

UFRRJ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

FARMACOLOGIA

DISSERTAÇÃO

AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DAS ATIVIDADES  
ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO COMPOSTO  
(±)-4-CLORO-6-(NAFTALENO-1-IL)-TETRAHIDRO-2H-PIRANO-2-  
IL-METANOL

Gabriela Mastrangelo Gonçalves

2016



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

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DAS ATIVIDADES**  
**ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO COMPOSTO**  
**(±)-4-CLORO-6-(NAFTALENO-1-IL)-TETRAHIDRO-2H-PIRANO-2-IL-**  
**METANOL**

**GABRIELA MASTRANGELO GONÇALVES**

*Sob a orientação do Professor*

**Bruno Guimarães Marinho**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra em Ciências Fisiológicas**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Área de Concentração em Farmacologia

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2016

615

G635a

Gonçalves, Gabriela Mastrangelo, 1989-

T

Avaliação farmacológica das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol / Gabriela Mastrangelo Gonçalves. - 2016.

75 f.: il.

Orientador: Bruno Guimarães Marinho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2016.

Bibliografia: f. 54-63.

1. Farmacologia - Teses. 2. Dor - Tratamento - Teses. 3. Agentes anti-inflamatórios - Teses. 4. Animais de laboratório - Teses. I. Marinho, Bruno Guimarães, 1978- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

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

**GABRIELA MASTRANGELO GONÇALVES**

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 23/02/2016

---

Prof. Dr. Bruno Guimarães Marinho. UFRRJ

(Orientador)

---

Prof. Dr. Wellington da Silva Cortes. UFRRJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Eline Matheus. UFRJ

## AGRADECIMENTOS

O mais complexo em produzir uma página de agradecimentos, após dois anos de intensas atividades como mestranda, está exatamente na dimensão da folha de papel. Uma página é muito pouco para colocar tudo o que se poderia dizer em agradecimento a todas as pessoas que participaram desse processo.

Quero agradecer primeiramente ao meu orientador (que se tornou um amigo), Bruno Guimarães Marinho. Ele foi meu primeiro contato com a área de pesquisa. Com toda sua paciência e dedicação, fez toda a diferença na minha vida acadêmica. Por ele ter me incentivado desde o começo e ter insistido para eu ingressar no mestrado. Por todas as horas de trabalho e conversas, por todo o apoio que recebi na minha vida profissional até aqui. A sua presença foi essencial para eu concluir esta etapa tão importante para mim.

À minha família, meus pais Silene e Valdir, meu irmão Guilherme e minha avó Helena. Sei que vocês se orgulham por eu ter atingido uma etapa que nenhum outro de nós tinha atingido antes. Mas este orgulho que sentem por mim, converto numa obrigação de a cada dia ser mais digna de representá-los. Obrigada por vocês existirem e depositarem em mim a confiança em todos os momentos.

À todos os amigos que foram presentes durante esta dissertação. Em especial à minha colega de laboratório e amiga Poliana. À minha amiga irmã Luiza, pela amizade de 25 anos, que seria impossível descrever em palavras tudo o que sinto por ela, mas fica aqui o meu eterno agradecimento.

E ao Gustavo, que por vezes deve ter detestado a mim e a este trabalho, pois ele sacrificou muitos momentos que poderíamos ter desfrutado juntos, mas sempre incentivou, apoiou e me cobrou para que eu continuasse e concluísse mais esta etapa de nossas vidas que vamos construindo juntos. Obrigada por existir e ter cruzado o meu caminho. Te amo muito.

Por fim, todos os que realizam um trabalho de pesquisa sabem que não o fazem sozinhos, embora seja solitário o ato da leitura e escrita. O resultado de nossos estudos é possível apenas pela cooperação e pelo esforço de muitas outras pessoas. Quero deixar expresso aqui toda a minha gratidão por todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

## RESUMO

GONÇALVES, Gabriela Mastrangelo. **Avaliação farmacológica das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol**. 2016. 63p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas, Farmacologia). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Diversos fármacos de uso corrente foram descobertos durante ensaios experimentais e mediante a observação em animais. Quando um novo composto parece promissor, geralmente este sofre alterações em sua estrutura química a fim de aperfeiçoar a sua seletividade, potência e eficácia terapêutica. O objetivo deste estudo foi avaliar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de um novo composto sintético ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) preparado a partir de um protótipo anterior, ácido ( $\pm$ )-cis-(6-etil-tetrahidropirano-2-il) fórmico. O composto CTHP foi avaliado em ensaios de indução de dor aguda. A administração oral do composto foi capaz de induzir atividade antinociceptiva nos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, formalina (em ambas as fases) e retirada da cauda. Para elucidação do mecanismo de ação do composto, o modelo de retirada de cauda foi utilizado. Neste modelo foi realizada a administração prévia de naloxona (antagonista opioide não-seletivo), em que foi observada a inibição do efeito produzido pelo composto. Assim, foi então avaliada a participação seletiva de receptores opioides ( $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ ), através de administração prévia de metilnaltrexona, naltrindol e nor-binaltorfimina, respectivamente, onde somente a nor-binaltorfimina foi capaz de reduzir o efeito antinociceptivo do composto. Para avaliar a possível participação da via NO/GMPc/KATP, os animais foram pré-tratados com N-nitro-arginina-L-metil éster (L-NAME), 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalina-1-ona (ODQ) (inibidor da guanilato ciclase sensível ao óxido nítrico) e glibenclamida (bloqueador de canais de potássio regulados por ATP), foi observado redução do efeito antinociceptivo com a administração prévia de todos estes. No teste de indução de tolerância, tanto a morfina quanto o composto desenvolveram tolerância, porém o composto de forma mais lenta e houve desenvolvimento de tolerância cruzada com a morfina. Para avaliar o envolvimento da via serotoninérgica na atividade do composto, foi realizada a administração diária por 3 dias de 4-cloro-DL-fenilalanina (inibidor da enzima triptofano hidroxilase). Nenhuma alteração no efeito antinociceptivo do composto foi observado, no que diz respeito ao envolvimento da via serotoninérgica. Já o modelo de campo aberto foi utilizado para avaliar a possibilidade de interferência da performance motora sobre o efeito antinociceptivo, foi demonstrada ausência desta interferência. Quanto à atividade anti-inflamatória, o resultado no teste de edema de pata indica efeito antiedematogênico do composto. Houve uma diminuição na quantidade de leucócitos totais, indicando que o composto foi capaz de reduzir a migração leucocitária na inflamação existente na bolsa de ar subcutâneo. O composto também demonstrou atividade inibitória sobre a produção de TNF- $\alpha$  e inibição seletiva da enzima COX-2. Esses resultados indicam atividade antinociceptiva significativa do composto, sem evidências de comprometimento motor. O composto CTHP demonstrou efeito antinociceptivo central, tendo este último contribuição dos sistemas opioide (seletivo para receptores do tipo  $\kappa$ ) e nitrérgico em seu mecanismo de ação. E ainda, atividade anti-inflamatória, com inibição da migração leucocitária, de TNF- $\alpha$  e atividade inibitória seletiva sobre COX-2.

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

## ABSTRACT

GONÇALVES, Gabriela Mastrangelo. **Antinociceptive and anti-inflammatory profile of (±)-4-chloro-6-(naphthalen-1-yl)-tetrahydro-2H-pyran-2-yl-methanol.** 2016. 63p. Dissertation (Master of Physiological Sciences, Pharmacology). Institute of Biological Sciences and Health, Department of Physiological Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Several drugs in current use were discovered during experimental tests and by observing animals. When a new compound looks promising, it usually undergoes changes in its chemical structure in order to perfect its selectivity, potency and therapeutic efficacy. The aim of this study was to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory activities of a new synthetic hybrid compound (±)-4-chloro-6-(naphthalen-1-yl)-tetrahydro-2H-pyran-2-yl-methanol (CTHP) prepared from a previous prototype acid, (±) - cis- (6-ethyl-tetrahydropyran-2-yl) Formic. The compound CTHP was evaluated in acute pain induction assays. Oral administration of the compound was able to induce antinociceptive activity in models of writhing induced by acetic acid, formalin (both stages) and tail flick. To elucidate the mechanism of action of the compound, the tail flick model was used. This model was performed by prior administration of naloxone (opioid antagonist non-selective), where we observed the inhibition of the effect produced by the compound. The selective involvement of opioid receptors ( $\mu$ ,  $\delta$  and  $\kappa$ ) was then evaluated by prior administration of methylnaltrexone, naltrindol, and nor-binaltorphimine, respectively, where only nor-binaltorphimine was able to reduce the analgesic effect of the compound. To evaluate the possible role of the NO/cGMP/KATP, animals were pretreated with N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), 1H- [1,2,4 ] oxadiazolo [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ) (inhibitor of guanylate cyclase sensitive to nitric oxide), and glibenclamide (blocker of the ATP-regulated potassium channels), where reduction was observed with the administration of analgesic effect prior to all of these. In the tolerance induction test, both morphine and compound developed tolerance, however the compound performed at a slower rate and developed cross-tolerance with morphine. To assess the involvement of serotonin pathway in the activity of the compound, daily administration for 3 days of 4-chloro-DL-phenylalanine (inhibitor of the enzyme tryptophan hydroxylase) was performed. No changes in the analgesic effect of the compound were noted, with regard to the involvement of serotonin pathway. The open field model was used to assess the possibility of interference from motor performance on the analgesic effect, which demonstrated absence of this interference. As for anti-inflammatory activity results in paw edema test indicate anti-oedematogenic effect of compound. There was a decrease in the number of total leukocytes, indicating that the compound was able to reduce existing inflammation in leukocyte migration in the air pouch model. The compound also demonstrated an inhibitory activity on TNF- $\alpha$  production and selective inhibition of COX-2 enzyme. These results indicate significant antinociceptive activity of the compound without evidence of motor impairment. The compound CTHP showed central analgesic effect, which has contribution of opioid systems (selective for the  $\kappa$ -like receptors) and nitrenergic in its mechanism of action. It has also showed an anti-inflammatory activity, with inhibition of leukocyte migration, TNF- $\alpha$  production and selective inhibitory activity on COX-2.

Keywords: opioid system, leukocyte migration, nociception.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2H-pirano-2-il-metanol (CTHP) .....	1
Figura 2 - Mecanismo de Hiperálgia Inflamatória .....	4
Figura 3 - Respostas desencadeadas pelo processo inflamatório .....	6
Figura 4 - Protocolo do modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	15
Figura 5 - Protocolo do modelo da formalina.....	16
Figura 6 - Protocolo do modelo de retirada da cauda.....	16
Figura 7 - Protocolo das aplicações diárias na indução de tolerância .....	17
Figura 8 - Protocolo do modelo de edema de pata .....	18
Figura 9 - Protocolo do modelo de bolsa de ar subcutânea .....	18
Figura 10 - Curva Padrão de Prostaglandina utilizada para avaliação da atividade enzimática de COX-1 e COX-2.....	19
Figura 11 - Efeito antinociceptivo do composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2H-pirano-2-il-metanol (CTHP) (1, 5, 10 e 30 mg/kg), veículo (veículo e ácido acético) e morfina (5,01 mg/kg) no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.. ..	21
Figura 12 - Efeito antinociceptivo do composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) (1, 5, 10 e 30 mg/kg), veículo (veículo e formalina) e morfina (5,01 mg/kg) no modelo de formalina. ....	22
Figura 13 - Efeito antinociceptivo do composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) no modelo de retirada da cauda. ....	23
Figura 14 - Influência da administração prévia de naloxona sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) no modelo de retirada da cauda.. ..	25
Figura 15 - Influência da administração prévia de naltrindol sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) no modelo de retirada da cauda. ....	27
Figura 16 - Influência da administração prévia de nor-Binaltorfimina sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) no modelo de retirada da cauda.....	29



Figura 17 - Influência da administração prévia de metilnaltrexona sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto (±)-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) no modelo de retirada da cauda.....	31
Figura 18 - Desenvolvimento de tolerância e tolerância cruzada induzida pelo composto (±)-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) no modelo de retirada da cauda.....	32
Figura 19 - Influência da administração prévia de N-nitro-arginina-L-metil éster (L-NAME) sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto (±)-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) no modelo de retirada da cauda.....	34
Figura 20 - Influência da administração prévia de 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto (±)-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) no modelo de retirada da cauda.....	36
Figura 21 - Influência da administração prévia de glibenclamida sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto (±)-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) no modelo de retirada da cauda. ....	38
Figura 22 - Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito do composto (±)-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP).....	39
Figura 23 - Avaliação do composto (±)-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) no modelo de campo aberto.....	40
Figura 24 - Efeito do composto (±)-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) no teste de edema de pata.....	41
Figura 25 - Efeito do composto (±)-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) na quantificação de leucócitos totais a partir do teste bolsa de ar subcutâneo.....	42
Figura 26 - Efeito do composto (±)-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) na quantificação de citocinas a partir do teste bolsa de ar subcutâneo.....	43
Figura 27 - Efeito de concentrações crescentes do composto (±)-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) sobre a atividade enzimática de COX-1 e COX-2.....	45
Figura 28 - Proposta do mecanismo de ação do composto CTHP .....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Subtipos das Fibras Nervosas A $\delta$ e C (ROCHA e cols., 2007).....	3
Tabela 2 - Locais de expressão dos receptores opioides (LESNIAK e LIPKOWSKI, 2011)..	10
Tabela 3 - Influência de concentrações crescentes do composto sobre a atividade das enzimas COX-1 e COX-2 através do método de imunensaio enzimático.....	44

## LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

A $\delta$ : fibra nervosa do tipo A-delta  
5HT: 5-hidroxitriptamina (serotonina)  
5HT1A: receptor de 5-hidroxitriptamina 1A  
5HT2: receptor de 5-hidroxitriptamina 2  
5HT3: receptor de 5-hidroxitriptamina 3  
AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato  
AMPc: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico  
ANOVA: análise de Variância  
ASC: rea sob a curva  
ATP: adenosina trifosfato  
B1: receptores de bradicinina tipo 1  
B2: receptores de bradicinina tipo 2  
C: fibra nervosa do tipo C  
Ca<sup>++</sup>: cálcio  
CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina  
cm: centímetro  
COX: cicloxigenase  
COX-1: cicloxigenase 1  
COX-2: cicloxigenase 2  
CTHP: composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol  
DbcGMP: 3':5' monofosfato de dibutililguanosina - cíclica  
DE50: dose responsável por 50% do efeito máximo  
e-NOS: xido nítrico sintase endotelial  
EPM: erro padrão da média  
g: gramas  
GDP: guanosina difosfato  
Gi: proteína G inibitória  
GMPC: guanosina mono-fosfato cíclico  
GTP: guanosina trifosfato  
IASP: Associao Internacional para o Estudo da Dor  
ICAM-1: intercellular adhesion molecule 1  
IgE: imunoglobulina E  
IL-1: interleucina 1  
IL-1 $\beta$ : interleucina 1-beta  
i-NOS: xido nítrico sintase induzível  
ip: intraperitoneal  
IS: ndice de seletividade  
K<sup>+</sup>: potássio  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: fosfato de potássio monobásico  
LB: linha de base  
L-NAME: N-nitro-arginina-L-metil ster  
LT: leucotrienos  
LTB<sub>4</sub>: leucotrieno B<sub>4</sub>  
LTC<sub>4</sub>: leucotrieno C<sub>4</sub>  
LTD<sub>4</sub>: leucotrieno D<sub>4</sub>  
M: morfina

m/s: metros por segundo  
mg/kg: miligrama por quilo  
mg: miligrama  
min: minuto(s)  
mL/kg: mililitro por quilo  
mL: mililitro  
mM: milimol  
Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: fosfato dissódico  
NaCl: cloreto de sódio  
NGF: fator de crescimento do nervo  
NK: células natural killer  
NMDA: N-metil-D-aspartato  
n-NOS: óxido nítrico sintase neuronal  
NO: óxido nítrico  
NOS: óxido nítrico sintase  
NTS: núcleo do trato solitário  
ODQ: -[1,2,4]Oxadiazol[4,3-a]quinoxalina-1-ona  
P2X<sub>3</sub>: subtipo de receptor purinérgico específico  
PCPA: 4-cloro-DL-fenilalanina  
PD: pata direita  
PE: pata esquerda  
PENK: proencefalina  
pg/mL: prostaglandina por mililitro  
PGD<sub>2</sub>: prostaglandina D<sub>2</sub>  
PGE<sub>2</sub>: prostaglandina E<sub>2</sub>  
PGI<sub>2</sub>: prostaciclina  
PKG: proteína quinase G  
POMC: proopiomelanocortina  
s.c: subcutâneo  
SBED: Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor  
SIN-1: doador de óxido nítrico 3- morfolinosidnoimina  
SIOM : 7- spiroindanyloxymorphone  
TL: tempos de latência  
TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa  
TR: tempo de reação  
TRPA1: receptor de potencial transitório A1  
TXA<sub>2</sub>: tromboxano  
UI: unidade internacional  
V: veículo  
v/v: volume por volume  
VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1  
vo: via oral  
VR1: receptor vanilóide tipo 1  
 $\mu$ L: microlitros

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	2
2.1	Nocicepção e dor .....	2
2.2	Processo inflamatório .....	5
2.3	Óxido nítrico .....	8
2.4	Opioides .....	9
3	OBJETIVOS.....	12
3.1	Objetivos Gerais .....	12
3.2	Objetivos Específicos .....	12
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	13
4.1	Animais.....	13
4.2	Reagentes .....	13
4.3	Administração dos fármacos.....	13
4.4	Tratamentos .....	13
4.5	Modelos experimentais .....	15
4.5.1	Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético .....	15
4.5.2	Teste da formalina.....	15
4.5.3	Modelo de retirada da cauda .....	16
4.5.4	Indução de tolerância .....	17
4.5.5	Modelo de campo aberto .....	17
4.5.6	Modelo de edema de pata.....	17
4.5.7	Modelo da bolsa de ar subcutâneo (air pouch).....	18
4.5.8	Quantificação de citocinas .....	19
4.5.9	Avaliação da atividade enzimática de COX-1 e COX-2.....	19
4.5.10	Avaliação toxicológica aguda <i>in vivo</i> .....	20
4.6	Análise estatística .....	20
5	RESULTADOS .....	21

5.1	Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	21
5.2	Teste da formalina .....	21
5.3	Modelo de retirada da cauda.....	22
5.3.1	Avaliação do sistema opioide sobre o efeito antinociceptivo do composto (±)-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol no modelo de retirada da cauda .....	24
5.4	Indução de tolerância .....	32
5.5	Avaliação da via NO/GMP <sub>c</sub> /K <sub>ATP</sub> sobre o efeito antinociceptivo do composto (±)-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol no modelo de retirada da cauda. ....	33
5.6	Avaliação da via serotoninérgica sobre o efeito antinociceptivo do composto (±)-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol no modelo de retirada da cauda. ....	39
5.7	Modelo de campo aberto.....	39
5.8	Modelo de edema de pata .....	40
5.9	Modelo da bolsa de ar subcutâneo (air pouch) .....	42
5.10	Quantificação de citocinas .....	42
5.11	Avaliação da atividade enzimática de COX-1 e COX-2 .....	44
5.12	Avaliação toxicológica aguda <i>in vivo</i> . ....	46
6	DISCUSSÃO.....	47
7	CONCLUSÕES.....	53
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

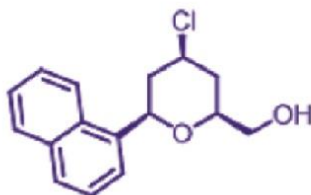
## 1 INTRODUÇÃO

A dor é uma experiência sensorial, com tonalidade afetiva desagradável, constituindo um dos componentes essenciais do sistema de defesa do organismo. Fornece um rápido aviso ao sistema nervoso para iniciar uma resposta motora e minimizar os possíveis danos. Nos animais analisa-se a nocicepção, definida como “processo neural de decodificação e processamento do estímulo nocivo”, a qual não envolve cognição.

A inflamação é um processo complexo frequentemente associado à nocicepção e é resultante da interação entre o tecido danificado e os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos, através da presença de mediadores inflamatórios, como a bradicinina, prostaglandinas e óxido nítrico. Estes atuam em determinados receptores e, através de vias de sinalização intracelular, levam ao desenvolvimento da sensibilização neuronal.

A identificação de compostos capazes de combater a dor e a inflamação com efeitos adversos limitados é um objetivo proeminente na pesquisa biomédica. Embora sejam comprovadamente eficazes, os fármacos analgésicos mais utilizados, como os opioides e os anti-inflamatórios não esteroidais, geralmente não estão dissociados de efeitos adversos importantes, tais como depressão respiratória, irritação gástrica, sedação e constipação intestinal. Com isso, tem-se a necessidade de buscar medidas alternativas para o desenvolvimento de novos medicamentos analgésicos e anti-inflamatórios. A pesquisa para obtenção de novas substâncias com fins terapêuticos pode ser realizada através de modificações na estrutura química de determinado composto, para que sua potência (quantidade de fármaco necessária para produzir um efeito) e eficácia terapêutica (resposta terapêutica máxima potencial que um fármaco pode produzir) sejam aperfeiçoadas, além de diminuição dos efeitos adversos.

Na contínua busca por novos fármacos analgésicos obteve-se o composto ácido (+)-cis-(6-etil-tetrahidropirano-2-il)-fórmico, que apresentou importantes propriedades antinociceptivas (MARINHO e cols., 2006). A partir deste, alterações químicas foram propostas para o desenvolvimento de análogos com a finalidade de obter moléculas com melhor perfil de atividade e menos efeitos adversos. Sendo assim, obtiveram-se 10 novas moléculas derivadas do ácido (+)-cis-(6-etil-tetrahidropirano-2-il)-fórmico (CAPIM e cols., 2012), e destas o composto (±)-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahidro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) se apresentou como sendo o mais promissor (Figura 1). O composto CTHP foi fornecido pelo grupo do Professor Doutor Mário Luiz Araujo de Almeida Vasconcellos do Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Paraíba da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Neste contexto, entende-se a relevância do desenvolvimento de pesquisas que investiguem o potencial terapêutico de novos compostos, a fim de otimizar a resposta farmacológica no controle da dor e no tratamento de doenças inflamatórias.



**Figura 1 - Estrutura química do composto (±)-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahidro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP)**

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Nociceção e dor

Em 2008, a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) realizou modificações nas terminologias empregadas no estudo da dor. Por definição, dor é “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial ou descrito em termos de tais danos” (LOESER E TREEDE, 2008). A versão de 2008 incluiu ainda outros termos fisiológicos importantes, como nociceção, sendo definida como “o processo neural de decodificação e processamento do estímulo nocivo”. Essa versão de 2008 alertou também que é importante a distinção entre os termos nociceção e dor, sendo a dor um fenômeno subjetivo, ao passo que nociceção é objeto da fisiologia sensorial.

A nociceção pode ser mensurada através de experimentos realizados com metodologias específicas, nos quais os animais apresentam reações comportamentais compatíveis com a sensação de dor, mimetizando os mecanismos de condições clínicas características. Medidas de comportamentos reflexivos, como limiares de retirada de estímulos nocivos têm sido utilizadas há décadas para examinar mecanismos da nociceção. Estes modelos animais têm sido claramente úteis em avançar nossa compreensão da base fisiológica da dor, a identificação dos neurotransmissores, receptores mensageiros intracelulares, e genes envolvidos nesse processo. Além disso, ao longo das últimas décadas, a ação farmacológica (por exemplo, eficácia, potência, duração da ação) de um amplo espectro de analgésicos para reduzir respostas sensoriais reflexivas em modelos animais de nociceção aguda e dor crônica demonstrou consistente correspondência para analgesia em humanos (GREGORY e cols., 2013).

De acordo com a Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED), considerando a duração de sua ação, a dor pode ser classificada como aguda (aquela que se manifesta transitoriamente durante um período relativamente curto, de minutos a algumas semanas, associada a lesões em tecidos ou órgãos, ocasionadas por inflamação, infecção, traumatismo ou outras causas), ou crônica (tem duração prolongada, que pode se estender de vários meses a vários anos e que está quase sempre associada a um processo de doença crônica). A dor crônica também pode ser consequência de uma lesão já previamente tratada e recorrente (apresenta períodos de curta duração que, no entanto, se repetem com frequência, podendo ocorrer durante toda a vida do indivíduo, mesmo sem estar associada a um processo específico). Um exemplo clássico deste tipo de dor é a enxaqueca.

