA, D.; AZEVEDO, A.O.; RASLAN, D.S.; CASTRO, M.S.A. **57 Antinociceptive effect from *Ipomoea cairica* extract.** *J. Ethnopharmacol.* 105: 148–53. 2006.

FERREIRA, F.S., BRITO, S.V., SARAIVA, R.A., ARARUNA, M.K.A., MENEZES, I.R.A., COSTA, J.G.M., COUTINHO, H.D.M., ALMEIDA, W.O., ALVES, R.R.N. **Topical anti-inflammatory activity of body fat from the lizard *Tupinambis merianae*.** *J. Ethnopharmacol.* 130: 514–520. 2010

FINSTERER, J.; WANSCHITZ, J.; QUASTHOFF, S.; IGLSEDER, S.; LOSCHER, W.; GRISOLD, W. **Causally treatable, hereditary neuropathies in Fabry's disease, transthyretinrelated familial amyloidosis, and Pompe's disease.** *Acta Neurol Scand*, v. 136, n. 6, p. 558-569, Dec 2017.

FISCHER, L.G.; SANTOS, D.; SERAFIN, C.; MALHEIROS, A.; MONACHE, F.D.; MONACHE, G.D.; FILHO, V.C.; SOUZA, M.M. **Further Antinociceptive Properties of Extracts and Phenolic Compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) Leaves.** *Biol. Pharm. Bull.* 31(2) 235—239, 2008.

FISCHER, M., CARLI, G., RABOISSON, P., AND REEH, P. **The interphase of the formalin test.** *Pain* 155, 511–521. 2014.

FITZGERALD, G.A.; PATRONO, C. **The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2.** *N Eng J Med*, v. 345 p. 433-442, 2001.

FLECKENSTEIN, J.; SIMON, P.; KONIG, M.; VOGT, BANZER. **The pain threshold of high-threshold mechanosensitive receptors subsequent to maximal eccentric exercise is a potential marker in the prediction of DOMS associated impairment.** *PLoS One*, v. 12, n. 10, p. e0185463, 2017.

FRANCO, P.; LAURA, F.; VALENTINA, C.; SIMONA, A.; GLORIA, A.; ELEONORA. **Interleukin-6 in rheumatoid arthritis.** *International Journal of Molecular Sciences.* 21(15):5238, 2020.

GABAY, E.; WOLF, G.; SHAVIT, Y.; YIRMIJA, R.; TAL, M. **Chronic blockade of interleukin-1 (IL-1) prevents and attenuates neuropathic pain behavior and spontaneous ectopic neuronal activity following nerve injury.** Eur J Pain. v. 15 p. 242– 248, 2011.

GADANI, P.S.; CRONK, J.C.; NORRISG.T.; KIPNIS, J. **Interleukin-4: A cytokine to remember.** J. Immunol. v.189(9), p. 4213-4219, 2012.

GALDINO, G. S.; DUARTE, I. D.; PEREZ. **The Nitric oxide/cGMP/KATP pathway mediates systemic and central antinociception induced by resistance exercise in rats.** International Journal of Neuroscience, v. 125, n. 10, p. 765–773, 3 out. 2015.

GAVVA, N. R.; SANDROCK, R.; ARNOLD, G. E.; DAVIS, M.; LAMAS, E.; LINDVAY, C.; LI, C. M.; SMITH, B.; BACKONJA, M.; GABRIEL, K., VARGAS, G. **Reduced TRPM8 expression underpins reduced migraine risk and attenuated cold pain sensation in humans.** Sci Rep, v. 9, n. 1, p. 19655, Dec 23 2019.

GAZERANI, S.; ZARINGHALAM, J.; MANAHEJI, H.; GOLABI, S. **The Role of C Fibers in Spinal Microglia Induction and Possible Relation with TRPV3 Expression During Chronic Inflammatory Arthritis in Rats.** Basic Clin Neurosci, v. 7, n. 3, p. 231- 40, Jul 2016.

GEBHART, G. F.; BIELEFELDT, K. **Physiology of Visceral Pain.** Compr Physiol, v. 6, n. 4, p. 1609-1633, Sep 15 2016.

GONÇALVES, G. M; CAPIM, S. L; VASCONCELLOS, M. L. A. A; MARINHO, B. G. **Antihyperalgesic effect of [±)-(2,4,6-cis)-4-chloro-6-(naphthalen-1-yl)-tetrahydro-2H-pyran-2-yl]methanol: participation of the NO/cGMP/KATP pathway and κ-opioid receptor..** Behavioural Pharmacology, 27(6), 506–515, 2016.

GONÇALVES, G.M.; DE OLIVEIRA, J.M.; FERNANDES, T.F.C.; CID, G.C.; LAUREANO-MELO, R.; CÔRTES, W.S.; CARVALHO, V.A.N.; CAPIM, S.L.; VASCONCELLOS, M.L.A.A.; MARINHO, B.G. **Evaluation of the systemic and spinal antinociceptive effect of a new hybrid NSAID tetrahydropyran derivative.** Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2021.

