

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**  
**VETERINÁRIA**

**TESE**

**Avaliação da Atividade Anti-inflamatória e Antinociceptiva do  
Composto Sintético ((2s,6s)-6-Etil-Tetraidro-2h-Pirano-2-Il)  
Metanol em Camundongos**

**Gustavo Nunes de Santana Castro**

**2022**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E  
ANTINOCICEPTIVA DO COMPOSTO SINTÉTICO ((2S,6S)-6-ETIL-  
TETRAIDRO-2H-PIRANO-2-IL) METANOL EM CAMUNDONGOS**

**GUSTAVO NUNES DE SANTANA CASTRO**

*Sob a Orientação do Professor*

**Bruno Guimarães Marinho**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor em**  
**Medicina Veterinária**, no Programa de  
Pós-Graduação em Medicina Veterinária,  
Área de Concentração em Ciências  
Clínicas

**Seropédica, RJ  
Fevereiro, 2022**

## FICHA CATALOGRAFICA

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

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

CC355a Castro, Gustavo Nunes de Santana, 1991-  
Avaliação da atividade anti-inflamatória e  
antinociceptiva do composto sintético ((2s-6s)-6-Etil  
Tetraidro-2h-Pirano-2-Il) Metanol em camundongos /  
Gustavo Nunes de Santana Castro. - Duque de Caxias,  
2022.  
89 f.

Orientador: Bruno Guimarães Marinho.  
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Medicina  
Veterinária, 2022.

1. Analgesia. 2. Inflamação . 3. Dor. 4. Nocicepção.  
I. Marinho, Bruno Guimarães , 1978-, orient. II  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária III.  
Título.

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA.**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**GUSTAVO NUNES DE SANTANA CASTRO**

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor(a)**, no Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária Área de Concentração em Patologia e Ciências Clínicas

TESE APROVADA EM 16/02/2022

**Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020**, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC.

Identificar membros da banca:

---

BRUNO GUIMARAES MARINHO, Dr., UFRRJ  
(Orientador / Presidente da Banca)

---

MAGDA ALVES DE MEDEIROS, Dra., UFRRJ

---

DAVID DO CARMO MALVAR, Dr., UFRRJ

---

CARLOS GIOVANI DE OLIVEIRA NASCIMENTO, Dr., UNIFAL-MG

---

LUIS FELIPE SOUZA DA SILVA, Dr., UFS



---

Emitido em 2022

**TERMO N° 144/2022 - PPGMV (12.28.01.00.00.00.00.51)**

**(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)**

*(Assinado digitalmente em 17/02/2022 15:21 )*  
BRUNO GUIMARAES MARINHO

*DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)*

*Matrícula: ###740#3*

*(Assinado digitalmente em 17/02/2022 22:39 )*  
DAVID DO CARMO MALVAR

*DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)*

*Matrícula: ###006#3*

*(Assinado digitalmente em 18/02/2022 11:23 )*  
MAGDA ALVES DE MEDEIROS

*DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)*

*Matrícula: ###930#6*

*(Assinado digitalmente em 23/02/2022 17:01 )*  
CARLOS GIOVANI DE OLIVEIRA NASCIMENTO

*CPF: ###.###.657-#*

*(Assinado digitalmente em 17/02/2022 15:38 )*  
LUIS FELIPE SOUZA DA SILVA

*CPF: ###.###.617-#*

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: **144**, ano: **2022**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **17/02/2022** e o código de verificação: **ee342dec04**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Pai Oxóssi, que me concede dia a dia o dom da caça, o brilho nos olhos para ir atrás dos meus objetivos, ele nunca me deixou desanimar. Okê arô!

Agradeço a minha Mãe Oyá, que sempre me transbordou de força, de determinação, de garra, e ao mesmo tempo, de leveza! Eparrey!

Agradeço ao Sr. Tranca Ruas, dono do meu caminho, pois com a companhia dele que estou hoje chegando nesse dia, meus caminhos sempre estarão abertos! Laroye!

Agradeço ao Pai Joaquim, este vovô me ensinou o que é ser humilde, o que é ter paciência, o que é ter perseverança, neste mundo onde as pessoas querem tudo para ontem, e não pestanejam em pisar nas outras! Adorei às Almas!

Agradeço ao meu compadre Zé Pelintra, que esteve comigo ao longo desta caminhada, me mostrando como driblar, com maestria, de quem não queria agregar, me ensinando a lançar as cartas! Salve a Malandragem!

Agradeço ao meu orientador (e grande amigo) professor Bruno Marinho! Ele sempre esteve presente ao longo de todo este período. De extrema competência, parceiro, sempre ao meu lado, sugerindo alternativas (pois este período pandêmico foi catastrófico para a pesquisa, meus amigos!). Com certeza me faltarão palavras para descrever o quão ele foi fundamental para todo o processo. Se pudesse escolher novamente, sem sombra de dúvidas, seria novamente orientado por ele. Gratidão, prof!

Agradeço aos meus professores e aos membros da banca; existe uma estrada linda a ser percorrida, e são os senhores que estão por lá, guiando nossos caminhos, como verdadeiros e legítimos mestres.

Agradeço à minha equipe, que sempre estiveram de prontidão para a execução dos projetos que envolveram a rotina anestésica!

Agradeço aos estagiários, colegas de centro cirúrgico, de laboratório, pois sem vocês nada seria possível.

Agradeço a equipe da professora Patrícia Dias Fernandes, que tornou possível a avaliação *in vitro* da molécula alvo da minha tese.

Agradeço à minha família, meu *periquito* Francis, minha *picurrucha* Nathy, pois estes estiveram ao meu lado, me apoiando desde que tudo era apenas um plano, e não me abandonaram no meu momento de maior estresse.. haha

Agradeço aos meus pais, Edna e Jorge, minha avó Iracy, meu avô Edgar (*in memorian*) e minha avó Amália (*in memorian*), pois todo fruto tem sua origem, tem sua árvore e tem sua raiz. E minha raiz, com orgulho, são eles.

Agradeço aos meus irmãos, Jorge, Anderson, André e Tássia, pelo apoio, carinho. Aos meus amigos, aos meus fechamentos, meus irmãos de outras mães. Agradeço à minha família de santo, Mameto Eloha, meus irmãos de santo, minhas mães Ekedys e meus pais Ogans. Eu tenho é gente comigo!

Agradeço a Perséfone, Gaia, Jack e Morfina, meus pets, que mesmo sentindo falta dos passeios diários, entenderam que era uma fase, que está passando. Amo vocês.

Agradeço aos meus alunos, pois é dentro de sala de aula que eu sinto que devo me capacitar mais e mais. Que preciso estar atento a tudo o que acontece, atualizado. É dentro de sala de aula que me mantendo vivo.

Para finalizar, agradeço a todos que direta ou indiretamente estiveram na minha caminhada, fomentando o meu melhor. Este privilégio é nosso. Ninguém nos tirará!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

**“Exu matou um pássaro ontem com uma pedra que só jogou hoje”**

Ditado Yorubá

## RESUMO

CASTRO, Gustavo Nunes de Santana. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO COMPOSTO SINTÉTICO ((2S,6S)-6-ETIL-TETRAIDRO-2H-PIRANO-2-IL) METANOL EM CAMUNDONGOS.** 2022. 86p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2022.

A dor e a inflamação podem ser geradas por uma infinidade de estímulos, por este motivo analgésicos e anti-inflamatórios são fármacos muito prescritos durante a rotina clínica. O objetivo deste estudo foi avaliar as atividades antinociceptiva e antiinflamatória de um novo composto sintético ((2S,6S)-6-etil-tetraidro-2H-pirano-2-IL) metanol (LS20). A administração do composto foi capaz de induzir atividade antinociceptiva nos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, formalina, retirada da cauda e placa quente. O modelo de retirada de cauda foi utilizado com antagonistas opioides, como a naloxona, metilnaltrexona, naltrindol e nor-binaltorfimina, e se observou que em todos os casos, o efeito do LS20 era inibido. Para avaliar a possível participação das vias nitrérgica, colinérgica e serotoninérgica, os animais foram pré-tratados com L-NAME, L-arginina, atropina, mecamilamina, ondansetron e PCPA, não sendo observado redução do efeito antinociceptivo com a administração prévia em nenhum destes testes. O resultado no teste de edema de pata indica efeito antiedemogênico do composto. O composto foi capaz de reduzir a migração leucocitária na inflamação existente na bolsa de ar subcutâneo, e também demonstrou atividade inibitória sobre a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1beta e IL-6, porém não demonstrou alteração nos níveis de IL-10. Observou-se ausência de citotoxicidade, e redução das concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-6, porém não houve alteração na produção de óxido nítrico. Observou-se a inibição seletiva da enzima COX-2. O composto LS20 demonstrou efeito antinociceptivo central, tendo este último contribuição do sistemas opioide de maneira não seletiva.