Em relação à localização do processo doloroso, pode-se classificar a dor como somática (os estímulos que geram a sensação dolorosa são oriundos da periferia do organismo) ou visceral (quando os estímulos referentes à dor são provenientes dos órgãos internos) (RAJA e cols., 1999).

A classificação pode ser também de acordo com a origem da estimulação do processo de dor, como a dor nociceptiva (desencadeada pela estimulação dos nociceptores localizados em várias partes do organismo), neurogênica (dano tecidual neuronal nos Sistemas Nervosos Periférico ou Central), neuropática (disfunção de nervos) e psicogênica (possivelmente desencadeada por fatores psicológicos) (MILLAN e cols., 1999).

A duração e intensidade do estímulo nocivo inicial leva a sensibilização tanto periférica quanto central, que sinergicamente exacerba a percepção da dor (VOSCOPOULOS E LEMA, 2010).



O conhecimento da fisiologia, fisiopatologia e neuroanatomia das vias de condução da dor são de extrema importância, já que esse estudo facilita o avanço nas pesquisas relacionadas a novos tipos de tratamento. A partir de um estímulo nocivo, ocorrem potenciais de ação que, das fibras nervosas periféricas, são transferidos para o sistema nervoso central (VOSCOPOULOS E LEMA, 2010).

Os nociceptores (receptores específicos para a dor) estão localizados nas terminações das fibras nervosas A $\delta$  e C (Tabela 1) e são capazes de traduzir um estímulo agressivo em estímulo elétrico que será transmitido até o sistema nervoso central e interpretado no córtex cerebral como dor. (ROCHA e cols., 2007).

**Tabela 1 – Subtipos das Fibras Nervosas A $\delta$  e C (ROCHA e cols., 2007)**

Tipo de fibra	Características
Fibras A $\delta$ tipo I	Respondem a temperatura em torno de 52°C, são insensíveis a capsaicina e possuem resposta mediada pelos receptores VR1 (receptor vanilóide tipo 1)
Fibras A $\delta$ tipo II	São sensíveis a temperatura em torno de 43°C, a capsaicina e ativam, via receptores VR1, canais catiônicos não seletivos permeáveis ao cálcio
Fibras C tipo I	Contêm substância P e CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) e expressam receptores tirosinase A, para o fator de crescimento nervoso. São responsivas a capsaicina e a prótons
Fibras C tipo II	Expressam receptores purinérgicos P2X3 para adenosina e um grupo de carboidratos de superfície, a $\alpha$ -D-galactose, capaz de se ligar a lecitina IB-4, sensíveis seletivamente a prótons

Quatro classes de nociceptores foram descritos: mecânicos, térmicos, polimodais e silenciosos. Os nociceptores mecânicos respondem à pressão intensa, os térmicos respondem às temperaturas extremas, quentes (> 45 °C) ou frios (< 5 °C). Ambos (mecânicos e térmicos) possuem fibras A mielinizadas, que conduzem impulsos na velocidade de 3 m/s a 40 m/s. Em conjunto, esses nociceptores de fibra A $\delta$ , são denominados nociceptores mecanotérmicos; já os polimodais respondem aos estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos; e possuem pequenas fibras C amielinizadas que conduzem impulsos em velocidade menor que 3 m/s. E ainda, nociceptores silenciosos (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).

A ativação periférica destes nociceptores (transdução) é modulada pela ação de diversas substâncias químicas que são produzidas ou liberadas quando existe algum tipo de lesão. Alguns exemplos dessas substâncias são: acetilcolina, bradicinina, histamina, serotonina, substância P, prostaglandinas, interleucinas e fator de crescimento do nervo (NGF). (ROCHA e cols., 2007).

O principal neurotransmissor excitatório em todos os nociceptores é o glutamato, embora as fibras sejam também sensibilizadas por outras substâncias químicas

endógenas liberadas no ambiente tecidual em condições anormais (SILVA e cols., 2013).

Os receptores ionotrópicos de glutamato (NMDA - N-metil-D-aspartato, AMPA -  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato e cainatos) estão presentes em neurônios primários aferentes, e o glutamato está presente em uma alta concentração no citosol (CARLTON e cols., 1995). A injeção de agonistas de NMDA, AMPA e cainatos na pele produz uma hiperalgesia mecânica e térmica transitória (ZHOU e cols., 1996).

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a estimulação repetida dos mediadores químicos causa normalmente uma sensibilização das fibras nervosas periféricas, causando a redução dos limiares de dor e dor espontânea, um mecanismo que pode ser sentido sob a forma de hipersensibilidade cutânea. Esse mecanismo de hipersensibilidade pode ser visto através de diferentes tipos de respostas, como alodinia (dor provocada por um estímulo inócuo, que normalmente não provoca dor) ou hiperalgesia mecânica e térmica transitória (resposta aumentada a um estímulo nocivo, que é normalmente doloroso, reflete a dor aumentada mediante estimulação supra-limiar) (Figura 2).

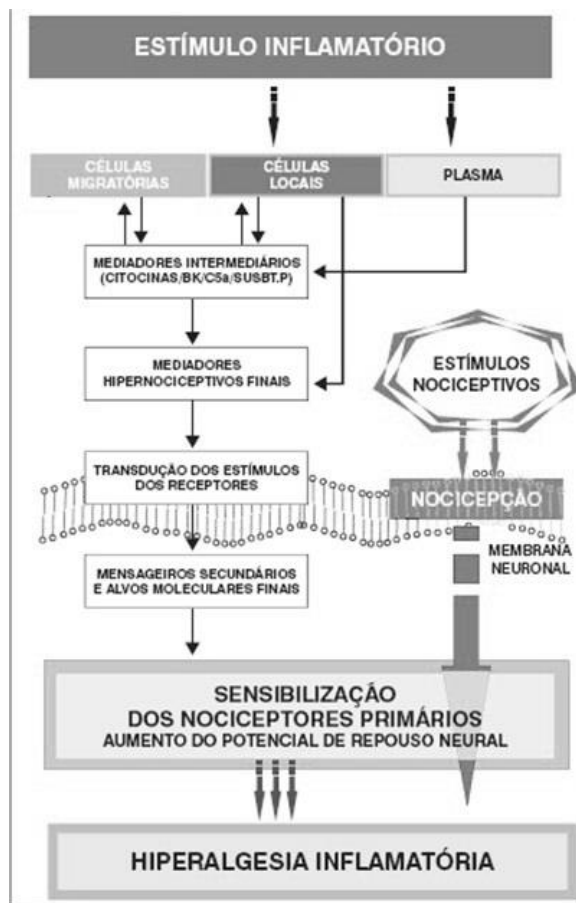


Figura 2 - Mecanismo de Hiperalgesia Inflamatória (FERREIRA e cols., 2010)

A informação sensorial, após ser captada pelas estruturas do sistema nervoso periférico, é transmitida para as unidades do sistema nervoso central, onde é decodificada e interpretada.

As fibras nociceptivas A $\delta$  e C, ao entrarem na medula espinhal, bifurcam-se ascendendo e descendendo alguns segmentos por meio do trato de Lissauer. A partir daí, há conexões com neurônios envolvidos na retransmissão da dor para outras regiões do sistema nervoso, através das lâminas I, II e V da substância cinzenta. Neurotransmissores importantes participam deste processo, como o glutamato (envolvido na geração de potenciais sinápticos rápidos) e a substância P (responsável por potenciais sinápticos lentos). (AIRES, 2008).

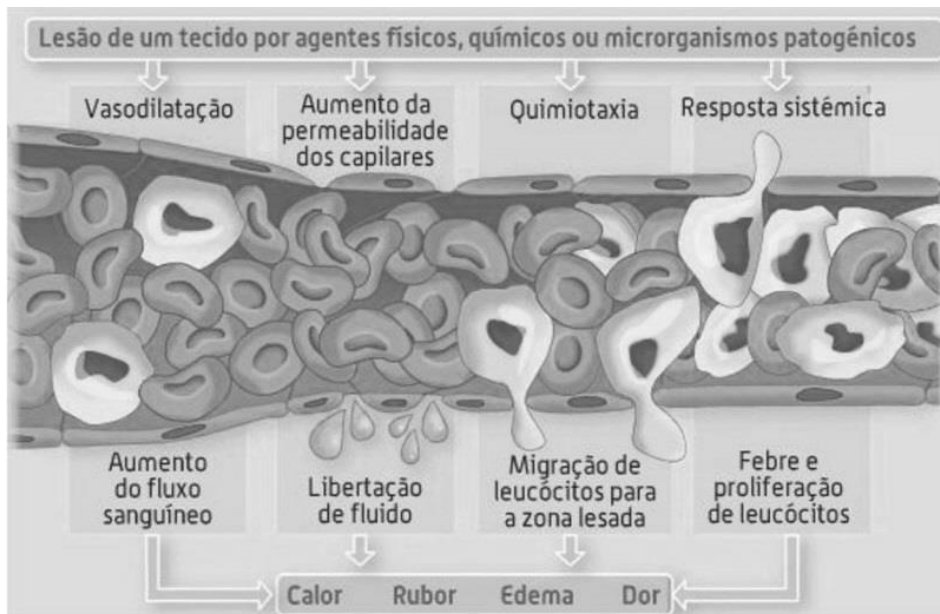
Uma importante via nociceptiva ascendente constitui o trato espinotalâmico, que será ativado quando ocorre dor aguda no organismo. Os axônios de neurônios espinhais de segunda ordem, cruzando a linha mediana ainda na medula, ascendem pelo quadrante ântero-lateral da substância branca projetando-se ao tálamo. Outra projeção nociceptiva é o trato espinomesencefálico que termina em algumas regiões do mesencéfalo onde se incluem a formação reticular mesencefálica e a substância cinzenta periaquedutal. Essa última região mantém conexões recíprocas com o sistema límbico por intermédio do hipotálamo. O trato espinomesencefálico é ativado quando há uma dor do tipo crônica. (AIRES, 2008).

A modulação da sensibilidade dolorosa começou a ser estudada nos anos 1960 por Melzack e Wall e ficou conhecida como “teoria da comporta”, em que a atividade de neurônios nociceptivos do corno posterior da medula seria modulada por intermédio de interneurônios inibitórios, pelo balanço entre as aferências nociceptivas veiculadas por fibras C e outras aferências, não-nociceptivas, transmitidas por fibras mielínicas A $\alpha$  e A $\beta$ . (AIRES, 2008).

A nociceção pode ser modulada também em outros pontos das vias centrais, como na analgesia induzida a partir de estímulos elétricos na substância cinzenta periaquedutal e em regiões do tálamo. Essa modulação ocorre graças a projeções descendentes que alcançam neurônios nociceptivos na medula espinhal. O mecanismo relacionado a essa analgesia está diretamente envolvido com os opioides, já que o bulbo rostroventral e a substância cinzenta periaquedutal são sensíveis à morfina. Outras regiões também participam dessa modulação descendente, como os núcleos da rafe, o núcleo do trato solitário (NTS) e o hipotálamo. Fica evidente então a integração de respostas tanto vegetativas como neuroendócrinas no processo de dor. Pode ocorrer também uma ação antinociceptiva diretamente na medula espinhal através da ação dos opioides. Um exemplo é a morfina, que inibe a atividade neuronal do corno posterior da medula, uma região com alta densidade de interneurônios que utilizam encefalinas e dinorfinas (peptídeos opioides) como neurotransmissores (AIRES, 2008).

## **2.2 Processo inflamatório**

A primeira defesa do organismo a um dano tecidual é a resposta inflamatória; um processo biológico complexo que envolve componentes vasculares, celulares e uma diversidade de substâncias solúveis, além de apresentar como sinais clínicos característicos: rubor, calor, edema, dor e prejuízo funcional (Figura 3). A finalidade desse processo é remover o estímulo indutor da resposta e iniciar a recuperação tecidual local (CRUVINEL, 2010).



**Figura 3 - Respostas desencadeadas pelo processo inflamatório (FELIPINI, 2013)**

A inflamação pode ser classificada como aguda e crônica. Na resposta inflamatória aguda, após uma agressão ao tecido, ocorre vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar mediados por aminas vasoativas (histamina e serotonina), que são liberadas por mastócitos e monócitos minutos após a lesão. Há saída de proteínas e água para o espaço extravascular, e marginalização dos leucócitos. O endotélio local torna-se ativado, favorecendo a aderência de leucócitos e eventual migração destes para os tecidos. Macrófagos residentes no tecido lesado liberam citocinas inflamatórias, como IL-1, TNF- $\alpha$  e quimiocinas. Uma vez no tecido, as células buscam fagocitar o patógeno, permitindo o reparo da lesão. Nesta resposta aguda, predominam elementos da resposta imune inata e as principais células envolvidas são os neutrófilos e macrófagos. Na inflamação crônica, em geral ocasionada por persistência do estímulo nóxico, o processo inflamatório se mantém e sofre alterações qualitativas, caracterizadas por mudança progressiva nos elementos celulares e solúveis que infiltram o tecido. A permanência do agente lesivo leva à cronificação do processo, havendo concomitância de destruição e reparo tecidual. Na resposta crônica, o tecido apresenta um infiltrado constituído por células mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos), sinais de angiogênese e fibrose (CRUVINEL, 2010).

O processo de coagulação devido à lesão tecidual está intimamente associado ao início da resposta inflamatória. A proteína caliceína liberada durante a coagulação produz bradicinina, um fator altamente algogênico (AMAYA e cols., 2013). Os receptores para bradicinina B<sub>2</sub> são constitutivos e medeiam o aumento da permeabilidade vascular, broncoconstrição e estimulação de receptores algésicos. Já os receptores B<sub>1</sub> são induzidos rapidamente em condições patológicas por diversos estímulos inflamatórios, como por exemplo, as citocinas (CALIXTO e cols., 2004).

A ativação de mastócitos constitui outro processo relevante na resposta inflamatória. Esta ativação induz a liberação de várias moléculas contidas nos grânulos dessas células em um processo conhecido como desgranulação. As principais moléculas liberadas são as aminas vasoativas (histamina e serotonina), citocinas e quimiocinas (FRENZEL, 2013). Leucotrienos e prostaglandinas são sintetizados durante a ativação

de mastócitos, através do ácido araquidônico liberado pela ação das fosfolipases (THEOHARIDES, 2012).

A histamina e a serotonina são os primeiros mediadores a serem liberados durante a inflamação. A histamina é encontrada principalmente nos mastócitos, mas também nos basófilos do sangue e nas plaquetas. É liberada através da desgranulação dos mastócitos devido a diversos estímulos, como uma injúria física, proteínas liberadoras de histamina derivadas de leucócitos, neuropeptídeos (substância P) e ligação de anticorpos aos mastócitos, que constitui a base das reações alérgicas. A histamina aumenta a permeabilidade vascular e este efeito é mediado principalmente pela ligação a receptores H1 nas células endoteliais microvasculares (ROBBINS & COTRAN, 2010). Além do aumento da permeabilidade vascular, seus efeitos fisiológicos incluem: contração do músculo liso, vasoconstrição pulmonar, aumento dos níveis de GMPc nas células, produção de prostaglandinas, aumento da secreção de ácido gástrico bem como de muco e ativação de células T supressoras (SCHRAMM e THORLACIUS, 2004)

A serotonina (5-hidroxitriptamina) tem ações semelhantes à histamina. Ela está presente nas plaquetas e em certas células neuroendócrinas (como por exemplo, no trato gastrointestinal). Sua liberação é estimulada quando ocorre agregação plaquetária após o contato com colágeno, trombina e complexos antígeno-anticorpo. Esta liberação também resulta em aumento da permeabilidade vascular (ROBBINS & COTRAN, 2010).

Outro grupo de mediadores inflamatórios inclui as citocinas e quimiocinas. As principais citocinas pró-inflamatórias são as interleucinas (como por exemplo, a IL-1 $\beta$ ) e o TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral –  $\alpha$ ) (GRELLNER, 2002). Estudos comprovam que o tratamento local com citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF –  $\alpha$  e a interleucina (IL) -1 $\beta$ , induz hiperalgesia no sítio de injeção (AMAYA e cols., 2013).

O TNF- $\alpha$  é produzido pelos neutrófilos, linfócitos, células naturais killer (NK), células do endotélio e mastócitos. Interage com as células endoteliais para induzir a expressão de molécula de adesão celular intercelular (ICAM-1), molécula de adesão celular vascular (VCAM-1) e E-selectina, o que permite o egresso de neutrófilos para áreas inflamatórias. Induz imunidade antitumoral através de efeitos citotóxicos diretos sobre células cancerosas e estimula respostas imunes antitumorais. Também é um potente ativador de neutrófilos, mediando a adesão, quimiotaxia e desgranulação (COMMINS e cols., 2010).

No local da lesão, as interleucinas estimulam a fagocitose dos neutrófilos e macrófagos, propiciam a proliferação de linfócitos T e aumentam a liberação de óxido nítrico (NO) (GRELLNER, 2002).

A IL-1 é produzida principalmente por células do sistema fagocítico mononuclear, mas também por células endoteliais, neutrófilos, queratinócitos, células sinoviais e numerosos outros tipos celulares. Possui função similar à do TNF- $\alpha$  (CUNNEEN e cols., 2004), pois induz a resposta inflamatória sistêmica em resposta a um agravo inicial (LOISA e cols., 2003). Uma das mais importantes atividades biológicas da IL-1 é a sua capacidade de ativar linfócitos T. Além disso, tem participação na febre, sono e anorexia, através de sua interação com o sistema nervoso central. Assim como o TNF- $\alpha$ , estimula a aderência celular endotelial de leucócitos através da regulação positiva da expressão de ICAM-1, VCAM e E-selectina (COMMINS e cols., 2010).

As quimiocinas são uma família de pequenas proteínas (8 a 12kD) que agem primariamente como quimioatraentes em numerosos tipos celulares, incluindo

neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e fibroblastos. As quimiocinas inflamatórias recrutam e ativam leucócitos e auxiliam na resposta imune e iniciam o processo de cicatrização de feridas (COMMINS e cols., 2010). As quimiocinas medeiam suas atividades pela ligação de receptores acoplados a proteínas G. São classificadas em grupos, de acordo com o arranjo dos resíduos de cisteína (ROBBINS & COTRAN, 2010). As duas principais famílias são as quimiocinas C-X-C, (tipicamente quimiotáticas para neutrófilos) e as quimiocinas C-C (atraem e ativam monócitos e linfócitos) (MATSUKAWA e cols., 2000).

Os metabólitos do ácido araquidônico também são mediadores químicos relevantes na inflamação e potentes agentes quimiotáticos. Através da enzima ciclooxigenase (COX) são liberadas as prostaglandinas. As mais importantes na inflamação são a PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> (prostaciclina) e o TXA<sub>2</sub> (tromboxano). A PGI<sub>2</sub> causa vasodilatação e inibe a agregação plaquetária, enquanto o TXA<sub>2</sub>, sintetizado ao nível das plaquetas, causa forte vasoconstrição e induz fortemente à agregação plaquetária, é um forte quimiotático para os neutrófilos e promove a ativação e a adesão dos mesmos ao endotélio. (FRANCISCHETTI e cols., 2010).

A PGE<sub>2</sub> é de particular interesse porque está envolvida em todo o processo inflamatório, levando aos sinais clássicos da inflamação: eritema e edema (resultado do aumento do fluxo sanguíneo para o tecido inflamado através do aumento da dilatação arterial e permeabilidade microvascular – mediados por PGE<sub>2</sub>) e dor (resulta da ação da PGE<sub>2</sub> nos neurônios sensoriais periféricos e em sítios centrais no interior da medula espinhal e do cérebro) (FITZGERALD e RICCIOTTI, 2011).

A prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) tem sido associada às condições inflamatórias e atópicas. É o prostanóide predominante produzido por mastócitos ativados, que iniciam respostas alérgicas do tipo I mediadas por imunoglobulina E (IgE) (FITZGERALD e RICCIOTTI, 2011).

Por outro lado, pela via da lipoxigenase, são formados os leucotrienos (LT). O LTC<sub>4</sub> e LTD<sub>4</sub> causam intensa vasoconstrição e permeabilidade vascular aumentada. O leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) dá origem a uma série de respostas, que incluem a ativação de adesão molecular das integrinas  $\beta_2$  e aderência à célula endotelial (FRANCISCHETTI e cols., 2010).

### 2.3 Óxido nítrico

O óxido nítrico é uma molécula mensageira que possui numerosos alvos moleculares. Tem diversas funções, como neurotransmissão, controle do tônus vascular, regulação da transcrição e tradução gênica e atua como mediador químico na inflamação. Nos mamíferos, o óxido nítrico pode ser gerado por três isoformas diferentes da enzima NO sintase, que são referidas como: NOS neuronal (n-NOS), NOS induzível (i-NOS) e NOS endotelial (e-NOS). Todas as isoformas utilizam L-arginina como substrato (FÖRSTERMANN e SESSA, 2012).

O óxido nítrico é um mediador importante de nocicepção. No entanto, as evidências experimentais e clínicas demonstraram que o NO também é capaz de induzir a analgesia. Em conjunto, estes dados indicam que o NO desempenha um papel complexo e diverso na modulação do processamento nociceptivo. Portanto, o óxido nítrico apresenta um duplo efeito sobre a transmissão e o controle da dor (CURY e cols., 2011).

Apesar do óxido nítrico estar envolvido em vias nociceptivas, várias linhas de pesquisa têm indicado que o NO induz analgesia e também que medeia o efeito

antinociceptivo periférico e central de compostos analgésicos, como opioides (JAVANMARDI e cols., 2005; HERVERA e cols., 2009; NAPIMOGA e cols., 2009), anti-inflamatórios não esteroidais (LOZANO-CUENCA e cols., 2005) e produtos naturais (GUJINSKI e cols., 2009; GUTIERREZ e cols., 2012).

Experimentos realizados no início de 1990 forneceram a primeira evidência de que o NO induz analgesia e também está envolvido no efeito antinociceptivo periférico de fármacos analgésicos. Os resultados deste estudo indicaram que o NO medeia a ação analgésica periférica de acetilcolina e também que o NO induz, por si só, o efeito analgésico. Além disso, estes dados sugerem que a ação analgésica de NO depende de uma via de sinalização intracelular envolvendo a formação de GMP cíclico (DUARTE e cols., 1990).

O papel do óxido nítrico no controle da dor também foi mostrado a nível central. Um experimento realizado com a administração intracerebroventricular de L-arginina e do doador de óxido nítrico 3- morfolinosidnoimina (SIN-1) em camundongos produziu antinocicepção. Esse efeito parece ser mediado por dinorfina e ser dependente de óxido nítrico. Essa sugestão foi baseada na observação de que a naloxona e também a administração intracerebroventricular de um anti-soro contra dinorfina bloqueou o efeito analgésico de ambas as substâncias. Além disso, o efeito induzido pela L-arginina também foi antagonizado por um inibidor de nNOS (CHUNG e cols., 2006).

Diversas linhas de pesquisa também têm indicado que, no sistema nervoso central, o óxido nítrico está envolvido no controle descendente inibitório da nocicepção (MILLAN, 2002).

Os mecanismos moleculares envolvidos na ação analgésica do óxido nítrico envolvem uma relação entre a via NO-GMPc e a abertura de canais de  $K^+$  sensíveis a ATP. Essa sugestão se baseia em dados experimentais que demonstram que o efeito antinociceptivo de doadores de óxido nítrico, bem como de um análogo permeável de GMPc (3: 5' monofosfato de dibutirilguanosina - cíclica - DbcGMP), é mediado através da abertura de canais específicos de  $K^+$  sensíveis a ATP (SOARES e cols., 2000; SOARES e cols., 2001).

Outros estudos eletrofisiológicos indicam que a morfina induz, em neurônios nociceptivos, um aumento na abertura de canais de  $K^+$  sensíveis a ATP, seguido por uma hiperpolarização do neurônio (CUNHA e cols., 2010). Esses resultados indicam que o NO, ou fármacos capazes de ativar a via NO-GMPc, causa antinocicepção via abertura de canais de  $K^+$  sensíveis a ATP, com conseqüente aumento da concentração de  $K^+$ , restaurando o alto limiar normal do nociceptor.