GRASSEL, S.; MUSCHTER, D. **Peripheral Nerve Fibers and Their Neurotransmitters in Osteoarthritis Pathology.** *Int J Mol Sci*, v. 18, n. 5, Apr 28 2017

GRIFFITHS, H. R.; GAO, D.; PARARASA, C. **Redox regulation in metabolic programming and inflammation.** *Redox Biol*, v. 12, p. 50-57, Aug 2017.

GRUNDMANN, K.; JASCHONEK, K.; KLEINE, B.; DICHGANS, J.; TOPKA, H.; **Aspirin non-responder status in patients with recurrent cerebral ischemic attacks.** *J. Neurol.* 250(1), 63–66; 2003.

GUGINSKI, G; LUIZ, A.P; SILVA, M.D; MASSARO, M; MARTINS, D.F; CHAVES, J; MATTOS, R.W; SILVEIRA, D; FERREIRA, V.M; CALIXTO, J.B; SANTOS, A.R. **Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice.** *Pharmacol. Biochem. Behav.* 93:10–16, 2009

GUTIERREZ, V; ZAMBELLI, V; PICOLO, G; CHACUR, M; SAMPAIO, S; BRIGATTE, P; CURY, Y. **Peripheral L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway and ATP-sensitive K⁺ channels are involved in the antinociceptive effect of crotalaphine on neuropathic pain in rats.** *Behav. Pharmacol.*, (1):14-24, 2012.

HALICI, Z.; DENGIZ, G.O.; ODABASOGLU, F.; SULEYMAN, H.; CADIRCI, E.; HALICI, M. **Amiodarone has anti-inflammatory and anti-oxidative properties: An experimental study in rats with carrageenan-induced paw edema.** *Eur J Pharmacol.* 566:215-21, 2007.

HARIRFOROOSH, S.; ASGHAR, W.; JAMALI, F. **Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications.** *J Pharm Pharm Sci.*;16(5):821-47. 2013.

HENRIQUES, M.G.; SILVA, P.M.; MARTINS, M.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; ASSUREY-FILHO, J.; CORDEIRO, R.S. **Mouse paw edema. A new model for inflammation?** *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.20, n.2, p.243-249, 1987.

HERVERA, A; LEANEZ, S; NEGRETE, R; POL, O. **The peripheral administration of a nitric oxide donor potentiates the local antinociceptive effects of a DOR agonist during chronic inflammatory pain in mice.** *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol* 380: 345–352, 2009.

HESS, S.; PADOANI, C.; SCORTEGANHA, L.C.; HOLZMANN, I.; MALHEIROS, A.; YUNES, R.A.; et al. **Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by myrsinoic acid** *B. Biol Pharm Bull* 33:209–215. 2010.

HOPKINS, A.L. **Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery.** *Nat. Chem. Biol.* 4(11), 682–690; 2008.

HOSSAIN, M. Z.; BAKRI, M. M.; YAHYA, F.; ANDO, H.; UNNO, S.; KITAGAWA, J. **The Role of Transient Receptor Potential (TRP) Channels in the Transduction of Dental Pain.** *Int J Mol Sci*, v. 20, n. 3, Jan 27 2019.

HUGHES, P.; BRIERLEY, S. M.; YOUNG, R. L.; BLACKSHAW, A. A. **Localization and comparative analysis of acid-sensing ion channel (ASIC1, 2, and 3) mRNA expression in mouse colonic sensory neurons within thoracolumbar dorsal root ganglia.** *J Comp Neurol*, v. 500, n. 5, p. 863-75, Feb 10 2007.

HUNSKAAR, S; HOLE, K. **The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain.** *Pain* 30: 103–14, 1987.

HYLANDS-WHITE, N.; DUARTE, R. V.; RAPHAEL, J. H. **An overview of treatment approaches for chronic pain management.** *Rheumatol Int*, v. 37, n. 1, p. 29-42, Jan 2017.

INNES, J. K.; CALDER, P. C. **Omega-6 fatty acids and inflammation.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v. 132, p. 41-48, May 2018

ITO, Y.; YAMAMOTO, M.; LI, M.; DOY, M.; TANAKA, F.; MUTCHE, T.; MITSUMA, T.; SOBUE, G. **Differential temporal expression of mRNAs for ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia inhibitory factor (LIF), interleukin-6 (IL- 6), and their receptors (CNTFR alpha, LIFR beta, IL-6R alpha and gp130) in injured peripheral nerves.** Brain Res; v. 793 p. 321–327. 1998

JAIN, M.; PARMAR, H.S. **Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation.** Inflammation research. v.60, p. 483-491, 201

JAVANMARDI, K, M; PARVIZ, S.S; SADR, M; KESHAVARZ, B; MINAI; DEHPOUR, A.R. **Involvement of N-methyl-D-aspartate receptors and nitric oxide in the rostral ventromedial medulla in modulating morphine pain-inhibitory signals from the periaqueductal grey matter in rats.** Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 32: 585–589, 2005.