**Palavras-chave:** analgesia, inflamação, dor, LS20, nocicepção

## ABSTRACT

CASTRO, Gustavo Nunes de Santana. **Evaluation Of The Anti-Inflammatory And Antinociceptive Activity Of The Synthetic Compound ((2s,6s)-6-Ethyl-Tetrahydro-2h-Pyran-2-Yl) Methanol In Mice.** 2022. 86p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2022.

Pain and inflammation can be generated by a multitude of stimuli, for this reason analgesics and anti-inflammatories are drugs that are often prescribed during the clinical routine. The aim of this study was to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory activities of a new synthetic compound ((2S,6S)-6-ethyl-tetrahydro-2H-pyran-2-IL) methanol (LS20). The administration of the compound was able to induce antinociceptive activity in models of abdominal writhing induced by acetic acid, formalin, tail withdrawal and hot plate. The tail flick model was used with opioid antagonists, such as naloxone, methylnaltrexone, naltrindol and nor-binaltorphimine, and it was observed that in all cases, the effect of LS20 was inhibited. To evaluate the possible participation of the nitrergic, cholinergic and serotonergic pathways, the animals were pre-treated with L-NAME, L-arginine, atropine, mecamylamine, ondansetron and PCPA, with no reduction in the antinociceptive effect being observed with previous administration in any of these tests. The result of the paw edema test indicates an antiedematogenic effect of the compound. The compound was able to reduce leukocyte migration in existing inflammation in the subcutaneous air pocket, and also demonstrated inhibitory activity on the production of TNF- $\alpha$ , IL-1beta and IL-6, but did not demonstrate alteration in IL-10 levels. Absence of cytotoxicity and reduction of TNF- $\alpha$  and IL-6 concentrations were observed, but there was no change in nitric oxide production. Selective inhibition of the COX-2 enzyme was observed. The compound LS20 demonstrated a central antinociceptive effect, with the latter contributing to the opioid system in a non-selective manner.

**Keywords:** analgesia, inflammation, pain, LS20, nociception

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Mediadores da inflamação.....	03
<b>Figura 2:</b> Sequência de eventos na migração de leucócitos para locais inflamados.....	05
<b>Figura 3:</b> TNF- $\alpha$ e suas funções.....	06
<b>Figura 4:</b> Mediadores de liberação de células imunes que produzem sensibilização periférica de neurônios sensoriais nociceptores e dor.....	14
<b>Figura 5:</b> Mediadores relacionados a dor inflamatória.....	17
<b>Figura 6:</b> As vias da dor.....	20
<b>Figura 7:</b> Protocolo do modelo de contorção abdominal.....	29
<b>Figura 8:</b> Protocolo do modelo da formalina.....	29
<b>Figura 9:</b> Protocolo do modelo de imersão de cauda em água quente.....	30
<b>Figura 10:</b> Protocolo do modelo de placa quente.....	31
<b>Figura 11:</b> Protocolo do modelo de Rotarod.....	32
<b>Figura 12:</b> Protocolo do modelo de Edema de Pata.....	32
<b>Figura 13:</b> Protocolo do modelo de bolsa de ar subcutâneo.....	33
<b>Figura 14:</b> Protocolo experimental do modelo de avaliação de citotoxicidade.....	35
<b>Figura 15:</b> Protocolo experimental do modelo de determinação indireta de óxido nítrico.....	35
<b>Figura 16:</b> Protocolo experimental do modelo de determinação de citocinas.....	36
<b>Figura 17:</b> Efeito antinociceptivo do composto LS20 no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	39
<b>Figura 18:</b> Efeito antinociceptivo do composto LS20 no modelo de formalina.....	41
<b>Figura 19:</b> Efeito antinociceptivo do composto LS20 (LS26 - 10, 100 e 300 $\mu$ mol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente.....	43
<b>Figura 20:</b> Influência da administração prévia de naloxona (N), N-nitro-arginina-L-metil éster (L-NAME) e L-arginina sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto LS20 (300 $\mu$ mol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente.....	45
<b>Figura 21:</b> Influência da administração prévia de metilnaltrexona (MN), Naltrindol (Nal) e Nor-Binaltorfimina (Nor) sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto LS20 (300 $\mu$ mol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente.....	47
<b>Figura 22:</b> Influência da administração prévia de Mecamilamina (Mec), Atropina (Atro), Ondansetron (Ond) e 4-cloro-DLfenilalanina (PCPA) sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto LS20 (300 $\mu$ mol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente.....	49
<b>Figura 23:</b> Efeito antinociceptivo do composto LS20 (LS20 - 10, 100 e 300 $\mu$ mol/kg) no modelo de placa quente.....	51
<b>Figura 24:</b> Avaliação do composto LS20 no teste de Rotarod.....	52
<b>Figura 25:</b> Avaliação do composto LS20 no modelo de edema de pata.....	54
<b>Figura 26:</b> Efeito do composto LS20 na quantificação de leucócitos totais (A), e de citocinas (B- TNF- $\alpha$ , C- IL-1 $\beta$ , D- IL-6 e E-IL-10) a partir do teste bolsa de ar subcutâneo.....	57

<b>Figura 27:</b> Viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 e Fibroblastos L929 após 24h de exposição a concentrações de 7,8 – 500,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LS20 determinado pelo ensaio colorimétrico MTT.....	58
<b>Figura 28:</b> Efeito de LS20 na produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ (A) e IL-6 (B) e de óxido nítrico (C) em cultura de células.....	60
<b>Figura 29:</b> Efeito de concentrações crescentes de LS20 sobre a atividade enzimática de COX-1 e COX-2.....	62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	38
<b>Tabela 2:</b> Tempos de lambedura, em segundos, no modelo de formalina.....	40
<b>Tabela 3:</b> Tempos de latência, em segundos, no modelo de imersão da cauda em água quente.....	42
<b>Tabela 4:</b> Avaliação da influência da administração prévia de Naloxona, L-NAME e L-arginina sobre os tempos de latência induzidos pelo LS20 no modelo de imersão da cauda em água quente.....	44
<b>Tabela 5:</b> Avaliação da influência da administração prévia de Metilnaltrexona, Naltrindol e Nor-Binaltorfimina sobre os tempos de latência induzidos pelo LS20 no modelo de imersão da cauda em água quente.....	46
<b>Tabela 6:</b> Avaliação da influência da administração prévia de Mecamilamina, Atropina, Ondansetron e PCPA sobre os tempos de latência induzidos pelo LS20 no modelo de imersão da cauda em água quente.....	48
<b>Tabela 7:</b> Tempos de latência, em segundos, no modelo de placa quente.....	50
<b>Tabela 8:</b> Avaliação no modelo de rotarod.....	52
<b>Tabela 9:</b> Avaliação no modelo de edema de pata induzido por carragenina.....	53
<b>Tabela 10:</b> Quantificação de citocinas no modelo de bolha de ar subcutâneo.....	56
<b>Tabela 11:</b> Quantificação das citocinas TNF- $\alpha$ e IL-6 e óxido nítrico em cultura de células.....	59
<b>Tabela 12:</b> Influência de concentrações crescentes de LS20 sobre a atividade das enzimas COX-1 e COX-2, através do método de imunoensaio enzimático.....	61

## LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

5-HT: 5-hidroxitriptofano

$\mu\text{mol/kg}$ : micromol por quilograma

$\mu\text{g/ml}$ : microgramas por mililitro

$\mu$ : mi

$\delta$ : delta

$\kappa$ : kappa

$\text{A}\delta$ : fibra nervosa do tipo A-delta

Ach: acetilcolina

AINE: anti-inflamatório não esteroidal

AMPA: alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiônico

ATP: adenosina trifosfato

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro

C: fibra nervosa do tipo C

CAA: célula apresentadora de antígeno

$\text{Ca}^{2+}$ : cálcio

CCA : córtex cingulado anterior

CD: cluster de diferenciação

CGRP : peptídeo relacionado ao gene de calcitonina

CI50: concentração inibitória de 50%

COX: cicloxigenase

cm: centímetro

d.C.: depois de Cristo

DRG: gânglios da raiz dorsal

DMSO: Dimetilsulfóxido

ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática

FNDC: fator neurotrófico derivado do cérebro

g: grama

GMPC: Monofosfato cíclico de guanosina

HPA: eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

PGE<sub>2</sub>: prostaglandina E<sub>2</sub>

PGF<sub>2 $\alpha$</sub> : prostaglandina F<sub>2 $\alpha$</sub>

PGI<sub>2</sub>: prostaglandina I<sub>2</sub>

PKG : proteína quinase G

NF-kB: fator nuclear kB

IASP: *International Association for the Study of Pain*

ICAM-1: molécula de adesão intercelular 1

IFN- $\gamma$ : interferon  $\gamma$

IL: interleucina

i.p.: intraperitoneal

IS: índice de seletividade

$\text{K}^+$ : potássio

L-NAME: N-nitro-arginina-L-metil éster

LNIL : L-N6-(1-iminoetil)-lisina

LPS: Lipopolissacarídeo

LS20: ((2s,6s)-6-etyl-tetrahidro-2h-pirano-2-il)-metanol

M: receptor muscarínico

MAP: proteína ativadora de mitógeno

MaR1: maresina

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

mg: miligrama

mg/ml: miligramas por mililitros

ml/g: mililitro por grama

ml: mililitro

mmol/kg: milimol por quilograma

MMPs: metaloproteinases de matriz

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio

Nav: canais de sódio

NK: célula *natural killer*

NK-A: neuroquinina A

NK-B: neuroquinina B

NMDA: N-metil-D-aspartato

NaCl: cloreto de sódio

NO: óxido nítrico

PCPA: 4-cloro-DL-fenilalanina

PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos

PAG : substância cinzenta periaquedatal

PD1: protectina

PK: proteína quinase

Rpm: rotações por minuto

RVM : bulbo rostroventromedial

Rv: resolvina

s.c.: subcutânea

SNC: sistema nervoso central

sP: substância P

TH: T *helper*

TLR: receptor *tool-like*

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral  $\alpha$

TRPA: canal do potencial receptor transitório anquirina

TRPV: canal do potencial receptor transitório vanilóide

VCAM-1: molécula de adesão da célula vascular 1

v.o.: via oral

v/v: volume por volume

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	01
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	03
2.1	<b>Inflamação.....</b>	03
2.1.1	Alterações vasculares e celulares.....	04
2.1.2	Citocinas e mediadores inflamatórios.....	05
2.1.3	Indutores da inflamação.....	10
2.2	<b>Nocicepção e dor.....</b>	12
2.2.1	Mediadores inflamatórios na nocicepção.....	13
2.2.2	Neurotransmissores na nocicepção.....	17
2.2.3	Vias de condução e modulatórias da dor.....	19
2.3	<b>Composto ((2S,6S)-6-etil-tetraidro-2H-pirano-2-IL) metanol.....</b>	23
3	<b>OBJETIVOS.....</b>	24
3.1	<b>Objetivos gerais.....</b>	24
3.2	<b>Objetivos específicos.....</b>	24
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	26
4.1	<b>Animais.....</b>	26
4.2	<b>Tratamentos.....</b>	26
4.3	<b>Agentes químicos.....</b>	27
4.4	<b>Modelos experimentais.....</b>	28
4.4.1	Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	28
4.4.2	Teste da formalina.....	29
4.4.3	Modelo de imersão da cauda em água quente.....	29
4.4.4	Modelo da placa quente.....	30
4.4.5	Teste de Rotarod.....	31
4.4.6	Modelo de edema de pata.....	32
4.4.7	Modelo da bolsa de ar subcutâneo.....	33
4.4.8	Quantificação de mediadores inflamatórios .....	34
4.4.9	Cultura de células .....	34
4.4.10	Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	34
4.4.11	Determinação indireta <i>in vitro</i> de óxido nítrico.....	35
4.4.12	Determinação <i>in vitro</i> de citocinas.....	35
4.4.13	Ensaio de inibição de COX <i>in vitro</i> .....	36
4.4.14	Avaliação toxicológica oral aguda.....	36
4.5	<b>Análise estatística.....</b>	36
5	<b>RESULTADOS.....</b>	38
5.1	<b>Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético .....</b>	38
5.2	<b>Teste da formalina.....</b>	39
5.3	<b>Modelo de imersão da cauda em água quente.....</b>	41
5.3.1	Avaliação do sistema opioide e do sistema nitrérgico sobre o efeito antinociceptivo do composto LS20 no modelo de retirada da cauda.....	43

5.3.2	Avaliação do sistema colinérgico e serotoninérgico sobre o efeito antinociceptivo do composto LS20 no modelo de retirada da cauda.....	47
5.4	<b>Modelo da placa quente.....</b>	49
5.5	<b>Teste de Rotarod.....</b>	51
5.6	<b>Modelo de edema de pata.....</b>	52
5.7	<b>Modelo da bolsa de ar subcutâneo.....</b>	54
5.7.1	Recrutamento de Leucócitos.....	55
5.7.2	Quantificação de citocinas.....	55
5.8	<b>Avaliação de citotoxicidade <i>in vitro</i>.....</b>	57
5.9	<b>Determinação indireta <i>in vitro</i> de óxido nítrico e citocinas.....</b>	58
5.10	<b>Ensaio de inibição de COX <i>in vitro</i>.....</b>	60
5.11	<b>Avaliação toxicológica oral aguda.....</b>	62
6	<b>DISCUSSÃO.....</b>	63
7	<b>CONCLUSÕES.....</b>	72
8	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	74

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo a IASP – International Association for the Study of Pain – a dor é “uma experiência sensitiva e emocional desagradável, associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial” (RAJA et al., 2020). Os nociceptores são um conjunto de terminações nervosas das fibras dos neurônios nociceptivos que produzem a nocicepção. Eles transformam estímulos químicos, mecânicos e/ou térmicos em estímulo elétrico, que é transmitido ao Sistema Nervoso Central e, a partir da ativação dos nociceptores pela ação das substâncias algogênicas, ocorre o processo de nocicepção e, consequentemente, a algesia. A dor pode ser decorrente de inflamação e/ou injúria dos nervos, invasão dos nervos por neoplasias, injúria nas estruturas da medula espinal e atividades anormais nas áreas de processamento de informação da dor (KOPF et PATEL, 2010).

A literatura aborda diversos fármacos utilizados para o controle da dor em medicina veterinária, sendo principalmente os opioides e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (DZIKITIet al., 2006; HELLYER et al., 2007; IMAGAWA et al., 2011).

Os AINEs são amplamente utilizados para redução de dor e edema associados à inflamação. O mecanismo deles se dá pela redução na síntese de prostaglandina e pela inibição da enzima cicloxigenase (COX) no metabolismo do ácido araquidônico. A interrupção do efeito citoprotetor das prostaglandinas pelos anti-inflamatórios não-esteroidais resulta em toxicidade, principalmente no trato gastrointestinal e nos rins, e assim limita seu uso terapêutico quando o tratamento em longo prazo é necessário (McMAHON, 2001).

O efeito adverso mais evidenciado com o uso prolongado dos AINEs é o distúrbio gastrointestinal, como vômitos e melena. Como a maioria dos fármacos desta classe bloqueia ambas as enzimas COX, as funções protetoras gástricas produzidas a partir das prostaglandinas não estão presentes. Isto torna o trato gastrointestinal suscetível a úlceras, dispepsia e sangramento gástrico. As úlceras gástricas e duodenais são prevalentes na endoscopia (15-30%) em pacientes que fazem uso de AINEs (LAINE, 2003).

Os efeitos adversos renais dos anti-inflamatórios não-esteroidais são também conhecidos e igualmente importantes. A função renal normal é parcialmente dependente da síntese de prostaglandinas e observa-se que ambas, COX-1 e COX-2, são importantes

na produção de prostaglandinas envolvidas na dilatação da vasculatura renal (LOMAS et GRAUER, 2015). A terapia com anti-inflamatórios não-esteroidais também está relacionada a distúrbios cardiocirculatórios, como desenvolvimento de edema periférico, elevação da pressão arterial e, raramente, insuficiência cardíaca congestiva (PATRONO, 2016).

Os opioides de ação central são analgésicos altamente eficientes, porém estão associados com o surgimento de efeitos adversos, incluindo náuseas e vômitos, depressão respiratória, retenção urinária, prurido, fadiga e ações sobre o sistema nervoso central, como: cefaleia, sonolência, tontura (KEITA et al., 2003). Outro fator limitante para o uso dos opioides é sua baixa biodisponibilidade após administração por via oral (KONGARA, 2018), o que compromete a qualidade analgésica.

Opioides também apresentam efeitos adversos como tolerância e dependência. A manifestação clínica da tolerância é uma diminuição na duração do efeito após uma dose em bolus. A fosforilação do receptor, o desacoplamento da proteína G e a internalização do receptor podem desempenhar um papel importante, além do envolvimento da ativação dos receptores NMDA e a produção de óxido nítrico. Após a administração de doses suficientes, todos os opioides podem induzir um estado de dependência física. A descontinuação da droga causa uma síndrome estereotipada de abstinência, ou abstinência, que inclui inquietação, midríase, arrepios, corrimento nasal, diarreia, calafrios e comportamento de busca de drogas (EVERS et al., 2011).

Estas condições adversas levam a necessidade de novas opções terapêuticas no manejo da dor, seja como fármaco analgésico adjuvante ou principal, sendo de fundamental importância para o alívio da dor em condições de difícil controle.