Todos estes estudos citados anteriormente indicam que uma via NO-GMPc medeia o efeito analgésico de diversos fármacos, incluindo opioides, dipirona e alguns agentes anti-inflamatórios. Os mecanismos específicos que estes fármacos utilizam para estimular a produção de NO ainda não estão muito bem esclarecidos (CURY e cols., 2011).

## **2.4 Opioides**

O sistema opioide é um dos principais sistemas endógenos envolvidos em vários comportamentos fortemente conservados durante a escala evolutiva de organismos superiores, como a percepção da dor e seus mecanismos de modulação, o sistema de recompensa, de dependência e o controle do medo (LESNIAK e LIPKOWSKI, 2011).

Os analgésicos mais utilizados e eficazes para o tratamento de quadros de dor aguda intensa e crônica são os fármacos opioides. A morfina e o fentanil, por exemplo, estão entre os fármacos mais prescritos no mundo (AL-HASANI, 2011).

Os opioides se dividem em quatro classes. A morfina e a codeína, mais conhecidas como opioides alcalóides, ocorrem naturalmente no ópio, a partir das folhas ainda verdes da papoula (*Papaver somniferum*). Os seus derivados semissintéticos incluem a oxicodeona e a heroína. Os opioides totalmente sintéticos, como a metadona, também tem utilização terapêutica valiosa (MAZÁK e cols., 2009). Os peptídeos opioides endógenos são ligantes naturais que ativam diferentes receptores opioides durante eventos inflamatórios, neuropatias dolorosas ou câncer. Nos mamíferos três tipos de peptídeos opioides, endorfinas, encefalinas e dinorfinas, são sintetizados via clivagem de proteínas precursoras (COSTANTINO e cols., 2012).

Por meio de pesquisas com preparações de tecidos de íleo de roedores foi possível identificar três receptores da classe dos opioides, e estes foram nomeados com letras gregas de acordo com a correspondente inicial de cada substância específica utilizada para estimulá-lo (MARTINS e cols., 2012). As endorfinas derivam da clivagem da proteína precursora proopiomelanocortina (POMC) e possuem afinidade pelos receptores  $\mu$  opioides. As encefalinas derivam da proteína precursora proencefalina (PENK) e possuem afinidade pelos receptores  $\mu$  e  $\delta$  opioides. As dinorfinas, por sua vez, derivam da clivagem da prodinorfina e exibem afinidade pelos receptores  $\kappa$  opioides (AKIL e cols., 1998).

Os receptores opioides são expressos principalmente no córtex, sistema límbico e tronco cerebral. Sítios de ligação para os três principais tipos de receptores opioides se sobrepõem na maioria das estruturas, mas algumas estruturas exibem maior expressão de um receptor sobre os outros (MERRER e cols., 2009). No entanto, em alguns estados de dor, incluindo danos nos nervos, dor inflamatória, destruição dos tecidos devido à expansão do câncer, os receptores opioides localizados na periferia desempenham um papel significativo no desenvolvimento da analgesia. Estão também presentes em outros tecidos não neurais, tais como o epitélio vascular ou queratinócitos (Tabela 2) (LESNIAK e LIPKOWSKI, 2011).

**Tabela 2 - Locais de expressão dos receptores opioides (LESNIAK e LIPKOWSKI, 2011)**

Tipo de receptor opioide	Expressão		
	Sistema Nervoso Central	Sistema Nervoso Periférico	Tecidos não neurais
$\mu$	Neocórtex, caudado-putâmen, núcleo accumbens, tálamo, hipocampo, amígdala, núcleo do trato solitário	Gânglio da raiz dorsal, estômago, duodeno, jejuno, íleo, cólon distal e proximal	Endotélio vascular, epitélio cardíaco, queratinócitos, canais deferentes, células de Sertoli
$\delta$	Neocórtex, caudado-putâmen, núcleo accumbens, amígdala	Gânglio da raiz dorsal	
$\kappa$	Caudado-putâmen, núcleo accumbens, amígdala, lobo posterior da hipófise	Gânglio da raiz dorsal, estômago, duodeno, jejuno, íleo, cólon distal e proximal	



De acordo com o subtipo dos receptores e sua localização no sistema nervoso, algumas ações são bem definidas. Os receptores  $\delta$  são responsáveis primariamente pela analgesia, mas também por modular funções cognitivas e de dependência física. Cabem aos receptores  $\kappa$  as funções de nocicepção, termorregulação, controle de diurese e secreção neuroendócrina. Quanto aos receptores  $\mu$ , estes regulam funções como a nocicepção, o ciclo respiratório e o trânsito intestinal (MARTINS e cols., 2012).

O receptor  $\delta$  foi o primeiro a ser clonado em laboratório. Possui como agentes agonistas principais a encefalina (deltorfina) cuja seletividade é baixa, mas possui alta afinidade, e também o SIOM (7- spiroindanyloxymorphone), derivado da oximorfona, mais seletivo e potente. Antagonizando tal substância, encontra-se o naltrindol, também derivado da naltrexona, sendo este, o primeiro a ser sintetizado em laboratório. Nos receptores  $\kappa$ , o primeiro agonista identificado foi a cetociclazocina e como antagonista possui a nor-binaltorfimina, de potente ação. Por fim, nos receptores  $\mu$ , teve como primeiro agonista identificado a morfina, e como antagonista, a naloxona (um antagonista não-seletivo opioide) (MARTINS e cols., 2012).

O mecanismo de ação pelo qual os opioides agem está bem caracterizado. Os receptores opioides são receptores acoplados à proteína  $G_i$ . Após o opioide se ligar ao receptor, mudanças conformacionais permitem o acoplamento intracelular da proteína  $G_i$  à porção C-terminal dos receptores opioides. Na subunidade  $G_\alpha$ , GDP é substituído por GTP e ocorre uma dissociação do complexo trimérico proteico em subunidades  $G_\alpha$  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  $K^+$ ,  $Ca^{++}$  e outros íons na membrana. Os três tipos de receptores opioides ( $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ ) modulam vários canais iônicos para  $Ca^{++}$ , suprimindo o influxo de cálcio e a liberação de neurotransmissor em muitos sistemas neuronais. Um exemplo proeminente é a inibição da liberação da substância P (um neuropeptídeo pró-nociceptivo e pró-inflamatório) de neurônios sensoriais centrais e periféricos. Na membrana pós-sináptica, os receptores opioides medeiam hiperpolarização, através da abertura de canais para  $K^+$ , dessa forma prevenindo a excitação e/ou propagação de potenciais de ação (STEIN, 2009).

Além de modulação da dor e da dependência, os receptores opioides são amplamente envolvidos em várias atividades fisiológicas e fisiopatológicas, incluindo a regulação da homeostase, proliferação celular, resposta emocional, ataques epiléticos, função imunitária, alimentação, obesidade, controle respiratório e cardiovascular, bem como algumas doenças neurodegenerativas (FENG e cols., 2012).

Embora os analgésicos opioides orais sejam comumente utilizados no tratamento de diversas formas de dor moderada a grave, eles estão associados a efeitos adversos que comprometem a qualidade do manejo da dor. Ensaios clínicos revelam que constipação, náusea, êmese, prurido e sonolência são os efeitos adversos mais frequentemente relatados por pacientes com dor crônica, neuropática, dor associada ao câncer e dor pós-operatória (GREGORIAN e cols., 2010). Outros efeitos incluem ainda tonturas, euforia ou disforia e depressão respiratória (KELLEY e TEPPER, 2012). Além disso, o uso prolongado de opioides conduz ao desenvolvimento de tolerância e dependência (COSTANTINO e cols., 2012). No entanto, abordagens específicas para analgesia opioide periférica oferecem uma alternativa interessante para o tratamento da

dor por evitarem ou pelo menos minimizarem os efeitos adversos de fármacos opioides de ação central (STEIN, 2009).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos Gerais**

- Avaliar a ação antinociceptiva do composto CTHP sob condições de dor aguda;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do composto CTHP sob condições de inflamação aguda;
- Avaliar a indução de tolerância produzida pelo composto CTHP durante a administração crônica;
- Elucidar os mecanismos responsáveis pelas suas atividades antinociceptiva e anti-inflamatória.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a atividade antinociceptiva do composto CTHP sobre a dor aguda através dos modelos de formalina, contorções abdominais induzidas por ácido acético e retirada da cauda;
- Avaliar a possibilidade de interferência da performance motora sobre o efeito anti-nociceptivo demonstrado pelo composto CTHP, através do teste de campo aberto;
- Avaliar a participação do sistema opioide sobre o efeito antinociceptivo do composto CTHP, 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 antinocicepção do composto CTHP, 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<sup>+</sup> sensível ao ATP);
- Avaliar o envolvimento da via serotoninérgica na atividade do composto CTHP, através da administração diária por 3 dias de 4-cloro-DL-fenilalanina (inibidor da enzima triptofano hidroxilase).
- Avaliar o desenvolvimento de tolerância e tolerância cruzada com opioides no modelo de retirada da cauda;
- Avaliar a atividade antiedematogênica do composto CTHP no modelo de edema de pata induzido por carragenina;
- Avaliar a atividade enzimática das enzimas cicloxigenases 1 e 2 frente ao composto CTHP;

- Avaliar a migração de leucócitos e promover a quantificação de citocinas (TNF  $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) a partir do modelo de bolsa de ar subcutâneo (air pouch);
- Avaliar a toxicidade aguda do composto CTHP;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, com peso de 20-24g. O protocolo para este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (CEUA/ICBS – UFRRJ) – sob o número 007/2014. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 1^\circ \text{C}$ ) e ciclo claro-escuro de 12h. Água e alimentação foram mantidas à disposição dos animais, porém a ração foi retirada 8h antes da administração oral do composto, morfina, ácido acetilsalicílico e veículo.

### 4.2 Reagentes

As seguintes substâncias foram usadas: ácido acético (Vetec), formaldeído (Merck), ácido acetilsalicílico (pureza – 99%), L-NAME (pureza  $\geq 98\%$ ), brometo de metilnaltrexona (pureza  $\geq 97\%$ ), 1H-[1,2,4]Oxadiazol[4,3-a]quinoxalina-1-ona (ODQ) (pureza  $\geq 98\%$ ), cloridrato de naltrindol (pureza  $\geq 98\%$ ), dicloridrato de nor-binaltorfimina (pureza  $\geq 98\%$ ), 4-cloro-DL-fenilalanina (PCPA - pureza  $\geq 98,5\%$ ), glibenclamida (pureza  $\geq 99\%$ ) e dimetil sulfóxido (pureza  $\geq 99,5\%$ ) (Sigma-aldrich), morfina (pureza - 97%), naloxona (pureza - 99%) (Cristália) e dexametasona (Decadron<sup>®</sup>, Aché Lab. Farm).

### 4.3 Administração dos fármacos

O composto CTHP foi testado nas doses de 1, 5, 10 e 30 mg/kg e administrado em volume final de 10 mL/kg (via oral, v.o.) em camundongos. A morfina e o ácido acetilsalicílico foram usados como fármacos de referência e foram administrados pela mesma via de administração que o composto em cada experimento. A dexametasona também foi usada como fármaco de referência, porém foi administrada por via subcutânea. As substâncias (naloxona, L-NAME, ODQ, glibenclamida, metilnaltrexona, naltrindol e nor-binaltorfimina) foram administradas 15 minutos antes da administração do composto e o PCPA foi administrado por 3 dias consecutivos anteriormente à administração do composto em volume final de 20 mL/kg (via intraperitoneal, i.p.).

### 4.4 Tratamentos

- Veículo: água destilada com dimetilsulfóxido, na concentração de 5% (v/v), para a solubilização do composto. Os grupos de animais tratados com veículo foram feitos para demonstrar que este não é o responsável pela atividade antinociceptiva e/ou anti-inflamatória.
- Ácido acético: foi preparado na concentração de 1,2% (v/v) em água destilada e injetado por via intraperitoneal (i.p), 60 minutos após a administração oral do composto CTHP, morfina e veículo no modelo de contorções abdominais.
- Formalina: foi preparada na concentração de 2,5% (v/v) em água destilada e injetada em uma das patas traseiras dos animais, 60 minutos após a

administração oral do composto CTHP, morfina, ácido acetilsalicílico ou veículo 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 do composto CTHP ou veículo e 15 minutos após a administração i.p. de dexametasona 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 e no modelo de bolsa de ar subcutâneo foi administrada na bolsa subcutânea estéril.
- Composto:  $(\pm)$ -4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP). Administrado por via oral (v.o) nas doses de 1, 5, 10 e 30 mg/kg.
- Morfina: agonista de receptores opioides. Utilizada como controle positivo em modelos nociceptivos com envolvimento do sistema nervoso central. Administrado por via oral (v.o) na dose de 5,01 mg/kg no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético e na dose de 8,15 mg/kg no modelo de retirada da cauda.
- Ácido acetilsalicílico: anti-inflamatório não esteroideal. Utilizado como controle positivo em modelos algésimétricos na avaliação da dor de origem inflamatória. Administrado por via oral (v.o) na dose de 100 mg/kg.
- Dexametasona: anti-inflamatório esteroideal. Utilizado como controle positivo em modelos de avaliação inflamatória. Administrado por via subcutânea (s.c.) na dose de 2,25 mg/kg.
- Naloxona: antagonista não-seletivo opioide. Administrado previamente por via intraperitoneal (i.p) nas doses de 0,01; 0,1; 1 e 3 mg/kg no modelo de retirada da cauda.
- N-nitro-arginina-L-metil éster (L-NAME): inibidor da óxido nítrico sintase, reduzindo assim a produção de óxido nítrico (NO). Administrado previamente por via intraperitoneal (i.p) nas doses de 0,1; 0,5 e 1 mg/kg no modelo de retirada da cauda.
- 1H-[1,2,4]Oxadiazol[4,3-a]quinoxalina-1-ona (ODQ): inibidor seletivo da guanilato ciclase sensível ao óxido nítrico. Administrado previamente por via intraperitoneal nas doses de 0,5; 1 e 2 mg/kg no modelo de retirada da cauda.
- Glibenclamida: bloqueador de canal de potássio sensível a ATP. Administrado previamente por via intraperitoneal (i.p) nas doses de 0,1; 0,5 e 1mg/kg no modelo de retirada da cauda.
- 4-cloro-DL-fenilalanina (PCPA): inibidor da enzima triptofano hidroxilase (enzima responsável pela biossíntese de serotonina (5-HT). Administrado previamente na dose de 100 mg/kg por via intraperitoneal (i.p), por 3 dias consecutivos no modelo de retirada da cauda.
- Naltrindol: antagonista seletivo de receptor opioide do tipo  $\delta$ . Administrado previamente por via intraperitoneal (i.p) nas doses de 0,1; 1 e 3 mg/kg no modelo de retirada da cauda.
- Metilnaltrexona: antagonista seletivo periférico de receptor opioide do tipo  $\mu$ . Administrado previamente por via intraperitoneal (i.p) nas doses de 0,1; 1 e 3 mg/kg no modelo de retirada da cauda.
- Nor-binaltorfimina: antagonista seletivo de receptor opioide do tipo  $\kappa$ . Administrado previamente por via intraperitoneal (i.p) nas doses de 0,1; 1 e 3 mg/kg no modelo de retirada da cauda.

A dose de morfina (5,01 [2,47 – 8,68] mg/kg e (8,15 [6,24 – 10,44] – v.o.- fármaco analgésico opioide) e a dose de dexametasona (2,25 [1,82 – 2,79] mg/kg s.c. – anti-inflamatório esteroide) foram obtidas pelo cálculo de DE<sub>50</sub> - dose responsável por 50% do efeito máximo - (limites de confiança) no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste de retirada da cauda e teste de edema de pata, respectivamente, que foram obtidas anteriormente. O valor de DE<sub>50</sub> para a ação antinociceptiva e anti-inflamatória foi obtida por regressão não-linear (curva dose-resposta sigmoidal), usando o software Graph Pad Prism 6.0. A dose utilizada do ácido acetilsalicílico foi de 100 mg/kg (v.o.), de acordo com Guilhon e cols. (2011).

#### 4.5 Modelos experimentais

##### 4.5.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

Este modelo é usado para triagem da atividade antinociceptiva (KOSTER e cols., 1959). Veículo, morfina (5,01 mg/kg) e o composto CTHP (1, 5, 10 e 30 mg/kg) foram administrados por via oral. As contorções abdominais são induzidas pela administração intraperitoneal de 0,01 mL/g de ácido acético (1,2%). 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 4).

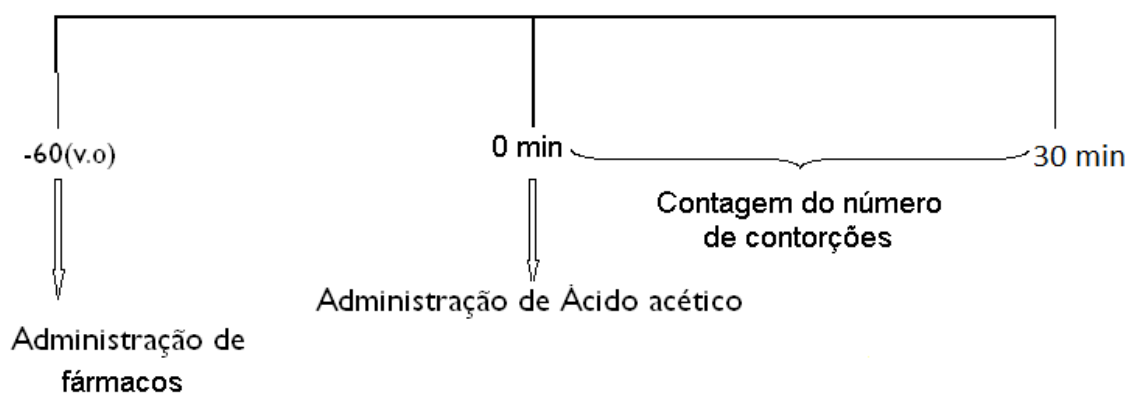


Figura 4 - Protocolo do modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético

##### 4.5.2 Teste da formalina

Este modelo é utilizado para avaliação da dor inflamatória e não-inflamatória (HUNSKAAR e HOLE., 1987). Veículo, morfina (5,01 mg/kg), ácido acetilsalicílico (100 mg/kg) e o composto CTHP (1, 5, 10 e 30 mg/kg) foram administrados por via oral. 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 5).

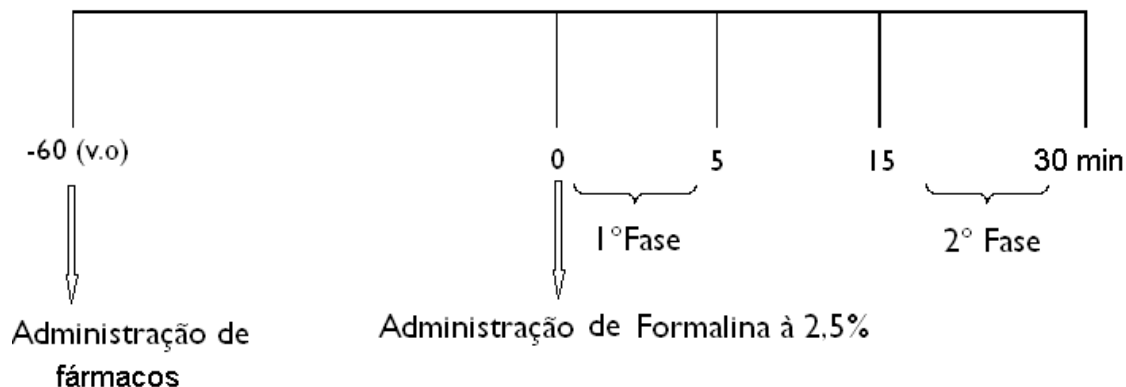


Figura 5 - Protocolo do modelo da formalina

#### 4.5.3 Modelo de retirada da cauda

O modelo foi realizado como previamente descrito por D'AMOUR e SMITH, 1941. Veículo, morfina (8,15 mg/kg) e o composto CTHP (1, 5, 10 e 30 mg/kg) foram administrados por via oral. Os animais foram mantidos em um tubo de acrílico e colocados em aparelho específico (analgesímetro “tail flick”). Um feixe de luz nocivo foi focado a aproximadamente 4 cm da ponta da cauda e a latência de retirada da cauda é registrada automaticamente. A intensidade da fonte de luz radiante foi ajustada para valores de linha de base entre 2 e 4 segundos; esta intensidade não é alterada e os animais que apresentaram valores de linha de base fora destes limites foram excluídos do experimento. Foram feitas várias medidas dos tempos de latência (TL) com intervalos de 20 minutos entre cada uma delas. As primeiras duas medidas foram realizadas antes da administração dos fármacos (e são chamadas de medidas controle). A média das medidas controle é denominada “linha de base” (LB). Para se evitar danos teciduais causados pela temperatura na cauda dos animais, calculou-se um tempo de corte (“cut off”) de 3 vezes o valor da linha de base. A antinocicepção foi quantificada como tempo de reação (TR) obtido em cada tempo de medida ou pela área sob a curva (ASC) das respostas obtidas entre os tempos de 20-120 min após a administração do composto, morfina ou veículo, calculado de acordo com a fórmula da área do trapézio, conforme segue abaixo:

$$ASC = 20 \times TR [(20 \text{ min}) + (40 \text{ min}) + \dots + (120 \text{ min})/2].$$

Na tentativa de elucidação do mecanismo de ação do composto CTHP, grupos experimentais receberam antagonistas específicos (PCPA, L-NAME, ODQ, naloxona, glibenclamida, metilnaltrexona, nor-binaltorfimina e naltrindol) por via intraperitoneal, 15 minutos antes da administração oral do composto (Figura 6).

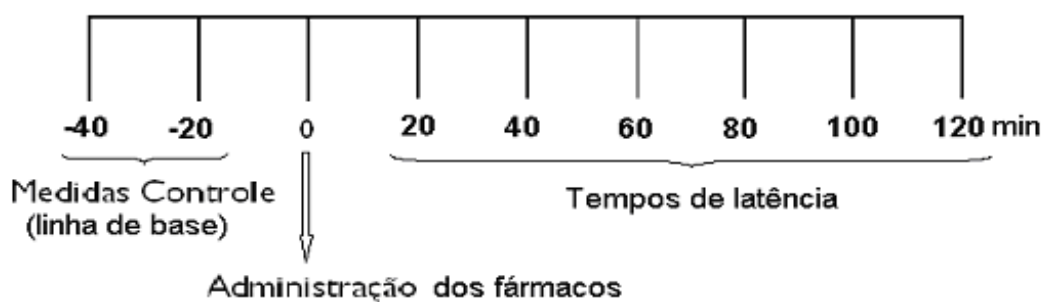


Figura 6 - Protocolo do modelo de retirada da cauda

#### 4.5.4 Indução de tolerância

Na avaliação do desenvolvimento de tolerância, os animais foram tratados com morfina (8,15 mg/kg) ou com o composto CTHP (30 mg/kg) por administrações orais a cada 24h, por 6 e 7 dias, respectivamente. A resposta no modelo de retirada da cauda foi avaliada 1h após cada administração oral. Para avaliar o desenvolvimento de tolerância cruzada, os animais receberam a morfina do dia 1 ao 6 e no 7º dia receberam o composto. Morfina e o composto não foram administrados concomitantemente em nenhum momento. Para descartar a hipótese dos animais desenvolverem resistência ao modelo, um grupo foi constituído por animais que receberam somente o veículo, pelo mesmo período usado pelo grupo administrado com o composto CTHP (Figura 7).

##### Dias de Aplicação

1	2	3	4	5	6	7
M	M	M	M	M	M	CTHP
CTHP	CTHP	CTHP	CTHP	CTHP	CTHP	CTHP
V	V	V	V	V	V	V

Figura 7 - Protocolo das aplicações diárias na indução de tolerância

Legenda: M – Morfina, CTHP – Composto CTHP e V – veículo

#### 4.5.5 Modelo de campo aberto

Para avaliar o prejuízo motor induzido pelo composto, 5 dias antes do início do experimento os animais foram treinados no equipamento. O procedimento foi similar ao descrito por BARROS e colaboradores em 1991. Os camundongos receberam o composto CTHP (30 mg/kg), morfina (8,15 mg/kg) e o veículo por via oral e foram colocados individualmente em uma câmara de observação (60 minutos após administração oral) cujo assoalho foi dividido em quadrados (5 x 5 cm). A atividade espontânea foi quantificada pelo número de quadrados percorridos durante o intervalo de 5 minutos.