JIA, G. et al. **Endothelial cell senescence in aging-related vascular dysfunction.** Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, v. 1865, n. 7, p. 1802-1809, Jul 1 2019.

JÚNIOR, W.B. **Estudo da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de protótipos de fármacos.** 126f. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/ IQB, Alagoas, Maceió, 2013.

KAWABATA, Y.; FUKUZUMI, Y.; FUKUSHIMA, H.; TAKAGI. **Antinociceptive effect of L-arginine on the carrageenin-induced hyperalgesia of the rat: possible involvement of central opioidergic systems,** Eur. J. Pharmacol. v.218 p.153–158, 2002.

KAWABATA, A.; FUKUZUMI, Y.; FUKUSHIMA, H.; TAKAGI. **Antinociceptive effect of L-arginine on the carrageenin-induced hyperalgesia of the rat: possible involvement of central opioidergic systems,** Eur. J. Pharmacol. v. 218 p. 153–158, 1992.

KHAN, A.; KHAN, S.; KIM, Y. S. **Insight into Pain Modulation: Nociceptors Sensitization and Therapeutic Targets.** Curr Drug Targets, v. 20, n. 7, p. 775-788, 2019.

KELLENBERGER, S.; SCHILD, L. **International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCI. structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels and the epithelial Na⁺ channel.** *Pharmacol Rev*, v. 67, n. 1, p. 1-35, 2015

KNEZEVIC, N. N.; TVERDOHLEB, T.; KNEVECIV, I., CANDIDO, K.D. **The Role of Genetic Polymorphisms in Chronic Pain Patients.** *Int J Mol Sci*, v. 19, n. 6, Jun 8 2018.

KNOX, C.; LAW, V.; JEWISON, T. **DrugBank 3.0: a comprehensive resource for ‘omics’ research on drugs.** *Nucleic Acids Res.* 39(Database issue), D1035–D1041; 2011.

KUMAR, VINAY *et al.* **Robbins, patología básica.** Rio de Janeiro : Elsevier., 928 p. 2013.

KUNNUMAKKARA, A. B. SAILO, B. L.; BANIK, K.; HARSHA, C.; PRASAD, S.; GUPTA, S.C.; BHARTI, A. C.; AGGARWAL, B.B. **Chronic diseases, inflammation, and spices: how are they linked?** *J Transl Med*, v. 16, n. 1, p. 14, Jan 25 2018.

KUREK, J.B.; AUSTIN, L.; CHEEMA, S.S.; BARLETT, P.F.; MURPHY, M. **Up-regulation of leukaemia inhibitory factor and interleukin-6 in transected sciatic nerve and muscle following denervation.** *Neuromuscul Disord.* v.6 p.105–114. 1996

LAW, Ping-Yee; WONG, Yung H.; LOH, Horace H. **Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling.** *Annual review of pharmacology and toxicology*, v. 40, n. 1, p. 389-430, 2000.

LE BARS, D.; GOZARIU, M. CADDEN, S.W. **Animals models of nociception.** *Pharmacology*, v. 53, p. 597-652, 2001.

LESNIAK, A.; LIPKOWSKI, A. W. **Opioid peptides in peripheral pain control.** *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, v. 71, n. 1, p. 129-38, 2011.

LEUNG, R. H.; STROMAN, P. W. **Neural Correlates of Cognitive Modulation of Pain Perception in the Human Brainstem and Cervical Spinal Cord using Functional**

Magnetic Resonance Imaging: A Review. Crit Rev Biomed Eng, v. 44, n. 1-2, p. 33-45, 2016.

LI, X.; Clark, J.D. Spinal cord nitric oxide synthase and heme oxygenase limit morphine induced analgesia, Brain Res. Mol. Brain Res. v.95 p.96–102, 2001.

LIN, E; CALVANO, S.E; LOWRY, S.F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. Surgery,;127:117-126, 2000

LIU, J.; ZHAN, X.; WAN, J.; WANG, Y.; WANG, C. Review for carrageenan-based pharmaceutical biomaterials: Favourable physical features versus adverse biological effects. Carbohydrate Polymers, v. 121, p. 27–36, 2015.