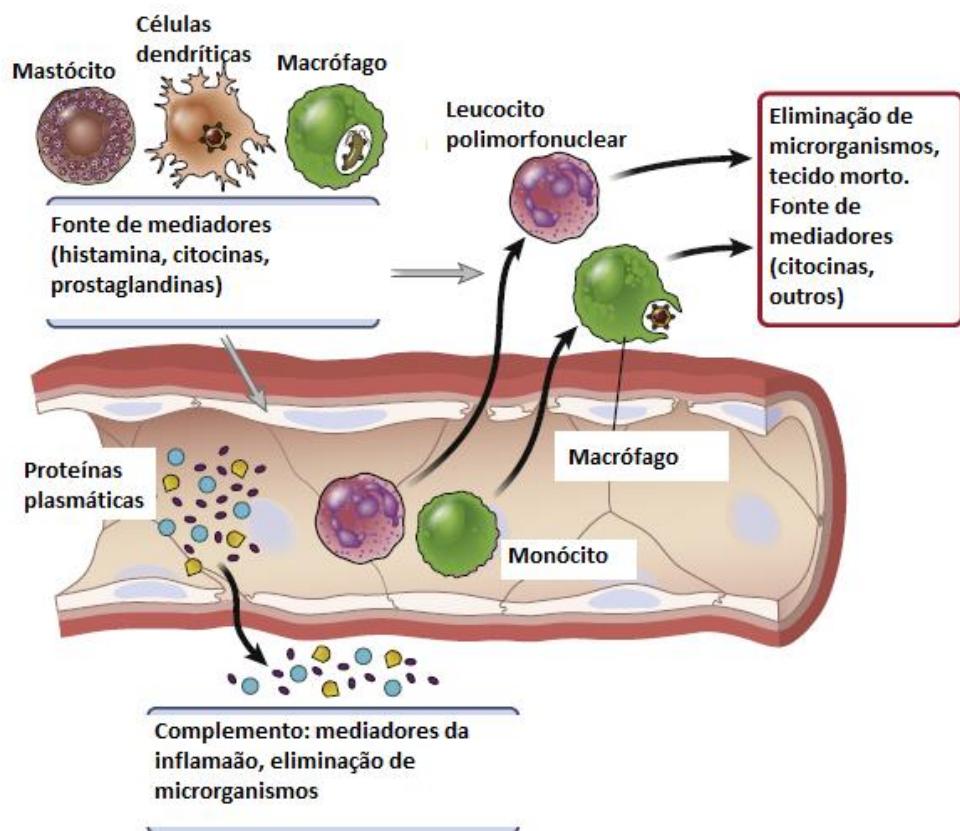
Na contínua busca por novos fármacos analgésicos obteve-se o composto ácido (+)-cis-(6-etyl-tetrahidropirano-2-il)-fórmico, que apresentou importantes propriedades antinociceptivas (MARINHO et al., 2006). A partir deste, alterações químicas foram propostas para o desenvolvimento de análogos com a finalidade de obter moléculas com melhor perfil de atividade e menos efeitos adversos e o composto ((2s,6s)-6-etyl-tetrahidro-2h-pirano-2-il)-metanol (LS20) se apresentou como sendo o mais promissor. 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.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Inflamação

A inflamação é um processo que vem sendo bem estudado desde os tempos antigos. É caracterizada por cinco sinais típicos: *rubor* (vermelhidão), *calor* (aumento de temperatura), *tumor* (inchaço), *dolor* (dor) e *functio laesa* (perda de função). Os primeiros quatro signos foram descritos por Celso no século I d.C., enquanto o quinto foi adicionado em 1871 por Virkow (RONCHETTI; MIGLIORATI et DELFINO, 2017).

A inflamação é uma reação tecidual que entrega mediadores de defesa do hospedeiro - células e proteínas circulantes - aos locais de infecção e lesão tecidual (Figura 1). Este fenômeno pode ser caracterizado pelo recrutamento de células e extravasamento de proteínas plasmáticas pelos vasos sanguíneos, além da ativação dessas células e proteínas nos tecidos extravasculares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2016).



**Figura 1: Mediadores da inflamação (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2016)**

Independente da causa, a inflamação presumivelmente evolui como uma resposta adaptativa para restaurar a homeostase (MEDZHITOV, 2008). O reconhecimento inicial

de um sítio infeccioso é mediado por macrófagos e mastócitos residentes em tecidos, levando à produção de uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo quimiocinas, citocinas, aminas vasoativas, eicosanoides e produtos de cascatas proteolíticas. O efeito principal e mais imediato desses mediadores é provocar localmente a produção de um exsudato inflamatório: proteínas plasmáticas e leucócitos (principalmente neutrófilos) que normalmente estão restritos aos vasos sanguíneos e passam a ter acesso aos tecidos extravasculares no local da lesão (MEDZHITOV, 2008).

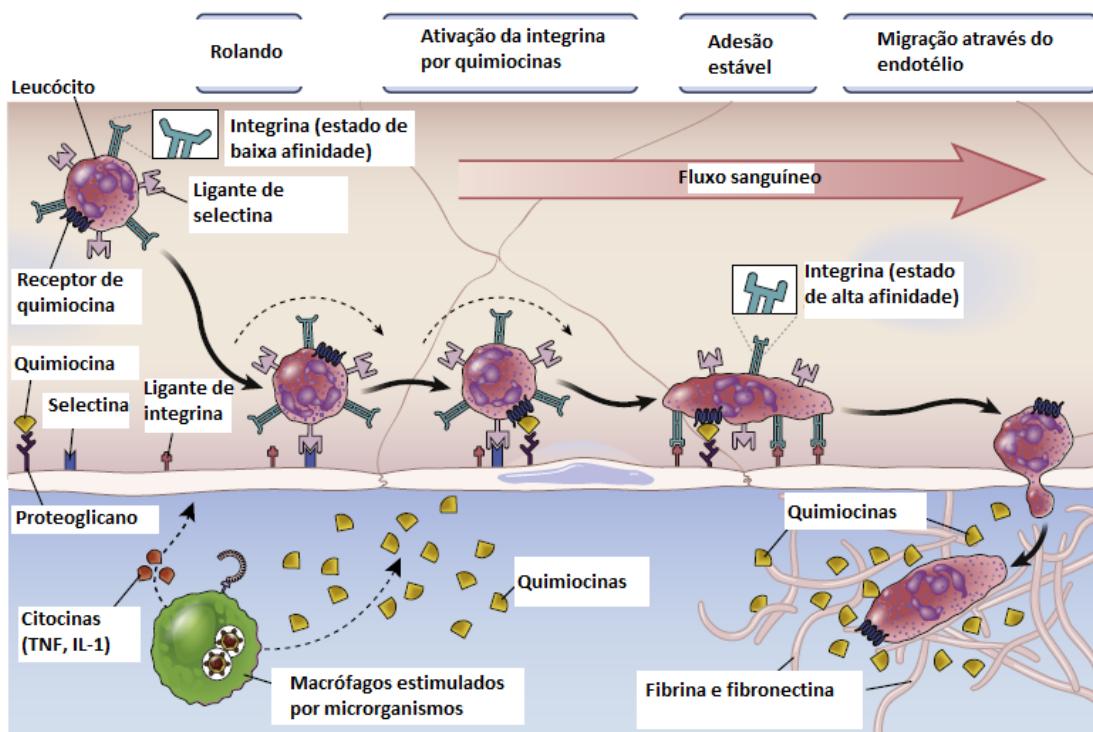
### **2.1.1 Alterações vasculares e celulares**

A liberação inicial de histamina, substância P (sP) e outros mediadores pelos mastócitos e macrófagos causa um aumento no fluxo sanguíneo local, exsudação de proteínas plasmáticas e ativação de terminações nervosas. Posteriormente ocorre um acúmulo local de fagócitos no tecido, em resposta às citocinas. Tais fagócitos, uma vez ativados, destroem microrganismos e substâncias nocivas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2016).

A migração leucocitária se dá através de moléculas de adesão do endotélio vascular em consequência da resposta de quimioatraentes produzidos pelas células sensibilizadas pela inflamação ou lesão tecidual. Este fenômeno se dá através de vários mecanismos (Figura 2).

Neutrófilos e monócitos circulantes são atraídos para o sítio inflamatório pela ação das substâncias quimioatraentes, que alteram a expressão do endotélio vascular pela apresentação de moléculas de adesão leucocitária. Caso um microrganismo atinja o espaço subepitelial, os leucócitos o reconhecem e respondem liberando citocinas, dentre elas o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-1 (IL-1), que são imprescindíveis para o início da migração leucocitária (DOAN et al., 2021).

Em resposta ao TNF- $\alpha$  e IL-1, o endotélio vascular expressa E-selectina, em contrapartida, neutrófilos e monócitos expressam receptores de superfície que se ligam especificamente às selectinas. Os leucócitos ficam então ancorados ao endotélio e dá-se início ao processo de rolamento, uma vez que o fluxo sanguíneo tem a capacidade de interromper a ligação. É importante frisar que eritrócitos não fazem a migração para o tecido inflamado justamente por não apresentarem selectinas na sua superfície (MALE et al., 2020).