#### 4.5.6 Modelo de edema de pata

Este modelo de avaliação edematogênica 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 tíbio-társica. Veículo e o composto CTHP (5, 10 e 30 mg/kg) foram administrados por via oral, e a dexametasona foi administrada por via subcutânea (2,25 mg/kg). 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 água destilada. O edema é avaliado nos tempos de 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção da carragenina (Figura 8).





#### 4.5.8 Quantificação de citocinas

Objetivando quantificar as citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  presentes nos exsudatos, estes foram centrifugados a 170 x g por 10 min a 4° C, os sobrenadantes foram coletados e procedeu-se a determinação da concentração destas citocinas em alíquotas (50 $\mu$ L) do lavado subcutâneo no teste de air pouch. Para isto, foram utilizados kits de imunoenensaio enzimático (Mouse IL-1 $\beta$  ELISA Kit Mouse, Immunoleader® e TNF- $\alpha$  ELISA Kit mouse, Cayman Chemical®), os quais mensuram as concentrações de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  na amostra através do método de ELISA, semelhante ao estudo de RAMANA e cols (2007).

#### 4.5.9 Avaliação da atividade enzimática de COX-1 e COX-2

Foi utilizado um kit de imunoenensaio 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/B<sub>0</sub>) e do log da concentração de prostaglandina em pg/mL (Figura 10). 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 também a porcentagem de inibição de ambas as enzimas frente à utilização de doses crescentes do composto CTHP.

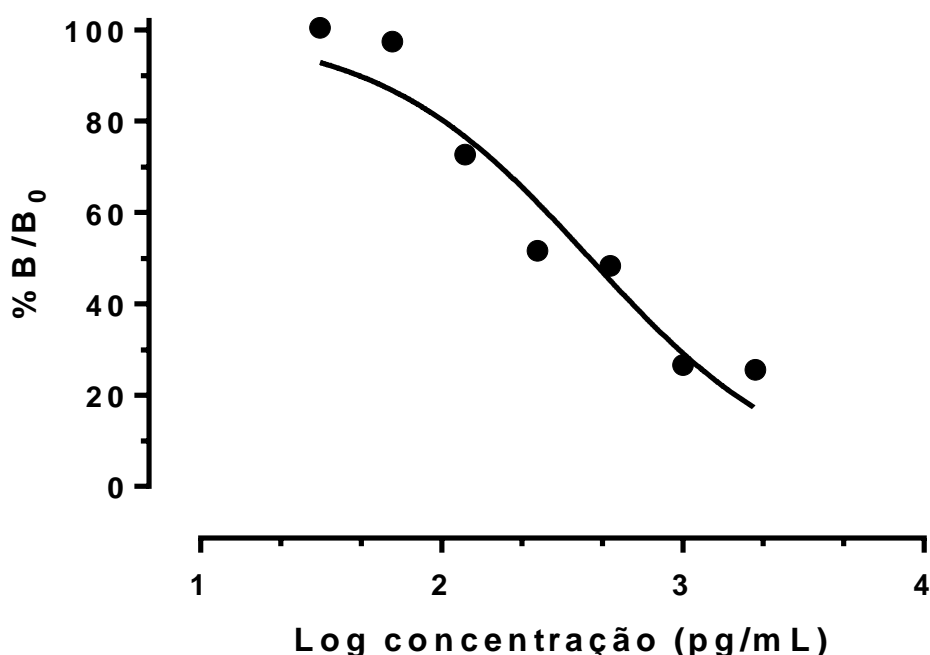


Figura 10 - Curva Padrão de Prostaglandina utilizada para avaliação da atividade enzimática de COX-1 e COX-2. %B/B<sub>0</sub> - percentual da razão entre a taxa de ligação de uma amostra e a taxa de ligação máxima.

#### **4.5.10 Avaliação toxicológica aguda *in vivo***

A toxicidade aguda foi determinada de acordo com o modelo experimental descrito por Lorke (1983). Uma única dose oral do composto CTHP (500 mg/kg) foi administrado a um grupo de 10 animais. Esta dose equivale a mais de dez vezes a maior dose testada do composto CTHP, que foi de 30 mg/kg. Os animais foram colocados posteriormente em uma câmara de observação. Parâmetros comportamentais foram avaliados por um período de 7 dias e incluíram a observação de convulsão, hiperatividade, perda do reflexo, alteração da frequência respiratória e sedação. Um grupo controle de 10 animais foi administrado com o veículo e foi exposto ao mesmo protocolo.

#### **4.6 Análise estatística**

Os grupos experimentais foram constituídos por 7-10 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, campo aberto, quantificação de leucócitos e quantificação de citocinas. E foi realizada pela aplicação de análise de variância (Two-Way ANOVA) acompanhada pelo teste de Bonferroni para os testes de retirada da cauda e edema de pata. Os valores de  $p$  menor que 0,05; 0,01 e 0,001 foram usados como nível de significância. A regressão não-linear foi utilizada para o cálculo de CI<sub>50</sub> (concentração inibitória de 50%) da atividade enzimática de COX-1 e COX-2.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

A administração intraperitoneal (i.p.) de ácido acético (1,2%) produziu  $54,2 \pm 6,1$  contorções em um intervalo de 30 minutos (no grupo controle). A administração oral do composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) nas doses de 5, 10, 30 mg/kg e morfina (5,01 mg/kg) foi capaz de inibir o número de contorções abdominais em relação ao grupo experimental controle (tratado com veículo e ácido acético), de forma dose-dependente, indicando atividade antinociceptiva deste composto (Figura 11). Os percentuais de inibição do número de contorções abdominais obtidos foram: 51,5% ( $26,3 \pm 7,4$  contorções), 53,3% ( $25,3 \pm 4,6$  contorções) e 88,2% ( $6,4 \pm 2,3$  contorções), respectivamente para as doses de 5, 10 e 30 mg/kg. A administração oral de morfina (5,01 mg/kg) inibiu o número de contorções abdominais em aproximadamente 50%, quando comparada ao grupo veículo.

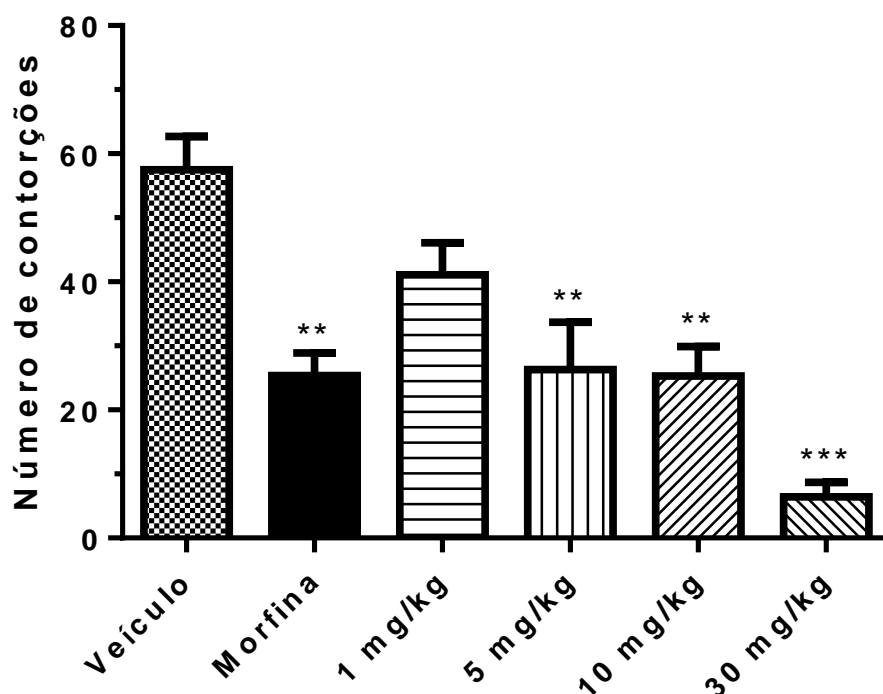


Figura 11 - Efeito antinociceptivo do composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) (1, 5, 10 e 30 mg/kg), veículo (veículo e ácido acético) e morfina (5,01 mg/kg) no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os tratamentos foram realizados por via oral. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 7-10) do número de contorções. A significância estatística (\* p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo veículo e os grupos tratados com morfina e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

### 5.2 Teste da formalina

Os animais foram tratados com o composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) (1, 5, 10 e 30 mg/kg; v.o). O fármaco padrão morfina (5,01 mg/kg) foi utilizado como controle positivo e apresentou percentual de

inibição de 50% em relação ao tempo de lambedura. No grupo de animais tratados somente com o veículo e formalina, o tempo obtido na 1<sup>o</sup> fase foi de  $50,8 \pm 3,6$  segundos e na 2<sup>o</sup> fase foi de  $173,9 \pm 7,8$  segundos. O tratamento com o composto CTHP reduziu significativamente o tempo que os animais permaneceram lambendo as patas após a injeção de formalina. Na 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> fases, o efeito inibitório somente foi observado com as maiores doses (10 e 30 mg/kg). Na 1<sup>o</sup> fase do modelo os percentuais de inibição do tempo de lambedura foram de aproximadamente 49% para as doses de 10 ( $27 \pm 6,1$  segundos) e 30 mg/kg ( $27,3 \pm 8,2$  segundos), já na 2<sup>o</sup> fase os percentuais foram de aproximadamente 40% para as doses de 10 ( $105,2 \pm 10,4$  segundos) e 30 mg/kg ( $105,1 \pm 4,0$  segundos) (Figura 12).

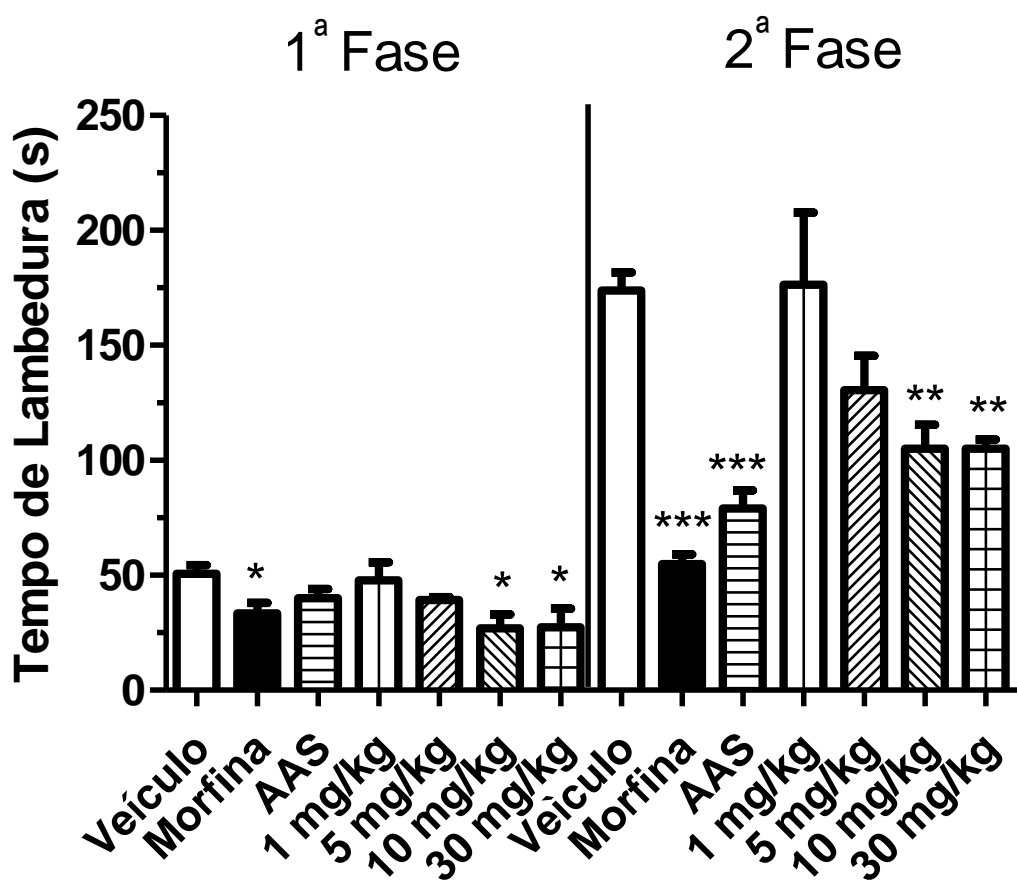


Figura 12 - Efeito antinociceptivo do composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) (1, 5, 10 e 30 mg/kg), veículo (veículo e formalina) e morfina (5,01 mg/kg) no modelo de formalina. Os tratamentos foram realizados por via oral. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 7-10) do tempo de lambedura. A significância estatística (\* p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo veículo e os grupos tratados com morfina e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

### 5.3 Modelo de retirada da cauda

Neste teste, os animais foram tratados com o composto CTHP (1, 5, 10 e 30 mg/kg; v.o). A morfina (8,15 mg/kg) foi utilizada como controle positivo. A figura 13 demonstra que as doses de 10 e 30 mg/kg do composto CTHP apresentaram diferença

significativa em relação ao grupo veículo, apresentando percentual de aumento da área sob a curva de 22% e 77% nas respectivas doses de 10 e 30 mg/kg, confirmando assim o seu efeito antinociceptivo central.

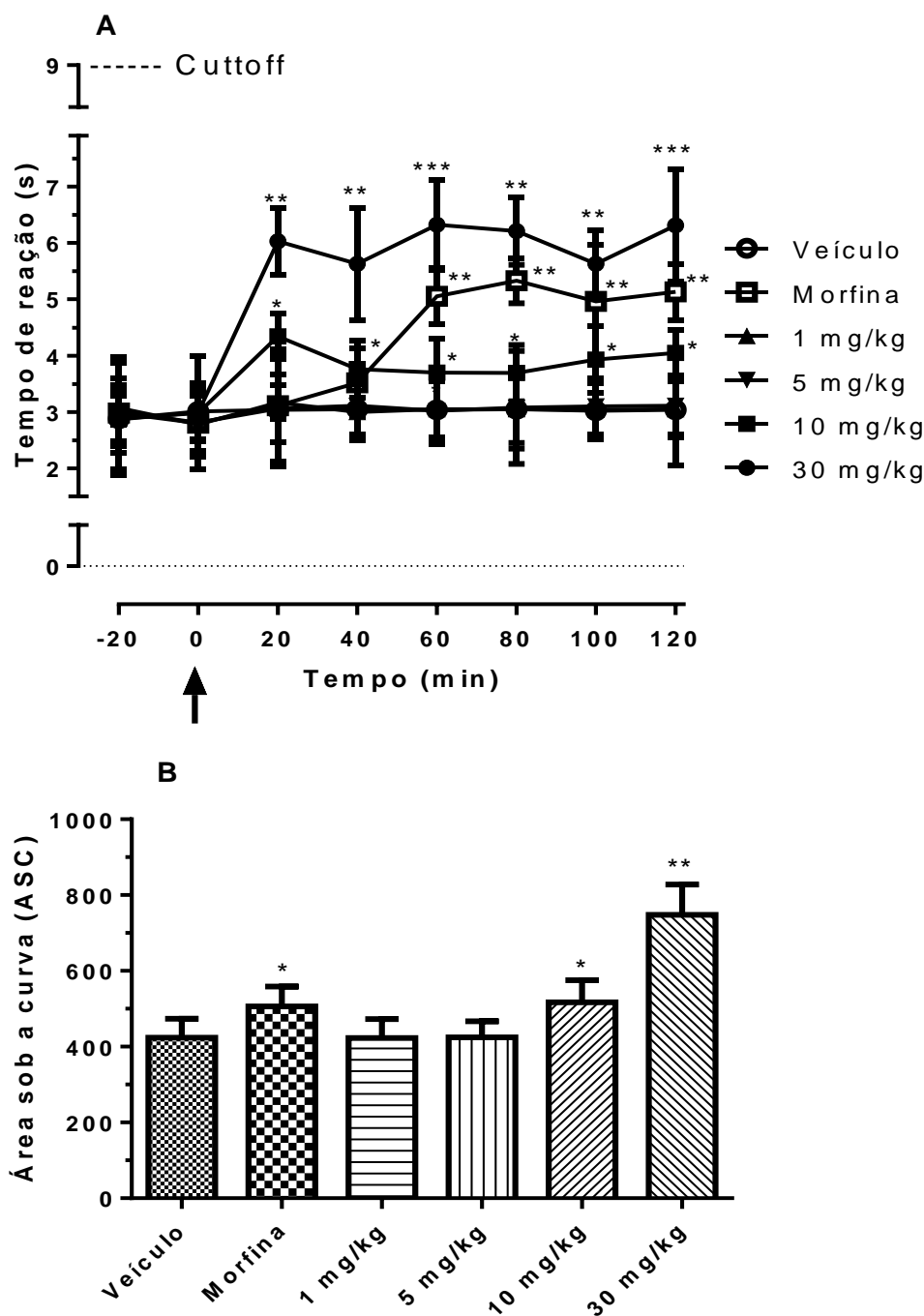


Figura 13 - Efeito antinociceptivo do composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) no modelo de retirada da cauda. Em A, os animais foram tratados por via oral com veículo, morfina (8,15 mg/kg) e doses crescentes do composto (1, 5, 10 e 30 mg/kg). Em B, o gráfico representa a área sob a curva calculada para cada curva tempo-efeito no teste de retirada da cauda. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 7-10) do tempo de reação em segundos. A significância estatística (\* p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o

grupo veículo e os grupos tratados com morfina e doses crescentes do composto, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni em A e por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni em B.

### **5.3.1 Avaliação do sistema opioide sobre o efeito antinociceptivo do composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol no modelo de retirada da cauda**

A figura 14 mostra o efeito induzido pela administração isolada do composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) na dose de 30 mg/kg e combinada com a prévia administração de doses crescentes de naloxona (0,01; 0,1; 1 e 3 mg/kg, i.p.; antagonista não-seletivo de receptor opioide). Deste modo, podemos observar uma redução do efeito antinociceptivo produzido pelo composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) com a prévia administração de naloxona de forma dependente da dose do antagonista, sendo observado uma redução completa com a dose de 3 mg/kg (não possuindo diferença significativa em relação ao grupo veículo), de modo a apresentar uma possível participação do sistema opioide na ação do composto.

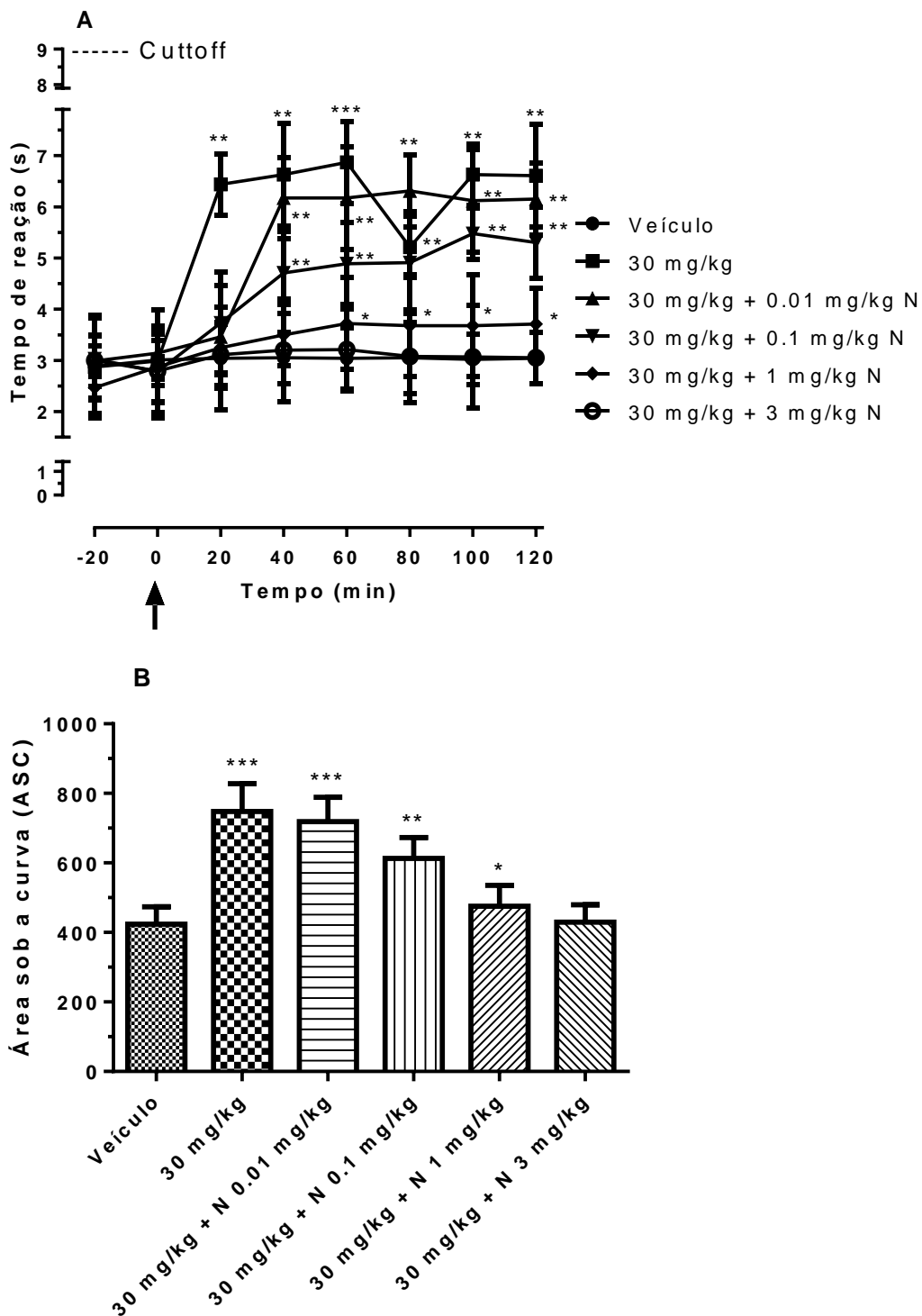


Figura 14 - Influência da administração prévia de naloxona sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) no modelo de retirada da cauda. Em A, os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com naloxona (N – 0,001; 0,1; 1 e 3 mg/kg) 15 minutos antes da administração do composto. Em B, o gráfico representa a área sob a curva calculada para cada curva tempo-efeito no teste de retirada da cauda. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 7-10) do tempo de reação em segundos. A significância estatística (\* p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o

**grupo veículo e os grupos tratados com o composto isoladamente e combinado a doses crescentes de naloxona, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni em A e por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni em B.**

Considerando a possível participação do sistema opioide no mecanismo de ação do composto, foi então avaliada a participação seletiva de receptores opioides ( $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ ). Na figura 15 foi avaliada a interferência da administração prévia de naltrindol (antagonista seletivo do receptor  $\delta$  opioide) sobre o efeito antinociceptivo do composto CTHP, sendo observado que nenhuma das doses utilizadas do antagonista foi capaz de reduzir o efeito do composto.