LOZANO-CUENCA, J.; CASTANEDA-HERNANDEZ, G.; GRANADOS-SOTO, V. Peripheral and spinal mechanisms of antinociceptive action of lumiracoxib. Eur. J. Pharmacol. 513: 81–91, 2005

MARCEAU, F.; BACHELARD, H.; BOUTHILLIER, J.; FORTIN, J.P.; MORISSEETE, G.; BAWOLAK, M.T.; MORIN, X. C.; GERA, L. Bradykinin receptors: Agonists, antagonists, expression, signaling, and adaptation to sustained stimulation. **Int Immunopharmacol**, v. 82, p. 106305, Feb 24 2020.

MARINHO, B.G; MIRANDA, L.S.M.; GOMES, N.M.; MATHEUS, M.E.; LEITÃO, S.G.; VASCONCELLOS, M.L.A.A.; FERNANDES, P.D. Antinociceptive action of (±)-cis-(6-ethyl-tetrahydropyran-2-yl)-formic acid in mice. European Journal of Pharmacology. 550: p. 47-53, 2006

MARTINEZ, J. E.; PEREIRA, G. A. F.; RIBEIRO, L. G. M.; NUNES, R.; ILIAS, D.; NAVARRO, L. G. M. **Estudo da automedicação para dor musculoesquelética.** Pontifícia Universidade Católica - São Paulo. Revista Brasileira de Reumatologia, v. 54, n. 2, p. 90-94, 2014.

MARTUCCI, C.; TROVATO, A.E.; COSTA, B.; BORSANI, E.; FRANCHI, S.; MAGNAGHI, V.; PENARI, A.; RODELLA, L.F.; VALSECCHI, A.E.; COLLEONI, M. **The**

purinergic antagonist PPADS reduces pain related behaviours and interleukin-1 beta, interleukin-6, iNOS and nNOS overproduction in central and peripheral nervous system after peripheral neuropathy in mice. Pain. v.137 p. 81– 95, 2008.

MEDZHITOY, R. Origin and physiological roles of inflammation. Nature. (454) 428-435, 2008.

MENDES, R.T. Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios. Rev. bras. reumatol, v. 52, n. 5, p. 774-782, 2012.

MERRER,J.L.; JECKER, J.A.; BEFORT, K.; KIEFFER, B.L. Reward processing by the opioid system in the brain. Physiol Rev. Oct;89(4):1379-412, 2009

MILLAN, M. J. Descending control of pain. Progress in Neurobiology, v. 66, n. 6, p. 355– 474, 2002.

MINNEMAN, K.P; IVERSEN, I.L. Enkephalin and opiate narcotics increase cyclic GMP accumulation in slices of rat neostriatum. Nature 262, 313–314, 1976.

MONTENEGRO, M.R.; FECCHIO, D. Inflamações: conceitos gerais e inflamação aguda. In: MONTENEGRO, M.R, FRANCO, M. **Patologia: processos gerais 4^{ed}.** São Paulo: Atheneu; p.109-128, 1992.

MONTINARI, M.R, MINELLI, S, DE CATARINA, R. The first 3500 years of aspirin history from its roots - A concise summary. Vascul Pharmacol. Feb;113:1-8. 2019.

MOSQUINI, A.F; ZAPPA, V; MONTANHA, F. P. Características farmacológicas dos antiinflamatórios não esteroidais – revisão de literatura. Revista científica eletrônica de medicina veterinária, n. 17, Julho de 2011.

MULLER, W. A. How endothelial cells regulate transmigration of leukocytes in the inflammatory response. The American Journal of Pathology, v. 184, n. 4, p. 886– 896, abr. 2014.

NAPIMOOGA, C.J.T; PELLEGRINI-DA-SILVA, A; FERREIRA, V.H; NAPIMOOGA, M.H; PARADA, C.A; TAMBELI, C.H. **Gonadal hormones decrease temporomandibular joint kappa-mediated antinociception through a downregulation in the expression of kappa opioid receptors in the trigeminal ganglia.** Eur. J. Pharmacol. 617: 41–47, 2009.

NEPALI, K; SHARMA, S; SHARMA, M; BEDI, P.M.S; DHAR, K.L. **Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids.** Eur J Med Chem, 77:422-87., 2014.

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. **TH1 cells control themselves by producing interleukin-10.** Nature Rev. Immunol. v.7, p. 425–428, 2007.

OMOTE, L.; HAZAMA, K.; KAWAMATA, M.; NAKAYAKA, Y.; TORIYABE, M.; NAMIKI, A. Peripheral nitric oxide in carrageenan-induced inflammation. Brain Res. 912: 171-175, 2001.

OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; KAWAMATA, T.; NAMIKI, A. Formalin-induced release of excitatory aminoacids in the skin of rat hindpaw. Brain Research, v. 787, p. 161-164, 1998.

OPREA, T.I.; MESTRE, J. **Drug repurposing: far beyond new targets for old drugs.** AAPS J. 14(4), 759–763; 2012.

OPREA, T.I.; NIELSEN, S.K.; URSU, O. **Associating Drugs, Targets and Clinical Outcomes into an Integrated Network Affords a New Platform for ComputerAided Drug Repurposing.** Mol. Inform. 30(2–3), 100–111; 2011.