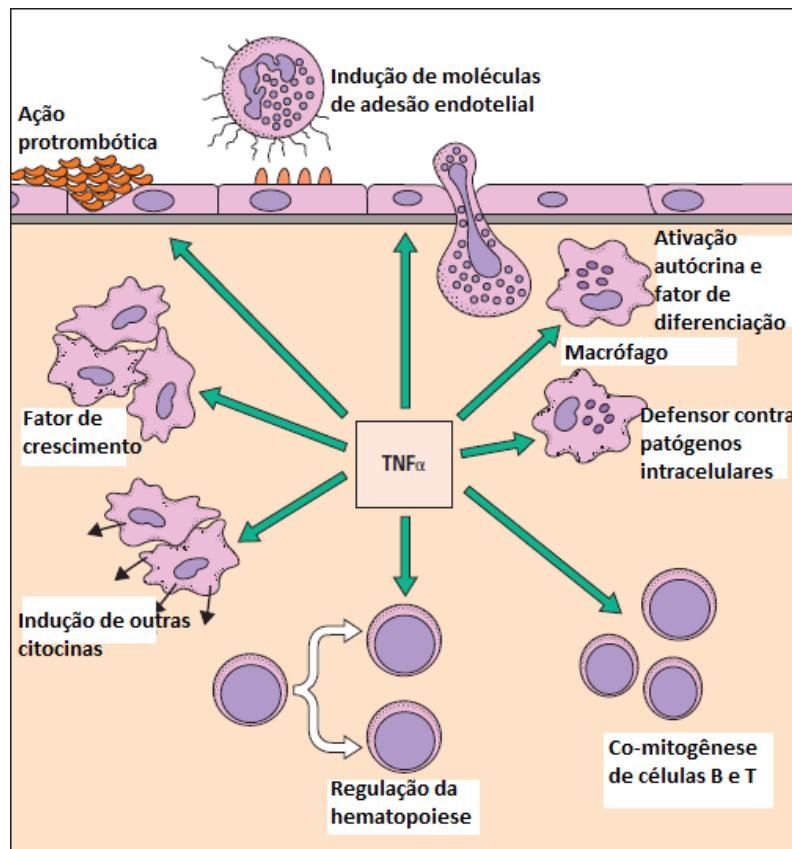


**Figura 2: Sequência de eventos na migração de leucócitos para locais inflamados (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2016)**

Os leucócitos também expressam moléculas de adesão chamadas de integrinas, que estão presentes em estado de baixa atividade em células não sensibilizadas. As quimiocinas liberadas pelos macrófagos teciduais ativados, como TNF- $\alpha$  e IL-1, são capazes de aumentar a atividade das integrinas, e uma vez ativadas, ocorre então a firme ligação entre os leucócitos e o endotélio, o que propicia o início da translocação celular (MURPHY, 2014; PUNT et al., 2018).

### 2.1.2 Citocinas e mediadores inflamatórios

O TNF- $\alpha$  e a IL-1 são particularmente importantes durante a resposta inflamatória. O TNF- $\alpha$  é produzido principalmente por neutrófilos, linfócitos, células *natural killer* (NK), endotélio e mastócitos e tem muitas funções no desenvolvimento da inflamação e na ativação de outros leucócitos (Figura 3) (MANTOVANI et al., 2004).



**Figura 3: TNF- $\alpha$  e suas funções (MALE et al., 2020)**

O TNF- $\alpha$  induz as moléculas de adesão e quimiocinas no endotélio, que são necessárias para o recrutamento leucocitário. O TNF- $\alpha$  e as citocinas relacionadas atuam em uma família de receptores causando a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, este foi descrito como um interruptor mestre do sistema imunológico (MALE et al., 2020).

O TNF- $\alpha$  induz imunidade antitumoral através de efeitos citotóxicos diretos em células cancerosas e estimulando respostas imunes antitumorais; interage com as células endoteliais para induzir a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), a molécula de adesão da célula vascular 1 (VCAM-1) e a E-selectina, permitindo a saída de granulócitos para os locais inflamatórios. O TNF- $\alpha$  é um potente ativador de neutrófilos, mediando aderência, quimiotaxia, degranulação e *burst* oxidativo (explosão respiratória é a liberação rápida das espécies reativas de oxigênio, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, de diferentes tipos de células). Além disso tem efeito inotrópico negativo e é o principal mediador do choque séptico (COMMINS; BORISH et STEINKE, 2010).

A IL-1 é produzida principalmente por células da linhagem mononuclear fagocítica, mas também é produzida por células endoteliais, queratinócitos, células sinoviais, osteoblastos, neutrófilos, células gliais e inúmeras outras células. A produção

de IL-1 é estimulada por uma variedade de agentes, incluindo endotoxinas, que estimulam os receptores de padrão molecular. Ela é sintetizada como precursor inativo sem uma sequência secretora. O mecanismo para sua secreção depende da clivagem por uma enzima conversora específica, denominada enzima conversora de IL-1 ou caspase-1, contida em um complexo intracelular especializado denominado inflamassoma, que cliva as procitocinas em suas formas secretadas ativas (SIMS et al., 1993).

Uma das atividades biológicas mais importantes da IL-1 é sua capacidade de ativar linfócitos T aumentando a produção de IL-2 e a expressão de receptores de IL-2. Na ausência de IL-1, desenvolve-se uma resposta imune ou tolerância diminuída. A produção de IL-1 (e outras citocinas derivadas de células apresentadoras de抗ígenos) durante a resposta imune produz um espectro de alterações associadas ao estar doente (CERRETTI et al., 1992).

A IL-1 interage com o sistema nervoso central para produzir febre, letargia, sono e anorexia. Uma interação IL-1-hepatócitos inibe a produção de proteínas de manutenção (por exemplo, albumina) e estimula a síntese de peptídeos de resposta de fase aguda (por exemplo, peptídeo amilóide, peptídeo C-reativo e proteínas do complemento). A IL-1 estimula a adesão de células endoteliais de leucócitos através da regulação positiva de ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina. A IL-1 contribui para a hipotensão do choque séptico. TNF e IL-1 compartilham inúmeras atividades biológicas, sendo a principal distinção que o TNF não tem efeito direto sobre a proliferação de linfócitos (COMMINS; BORISH et STEINKE, 2010).

As células fagocíticas mononucleares são a fonte mais importante de IL-6; entretanto, a IL-6 também é produzida por linfócitos T e B, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos, hepatócitos e células da medula óssea. Sob a influência de IL-6, os linfócitos B diferenciam-se em plasmócitos maduros e secretam imunoglobulinas. A IL-6 medeia a ativação, o crescimento e a diferenciação de células T. Além da ativação de linfócitos, a IL-6 compartilha várias atividades com a IL-1, incluindo a indução de pirexia e a produção de proteínas de fase aguda. A IL-6 é o indutor mais importante de proteínas de fase aguda (COMMINS; BORISH et STEINKE, 2010).

A IL-10 é uma importante citocina imunorreguladora com múltiplos efeitos biológicos em diferentes tipos de células. Embora a fonte primária de células T para IL-10 sejam os linfócitos T reguladores, monócitos e células B são as principais fontes de IL-10. IL-10 inibe a produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos TH1; IL-4 e IL-5 por linfócitos

TH2; IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- $\alpha$  por fagócitos mononucleares; e IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  por células NK (DEL PRETE et al., 1993).

A expressão de MHC classe II por células apresentadoras de抗ígenos (CAAs) é inibida por IL-10, assim como ICAM-1. A inibição de IL-10 da expressão das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 por células dendríticas e outras CAAs elimina a capacidade da CAA de fornecer os sinais acessórios necessários para a ativação das células TH, que é a principal responsável pela inibição da produção de citocinas. No entanto, IL-10 também funciona diretamente nas células T para inibir sua produção de citocinas, suprimindo a expressão de CD28 e como coestimulador de células T induzíveis (COMMINS; BORISH et STEINKE, 2010).

Quando atingem o local do tecido afetado, os neutrófilos são ativados, seja por contato direto com patógenos ou pela ação de citocinas secretadas por células residentes no tecido. Os neutrófilos tentam matar os agentes invasores liberando o conteúdo tóxico de seus grânulos, que incluem espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, proteinase, catepsina G e elastase. Esses efetores altamente potentes não discriminam entre alvos microbianos e hospedeiros, portanto, danos colaterais aos tecidos do hospedeiro são inevitáveis (MEDZHITOY, 2008).

Os mediadores inflamatórios podem ser classificados em aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, fragmentos de componentes do complemento, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas.

As aminas vasoativas, histamina e serotonina, são liberadas quando os mastócitos e as plaquetas degranulam. Eles têm efeitos complexos na vasculatura, causando aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, ou vasoconstrição, dependendo do contexto. As consequências imediatas de sua liberação pelos mastócitos podem ser altamente prejudiciais em organismos sensibilizados, resultando em colapso vascular e respiratório durante o choque anafilático (MEDZHITOY, 2008).