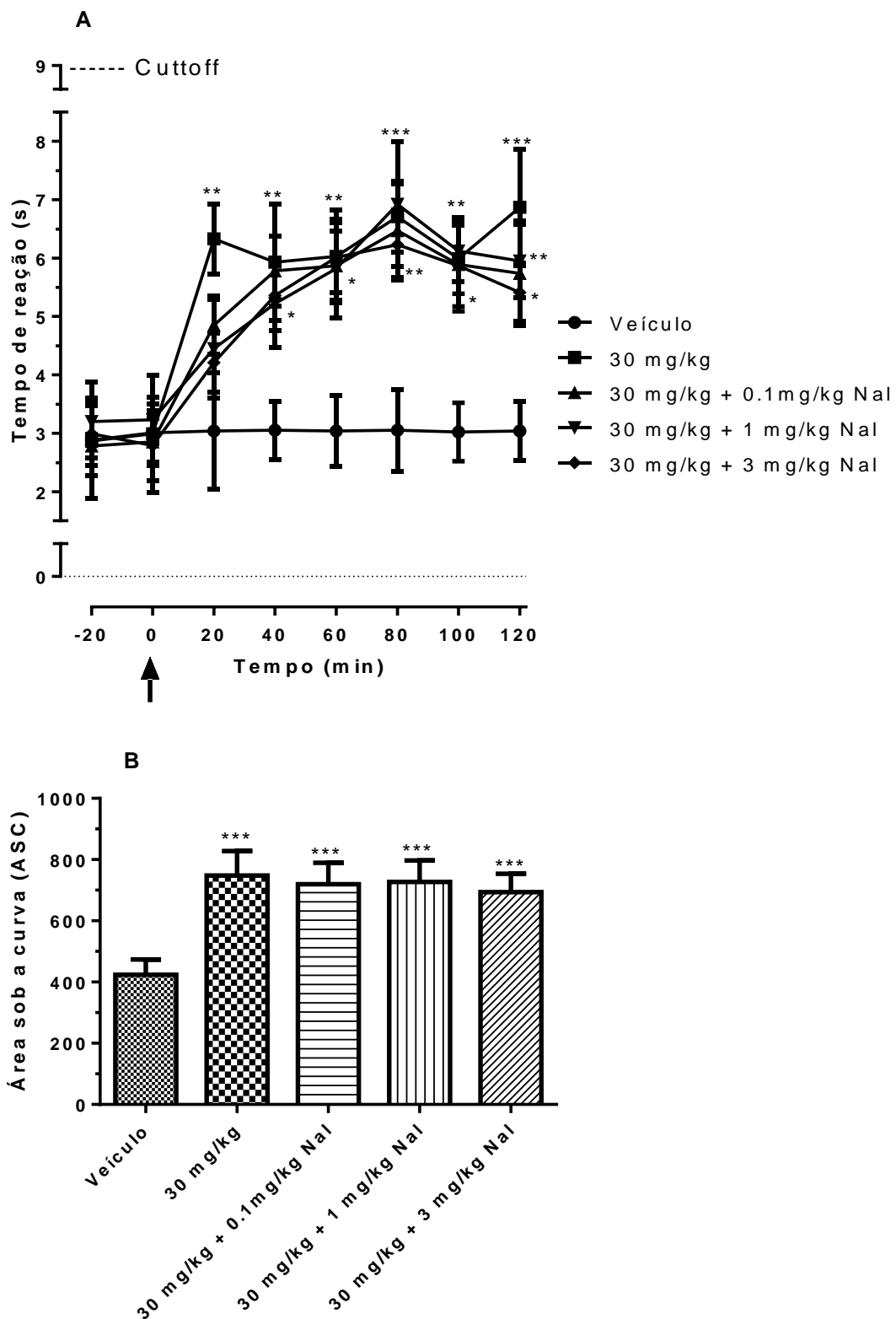


Figura 15 - Influência da administração prévia de naltrindol sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto  $(\pm)$ -4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) no modelo de retirada da cauda. Em A, os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com naltrindol (Nal -0,1; 1 e 3 mg/kg) 15 minutos antes da administração do composto. Em B, o gráfico representa

a área sob a curva calculada para cada curva tempo-efeito no teste de retirada da cauda. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 7-10) do tempo de reação em segundos. A significância estatística (\* p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo veículo e os grupos tratados com o composto isoladamente e combinado a doses crescentes de naltrindol, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni em A e por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni em B.

No entanto, a administração prévia de nor-binaltorfimina (antagonista seletivo do receptor  $\kappa$  opioide) reduziu o efeito antinociceptivo do composto em todas as doses utilizadas, demonstrando o envolvimento deste receptor no mecanismo de ação do composto (Figura 16).

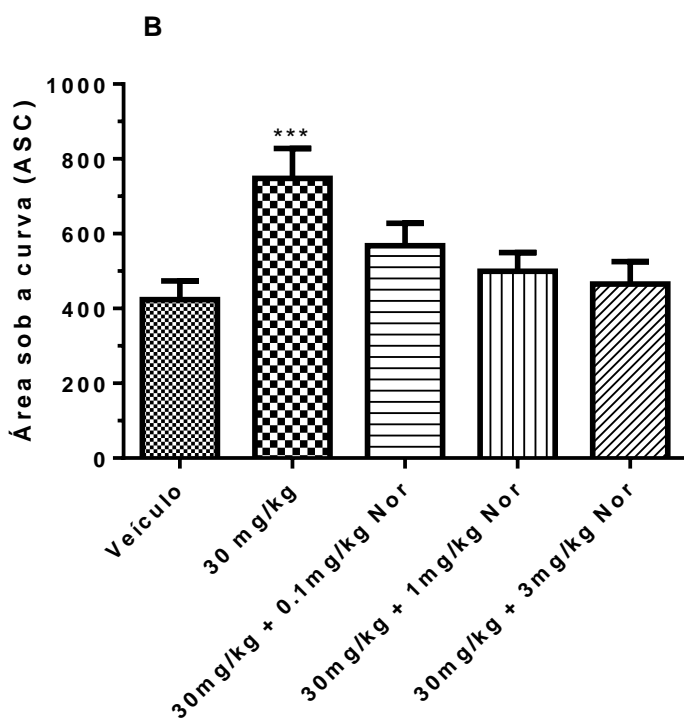
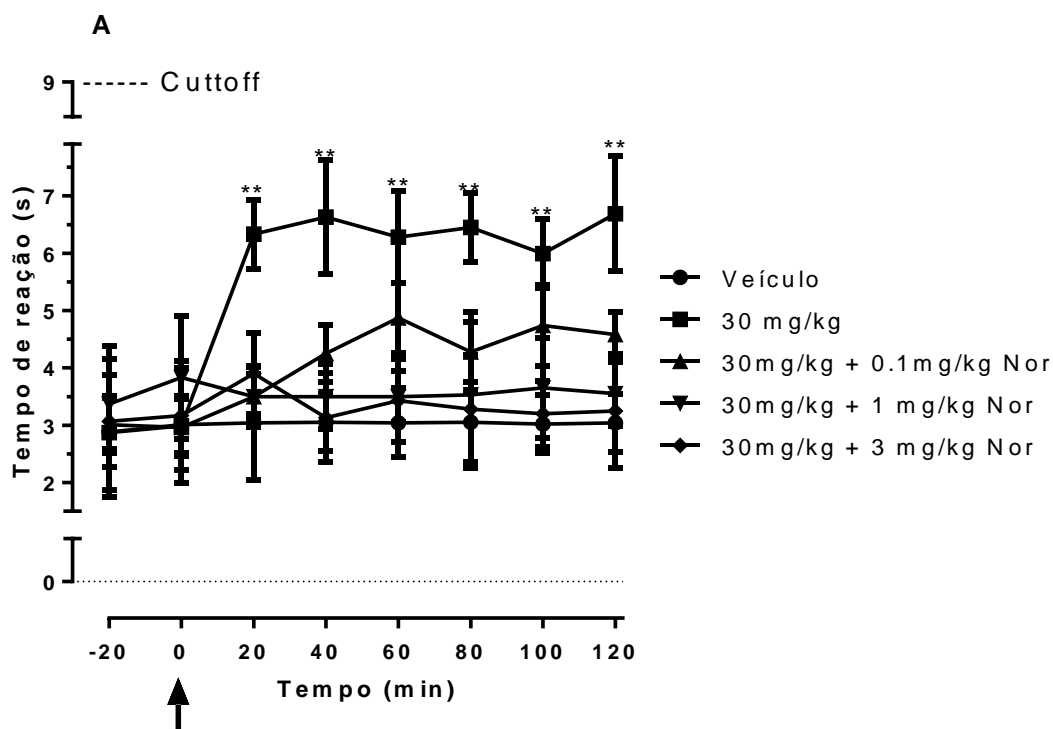


Figura 16 - Influência da administração prévia de nor-binaltorfimina sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) no modelo de retirada da cauda. Em A, os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com Nor-Binaltorfimina (Nor -0,1; 1 e 3 mg/kg) 15 minutos antes da administração do composto. Em B, o gráfico representa a área sob a curva calculada para cada curva tempo-efeito no teste de retirada da cauda. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 7-10) do tempo de reação em

segundos. A significância estatística (\*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ) foi calculada entre o grupo veículo e os grupos tratados com o composto isoladamente e combinado a doses crescentes de Nor-Binaltorfimina, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni em A e por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni em B.

A administração prévia de metilnaltrexona (antagonista seletivo periférico do receptor  $\mu$  opioide) não interferiu no efeito antinociceptivo do composto CTHP em todas as doses utilizadas (Figura 17).

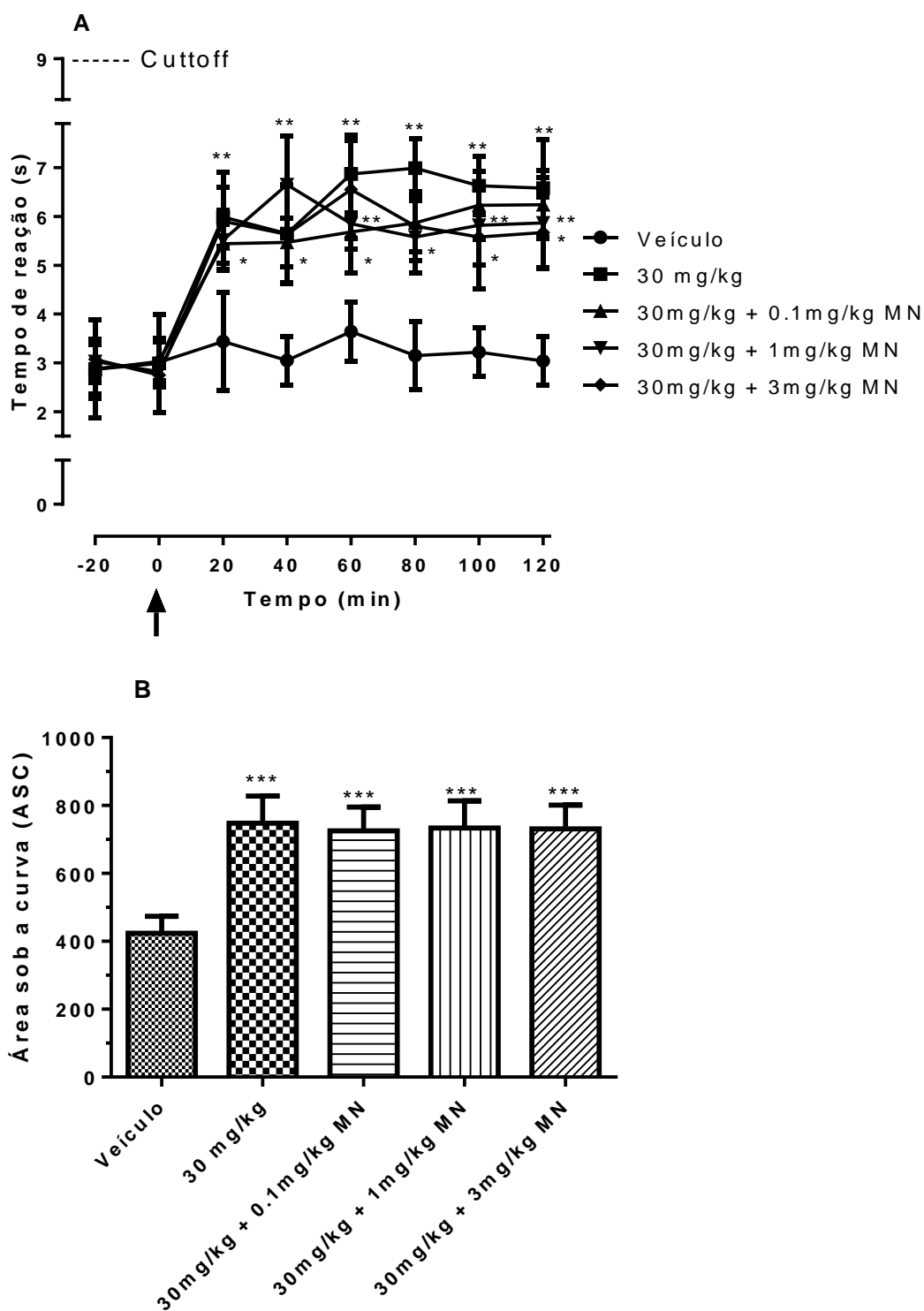


Figura 17 - Influência da administração prévia de metilnaltrexona sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto  $(\pm)$ -4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) no modelo de retirada da cauda. Em A, os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com Metilnaltrexona (MN -0,1; 1 e 3 mg/kg) 15 minutos antes da administração do composto. Em B, o gráfico representa a área sob a curva calculada para cada curva tempo-efeito no teste de retirada da cauda. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 7-10) do tempo de reação em

segundos. A significância estatística (\*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ) foi calculada entre o grupo veículo e os grupos tratados com o composto isoladamente e combinado a doses crescentes de metilnaltrexona, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni em A e por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni em B.

#### 5.4 Indução de tolerância

Neste teste, os animais foram tratados com o composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) na dose de 30 mg/kg ou morfina (8,15 mg/kg). Os resultados mostram que, com a progressão do tratamento, tanto a morfina quanto o composto CTHP desenvolveram tolerância. E o pré-tratamento com veículo não induziu qualquer alteração na linha de base, isso indica que os animais não se tornaram adaptados ao equipamento (Figura 18). Com a administração da morfina, podemos notar que houve uma redução drástica da atividade antinociceptiva já no 2º dia de tratamento, e no 6º dia, atingindo efeito similar ao apresentado pelo grupo veículo. Já com a administração crônica do composto, a tolerância se manifestou somente no 4º dia de tratamento.

Pode-se observar ainda que houve o desenvolvimento de tolerância cruzada, pois após serem realizados seis dias consecutivos de administração do fármaco opioide (morfina) e este desenvolveu tolerância, administramos o composto CTHP no 7º dia e este manteve o baixo nível de efeito, demonstrando tolerância a um fármaco que até então estes animais não haviam recebido (tolerância cruzada), sendo esta mais uma evidência da ação do composto CTHP sobre os receptores opioides.

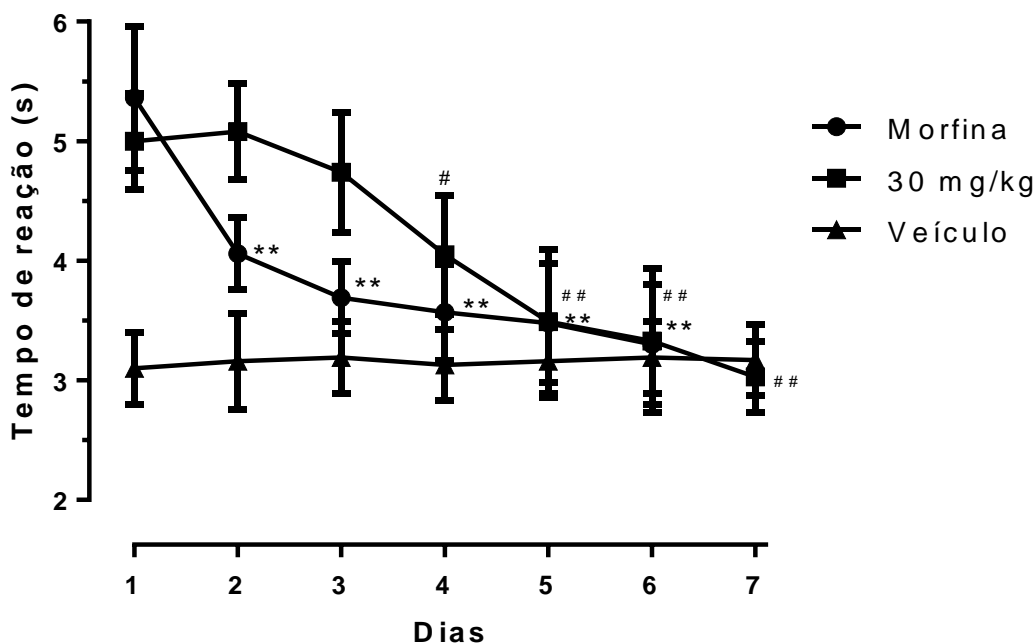


Figura 18 - Desenvolvimento de tolerância e tolerância cruzada induzida pelo composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) no modelo de retirada da cauda. A resposta de retirada de cauda foi registrada 60 minutos após cada administração do composto, diariamente. Tolerância cruzada: efeito antinociceptivo após a administração do composto (30 mg/kg) no 7º dia, após 6 dias de tratamento com morfina (8,15 mg/kg). Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 7-10) do tempo de reação em segundos. A significância estatística (\*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ) foi calculada entre o 1º dia de tratamento da morfina com os dias

subsequentes de tratamento com a morfina e a significância estatística (#  $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  e ### $p < 0,001$ ) foi calculada entre o 1º dia de tratamento do composto com os dias subsequentes de tratamento com o composto, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

### **5.5 Avaliação da via NO/GMP<sub>c</sub>/K<sub>ATP</sub> sobre o efeito antinociceptivo do composto (±)-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol no modelo de retirada da cauda.**

Para avaliar a possível participação da via NO/GMP<sub>c</sub>/K<sub>ATP</sub> no mecanismo de antinocicepção do composto (±)-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP), os animais foram pré-tratados com N-nitro-arginina-L-metil éster - L-NAME (0,1; 0,5 e 1 mg/kg, i.p.; inibidor da óxido nítrico sintase), como demonstrado na figura 19. Os resultados demonstram que a via L-arginina-NO tem uma possível participação no mecanismo do composto, já que a maior dose de L-NAME utilizada (1 mg/kg) foi capaz de inibir completamente a antinocicepção causada pelo composto CTHP.

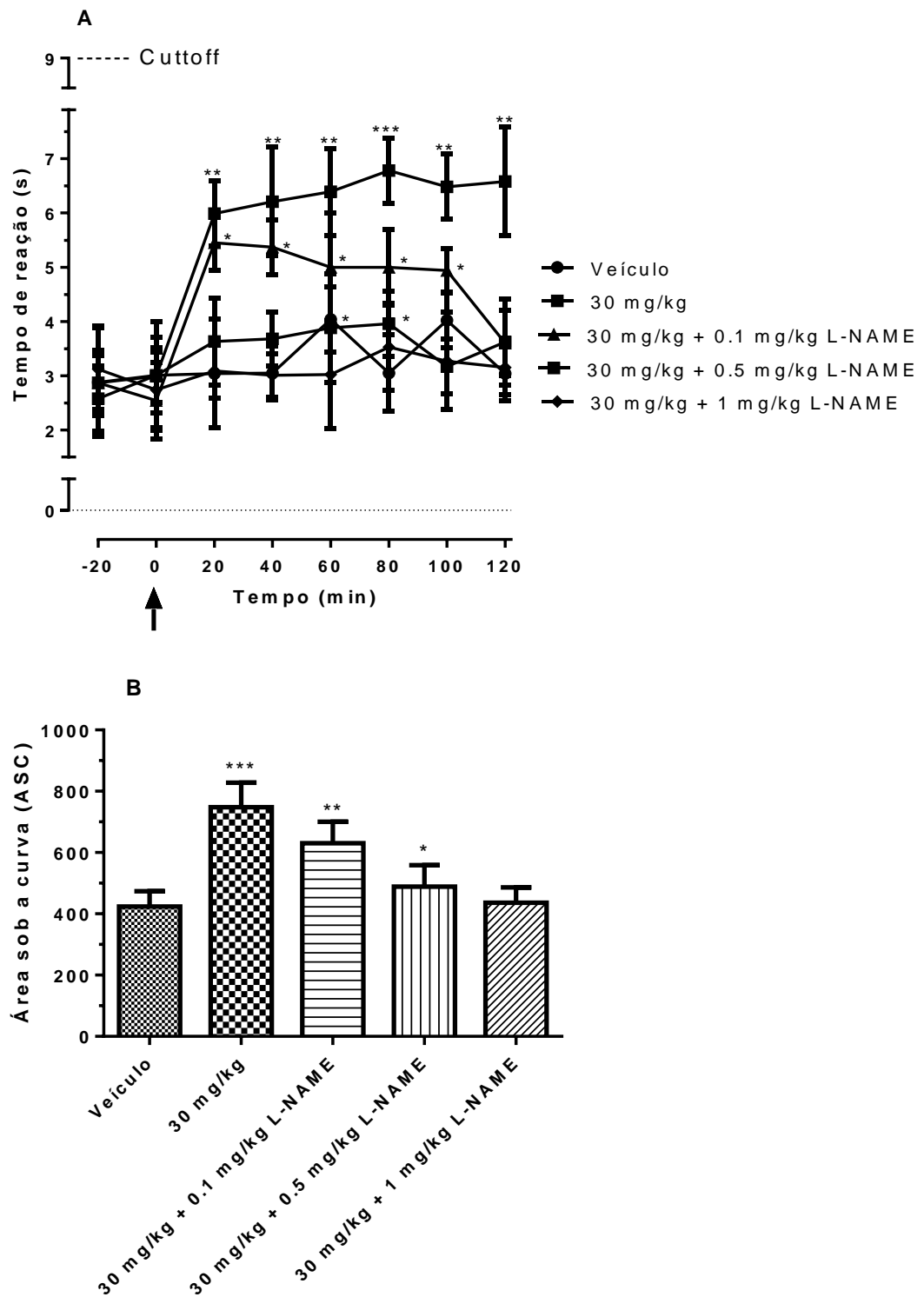


Figura 19 - Influência da administração prévia de N-nitro-arginina-L-metil éster - L-NAME sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) no modelo de retirada da cauda. Em A, os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com N-nitro-arginina-L-metil éster (L-NAME 0,1; 0,5 e 1 mg/kg) 15 minutos antes da administração do composto. Em B, o gráfico representa a área sob a curva calculada para



**cada curva tempo-efeito no teste de retirada da cauda. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 7-10) do tempo de reação em segundos. A significância estatística (\* p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo veículo e os grupos tratados com o composto isoladamente e combinado a doses crescentes de L-NAME, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni em A e por One-Way ANOVA via seguida pelo teste de Bonferroni em B.**

Posteriormente, foi avaliado a influência da pré-tratamento dos animais com 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) (inibidor da guanilato ciclase sensível ao óxido nítrico). O tratamento prévio dos animais com ODQ foi capaz de reduzir o efeito antinociceptivo induzido pelo composto, não havendo diferença significativa entre o veículo e o grupo pré-tratado com a dose de 2 mg/kg de ODQ (Figura 20).