OPREE, A.; KRESS, M. **Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin.** J Neurosci, v. 20, n. 16, p. 6289-93, 2000.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. **Central modulation of pain.** J Clin Invest, v. 120, n. 11, p. 3779-87, Nov 2010.

ORR, P. M.; SHANK, B. C.; BLACK, A. C. **The Role of Pain Classification Systems in Pain Management.** *Crit Care Nurs Clin North Am*, v. 29, n. 4, p. 407-418, Dec 2017.

PACHER, P., BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 87(1):315-424, 2007.

PASTERNAK, Gavril W.; PAN, Ying-Xian. **Mu opioids and their receptors: evolution of a concept.** *Pharmacological reviews*, v. 65, n. 4, p. 1257-1317, 2013.

PASTERNAK, G.W.; CHILDERS, S.R.; PAN, Y.-X. **Emerging insights into mu opioid pharmacology.** *Handb. Exp. Pharmacol.* v. 258, p. 89–125; 2019.

PATHAN, Hasan; WILLIAMS, John. **Basic opioid pharmacology: an update.** *British Journal of Pain*, v. 6, n. 1, p. 11-16, 2012

PATIDAR, A.; SELVARAJ, S.; SARODE, A.; CHAUHAN, P.; CHATTOPADHYAY, D.; SAHA, B. **DAMP-TLR-cytokine axis dictates the fate of tumor.** *Cytokine*, v. 104, p. 114-123, Apr 2018.

PATTISON, L.A.; CALLEJO, G., JOHN S.E. **Evolution of acid nociception: ion channels and receptors for detecting acid.** *Phil. Trans. Royal Society. B* v.374, n. 20, p.190-291. 2019

PAULSEN, O.; LAIRD, B.; AASS, N.; LEA, T.; FAYERS, P.; KAASA, S.; KLEPSTAD, P. The relationship between pro-inflammatory cytokines and pain, appetite and fatigue in patients with advanced cancer. *PLoS One*, v. 12, n. 5, p. e0177620, 2017.

PENG, Y.; VAN WERSCH, R.; ZHANG, Y. **Convergent and Divergent Signaling in PAMP-Triggered Immunity and Effector-Triggered Immunity.** *Mol Plant Microbe Interact*, v. 31, n. 4, p. 403-409, Apr 2018.

PERAZA, G.G. **Uso de modelos animais para avaliar o potencial antinociceptivo dos produtos de origem natural.** *Vitalle*, v.9, p. 35-44, 2077

PICOLO, G.; CURY, Y. **Peripheral neuronal nitric oxide synthase activity mediates the antinociceptive effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom, a deltaand kappa-opioid receptor agonist.** *Life Sci.* v.75 p. 559–573, 2004

PINHO-RIBEIRO, F. A.; VERRI, W. A., JR.; CHIU, I. M. **Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation.** *Trends Immunol.* v. 38, n. 1, p. 5-19, Jan 2017.

PINTO, W.B.V.R.; KO, G.M. **Teste de rotarod: contribuições no estudo das doenças neuromusculares, das síndromes extrapiramidais e das ataxias cerebelares.** *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*, v.1 n.2, p. 202-212, 2012

POZSGAI, G.; BATAI, I. Z.; PINTER, E. **Effects of sulfide and polysulfides transmitted by direct or signal transduction-mediated activation of TRPA1 channels.** *Br J Pharmacol*, v. 176, n. 4, p. 628-645, Feb 2019.

RAAIJMAKERS, TK, VAN DEN BIJGAART, RJE, SCHEFFER, GJ, ANSERMS, M, ADEMA, GJ. **NSAIDs affect dendritic cell cytokine production.** *PLoS One.* Oct 13;17(10). 2022.

REDDY, S.; ZHANG, S. **Polypharmacology: drug discovery for the future.** *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 6(1), 41-47; 2013.

REGLERO-REAL, N. et al. **Endothelial Cell Junctional Adhesion Molecules: Role and Regulation of Expression in Inflammation.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v. 36, n. 10, p. 2048-2057, Oct 2016.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; THOMAZZI, S.M. PASCHOALATO, A.B.P.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. **Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing noceptive response induced by Zymosan and acetic acid in mice.** *European Journal of Pharmacology*, v. 387, n. 1, p. 111-118, 2000.

RICCIARDOLO, F. L. M.; FOLKERTS, G.; FOLINO, A., MOGNETTI, B. **Bradykinin in asthma: Modulation of airway inflammation and remodelling.** Eur J Pharmacol, v. 827, p. 181-188, May 15 2018.