Os peptídeos vasoativos podem ser armazenados em uma forma ativa em vesículas secretoras, como a sP, ou gerados pelo processamento de precursores inativos no fluido extracelular (por exemplo, cininas). A sP é liberada por neurônios sensoriais e pode causar degranulação de mastócitos. Outros peptídeos vasoativos são gerados por proteólise pelo fator Hageman, trombina ou plasmina e causam vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. O fator Hageman ativa a cascata calicreína-cinina, e o principal produto dessa cascata, a bradicinina, afeta a vasculatura, além de ter um potente

efeito pró-algésico. A sensação de dor tem um importante papel fisiológico na inflamação ao alertar o organismo para o estado anormal do tecido lesado.

Os fragmentos do complemento C3a, C4a e C5a são produzidos por várias vias de ativação do complemento. C5a promovem o recrutamento de granulócitos e monócitos e induzem a degranulação de mastócitos, afetando assim a vasculatura (MEDZHITOV, 2008).

Os mediadores lipídicos (eicosanoides e fatores de ativação de plaquetas) são derivados de fosfolipídios que estão presentes nas membranas celulares. Após ativação por íons  $Ca^{2+}$  intracelulares, a fosfolipase A<sub>2</sub> citosólica gera ácido araquidônico e ácido lisofosfatídico. O ácido araquidônico é metabolizado para formar eicosanoides tanto por cicloxigenases (COX-1 e COX-2), que geram prostaglandinas e tromboxanos, quanto por lipoxigenases, que geram leucotrienos e lipoxinas. A COX-2 é a isoforma predominante da COX, mas não é fonte exclusiva de prostaglandinas, que são expressas constitutivamente no cérebro e induzidas em tecidos lesados por IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6. A COX-1 é a principal fonte de prostanoïdes que medeiam funções fisiológicas, mas também pode estar envolvida em processos patológicos (RONCHETTI; MIGLIORATI et DELFINO, 2017).

As prostaglandinas E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), por sua vez, causam vasodilatação, sendo a PGE<sub>2</sub> também hiperalgésica e potente indutora de febre. As lipoxinas inibem a inflamação e promovem a resolução da inflamação e o reparo tecidual. A segunda classe de mediadores lipídicos, os fatores ativadores de plaquetas, são gerados pela acetilação do ácido lisofosfatídico e ativam diversos processos que ocorrem durante a resposta inflamatória, incluindo recrutamento de leucócitos, vasodilatação e vasoconstrição, aumento da permeabilidade vascular e ativação plaquetária.

As enzimas proteolíticas (incluindo elastina, catepsinas e metaloproteinases de matriz) têm diversos papéis na inflamação, em parte através da degradação da matriz extracelular e proteínas da membrana basal. Essas proteases têm papéis importantes em muitos processos, incluindo defesa do hospedeiro, remodelação de tecidos e migração de leucócitos.

Embora o efeito mais óbvio dos mediadores inflamatórios seja induzir a formação de um exsudato (através de seus efeitos na vasculatura e na migração de leucócitos), muitos mediadores inflamatórios têm outros efeitos igualmente importantes nas funções neuroendócrinas e metabólicas e na manutenção dos tecidos. homeostase em geral. Essas funções dos mediadores inflamatórios refletem um papel mais geral da inflamação no

controle da homeostase tecidual e na adaptação a condições nocivas (MEDZHITOY, 2008).

A resposta inflamatória aguda bem-sucedida resulta na eliminação dos agentes infecciosos e é seguida por uma fase de resolução e reparo, mediada por macrófagos residentes em tecidos e recrutados. A mudança nos mediadores lipídicos de prostaglandinas pró-inflamatórias para lipoxinas, que são anti-inflamatórias, é crucial para a transição da inflamação para a resolução.

As lipoxinas inibem o recrutamento de neutrófilos e promovem o recrutamento de monócitos, que removem as células mortas e iniciam a remodelação tecidual. As resolvinas e as protectinas, que constituem outra classe de mediadores lipídicos, assim como o fator de crescimento transformador- $\beta$  e os fatores de crescimento produzidos por macrófagos, também têm papel crucial na resolução da inflamação, incluindo o início do reparo tecidual (MEDZHITOY, 2008).

### **2.1.3 Indutores da inflamação**

A resposta inflamatória é coordenada por uma grande variedade de mediadores que formam redes regulatórias complexas. Os indutores da inflamação, que podem ser exógenos ou endógenos, são os sinais que iniciam a resposta inflamatória, ativando sensores especializados, que então provocam a produção de conjuntos específicos de mediadores.

Os indutores exógenos podem ser classificados em dois grupos: microbianos e não microbianos. Existem duas classes de indutores microbianos: padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e fatores de virulência. Os PAMPs são um conjunto limitado e definido de padrões moleculares conservados que são carreados por todos os microrganismos de uma determinada classe. Já os fatores de virulência são restritos aos patógenos, eles não são detectados diretamente por receptores específicos. Os efeitos adversos de sua atividade nos tecidos do hospedeiro são responsáveis por desencadear a resposta inflamatória (MEDZHITOY, 2008).

Indutores exógenos de inflamação incluem alérgenos, irritantes, corpos estranhos e compostos tóxicos. Certos alérgenos são detectados porque imitam a atividade de virulência dos parasitas; outros podem atuar como irritantes no epitélio da mucosa. A resposta inflamatória induzida por ambos os tipos de alérgenos é bastante semelhante

porque a defesa contra parasitas e irritantes ambientais depende da expulsão e eliminação mediada pelo epitélio da mucosa (MAJNO, 2004).

Corpos estranhos são partículas indigeríveis que são grandes demais para serem fagocitadas ou causam danos à membrana fagossômica em macrófagos. Se um corpo estranho for muito grande para formar um cálice fagocitário, o macrófago forma um granuloma ao redor desse corpo. Em alguns casos, os macrófagos podem se fundir para formar “células gigantes” que encapsulam o corpo estranho (RIZKI et RIZKI, 1992).

Indutores endógenos de inflamação são sinais produzidos por tecidos estressados, danificados ou com mau funcionamento. Durante a morte celular necrótica, por exemplo, a integridade da membrana plasmática é rompida, resultando na liberação de ATP, íons K<sup>+</sup>, ácido úrico, e vários membros da família de proteínas de ligação ao cálcio S100. O ATP se liga a receptores purinos na superfície dos macrófagos, resultando em efluxo de íons K<sup>+</sup>, e pode cooperar com outros sinais para ativar o inflamassoma. O ATP também ativa os nociceptores, levando a lesão tecidual do sistema nervoso (MEDZHITOY, 2008).

Em tecidos sadios, as células epiteliais e as células mesenquimais são normalmente separadas umas das outras pela membrana basal, e a ruptura dessa barreira resulta em interações epitélio-mesenquimais “não programadas”. Essas interações indicam a presença de dano tecidual e, consequentemente, iniciam respostas de reparo tecidual. O dano ao endotélio vascular permite que proteínas plasmáticas e plaquetas tenham acesso aos espaços extravasculares. Um regulador chave da inflamação derivado do plasma, o fator Hageman é ativado pelo contato com colágeno e outros componentes da matriz extracelular. O fator Hageman ativado atua como um sensor de dano vascular e inicia as quatro cascatas proteolíticas que geram mediadores inflamatórios: a cascata calicreína-cinina, a cascata da coagulação, a cascata fibrinolítica e a cascata do complemento. As plaquetas também são ativadas pelo contato com o colágeno e produzem vários mediadores inflamatórios, incluindo tromboxano e serotonina.

Outro grupo de indutores endógenos de inflamação consiste em produtos de degradação da matriz extracelular que são gerados durante o mau funcionamento ou dano tecidual. O componente mais bem estudado é o hialuronato de glicosaminoglicano. A lesão tecidual promove sua quebra em fragmentos de baixo peso molecular, que são inflamatórios, ativando o receptor *tool-like* 4 (TLR4) e promovendo uma resposta de reparo tecidual (MEDZHITOY, 2008).

Os indutores de inflamação desencadeiam a produção de numerosos mediadores inflamatórios, que por sua vez alteram a funcionalidade de muitos tecidos e órgãos. Esses

mediadores podem ser derivados de proteínas plasmáticas ou secretados pelas células. Alguns mediadores (como histamina e serotonina) são pré-formados e armazenados nos grânulos de mastócitos, basófilos e plaquetas. Outros são pré-formados e circulam como precursores inativos no plasma.

## 2.2 Nocicepção e Dor

A sensação de dor nos alerta para lesão real ou iminente e dispara respostas protetoras apropriadas (RONCHETTI; MIGLIORATI; DELFINO, 2017). Segundo a IASP – *International Association for the Study of Pain* – a dor é “uma experiência sensitiva e emocional desagradável, associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial.” (RAJA et al., 2020). A própria definição da dor demonstra a possibilidade de um indivíduo relatar a experiência de dor, sem apresentar nenhuma região lesionada/inflamada.