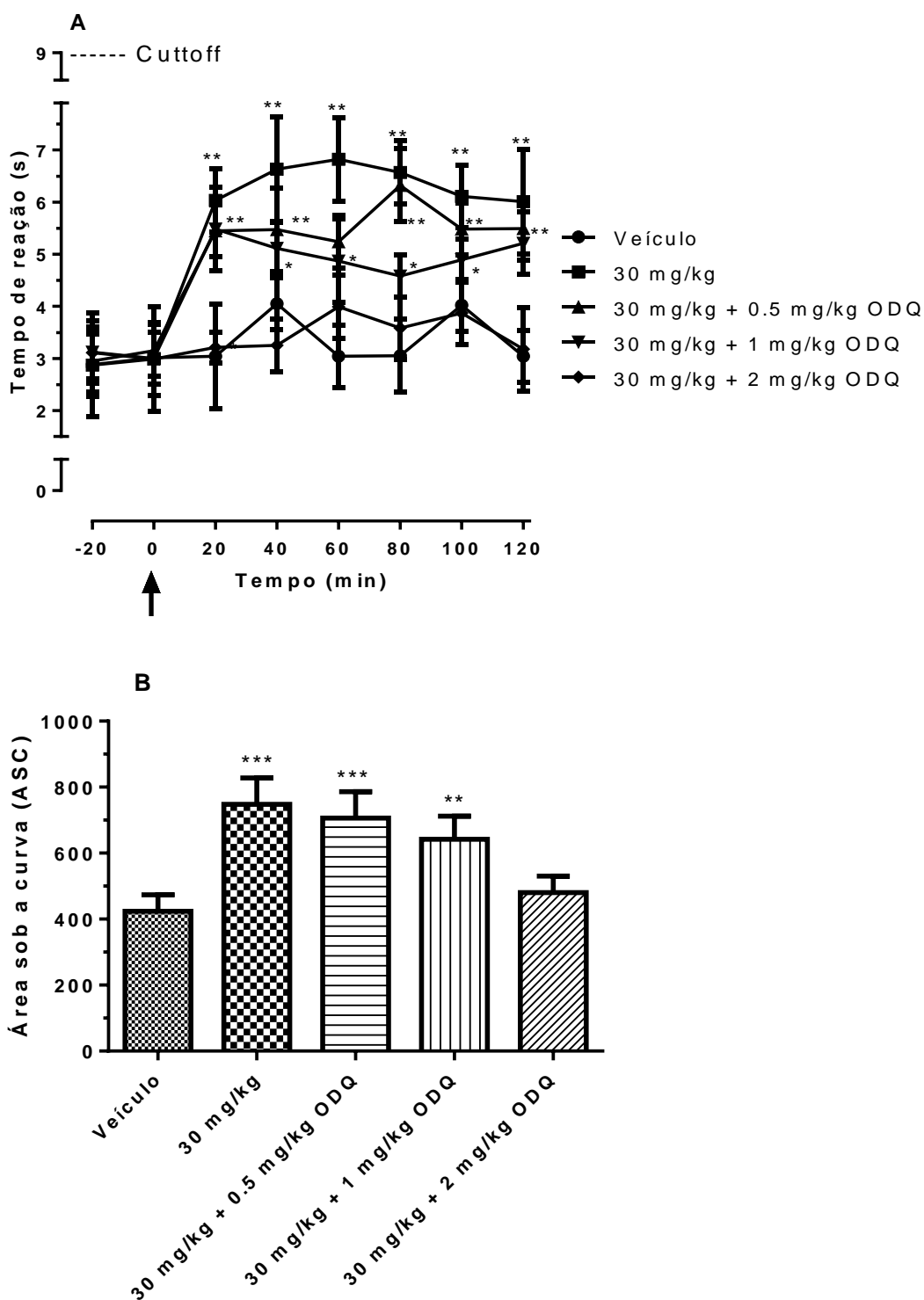


Figura 20 - Influência da administração prévia de 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto (±)-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) no modelo de retirada da cauda. Em A, os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ 0,5; 1 e 2 mg/kg) 15 minutos antes da administração do composto. Em B, o gráfico representa a área sob a curva calculada para cada curva tempo-efeito no teste de retirada da cauda. Os

resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 7-10) do tempo de reação em segundos. A significância estatística (\* p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo veículo e os grupos tratados com o composto isoladamente e combinado a doses crescentes de ODQ, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni em A e por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni em B.

Avaliou-se também o envolvimento de canais de potássio regulados por ATP no mecanismo de ação do composto CTHP administrando-se glibenclamida previamente à administração do composto. A glibenclamida reduziu completamente o efeito antinociceptivo com a maior dose utilizada (1 mg/kg) (Figura 21).

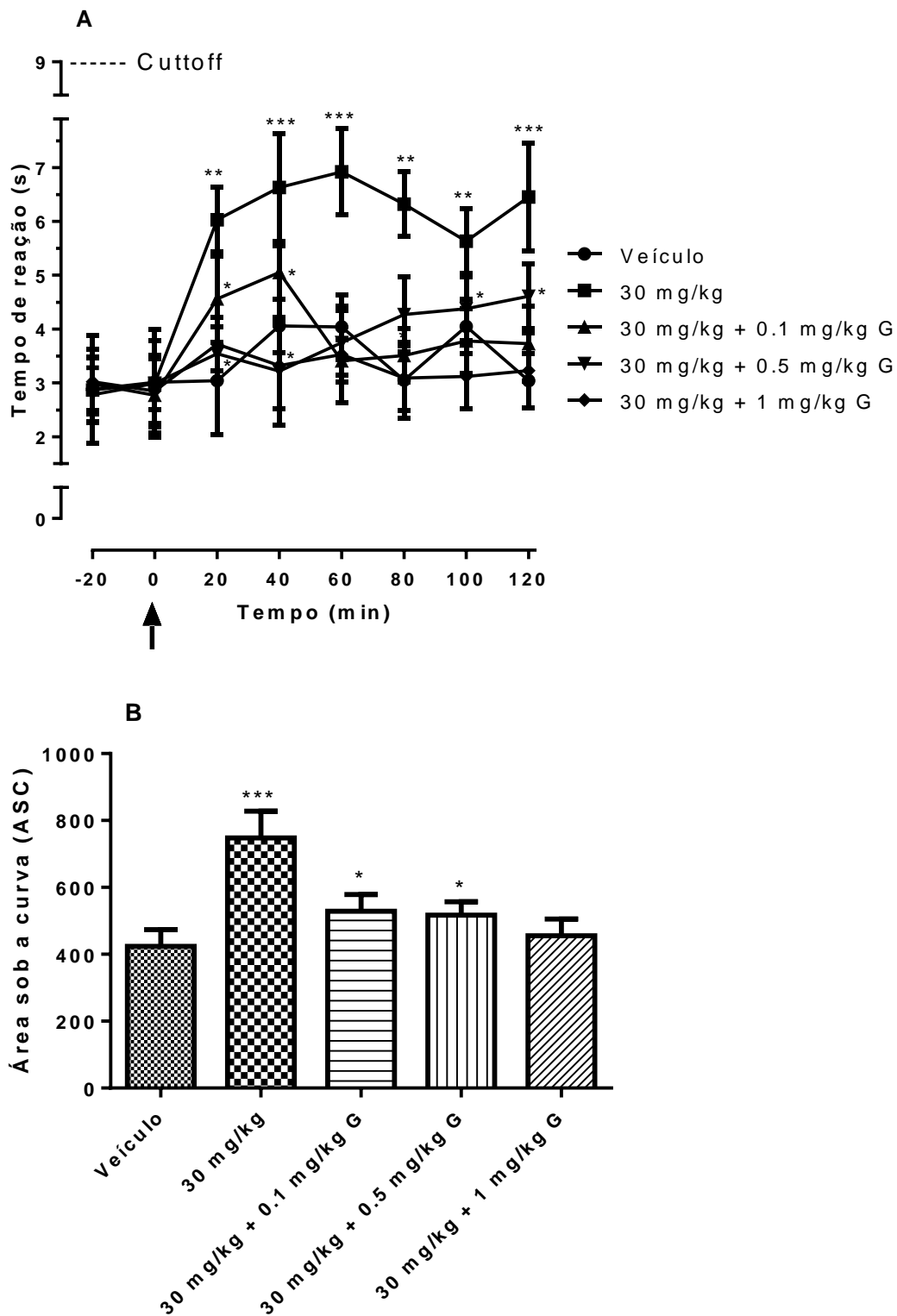


Figura 21 - Influência da administração prévia de glibenclamida sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto  $(\pm)$ -4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) no modelo de retirada da cauda. Em A, os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com glibenclamida (G 0,1; 0,5 e 1 mg/kg) 15 minutos antes da administração do composto. Em B, o gráfico representa a área sob a curva calculada para cada curva tempo-efeito no teste de retirada

da cauda. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 7-10$ ) do tempo de reação em segundos. A significância estatística (\*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ) foi calculada entre o grupo veículo e os grupos tratados com o composto isoladamente e combinado a doses crescentes de Glibenclamida, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni em A e por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni em B.

### 5.6 Avaliação da via serotoninérgica sobre o efeito antinociceptivo do composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol no modelo de retirada da cauda.

Para avaliar o envolvimento da via serotoninérgica no que diz respeito à produção e liberação de serotonina endógena na atividade do ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP), foi realizada a administração diária por 3 dias de 4-cloro-DL-fenilalanina (inibidor da enzima triptofano hidroxilase). Nenhuma alteração no efeito antinociceptivo do composto CTHP foi observado (Figura 22).

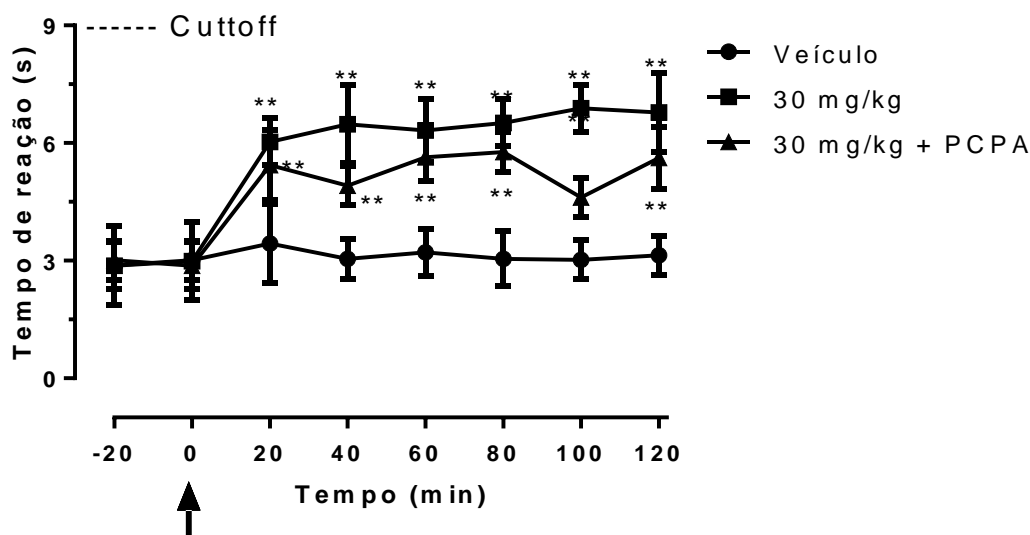


Figura 22 - Envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito do composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP). Os animais foram pré-tratados com 4-cloro-DL-fenilalanina (PCPA) intraperitonealmente na dose de 100 mg/kg por 3 dias consecutivos e posteriormente receberam o composto ou foram administrados somente com o composto (30 mg/kg). Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 7-10$ ) do tempo de reação em segundos. A significância estatística (\*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ) foi calculada entre o grupo veículo e os grupos tratados com o composto isoladamente e combinado ao tratamento prévio com PCPA, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

### 5.7 Modelo de campo aberto

Neste modelo, os animais foram tratados por via oral com o composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) (30 mg/kg; v.o), veículo e morfina (8,15 mg/kg). A figura 23 demonstra que esta dose de 30 mg/kg não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, mostrando que a atividade observada nos modelos nociceptivos não está relacionada ao desenvolvimento de déficit motor. O grupo da morfina apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle (tratado somente com veículo), pois apresenta atividade hipnótica, possivelmente responsável pelo efeito observado.

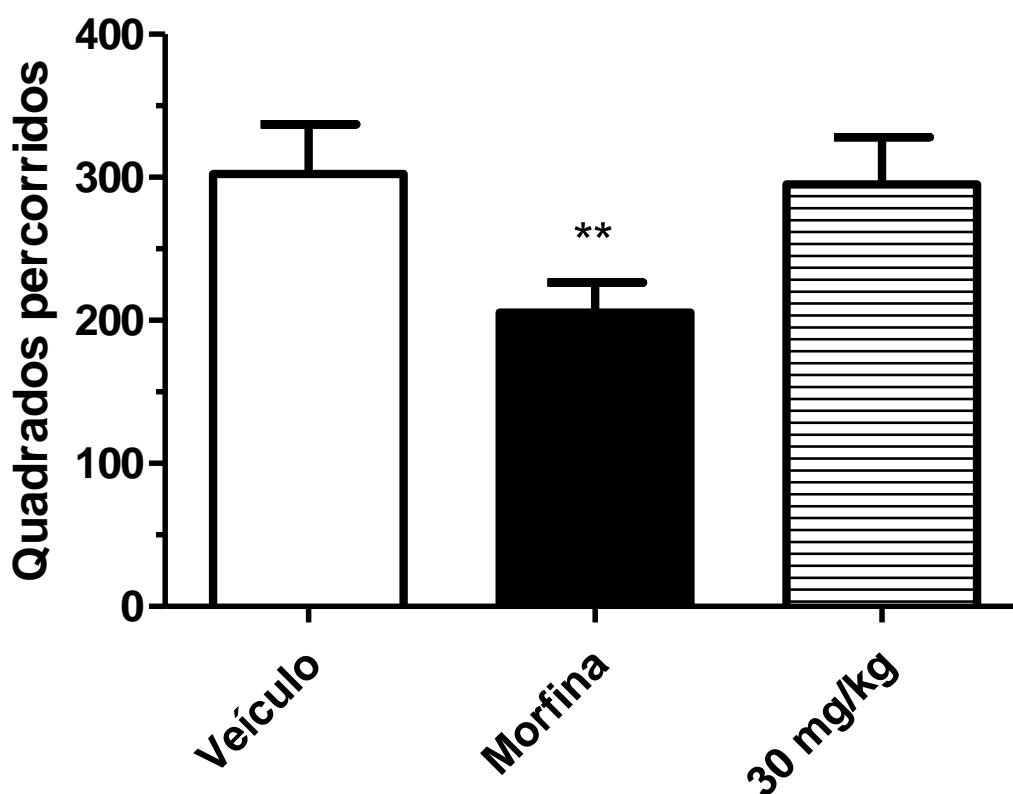


Figura 23 - Avaliação do composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) no modelo de campo aberto. Os tratamentos com o veículo, composto (30 mg/kg) e morfina (8,15 mg/kg) foram realizados por via oral. A significância estatística (\*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ) foi calculada entre o grupo veículo e os grupos tratados com morfina e composto, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

### 5.8 Modelo de edema de pata

Neste teste, os animais foram tratados com o composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) (5, 10 e 30 mg/kg; v.o). O fármaco padrão dexametasona (2,5 mg/kg; s.c) foi utilizado como controle positivo. Os animais receberam carragenina 1% (0,02 mL; intraplantar). A figura 24 demonstra que todas as doses do composto CTHP apresentaram diferença significativa em relação ao grupo veículo, indicando o efeito anti edematogênico do composto.

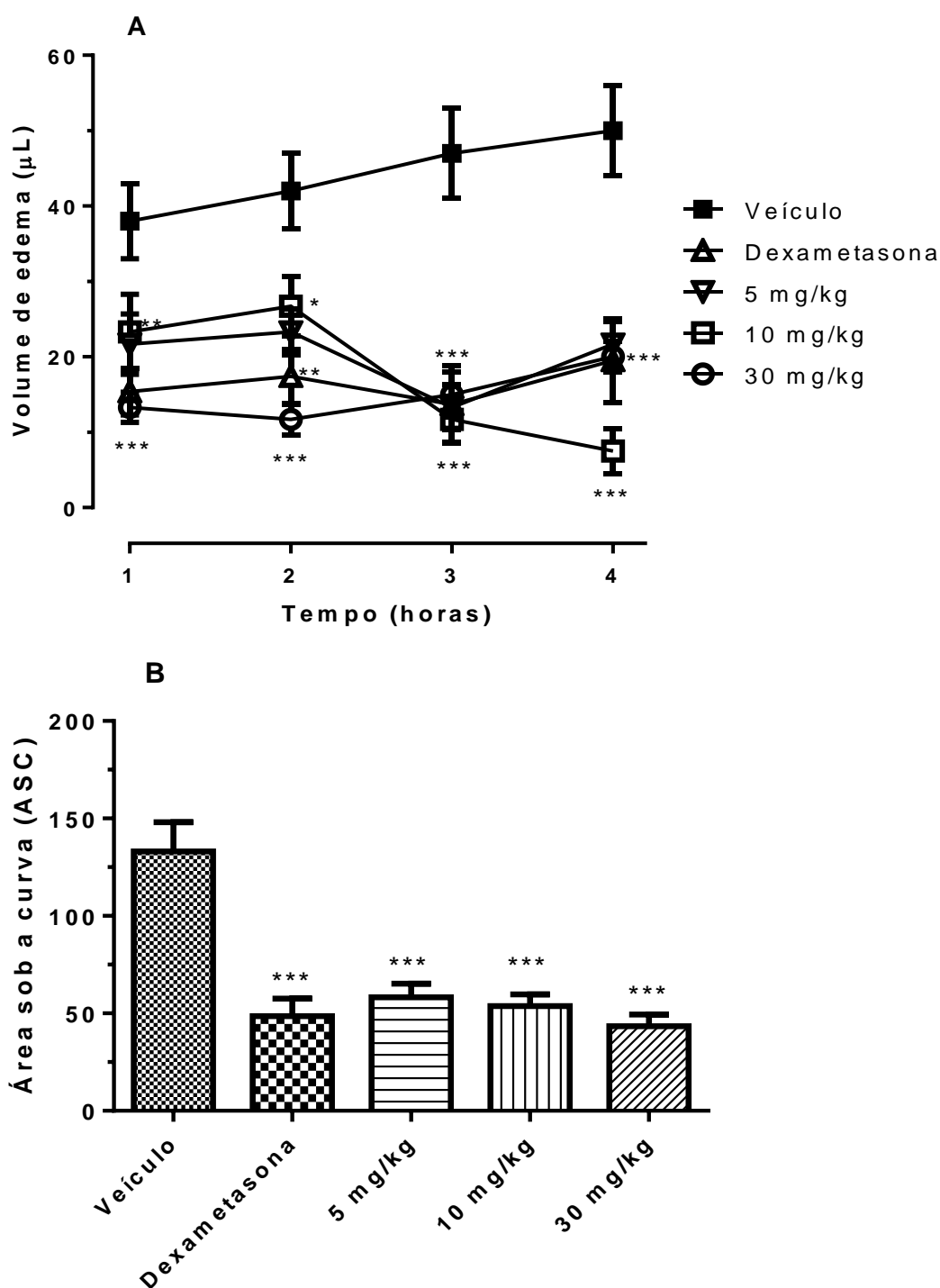


Figura 24 - Efeito do composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) no teste de edema de pata. Em A, os animais foram pré-tratados com veículo, dexametasona (2,5 mg/kg; s.c.) e o composto (5, 10 e 30 mg/kg). Em B, o gráfico representa a área sob a curva calculada para cada curva tempo-efeito no teste de edema de pata. A carragenina foi aplicada nas patas dos animais em todos os grupos. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 6) do volume de edema da pata. A significância estatística (\* p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo veículo e os grupos tratados com a dexametasona e doses

crescentes do composto, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni em A e por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni em B.

### 5.9 Modelo da bolsa de ar subcutâneo (air pouch)

O tratamento foi realizado com o composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) (5, 10 e 30 mg/kg; v.o). A dexametasona (2,5 mg/kg) administrada por via subcutânea foi usada como controle positivo. E o grupo veículo foi tratado com solução salina ou com carragenina 1% (0,1 mL; s.c). Os grupos tratados com as doses de 5, 10 e 30 mg/kg do composto e 2,5 mg/kg da dexametasona foram comparados com o grupo veículo. Observamos que houve uma diminuição na quantidade de leucócitos totais nos grupos tratados com as doses de 10 e 30 mg/kg, indicando que o composto CTHP foi capaz de reduzir a migração leucocitária na inflamação existente na bolsa de ar subcutâneo (Figura 25).

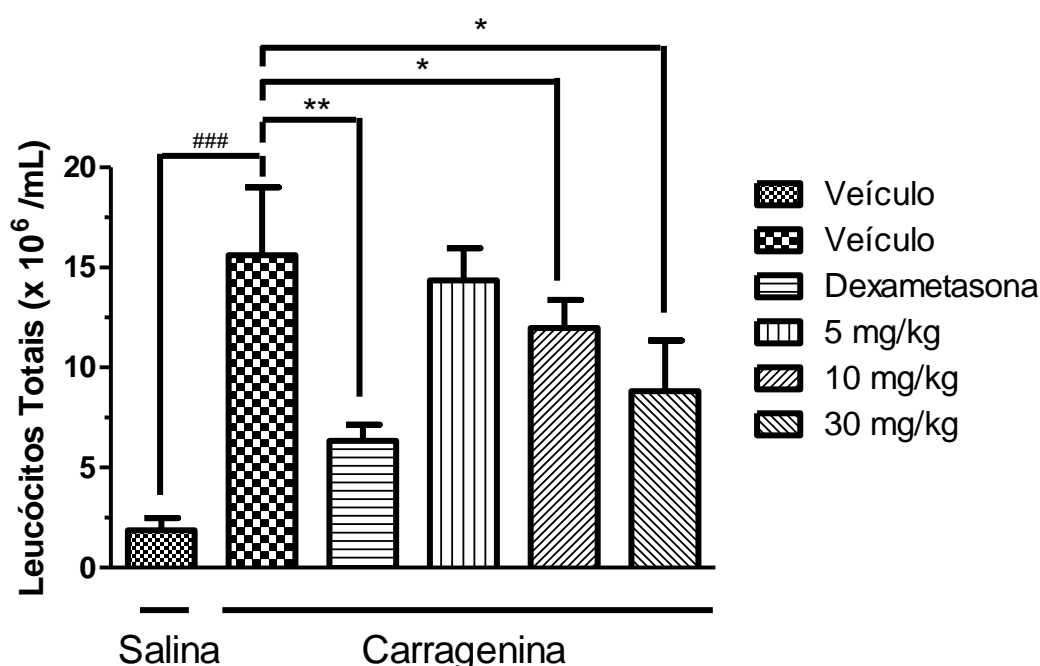


Figura 25 - Efeito do composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) na quantificação de leucócitos totais a partir do teste bolsa de ar subcutâneo. Os animais foram pré-tratados com veículo, dexametasona (2,5 mg/kg; s.c.) e o composto (5, 10 e 30 mg/kg). Na bolsa de ar subcutâneo foram aplicadas solução salina e carragenina. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 7-10) do número de leucócitos totais. A significância estatística (\* p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo veículo e os grupos tratados com a dexametasona e doses crescentes do composto e a significância estatística (# p < 0,05, ##p < 0,01 e ###p < 0,001) foi calculada entre o grupo que recebeu solução salina e o que recebeu carragenina, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

### 5.10 Quantificação de citocinas

Na determinação da produção de TNF- $\alpha$ , observamos que a administração do composto CTHP foi capaz de inibir a produção desta citocina somente com a dose de 30 mg/kg; por outro lado não alterou a concentração de IL-1 $\beta$  no exsudato inflamatório (Figura 26). A administração subcutânea de dexametasona reduziu a concentração de ambas as citocinas.