ROCHA APC, KRAYCHETE DC, LEMONICA L, CARVALHO LR, BARROS GAM, GARCIA JBS, SAKATA RK — **Pain: Current Aspects on Peripheral and Central Sensitization.** Rev Bras Anestesiol Review article 57: 1: 94-105, 2007

RONCHETTI, S.; MIGLIORATI, G.; DELFINO, D. V. **Association of inflammatory mediators with pain perception.** Biomed Pharmacother, v. 96, p. 1445-1452, Dec 2017.

ROSAS-BALLINA, M; OLOFSSON, P.S; OCHANI, M; VALDES-FERRER, S.I; LEVINE, Y.A; REARDON, C; TUSCHE, M.W; PAVLOV, V.A, ANDERSSON, U; CHAVAN, S; MAK, T.W; TRACEY, K.J. **Acetylcoline-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit.** Science 334: 98-101. 2011.

ROSLBERG, H.E.; CARLSSON, K.S.; DAHLIN, L.B. Prospective study of patients with injuries to the hand and forearm: costs, function, and general health. **Scandinavian Journal of Plastic Reconstruction Surgery and Hand Surgery** 39 (6), 360-369, 2005

ROSLAND, JH.; HUNSKAAR, S.; HOLE, L. **Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently in mice.** Pharmacol Toxicol. v.66 n. 5, p.382-386. 1990

RUSSO, M. M.; SUNDARAMURTHI, T. **An Overview of Cancer Pain: Epidemiology and Pathophysiology.** Semin Oncol Nurs, v. 35, n. 3, p. 223-228, Jun 2019.

SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S.; ALLCHORNE, A.; WINTER, J.; WOOLF, C.J. **The contribution of interleukin-1 beta to the inflammationinduced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia.** Br J Pharmacol. 115:1265–75. 1995

SAIJO, Y.; LOO, E. P.; YASUDA, S. **Pattern recognition receptors and signaling in plant-microbe interactions.** Plant J, v. 93, n. 4, p. 592-613, Feb 2018.

SALMON, J. A.; HIGGS, G. A. **Prostaglandins and leukotrienes as inflammatory mediators.** British Medical Bulletin, v. 43, n. 2, p. 285–296, abr. 1987.

SANTOS, G.C.M. FERNANDES, R.D; BARROS, T.R. ABREU, H.S. SUZART L.R., DE CARVALHO, M.G. BRAZ FILHO, R. MARINHO B.G.. **Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of the Methanolic Extract from the Stem Bark of Lopanthera lactescens.** *Planta Medica*, 81: 1688–1696. 2015.

SBED – Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor. 2020 Disponível em: <<http://www.dor.org.br/duvidas-frequentes-2/dor-no-Brasil/>> Acesso em: 06 out. 2021

SCHOLER, D. W; KU, E. C; BOETTCHER, I; SCHWEIZER, A. **Pharmacology of diclofenac sodium.** *The American Journal of Medicine*, 80(4), 34–38, 1986.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. **Mechanism of the inflammatory response.** *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 18(3):385-405, 2004.

SCHOENICHEN, C.; BODE, C.; DUERSCHMIED, D. **Role of platelet serotonin in innate immune cell recruitment.** *Front Biosci (Landmark Ed)*, v. 24, p. 514-526, Jan 1 2019

SETHI, R.; CORONADO, N.G.; WALKER, A.J.; ROBERTSON, O.D.A., AGUSTINI, B.; BERK, M.; DODD, S. **Neurobiology and Therapeutic Potential of Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitors for Inflammation in Neuropsychiatric Disorders.** *Front Psychiatry*, v. 10, p. 605, 2019.

SHEN, J. ABU AMER, Y.; MCALINDEN, O. A. **Inflammation and epigenetic regulation in osteoarthritis.** *Connect Tissue Res*, v. 58, n.1, p. 49-63, Jan 2017.

SHI, G; LIU, Y; LIN, H; YANG, S; FENG, Y; REID, P.F; QIN, Z. **Involvement of cholinergic system in suppression of formalin-induced inflammatory pain by cobra toxin.** *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 32, p. 1233-1238, 2011.

SHIRAZI, L.F.; BISSETT, J.; ROMEO, F.; MEHTA, J.L. **Role of Inflammation in Heart Failure.** *Curr Atheroscler Rep*. 2017

SILVA, C. S.; SARAIVA, S. R. G. L.; JÚNIOR, R. G. O; ALMEIDA, J. R. G. S.; **Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão.** Rev. Bras. Farm. 94 (1): 18-23, 2013

SIMPSON, M.R.; MASHETER, H.C. **New drugs. 8. Flufenamic acid in rheumatoid arthritis. Comparison with aspirin and the results of extended treatment.** Ann. Phys. Med. 8(6), 208–213; 1966.

SMITH, W.L.; DEWITT, D.L. **Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2.** Adv Immunol, v.62 p.167-215, 1996.