Uma interação complexa entre várias respostas biológicas do sistema imunológico, do sistema nervoso autônomo, da regulação vascular e dos sistemas nervosos central e periférico em resposta aos insultos de lesão tecidual, patógenos e irritantes compreende a sensação de dor pelo corpo. A dor pode desempenhar um papel protetor vital para um organismo, como é o caso da inflamação aguda que resulta na percepção da dor, evitando estímulos prejudiciais e estimulando a cicatrização do tecido danificado (MATSUDA; HUH et JI, 2019).

A terminologia nocicepção vem do latim *nocere* [fazer mal, lesar) e *capere* (receber, perceber). Nocicepção é definida como a codificação e o processamento de estímulos nocivos no sistema nervoso (POSSO et al., 2017). Neurônios aferentes primários podem detectar estímulos químicos, térmicos e mecânicos nocivos, e o corpo celular desses neurônios reside nos gânglios trigeminal e da raiz dorsal (DRG) (RONCHETTI; MIGLIORATI et DELFINO, 2017).

## 2.2.1 Mediadores inflamatórios na nocicepção

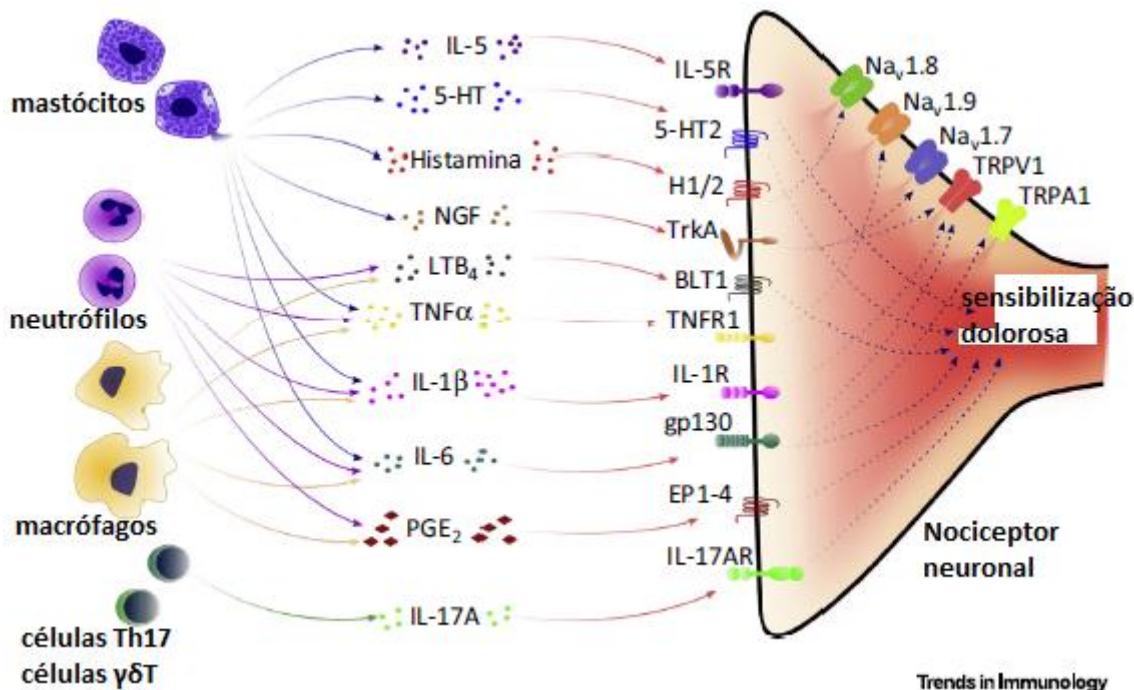
Mediadores inflamatórios, produzidos durante a inflamação, evocam dor via ativação direta e sensibilização de nociceptores. A PGE<sub>2</sub> é considerada um agente sensibilizante porque aumenta a sensibilização dos nociceptores, diminuindo o limiar dos canais de sódio resistentes à tetrodotoxina, modula o canal do potencial receptor transitório vanilóide 1 (TRPV-1) para sensação de calor e sensibiliza os neurônios aferentes primários à bradicinina. A bradicinina, liberada por mastócitos e tecidos danificados, liga-se a receptores de bradicinina 2 que são constitutivamente expressos em neurônios, como os polimodais C-nociceptores. Como consequência, o limiar de calor é reduzido, o que causa a dor duradoura associada à inflamação (RONCHETTI; MIGLIORATI et DELFINO, 2017).

O fator neurotrófico derivado do cérebro (FNDC) contribui para a sensibilização central dos neurônios nociceptivos do corno dorsal e é induzido por estímulos inflamatórios. A concentração de FNDC é aumentada no córtex cingulado anterior (CCA) durante a inflamação periférica, e que isso é suficiente para induzir certas alterações plásticas. Acredita-se que o CCA seja importante na antecipação de um estímulo doloroso, de modo que o FNDC pode ser considerado um facilitador da dor e um contribuinte para os mecanismos subjacentes à dor crônica. As células imunes juntamente com a glia e os neurônios constituem uma rede integrada na qual uma resposta imune desencadeada por um estímulo inflamatório modula a dor resultante (RONCHETTI; MIGLIORATI et DELFINO, 2017).

Os nociceptores são um subconjunto de neurônios aferentes primários, com corpos celulares localizados no DRG e nos gânglios do trigêmeo, que respondem à lesão tecidual e são constituídos por fibras C não mielinizadas e fibras A $\delta$  mielinizadas que inervam a pele, os músculos, as articulações e as vísceras. Esses neurônios sensíveis à lesão tecidual sinalizam através da ativação ou sensibilização de receptores acoplados à proteína G, receptores ionotrópicos e receptores de tirosina quinase localizados em terminais nervosos e corpos celulares (MATSUDA; HUH et JI, 2019).

O fenômeno da sensibilização periférica, que é marcado por um estado de hipersensibilidade e hiperexcitabilidade de nociceptores como resultado de lesão tecidual e inflamação, é causado pela ativação de uma coleção variada de canais iônicos, incluindo os canais iônicos potenciais do receptor transitório (TRPA-1, TRPV-1 e TRPV-4), canais

de sódio (Nav1.7, Nav1.8 e Nav1.9) e canais de íons piezossensíveis mecanossensíveis (Figura 4) (PINHO-RIBEIRO; VERRI Jr et CHIU, 2017; MATSUDA; HUH et JI, 2019)



**Figura 4: Mediadores de liberação de células imunes que produzem sensibilização periférica de neurônios sensoriais nociceptores e dor (PINHO-RIBEIRO; VERRI Jr et CHIU, 2017)**

As proteínas quinases, incluindo MAP quinases, proteína quinase A (PKA) e proteína quinase C (PKC) são ligações de ativação críticas nas vias de sinalização do receptor de nociceptores, levando à indução e manutenção da sensibilização periférica, que é marcada pelo aumento da atividade do TRPV-1 em resposta ao TNF e aumento da atividade Nav1.8 em resposta à IL-1 $\beta$ . A expressão elevada continuada de TRPV-1 mantém o estado de sensibilização periférica e, consequentemente, a transição de dor aguda para crônica (MATSUDA; HUH et JI, 2019).

Nociceptores e células imunes estão envolvidos na comunicação neuroimune envolvendo um repertório comum de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas e TLRs. Assim, no contexto da inflamação e da dor, as interações neuroimunes permitem a modulação do nociceptor e da resposta imune à lesão, regulando as células imunes residentes, bem como o recrutamento de populações de células imunes para a área de inflamação local, aferentes primários e gânglios da raiz dorsal (DRG) (MATSUDA; HUH et JI, 2019).

É importante salientar que a inflamação aguda não só induz a dor, mas também promove a resolução da dor através da produção de mediadores pró-resolução especializados, incluindo resolvinas (RvD1, RvD2, RvD5, RvE1), protectina (PD1) e maresina (MaR1). Mediadores pró-resolução especializados produzidos durante a fase de resolução da inflamação, exibem potentes ações anti-inflamatórias e são analgésicos potentes que inibem e resolvem a dor inflamatória e a dor pós-operatória (MATSUDA; HUH et JI, 2019).

A inflamação periférica também resulta em hiperatividade do sistema nervoso central (SNC), incluindo a medula espinal e o cérebro, bem como os terminais centrais aferentes primários na medula espinal e no núcleo trigeminal. O SNC exibe aumentos na produção e liberação de neurotransmissores e/ou neuromoduladores envolvidos na inflamação, incluindo glutamato, neuropeptídeos, sP e peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP), bem como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), quando persistentemente ativado por estímulos inflamatórios de nociceptores periféricos (MATSUDA; HUH et JI, 2019).