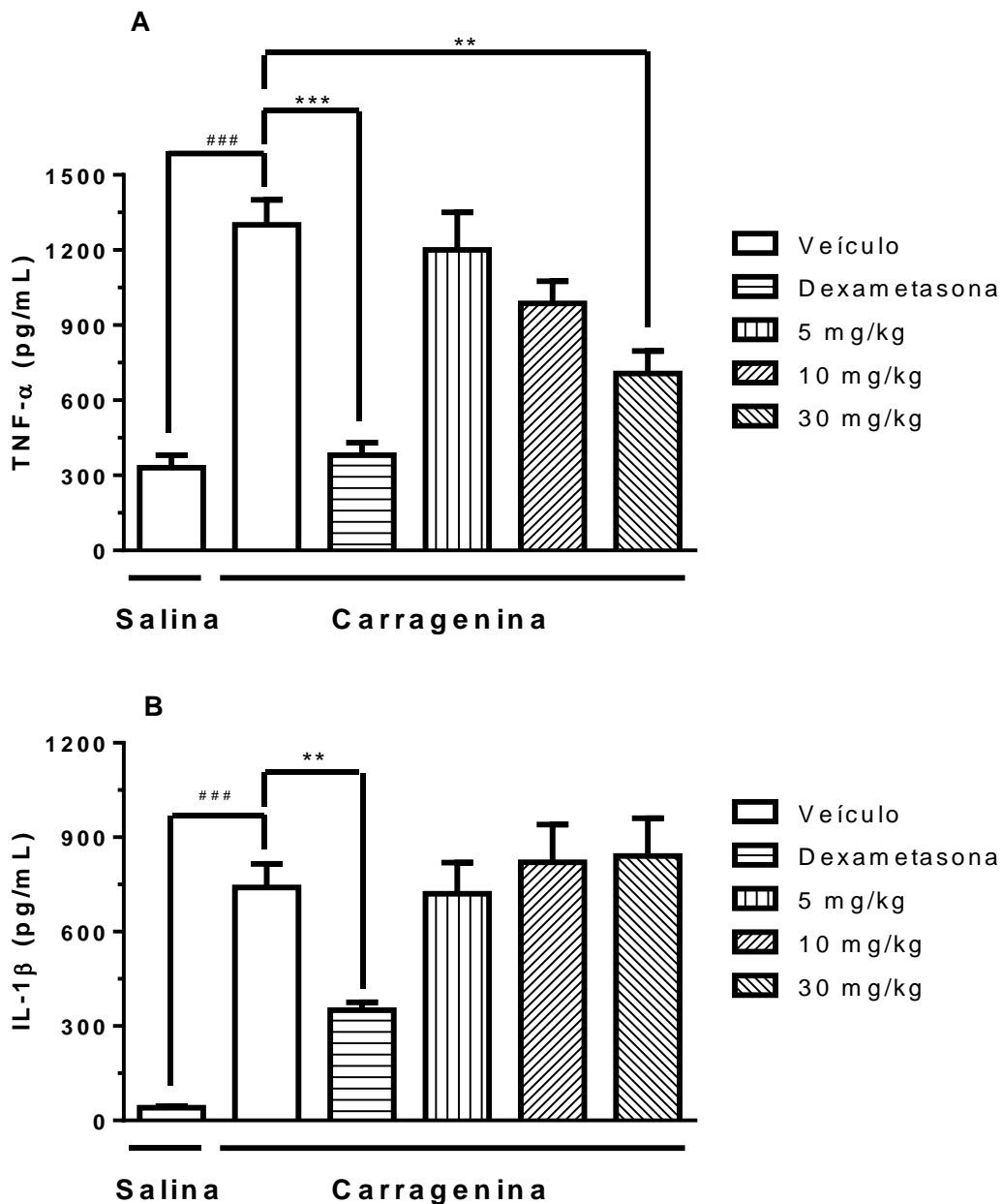


Figura 26 - Efeito do composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) na quantificação de citocinas a partir do teste bolsa de ar subcutâneo. Os animais foram pré-tratados com veículo, dexametasona (2,5 mg/kg; s.c) e o composto (5, 10 e 30 mg/kg; v.o). Na bolsa de ar subcutâneo foram aplicadas solução salina e carragenina. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 7-10) da concentração de TNF- $\alpha$  (A) e IL-1 $\beta$  (B). A significância estatística (\* p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo veículo e os grupos tratados com a dexametasona e doses crescentes do composto e a significância estatística (# p < 0,05, ##p < 0,01 e ###p < 0,001) foi calculada entre o grupo que recebeu solução salina e o que recebeu carragenina, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

### 5.11 Avaliação da atividade enzimática de COX-1 e COX-2

A tabela 3 foi construída com o auxílio da curva padrão de prostaglandina (Figura 10). Observamos a capacidade do composto em diretamente inibir a enzima cicloxigenase (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 determinação do  $CI_{50}$  (concentração inibitória de 50%). A  $CI_{50}$  do composto CTHP frente à COX-1 foi de 840,4  $\mu\text{g/mL}$ , já a  $CI_{50}$  do composto frente à COX-2 foi de 73,16  $\mu\text{g/mL}$ . Esta inibição enzimática promovida pelo composto se dá de forma seletiva para a isoforma COX-2, pois apresenta um  $CI_{50}$  inferior para a COX-2, ou seja, o composto consegue inibir 50% da atividade enzimática de COX-2 com a utilização de uma concentração mais baixa do composto (Figura 27). O índice de seletividade (IS) obtido para o composto foi de 11,49; sendo que  $IS = CI_{50}COX-1/CI_{50}COX-2$ ;  $IS > 1$  – seletividade para COX-2,  $IS < 1$  – seletividade para COX-1.

**Tabela 3 - 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	225,45	201,53	0	0
12,5	218,44	175,05	3,11	13,14
25	206,85	160,94	8,25	20,14
50	202,43	127,41	10,21	36,78
100	183,65	89,40	18,54	55,64
200	168,37	31,62	25,32	84,31

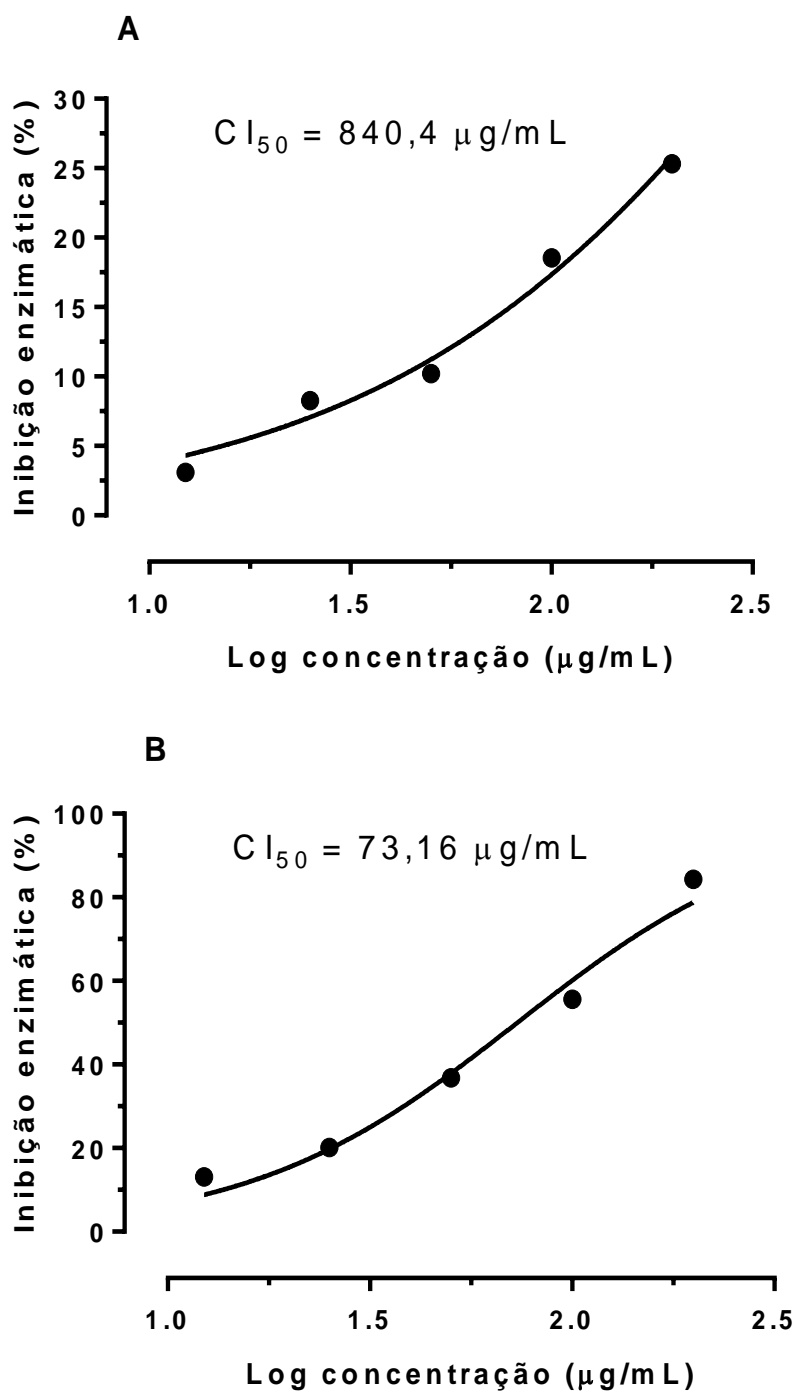


Figura 27 - Efeito de concentrações crescentes do composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) sobre a atividade enzimática de COX-1 e COX-2. Os resultados são expressos como percentuais de inibição enzimática. Foi utilizado o método de regressão não-linear para o cálculo de  $CI_{50}$ . O índice de seletividade (IS) obtido para o composto foi de 11,49; sendo que  $IS > 1$  – seletividade para COX-2,  $IS < 1$  – seletividade para COX-1.

### **5.12 Avaliação toxicológica aguda *in vivo*.**

O composto CTHP foi avaliado para a toxicidade aguda em camundongos. Nenhum sintoma de intoxicação (convulsão, hiperatividade, perda de reflexo, alteração da frequência respiratória e sedação) foi observado nos animais. O composto CTHP não produziu toxicidade após administração oral ( $DL_{50} > 500$  mg/kg).

## 6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) foram testadas em modelos de nocicepção e de inflamação em camundongos.

Para iniciar o estudo da atividade antinociceptiva, o modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético foi o primeiro a ser realizado. Este modelo tem sido utilizado como um modelo clássico para avaliar o potencial antinociceptivo de novos agentes analgésicos (MOHAMAD e cols., 2010).

Quando o ácido acético é administrado por via intraperitoneal, ocorre uma reação dolorosa e uma inflamação aguda na área peritoneal. A estimulação de nociceptores é indireta e ocorre com a liberação de substâncias endógenas, que por sua vez, estimulam terminações nervosas (ALVARENGA e cols., 2013). A nocicepção observada neste modelo tem sido relacionada a mediadores como PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  e PGI<sub>2</sub>, bem como produtos da lipoxigenase (PARVEEN e cols., 2007). Este modelo também induz a liberação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , mediadores diretamente ligados aos processos inflamatório e nociceptivo, tendo sido caracterizado que anticorpos anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-1 $\beta$  inibem as contorções abdominais (VERRI e cols., 2006), comprovando a relação do modelo com estes processos.

O composto CTHP foi capaz de inibir o número de contorções abdominais em relação ao grupo controle nas doses de 5, 10 e 30 mg/kg, demonstrando atividade antinociceptiva. O resultado apresentado neste modelo mostra uma atividade antinociceptiva inespecífica, incapaz de esclarecer sobre a ação central ou periférica do composto (NESS e GEBHART, 1990).

Para melhor caracterizar a atividade antinociceptiva do composto foi utilizado o teste da formalina, que se trata de um modelo mais específico, que permite discriminar a ação antinociceptiva sobre a dor inflamatória e não inflamatória. O mecanismo responsável pela ação nociceptiva da 1ª fase do teste, que se inicia imediatamente após a administração da formalina, é caracterizado pela direta ativação de fibras C sensoriais através de receptores TRPA1 (MCNAMARA e cols., 2007). Tem sido também relatado que mediadores como substância P e bradicinina participam deste mecanismo neurogênico (PARADA e cols., 2001). Fármacos que atuam a nível central (opioides) constituem os principais agentes atuantes nesta fase neurogênica de nocicepção (FERREIRA e cols., 2006). Na 2ª fase do teste, que ocorre após 15-30 min, mediadores inflamatórios resultantes da administração de formalina são liberados, incluindo prostaglandinas, serotonina, bradicinina, histamina, aminas simpatomiméticas, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas (HUNSKAAR e HOLE, 1987; TORNOS e cols., 1999; MILANO e cols., 2008). Fármacos que atuam principalmente no sistema nervoso central inibem igualmente ambas as fases, enquanto os fármacos de ação periférica inibem somente a fase II (FISCHER e cols., 2008).

Os resultados apresentados sugerem que as maiores doses do composto CTHP (10 e 30 mg/kg), assim como a morfina (um fármaco de ação central), demonstraram atividade sobre as duas fases do modelo, sugerindo atividade antinociceptiva central, enquanto o ácido acetilsalicílico demonstrou atividade somente na 2ª fase, sugerindo atividade antinociceptiva periférica-inflamatória.

Na tentativa de comprovar a atividade antinociceptiva central do composto CTHP, realizamos o teste de retirada de cauda com o uso de doses crescentes do composto, pois este método avalia os mecanismos espinhais envolvidos na antinocicepção, através de um estímulo térmico que provoca uma reação de retirada da

cauda dos animais por meio de um movimento reflexo de origem espinhal rápido e vigoroso (CAMARATA e YAKSH, 1985). Esse teste é considerado um reflexo espinhal, mas também pode envolver estruturas neurais superiores e, portanto, identifica principalmente analgésicos de ação central (LE BARS e cols., 2001). Além disso, é sensível para identificar a atividade de compostos presentes em extratos vegetais ou isolados a partir desses, além de sintéticos, cujos mecanismos sejam semelhantes aos promovidos pelos analgésicos opioides (OLIVEIRA e cols., 2008).

O composto CTHP produziu atividade antinociceptiva no teste de retirada da cauda com as maiores doses administradas (10 e 30 mg/kg), assim como a morfina. O composto CTHP apresentou um efeito mais precoce quando comparado à morfina, visto que por via oral a morfina apresenta biodisponibilidade reduzida devido à absorção intestinal irregular e efeito de primeira passagem hepático (BALTIERI e cols., 2004). Posteriormente, ainda com o modelo de retirada de cauda, os resultados demonstram que a naloxona (antagonista não-seletivo opioide) foi capaz de reduzir o efeito antinociceptivo do composto CTHP, evidenciando a participação da via opioide no seu mecanismo de ação.

O desenvolvimento de tolerância devido ao uso prolongado são características presentes em todos os fármacos opioides conhecidas, e essas são as principais limitações clínicas aos seus usos (OSSIPOV e cols., 2003; MERRER e cols., 2009). Exposições prolongadas e repetidas aos agonistas opioides reduzem a responsividade da proteína G acoplada a receptores opioides. Essa redução na função do receptor é responsabilizada por contribuir para a tolerância a opioides (VARGA e cols., 2003). Desse modo, foi avaliada a indução de tolerância através do teste de retirada da cauda para avaliar se com a administração crônica do composto CTHP, o mesmo desenvolveria tolerância. Conforme observado nos resultados, a morfina apresentou tolerância no 2º dia de tratamento, enquanto a administração diária do composto CTHP induziu tolerância mais tardia (somente no 4º dia).

A morfina é um poderoso analgésico, mas também um potente indutor de tolerância e dependência. A tolerância induzida por morfina requer um ajuste na dose (aumento) para que os níveis de analgesia sejam mantidos (BOHN e cols., 2000). A tolerância aos efeitos analgésicos da morfina resulta de complexas mudanças em várias vias bioquímicas e moleculares (STAROWICZ e cols., 2005).

O composto CTHP também demonstrou induzir tolerância cruzada, uma vez que após a administração diária de morfina por 6 dias consecutivos, a administração do composto no 7º dia não foi capaz de produzir efeito antinociceptivo.

No aprofundamento da investigação da participação seletiva de receptores opioides ( $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ ), nossos resultados demonstram que a nor-binaltorfimina (antagonista seletivo do receptor  $\kappa$  opioide) reduziu o efeito antinociceptivo do composto CTHP em todas as doses utilizadas, demonstrando o envolvimento deste receptor no mecanismo de ação do composto. Por sua vez, o bloqueio dos receptores  $\mu$  e  $\delta$  (pelos antagonistas metilnaltrexona e naltrindol, respectivamente) se mostraram ineficazes em reduzir o efeito do composto, determinando assim a ausência do envolvimento destes receptores na ação do composto.

O receptor opioide  $\kappa$  está presente no terminal pré-sináptico de neurônios e sua ativação causa hiperpolarização que previne a liberação do neurotransmissor excitatório na fenda sináptica, inibindo a geração de impulsos nos neurônios pós-sinápticos (MILLER, 1998). A literatura tem relatado que a ativação do receptor opioide  $\kappa$  é diretamente responsável pelo fechamento de canais de sódio (SU e cols., 2002; SU e cols., 2009) e pela abertura de canais de potássio sensíveis ao ATP, que é responsável

pela analgesia induzida pelo receptor opioide  $\mu$  (OCANA e cols., 2004). Os receptores opioides  $\kappa$  são encontrados na periferia, no gânglio da raiz dorsal, medula espinhal e regiões supra-espinhais associadas com a modulação da dor (VANDERAH, 2010). Além disso, os receptores opioides  $\kappa$  têm demonstrado ativar vias inibitórias de condução da dor no sistema nervoso central (PAN e cols., 1997).

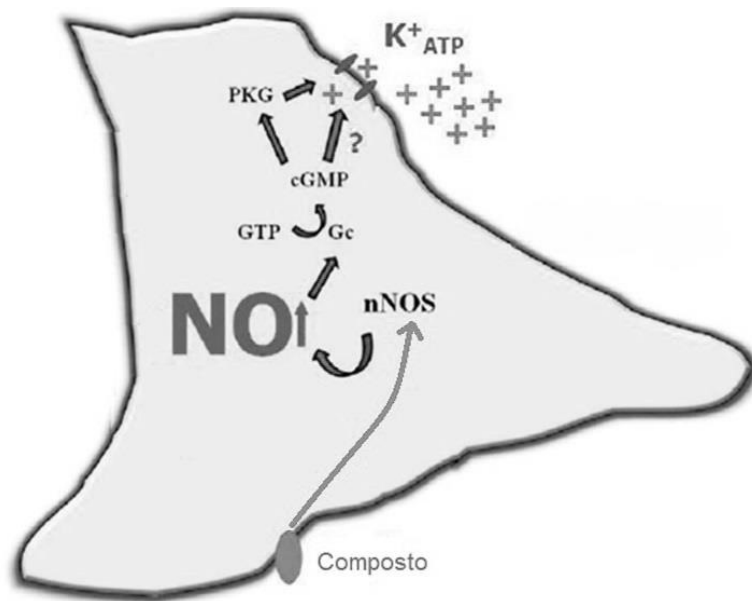
Diversos mecanismos moleculares estão envolvidos na ação analgésica dos opioides. Estes mecanismos incluem a abertura de canais de potássio, com consequente hiperpolarização da membrana celular e/ou a inibição do sistema adenil ciclase, diminuindo a produção de AMPc (SCHULTZ E GROSS, 2001) e inibindo canais de cálcio voltagem dependentes. A redução do influxo de cálcio nas fibras nervosas acarreta em inibição da liberação de neurotransmissores, contribuindo para a diminuição da transmissão sináptica do impulso nervoso (DICKENSON E SULLIVAN, 1987; LAW e cols., 2000).

A participação do óxido nítrico (NO) e do GMPc no efeito analgésico periférico de opioides foi evidenciada pela observação de que inibidores da enzima responsável pela síntese de NO, ou da guanilil ciclase, revertem o efeito destes fármacos, quando avaliados em modelos de hipernocicepção inflamatória aguda (FERREIRA, 1990; AMARANTE E DUARTE, 2002).

Um estudo demonstrou, por meio de ensaios *in vivo* e *in vitro*, que a ativação da via do NO, pela morfina e de agonista de receptores opioides do tipo  $\kappa$ , é dependente da estimulação de PI<sub>3</sub>K $\gamma$ /AKT. Uma vez sintetizado, o NO é capaz de estimular a enzima guanilato ciclase a catalisar a conversão do trifosfato de guanosina (GTP) em GMPc (CUNHA e cols., 2010)

Vários estudos experimentais demonstram que a síntese de GMPc pelo NO, promove a abertura de canais para potássio sensíveis à ATP (K<sub>ATP</sub>) (SOARES E DUARTE, 2001). O GMPc é capaz de modular, direta ou indiretamente (via ativação da proteína quinase G, PKG), a atividade destes canais, favorecendo o efluxo de íons potássio e a hiperpolarização da célula neuronal, resultando em antinocicepção (HAN e cols., 2001). A PKG é uma proteína quinase que é estimulada seletivamente, mas não exclusivamente, pelo GMPc. Uma vez estimulada, a PKG induz a inibição da atividade da fosfolipase C, do 1, 4, 5-inositol trifosfato e de canais de Ca<sup>2+</sup>, além de estimular a atividade da Ca<sup>2+</sup> ATPase e de canais de K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> (SACHS e cols., 2004).

Baseado nisto, a prévia administração de doses crescentes de 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<sup>+</sup> sensível ao ATP) foram capazes de reduzir o efeito antinociceptivo do composto CTHP, mostrando que existe o envolvimento de uma via em seu mecanismo de ação (via NO/GMPc/K<sub>ATP</sub>), através de sua ativação sequencial (Figura 28). Este efeito é consequência da ativação da guanilato ciclase, com subsequente elevação dos níveis intracelulares de GMPc, ativação de proteína quinase G (PKG) e abertura de canais de potássio (ALVES e DUARTE, 2002).



**Figura 28 - Proposta do mecanismo de ação do composto CTHP (Adaptada de Cury e cols., 2011)**

O sistema serotoninérgico é uma das vias que tem um papel relevante na modulação da nocicepção, por isso também foi avaliada sua participação na atividade antinociceptiva do composto. A serotonina tem sido associada com o processamento e modulação da dor tanto no Sistema Nervoso Central quanto no Periférico. 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<sub>1A</sub>, 5HT<sub>2</sub> e 5HT<sub>3</sub> estão presentes nas fibras aferentes do tipo C. 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). O PCPA é um inibidor reversível da enzima triptofano hidroxilase e incorpora-se à enzima para produzir uma proteína inativa. Esta inativação provoca depleção de estoques de 5-HT no encéfalo, tecidos periféricos e sangue. Porém, esta depleção serotoninérgica não interfere com os efeitos demonstrados pelo composto CTHP, indicando que não há envolvimento da via serotoninérgica sobre o efeito do composto.

O modelo do campo aberto foi realizado para excluir a possibilidade da ação antinociceptiva do composto CTHP estar relacionada a um comprometimento na atividade locomotora dos animais. Os resultados mostraram que as doses do composto que tiveram ação antinociceptiva não alteraram o desempenho motor dos camundongos. Nesse contexto, foi relatado que vários fármacos analgésicos com ação depressora sobre o sistema nervoso central e muscular podem reduzir a coordenação motora em animais, bem como a expressão de comportamentos nociceptivos (SOJA e cols., 2002).

No estudo da atividade anti-inflamatória, o composto CTHP foi avaliado no modelo do edema de pata induzido por carragenina, onde o mesmo foi capaz de reduzir significativamente o edema com todas as doses testadas (5, 10 e 30 mg/kg). Este é um modelo experimental amplamente utilizado para triagem de substâncias de caráter anti-inflamatório e tem sido frequentemente utilizado para avaliar o efeito antiedematogênico, exibindo um elevado grau de reprodutibilidade (THOMAZZI e cols., 2010).



Este envolve a participação de uma ampla variedade de mediadores inflamatórios, como histamina e serotonina (primeira fase, que ocorre entre 1 e 2 horas), responsáveis pelo desenvolvimento de eventos vasculares, e em uma segunda fase (entre 3 e 6 horas) ocorre a participação de citocinas (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ), prostaglandinas e óxido nítrico (DI ROSA e cols., 1971; ZHU e cols., 2011). O edema também é caracterizado por um intenso infiltrado de células, onde a presença de neutrófilos se destaca (WINTER e cols., 1962; DAWSON e cols., 1991).

Para melhor caracterizar o efeito anti-inflamatório do composto CTHP, foi executado o modelo da bolsa de ar subcutâneo. O tecido da bolsa é composto por linhagens de células que consistem inicialmente de macrófagos e fibroblastos, semelhantes à cavidade sinovial. Este modelo permite quantificar a resposta inflamatória a partir da avaliação do volume e composição do exsudato, pois pode ser injetada uma variedade de substâncias consideradas irritantes para produzir inflamação nesta área (DUARTE e cols., 2012).

A injeção de carragenina na bolsa de ar produz uma reação inflamatória não imunológica, caracterizada pela produção acentuada de mediadores inflamatórios, incluindo prostaglandinas, leucotrienos e citocinas, bem como influxo significativo de leucócitos, principalmente neutrófilos. Estes parâmetros podem ser quantificados e utilizados para determinar o grau de inflamação, a resolução da inflamação ou a atividade anti-inflamatória de fármacos (DUARTE e cols., 2012; JAIN e cols., 2011). O influxo leucocitário a partir do sangue para o sítio da inflamação representa um passo crucial na resposta inflamatória. Reações inflamatórias iniciais são caracterizadas por um influxo de neutrófilos para o tecido inflamado, enquanto que mais tardiamente um intenso fluxo de eosinófilos e células mononucleares são observados. Nossos resultados mostram uma significativa migração leucocitária na bolsa de ar 4h após a aplicação de carragenina. Esta migração foi inibida pela administração do composto CTHP.

O tratamento com o composto resultou em um pronunciado efeito contra a inflamação aguda induzida pela carragenina. Tem sido demonstrado que a resposta inflamatória aguda induzida por carragenina em camundongos induz liberação de mediadores, como histamina, bradicinina, substância P e prostaglandinas, acompanhada pela exsudação e infiltração leucocitária no sítio inflamatório. Esta resposta inflamatória aguda é inibida pelos anti-inflamatórios não-esteroidais (MENEGAZZI e cols., 2008).