SLUKA, K. A.; WILLIS, W. D. Increased spinal release of excitatory aminoacids following intradermal injection of capsaicin is reduced by a protein kinase G inhibitor. Brain Research, v. 798, p. 281-286, 1998.

SNEDDON, L.U.; ELWOOD, R.W.; ADAMO, S.; LEACH, M.C. **Defining and assessing pain in animals.** Anim. Behav. v.97, p. 201–212. 2014

SNYDER, Solomon H.; PASTERNAK, Gavril W. **Historical review: opioid receptors.** Trends in pharmacological sciences, v. 24, n. 4, p. 198-205, 2003.

SOARES, A.C.; Duarte, I.D. **Dibutyryl-cyclic GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K(+) channels in the rat PGE2-induced hyperalgesic paw,** Br. J. Pharmacol. v.134, p.127–13; 2001

SOARES, A.C.; LEITE, R.; TATSUO, M.A. DUARTE, I.D. **Activation of ATP-sensitive K(+) channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside,** Eur. J. Pharmacol. v.400 p.67–71; 2000.

SOLOMON, D.H.; SCHNEEWEISS, R.J.; GLYNN, Y.; KIYOTA, R.; LEVIN, H.; MOGUN, J. **Relationship between selective cyclooxygenase- 2 inhibitors and acute myocardial infarction in older adults.** Circulation, v. 109 p. 2068-2073, 2004.

SOMMER, C. **Serotonin in Pain and Analgesia - Actions in the Periphery.** Molecular Neurobiology, v. 30, p. 117-125, 2004.

SOMMER, C; WHITE, F. **Cytokines, Chemokines, and Pain.** Pharmacology of Pain. 1st Ed, Seattle, IASP Press,;279-302, 2010.

STEFANO, G.B; SCHARRER, B; SMITH, E.M; HUGHES, T.K.J; MAGAZINE, H.I; BILFINGER, T.V; HARTMAN, A. R; FRICCHIONE, G.I; LIU, Y; MAKMAN, M.H. **Opioid and opiate immunoregulatory processes.** Crit. Rev. Immunol. 37 (2-6): 213-248. 2017.

STEIN, C.; CLARK, J.D.; VASKO, M.R.; WILCOX, G.L.; OVERLAND, A.C.; VANDERAH, T.W.; SPENCER, R.H. **Peripheral mechanisms of pain and analgesia.** Brain Res Rev. 2009 Apr;60(1):90-113, 2009.

STEIN C. **Opioid Receptors.** Annu Rev Med;67:433-51, 2016.

SU, J. B. **Role of Bradykinin in the Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression by Cardiovascular Drugs.** Curr Pharm Des, v. 23, n. 40, p. 6215-6222, 2017.

SUVAS, S. **Role of Substance P Neuropeptide in Inflammation, Wound Healing, and Tissue**

Homeostasis. J Immunol, v. 199, n. 5, p. 1543-1552, Sep 1 2017.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. **IL-6 in inflammation, immunity, and disease.** Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 6, 2014

THOMPSON, J. M.; NEUGEBAUER, V. **Cortico-limbic pain mechanisms.** Neurosci Lett, v. 702, p. 15-23, May 29 2019.

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

TODA, N.; KISHIOKA, S.; HATANO, Y.; TODA, H. **Modulation of opioid actions by nitric oxide signaling.** *Anesthesiology* v.110 p.166–181, 2009.

THOMAZZI, S. M.; SILVA, C. B.; SILVEIRA, D. C. R.; VASCONCELLOS, C. L. C.; LIRA, A. F.; CAMBUI, E. V. F.; ESTEVAM, C. S.; ANTONIOLLI, A. R. **Antinociceptive and anti-inflammatory activities of Bowdichia virgilioides (sucupira).** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 127, p. 451 - 456, 2010.

TRAYES, K. P. et al. **Edema: diagnosis and management.** *Am Fam Physician*, v. 88, n. 2, p. 102-10, Jul 15 2013.

TSANTOULAS, C.; McMAHON, S.B.; **Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain.** *Trends Neurosci.* 37(3):146–58, 2014

TSUGE, K., INAZUME, T., SHIMAMOTO, A.; SUGIMOTO, Y. **Molecular mechanisms underlying prostaglandin E2-exacerbated inflammation and immune diseases.** *Int Immunol*, v. 31, n. 9, p. 597-606, Aug 23 2019

VARELA, M. L.; MOGILDEA, M.; MORENO, I.; LOPES, A. **Acute Inflammation and Metabolism.** *Inflammation*, v. 41, n. 4, p. 1115-1127, Aug 2018.

VERRI, W.A; CUNHA, T.M; PARADA, C.A; POOLE, S; CUNHA, F.Q; FERREIRA, S.H. **Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development?** *Pharmacol Ther.* :116-38, 2006.