Nossos resultados revelam que o composto CTHP foi capaz de reduzir a concentração de TNF- $\alpha$  no exsudato inflamatório, mas não de IL-1 $\beta$ . TNF- $\alpha$  é uma citocina que desempenha um papel chave na resposta imune inata e está associada com migração celular e exsudação (VIGIL e cols., 2008). Já a IL-1 $\beta$  promove a expressão de moléculas de adesão, migração leucocitária e aumento da permeabilidade vascular, indicando que ela atua como importante mediador pró-inflamatório (HALLEGUA e WEISMAN, 2002). A inibição da migração leucocitária observada pode estar relacionada à redução dos níveis de TNF- $\alpha$  induzida pelo composto.

Nossos resultados também mostram a atividade inibitória seletiva do composto CTHP sobre a enzima cicloxigenase-2 (COX-2). A enzima cicloxigenase, também chamada de prostaglandina H sintase, é uma enzima bifuncional exibindo atividades ciclooxygenase e peroxidase. O componente cicloxigenase converte ácido araquidônico em prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>), e o componente peroxidase reduz o endoperóxido no álcool correspondente (Prostaglandina H<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>), o precursor das prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina (NUGTEREN e HAZELHOF, 1973).

Existem 3 isoformas de COX, que utilizam os mesmos substratos, produzem os mesmos produtos e catalisam a mesma reação, usando mecanismos catalíticos idênticos,

mas diferem na seletividade do inibidor (BALAJI e cols., 2014). A isoforma COX-1 apresenta um papel fundamental na manutenção da homeostase, principalmente em órgãos como os rins e estômago. Já a COX-2 é responsável por induzir condições inflamatórias e mediar a dor. A inibição da COX-1 é responsável pelos efeitos adversos gastrointestinais, enquanto a inibição da COX-2 seria responsável pelos efeitos terapêuticos dos anti-inflamatórios não-esteroidais (BANSAL e cols., 2014). Desta forma, podemos observar um menor potencial do composto CTHP em desenvolver efeitos adversos devido a sua seletividade pela isoforma COX-2. Esta ausência de efeitos adversos foi confirmada pela ausência destes após a administração oral aguda de 500mg/kg do composto CTHP no ensaio de toxicidade aguda.

## 7 CONCLUSÕES

Podemos pontuar as seguintes conclusões:

- O composto ( $\pm$ )-4-cloro-6-(naftaleno-1-il)-tetrahydro-2h-pirano-2-il-metanol (CTHP) possui atividade contra a nocicepção aguda induzida quimicamente, conforme observado nos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético 1,2% e da indução de dor pela injeção intraplantar de formalina 2,5%.
- O composto CTHP possui atividade antinociceptiva central, conforme observado pela ação nas 2 fases do modelo de formalina e no modelo de retirada de cauda.
- O mecanismo de ação antinociceptivo do composto CTHP está envolvido com o sistema opioide, mais especificamente envolvendo os receptores opioides  $\kappa$ , pois houve uma redução do efeito produzido pelo composto CTHP com a prévia administração de naloxona (antagonista não seletivo opioide) e nor-binaltorfimina (antagonista seletivo do receptor  $\kappa$  opioide) de forma dependente da dose do antagonista, no modelo de retirada de cauda.
- O composto CTHP, assim como a morfina, desenvolveu tolerância. Porém, a tolerância diante do composto se manifestou mais tardiamente, comparada à morfina. Houve desenvolvimento de tolerância cruzada, o que seria mais uma evidência da ação do composto CTHP sobre os receptores opioides.
- A via NO/cGMP/K<sub>ATP</sub> demonstra participação na atividade farmacológica do composto CTHP, comprovada devido à inibição completa da antinocicepção causada pelo composto com a administração prévia de L-NAME, 1H-[1,2,4] Oxadiazolo[4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ) e glibenclamida.
- A atividade antinociceptiva observada pelo composto CTHP não parece envolver diretamente a via serotoninérgica, uma vez que não foi observada nenhuma alteração na atividade do composto diante do tratamento prévio diário por três dias de 4-cloro-DL-fenilalanina.
- A atividade observada nos modelos nociceptivos não está relacionada ao desenvolvimento de déficit motor, conforme demonstrado pelo modelo de campo aberto.
- O composto CTHP apresenta efeito antiedematogênico, conforme demonstrado pelo modelo de edema de pata induzido por carragenina 1%.
- O composto CTHP possui atividade anti-inflamatória, conforme constatado pela sua capacidade em reduzir a migração leucocitária e a produção da citocina TNF- $\alpha$  na inflamação induzida pela carragenina no modelo de bolsa de ar subcutâneo.
- O composto CTHP inibiu de forma seletiva a atividade da enzima COX-2, conforme avaliação *in vitro* da atividade enzimática de COX.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES, M. M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1252p.
- 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-HASANI, R.; BRUCHAS, M. R. **Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior**. *Anesthesiology*, v. 115, n. 6, p. 1363-81, 2011.
- ALVARENGA, F.Q.; MOTA, B.C.F.; LEITE, M.N.; FONSECA, J.M.S.; OLIVEIRA, D.A.; ROYO, V.A.; SILVA, M.L.A.; ESPERANDIM, V.; BORGES, A.; LAURENTIZ, R.S. **In vivo analgesic activity, toxicity and phytochemical screening of the hydroalcoholic extract from the leaves of *Psidium cattleianum* Sabine**. *Journal of Ethnopharmacology* 150, 280–284, 2013.
- ALVES, D; DUARTE, I.D. **Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrone**. *Eur. J. Pharmacol.*; 444: 47-52. 2002.
- 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.*, v.454, n.1, p. 19-23, 2002.
- AMAYA, F; IZUMI, Y; MATSUDA, M; SASAKI, M. **Tissue Injury and Related Mediators of Pain Exacerbation**. *Curr Neuropharmacol.*; 11(6): 592–597, 2013.
- BALAJI, B; HARIHARAN, S; SHAH, D.B; RAMANATHAN, M. **Discovery of potential and selective COX-1 inhibitory leads using pharmacophore modelling, in silico screening and in vitro evaluation**. *Eur. J. Med. Chem.* 86: 469-480. 2014.
- BALTIERI, D.A.; STRAIN, E.C.; DIAS, J.C.; SCIVOLETTO, S.; MALBERGIER, A.; NICASTRI, S.; JERÔNIMO, C.; ANDRADE, A.G. **Brazilian guideline for the treatment of patients with opioids dependence syndrome**. *Rev Bras Psiquiatr* 2004;26(4):259-69, 2004.
- BANSAL, S;BALA, M; SUTHAR, S.K;CHOUDHARY, S; BHATTACHARYA, S; BHARDWAJ, V; SINGLA, S; JOSEPH, A. **Design and synthesis of novel 2-phenyl-5-(1, 3-diphenyl-1 H-pyrazol-4-yl)-1,3,4-oxadiazoles as selective COX-2inhibitors with potent anti-inflammatory activity**. *Eur. J. Med. Chem.* 80:167- 174. 2014.
- BARROS, H.M; TANNHAUSER, M.A; TANNHAUSER, S.L; TANNHAUSER, M. **Enhanced detection of hyperactivity after drug withdrawal with a simple modification of the open-field apparatus**. *J Pharmacol Methods.* 26(4):269-275, 1991.

BOHN, L.M; GAINETDINOV, R.R; LIN, F.T; LEFKOWITZ, R.J; CARON, M.G. **Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence.** *Nature*; 408: 720–23. 2000.

CALIXTO JB, MEDEIROS R, FERNANDES ES, FERREIRA J, CABRINI DA, CAMPOS MM. **Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes.** *Br J Pharmacol.*; 143:803-18, 2004.

CAMARATA, P.J., YAKSH, T.L. **Characterization of the spinal adrenergic receptors mediating the spinal effects produced by the microinjection of morphine into the periaqueductal gray.** *Brain Res.* Jun 10;336(1):133–142, 1985.

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.

CARLTON, S.M.; HARGETT, G.L.; COGGESHALL, R.E. **Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin.** *Neurosci. Lett.*, 197(1), (25-28), 1995.

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.* 70: 245–250, 2006.

COMMINS, S.P; BORISH, L; STEINKE, J.W. **Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines.** *The Journal of allergy and clinical immunology.* 125(2 Suppl 2):S53-72., 2010.

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.

CRUVINEL, W.M e cols. **Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória.** *Rev. Bras. Reumatol.*, São Paulo , v. 50, n. 4, p. 434-447, Aug. 2010.

CUNNEEN, J.; CARTWRIGHT, M. **The puzzle of sepsis: fitting the pieces of the inflammatory response with treatment.** *AACN Clinical Issues*, v. 15, n. 1, p. 18-44, 2004.

CUNHA, T.M; ROMAN-CAMPOS, D; LOTUFO, C.M; DUARTE, H.L; SOUZA, G.R; VERRI, W.A., JR; FUNEZ, M.I; DIAS, Q.M; SCHIVO, I.R; DOMINGUES, A.C; SACHS, D; CHIAVEGATTO, S; TEIXEIRA, M.M; HOTHERSALL, J.S; CRUZ, J.S; CUNHA, F.Q; FERREIRA, S.H. **Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3K $\gamma$ / AKT/ $\eta$ NOS/NO/KATP signaling pathway.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:4442–4447, 2010.

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

D'AMOUR, F.E; SMITH, D.L. **A method for determining loss of pain sensation.** J. Pharmacol. Exp. Ther., 72: 74–79, 1941.

DAWSON, J.; SEDGWICK, A. D.; EDWARDS, J. C.; LEES, P. **A comparative study of the cellular, exudative and histological responses to carrageenan, dextran and zymosan in the mouse.** International Journal of Tissue Reactions, v. 13, n. 4, p. 171–185, 1991.

DICKENSON, A.H.; SULLIVAN, A.F. **Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiaton of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following C fibre stimulation.** Neuropharmacology, v.26, n. 8, p. 1235-1238, 1987.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. **Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine.** Journal of Pathology, Amsterdam, v. 104, n. 1, p. 15-29, 1971.

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

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.

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 30 de Março de 2015.

FENG, Y.; XIAOZHOU, H.; YANG, Y.; CHAO, D.; LAZARUS, L.H.; XIA, Y. **Current research on opioid receptor function.** Curr Drug Targets, v. 13, n. 2, p. 230-46, 2012.

FELIPINI, R.C. **Vídeo de Inflamação Aguda** – UNESP. Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, 2013. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=gqCIIpHifqw>. Acesso em: 10 fev.2016.

FERREIRA, S.H; VAN ARMAN, C.G. **Oedema and increased vascular permeability.** In: Vane JR, Van Arman CG, editors. Handbook of experimental pharmacology. New York 7 Springer-Verlag; p. 75-91, 1979.

FERREIRA, S.H. **A classification of peripheral analgesics based upon their mode of action.** Oxford: Oxford University Press, 1990.

FERREIRA, A.A; AMARAL, F.A; DUARTE, I.D.G; OLIVEIRA, P.M; ALVES, R.B; SILVEIRA, D; AZEVEDO, A.O; RASLAN, D.S; CASTRO, M.S.A.

**Antinociceptive effect from Ipomoea cairica extract.** J. Ethnopharmacol; 105: 148–53. 2006.

FERREIRA, S.H; FERRARI, L.F; CUNHA, T.M; NASCIMENTO, P.G.B.D; JUNIOR, W.A.V; CUNHA, F.Q. **Dor: Princípios e Prática. Capítulo 19: Dor Inflamatória.** 2010. Disponível em: < <http://dol.inf.br/Html/DorInflamatoria.html>>. Acesso em: 2 set. 2016.

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.

FITZGERALD, G.A; RICCIOTTI, E. **Prostaglandins and Inflammation.** Arterioscler Thromb Vasc Biol.; 31(5): 986–1000, 2011.

FÖRSTERMANN, U; SESSA, W.C. **Nitric oxide synthases: regulation and function.** European Heart Journal 33, 829–837, 2012.

FRANCISCHETTI, I; MORENO, J.B; SCHOLZ, M; YOSHIDA, W.B. **Leukocytes and the inflammatory response in ischemia-reperfusion injury.** Rev Bras Cir Cardiovasc.; 25(4): 575-584, 2010.

FRENZEL, L; HERMINE, O. **Mast cells and inflammation.** Joint Bone Spine 80: 141-145, 2013.

GREGORIAN, R.S., JR.; GASIK, A.; KWONG, W.J; VOELLER, S.; KAVANAGHZ, S. **Importance of Side Effects in Opioid Treatment: A Trade-Off Analysis With Patients and Physicians.** The Journal of Pain, Vol 11, No 11: pp 1095-1108, 2010.

GREGORY, N.S; HARRIS, A.L; ROBINSON, C.R; DOUGHERTY, P.M, FUCHS, P.N, SLUKA, K.A. **An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures.** J Pain. doi:10.1016/j.jpain.2013.06.008. November; 14(11), 2013.

GRELLNER, W. **Time-dependent imunohistochemical detection of pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, TNF) in human skin wounds.** Forens Sci. Int., v. 130, n. 2-3, p. 90-96, 2002.

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.

GUILHON, C.C; RAYMUNDO, L.J.R.P; ALVIANO, D.S; BLANK, A.F; ARRIGONI-BLANK, M.F; CAVALCANTI, S.C; ALVIANO, C.S; FERNANDES, P.D. **Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities and mechanism of the action of *Lippia gracilis* essential oil.** Journal Ethnopharmacology, v. 135, p. 406-413, 2011.

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<sup>+</sup> channels are involved in the antinociceptive effect of crotalpine on neuropathic pain in rats.** *Behav. Pharmacol.*, (1):14-24, 2012.

HALLEGUA, D.S; WEISMAN, M.H. **Potential therapeutic uses of interleukin1receptor antagonists in human diseases.** *Ann Rheum*; 61: 960–967. 2002.

HAN, J.; KIM, N.; KIM, E.; HO, W.K; EARM, Y.E. **Modulation of ATP-sensitive potassium channels by cGMP-dependent protein kinase in rabbit ventricular myocytes.** *J. Biol. Chem.*, v.276, n. 25, p. 22140-22147, 2001.

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.

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

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, 2011.

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.

KELLEY, N.E; TEPPER, D.E. **Rescue therapy for acute migraine, part 3: opioids, NSAIDs, steroids, and post-discharge medications.** *Headache.*;52(3):467-82, 2012.

KOSTER, R; ANDERSON, M; DE BEER, EJ. **Acetic acid for analgesic screening.** *Federation Proceedings*. v. 18, p. 412, 1959.

LAW, B.K.; WALTNER-LAW, M.E; ENTINGH, A.J.; CHYTIL, A; AAKRE, M.E.; NØRGAARD, P.; MOSES, H.L. **Salicylate-induced growth arrest is associated with inhibition of p70s6K and down-regulation of c-myc, cyclin D1, cyclin A, and proliferating cell nuclear antigen.** *J. Biol. Chem.*, v.275, n.49, p. 38261-38267, 2000.

LE BARS, D., GOZARIU, M., CADDEN, S. **Animal models of nociception.** *Pharmacological Reviews*, v. 53, p. 628-651, 2001.

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



LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. **The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology.** Pain, v. 137, n. 3, p. 473-477, Jul 31 2008.

LOISA, P.; RINNE, T.; LAINE, S.; HURME, M.; KAUKINEN, S. **Anti-inflammatory cytokine response and the development of multiple organ failure in severe sepsis.** Acta Anaesthesiologica Scandinavica, v. 47, n. 3, p. 319-325, 2003.

LORKE, D. **A new approach to practical acute toxicity testing.** Arch. Toxicol; 54: 275-87. 1983.

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.

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: 47-53, 2006.

MARTINS, R.T.; ALMEIDA, D.B.; MONTEIRO, F.M.R.; KOZACS, P.A.; RAMINA, R. **Opioid receptors to date.** Rev Dor. São Paulo, 13(1):75-9, 2012.

MATSUKAWA, A.; HOGABOAM, C.M.; LUKACS, N.W.; LINCOLIN, P.M.; EVANOFF, H.L.; KUNKEL, S.L. **Pivotal role of the CC chemokine, macrophage derived chemokine, in the innate immune response.** Journal of Immunology, Boston, v.164, p.5362-5368, 2000.

MÁZAK, K.; HOSZTAFI, S.; RÁCZ, Á.; NOSZÁL, B. **Structural and physicochemical profiling of morphine and related compounds of therapeutic interest.** Mini-reviews in Med. Chem., v.9, p. 984-995, 2009.

MCNAMARA CR, MANDEL-BREHM J, BAUTISTA DM, SIEMENS J, DERANIAN KL, ZHAO M, HAYWARD NJ, CHONG JA, JULIUS D, MORAN MM, FANGER CM. **TRPA1 mediates formalin-induced pain.** Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. ; 104: 1352-3530. 2007.

MENEGAZZI, M; DI PAOLA, R; MAZZON, E; GENOVESE, T; CRISAFULLI, C; DAL BOSCO, M; ZOU, Z; SUZAKI, H; CUZZOCREA S. **Glycyrrhizin attenuates the development of carrageenan-induced lung injury in mice.** Pharmacol Res; 58: 22-31. 2008.

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.

MILANO, J; OLIVEIRA, S.M; ROSSATO, M.F; SAUZEM, P.D; MACHADO, P; BECK, P; ZANATTA, N; MARTINS, M.A.P; MELLO, C.F; RUBIN, M.A; FERREIRA, J; BONACORSO, H.G. **Antinociceptive effect of novel trihalomethyl-substituted pyrazoline methyl esters in formalin and hot-plate tests in mice.** Eur. J. Pharmacol; 581: 86-96. 2008.

MILLAN, M.J. **The induction of pain: an integrative review.** Prog. Neurobiol, v. 57, p. 161-164, 1999.

MILLAN, M.J. **Descending control of pain.** Prog. Neurobiol. 66:355–474, 2002.

MILLER, R.J. **Presynaptic receptors.** Annu Rev Pharmacol Toxicol; 38: 201–27. 1998.

MOHAMAD, A. S.; AKHTAR, M. N.; ZAKARIA, Z. A.; PERIMAL, E.K.; KHALID, S.; MOHD, P. A.; KHALID, M. H.; ISRAF, D. A.; LAJIS, N. H.; SULAIMAN, M. R. **Antinociceptive activity of a synthetic chalcone, flavokawin B on chemical and thermal models of nociception in mice.** European Journal of Pharmacology. v. 647, n. 1 – 3, p. 103 – 109, 2010.

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

NESS, T.J., GEBHART, G.F. **Visceral pain: a review of experimental studies.** Pain 41:167–234, 1990.

NUGTEREN, D.H; HAZELHOF, E. **Isolation and properties of intermediates in prostaglandin biosynthesis.** Biochim. Biophys. Acta. 326: 448-461. 1973.

OCANA, M; CENDRAN, C.M; COBOS, E.J; ENTRENA, J.M; BAEYENS, J.M. **Potassium channels and pain: present realities and future opportunities.** Eur J Pharmacol; 500: 203–19. 2004.

OLIVEIRA, F.S.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N. **Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone.** Biol Pharm Bull 31(4): 588 – 591, 2008.

OSSIPOV, M.H.; LAI J, VANDERAH, T.W.; PORRECA, F. **Induction of pain facilitation by sustained opioid exposure: relationship to opioid antinociceptive tolerance.** Life Sciences, v. 73, p.783-800, 2003.

PAN, Z.Z; TERSHNER, S.A; FIELDS, H.L. **Cellular mechanism for anti-analgesic action of agonists of the kappa-opioid receptor.** Nature; 389: 382–5. 1997.

PARADA, C.A; TAMBELI, C.H; CUNHA, F.Q; FERREIRA, S.H. **The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception.** Neuroscience; 102: 937–44. 2001.

PARVEEN, Z.; DENG, Y.; SAEED, M.K.; DAI, R.; AHAMAD, W.; YU, Y.H. **Antiinflammatory and analgesic activities of Thesium chinese Turcz extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside.** Yakugaku Zasshi, v.127, p.1275-1279, 2007.

RAJA, S.; MEYER, R.A.; RINCKAMP, M.; CAMPBELL, J.N. **Peripheral neural mechanism of nociception.** In WALL, P.D.; MELZACK, R. (Eds). Textbook of pain. Edinburgh: Churchill Livingstone, p. 11-57, 1999.

RAMANA, K.V.; TAMMALLI, R.; REDDY, A.B.M.; BHATNAGAR, A.; SRIVASTAVA, S.K.; **Aldose Reductase-Regulated Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$  Production Is Essential for High Glucose-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Growth.** Endocrinology. 148, n. 9, 4371-4384, 2007.

ROBBINS & COTRAN. **Patologia: Bases patológicas das doenças.** 8ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1458 p.

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

SACHS, D.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. **Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive  $K^+$  channel pathway.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 101, n. 10, p. 3680-3685, 2004.

SCHRAMM, R; THORLACIUS, H. **Neutrophil recruitment in mast cell-dependent inflammation inhibitory mechanisms of glucocorticoids.** Inflammation research, v.53 (12), p. 644-652, 2004.

SCHULTZ, J.; GROSS, G. **Opioids and cardioprotection.** Pharmac. Ther., v.89, p. 123-137, 2001.

SILVA, J.C; SARAIVA, S.R; OLIVEIRA, R.G; ALMEIDA, J.R. **Experimental models for evaluation of antinociceptive activity of natural products: a review.** Rev. Bras. Farm. 94 (1): 18-23, 2013.

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. 400: 67–71, 2000.

SOARES, A.C; DUARTE, I.D. **Dibutyl-cyclic GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive  $K^+$  channels in the rat PGE<sub>2</sub>-induced hyperalgesic paw,** Br. J. Pharmacol. 134: 127–131, 2001.

SOJA, P. J.; TAEPAVARAPRUK, N.; PANG, W.; CAIRNS, B. E.; MCERLANE, S. A.; FRAGOSO, M. C. **Transmission through the dorsal spinocerebellar and spinoreticular tracts: wakefulness versus thiopental anesthesia.** Anesthesiology, v. 97, n. 5, p. 1178-88, 2002.

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

STAROWICZ, K; OBARA, I; PRZEWLOCKI, R; PRZEWLOCKA, B. **Inhibition of morphine tolerance by spinal melanocortin receptor blockade.** Pain; 117: 401–11. 2005.

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.

SU, X; JOSHI, S.K; KARDOS, S; GEBHART, G.F. **Sodium channel blocking actions of the kappaopioid receptor agonist U50,488 contribute to its visceral antinociceptive effects.** J Neurophysiol; 87: 1271–9. 2002.

SU, X; CASTLE, N.A; ANTONIO, B; ROELOFFS, R; THOMAS, J.B; KRAFTE, D.S; et al. **The effect of kappa-opioid receptor agonists on tetrodotoxin-resistant sodium channels in primary sensory neurons.** Anesth Analg; 109: 632–40. 2009.

THEOHARIDES, T.C; ALYSANDRATOS, K.D; ANGELIDOU, A; DELIVANIS, D.A; SISMANOPOULOS, N; ZHANG, B; ASADI, S; VASIADI, M; WENG, Z; MINIATI, A; KALOGEROMITROS, D. **Mast cells and inflammation.** Biochimica et Biophysica Acta 1822, 21–33, 2012.

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.

TORNOS, M.P; SÁENZ, M.T; GARCIA, M.D; FERNÁNDEZ, M.A. **Antinociceptive effects of the tubercles of Anredera leptostachys.** J. Ethnopharmacol; .68: 229–34. 1999.

VANDERAH, T.W. **Delta and kappa opioid receptors as suitable drug targets for pain.** Clin J Pain; 26: 10–5. 2010.

VARGA, E.V.; YAMAMURA, H.I; RUBENZIK, M.K.; STROPOVA, D.; NAVRATILOVA, E.; ROESKE, W.R. **Molecular mechanisms of excitatory signaling upon chronic opioid agonist treatment.** Life Sciences, v. 74, p. 299-311, 2003.

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. Oct;112(1):116-38, 2006.

VIGIL, S.V.G; DE LIZ, R.; MEDEIROS, Y.S.; FRÖDETS. **Efficacy of tacrolimus in inhibiting inflammation caused by carrageenan in a murine model of air pouch.** Transpl Immunol; 19:25-29, 2008.

VOSCOPOULOS, C.; LEMA, M.; **When does acute pain become chronic?** Br J Anaesth, v. 105 Suppl 1, p. i69-i85. ISSN 0007-0912, 2010.

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

ZHOU, S.; BONASERA, L.; CARLTON, S.M. **Peripheral administration of NMDA, AMPA or KA results in pain behaviors in rats.** Neuroreport, 7(4), 895-900., 1996.

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.