VIEIRA, J. S. et al. **Analgesic Effects Elicited by Neuroactive Mediators Injected into the ST Acupuncture Point on Inflammatory and Neuropathic Pain in Mice.** *J Acupunct Meridian Stud*, v. 11, n. 5, p. 280-289, Oct 2018. 36

WALTERS, E.T.; WILLIAMS, A.C. de C. **Evolution of mechanisms and behaviour important for pain.** *Phil. The Royal Society. B* 374: 20190275. 2019

WANG, T. et al. **Arachidonic Acid Metabolism and Kidney Inflammation.** *Int J Mol Sci*, v. 20, n. 15, Jul 27 2019.

WATKINS, L.R.; HUTCHINSON, M.R.; JOHNSTON, I.N.; MAIER, S.F.; **Glia: novel counter-regulators of opioid analgesia.** Trends Neurosci; v. 28 p. 661–9. 2005

WATKINS, L.R.; HUTCHINSON, M.R.; LEDEBOER, A.; WIESELER-FRANK, J.; MILLIGAN, E.D.; MAIER, S.F. **Norman Cousins Lecture. Glia as the “bad guys”: implications for improving clinical pain control and the clinical utility of opioids.** Brain Behav Immun, v. 21 p.131–46. 2007

WITKAMP, R.; MONSHOUWER, M. **Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review.** Vet Q. 22(1):11-6, 2000.

WOLF, G.; GABAY, E.; TAL, M.; YIRMIJA, R.; SHAVIT, Y. **Genetic impairment of interleukin-1 signaling attenuates neuropathic pain, autotomy, and spontaneous ectopic neuronal activity, following nerve injury in mice.** Pain. v. 120 p. 315–324, 2006.

WOOLF CJ, MANNION RJ. **Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management.** Lancet v. 353 p. 1959–64. 1999.

WU, H.; DENNA, T.H.; STORKERSEN, N. J., GERRIETS, V.A. **Beyond a neurotransmitter: The role of serotonin in inflammation and immunity.** Pharmacol Research, v. 140, p. 100-114, Feb 2019.

XIE, L.; KINNINGS, S.L.; BOURNE, P.E. **Novel computational approaches to polypharmacology as a means to define responses to individual drugs.** Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 52, 361–379; 2012.

XU, J.; KUNHUA, W.; GUOJUN, Z.; LUJING, L.; DAEWEI, Y.; WENLE, W.; QIHENG, H.; YUAN, X.; YAQIONG, B.; MIN, Y.; MINHUI, L. **Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of Chinese *Salvia* species: A review.** J Ethnopharmacol, v. 225, p. 18-30, Oct 28 2018.

YAM, M. F.; LOH, Y. C.; TAN, C. S.; ADAM, S. K.; MANAN, N. A.; BASIR, R. **General Pathways of Pain Sensation and the Major Neurotransmitters Involved in Pain Regulation.** *Int J Mol Sci*, v. 19, n. 8, Jul 24 2018.

YANG, X. et al. **Structural Biology of NOD-Like Receptors.** *Adv Exp Med Biol*, v. 1172, p. 119-141, 2019.

YAXLEY, J.; LITFIN, T. **Non-steroidal anti-inflammatories and the development of analgesic nephropathy: a systematic review.** *Ren Fail*, v. 38, n. 9, p. 1328-1334, Oct 2016.

ZAIN, M.; BONIN, R. P. **Alterations in evoked and spontaneous activity of dorsal horn wide dynamic range neurons in pathological pain: a systematic review and analysis.** *Pain*, v. 160, n. 10, p. 2199-2209, Oct 2019.

ZHANG, J.M, AN, J. **Cytokines, inflammation, and pain.** *Int Anesthesiol Clin*, 45:27, 37, 2007.

ZHANG, Q.; LENARDO, M. J.; BALTIMORE, D. **30 Years of NF-kappaB: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology.** *Cell*, v. 168, n. 1-2, p. 37-57, Jan 12 2017.

ZHENG, B.X.; MALIK, A.; XIONG, M.; BEKKER, A.; XIANG TAO, Y. **Nerve trauma-caused downregulation of opioid receptors in primary afferent neurons: Molecular mechanisms and potential managements.** *Experimental Neurology*, 337, 113-572, 2021.

ZHU, Z. Z.; MA, K. J.; RAN, X.; ZHANG, H.; ZHENG, C. J.; HAN, T.; ZHANG, Q. Y.; QIN, L. P. **Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the petroleum ether fraction from the ethanol extract of Desmodium podocarpum.** *Journal of Ethnopharmacology*. v. 133, n. 3, p. 1126 – 1131, 2011.

ZUARDI, L. R. **Concentrações salivares, sanguíneas e plasmáticas de óxido nítrico em pacientes com doença periodontal antes e depois do tratamento periodontal não cirúrgico.** Ribeirão Preto/USP, Dissertação de mestrado, 2012.