A interação entre células imunes e células gliais caracteriza a neuroinflamação, na qual a liberação de mediadores inflamatórios tem papel crítico na patogênese da dor crônica. As células imunes são recrutadas no local da inflamação e sua ativação leva à liberação de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e quimiocinas. A degranulação dos mastócitos residentes está envolvida no desencadeamento da nociceção, tanto por meio da interação direta com os terminais nervosos periféricos através da molécula de adesão celular N-caderina, quanto indiretamente pela liberação de histamina, bradicinina e outros mediadores vasodilatadores. A degranulação de mastócitos também leva ao rápido início da hiperalgesia induzida pelo fator de crescimento nervoso (RONCHETTI; MIGLIORATI et DELFINO, 2017).

Certas citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , desempenham um papel direto na geração e manutenção da dor, facilitando a sensibilização central e a hiperalgesia. Os neurônios nociceptivos possuem receptores para essas citocinas em sua superfície, e a neutralização dessas citocinas pode resultar em rápida redução da dor antes da atenuação da inflamação. O TNF- $\alpha$  é um iniciador de dor neuropática e sua injeção intratecal tem um efeito pró-nociceptivo. A IL-6 é uma citocina que transfere sinais imunes periféricos para o SNC. A IL-6 demonstrou desempenhar um papel importante na

dor neuropática após lesão nervosa, e a administração de anticorpo anti-IL-6 atenua significativamente a alodinia mecânica. A IL-1 $\beta$  é a primeira citocina envolvida na lesão do nervo periférico. Sua expressão aumenta em uma variedade de doenças autoimunes nas quais a dor é uma característica principal, e é amplamente produzida pelas células gliais e regulada positivamente após lesão do nervo periférico. A IL-1 $\beta$  tem a capacidade de induzir a expressão de outros fatores pró-inflamatórios que juntos contribuem para a indução e manutenção da dor (RONCHETTI; MIGLIORATI et DELFINO, 2017).

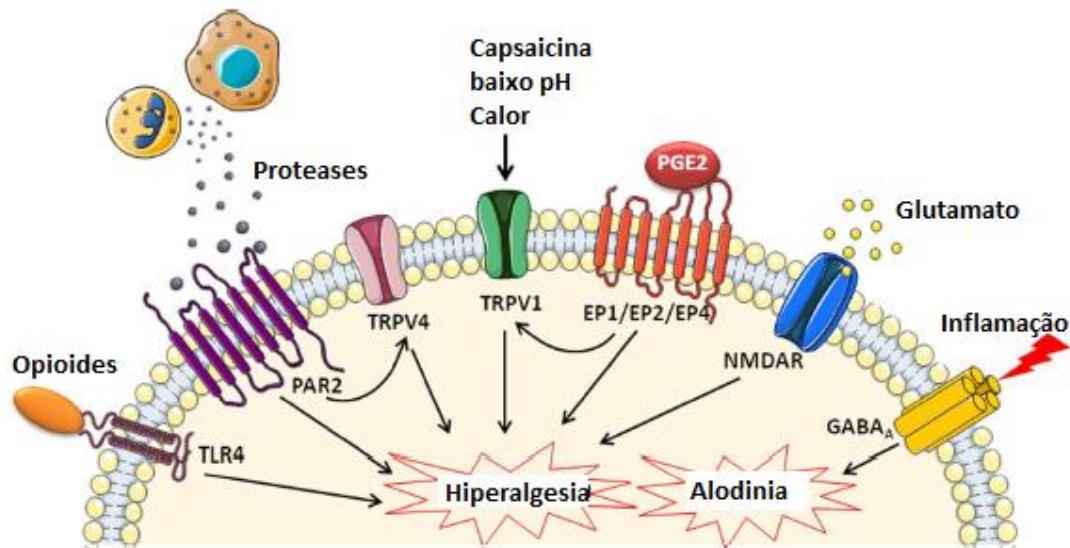
Os receptores de PGE<sub>2</sub> contribuem para a hiperalgesia inflamatória, principalmente na sensibilização periférica. A expressão e a superfície celular e o tráfego axonal do TRPV-1 são potencializados pela PGE<sub>2</sub>, potencializando assim a atividade deste receptor (RONCHETTI; MIGLIORATI et DELFINO, 2017).

Em geral, muitos mediadores da cascata inflamatória induzem direta ou indiretamente uma resposta nociceptiva, mas alvos farmacológicos específicos ainda precisam ser identificados (Figura 5) (RONCHETTI; MIGLIORATI et DELFINO, 2017).

As metaloproteinases de matriz (MMPs), estão associadas ao processo inflamatório. Alguns deles exercem efeitos pró-inflamatórios, enquanto outros estão envolvidos na resolução da inflamação. As MMPs são liberadas por várias células vasculares e não vasculares, incluindo células endoteliais, fibroblastos, monócitos e macrófagos e aumentam a permeabilidade do vaso. É importante ressaltar que MMP-2 e MMP-9 têm sido implicados na geração e manutenção da dor neuropática, e sua secreção por macrófagos residentes, células de Schwann, astrócitos e micróglia desempenha um papel importante no desenvolvimento da hipersensibilidade à dor crônica. As proteases desempenham papéis fundamentais na dor induzida pela inflamação (RONCHETTI; MIGLIORATI et DELFINO, 2017).

O estresse psicológico é uma condição que causa ativação das vias neuroendócrinas em direção à periferia que, em última análise, leva à liberação de glicocorticoides pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). A bem conhecida modulação do sistema imune pelos glicocorticoides inclui mudanças no tráfego celular, secreção de citocinas, produção de anticorpos e ativação e proliferação de células imunes. Uma resposta aguda ao estresse estimula o sistema imunológico a reagir, enquanto uma prolongada causa efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores. Portanto, os

glicocorticóides representam um elo fundamental entre o sistema nervoso e o controle da inflamação (RONCHETTI; MIGLIORATI et DELFINO, 2017).



**Figura 5: Mediadores relacionados a dor inflamatória (RONCHETTI; MIGLIORATI et DELFINO, 2017)**

## 2.2.2 Neurotransmissores na nocicepção

O glutamato é um importante neurotransmissor excitatório no SNC que está envolvido na dor aguda e crônica. A PGE<sub>2</sub> amplifica a transmissão sináptica estimulando a liberação de glutamato, e a inibição da COX-2 previne a liberação de glutamato dos terminais nervosos, ligando assim a inflamação ao glutamato e à dor. O glutamato desempenha um papel modulador no DRG após hiperalgesia mecânica inflamatória periférica. A liberação de glutamato ativa os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) em células gliais satélites. Os receptores NMDA são amplamente estudados no contexto da dor. Eles desempenham um papel importante tanto na inflamação quanto na sensibilização central induzida por lesão nervosa, e foram propostos como alvos farmacológicos para o tratamento da dor neuropática.

A entrada nociceptiva persistente, por sua vez, resulta no desenvolvimento de sensibilização central, marcada pela hiperatividade e hiperexcitabilidade dos neurônios no cérebro e na medula espinal. Além disso, há envolvimento particular de receptores NMDA de glutamato pós-sinápticos e inserção de receptores AMPA na membrana

plasmática, bem como ativação de neurônios pós-sinápticos, para iniciar e manter a sensibilização central (MATSUDA; HUH et JI, 2019).

Os opioides endógenos são atores importantes na modulação da dor. A inflamação aumenta a expressão de opioides nas células do sistema imunológico e nos estágios iniciais da inflamação. Nos terminais periféricos dos neurônios sensoriais, os opioides liberados pelas células imunes ativam os receptores opioides, passando pela bainha perineural danificada. Essa interação entre células imunes e neurônios sensoriais periféricos é provavelmente necessária para a entrega de peptídeos opioides em estreita proximidade com os receptores opioides, o que resulta no alívio da dor. Também foi postulado que os opioides periféricos desempenham um papel anti-inflamatório através da inibição da secreção de noradrenalina, sP e TNF- $\alpha$  das células neuronais (RONCHETTI; MIGLIORATI et DELFINO, 2017).

A sP é expressa em todo o sistema nervoso e imunológico e pode induzir a liberação de citocinas por vários tipos de células, desempenhando assim um papel crítico na modulação das respostas imunes em locais periféricos, como os tratos gastrointestinal e respiratório durante a inflamação. A sP também demonstrou aumentar a inflamação no SNC e estimular a produção de citocinas inflamatórias por monócitos/macrófagos, linfócitos T e mastócitos, bem como a liberação de grânulos contendo mediadores inflamatórios de neutrófilos, mastócitos e eosinófilos. Juntamente com a neurocinina A (NK-A), neurocinina B (NK-B) e o CGRP, a sP contribui para a inflamação neurogênica e ativa mastócitos, microglia e astrócitos (RONCHETTI; MIGLIORATI et DELFINO, 2017).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula mensageira que possui diversos alvos moleculares. Ele pode ser gerado por três isoformas diferentes da enzima NO sintase: NO sintase neuronal, NO sintase induzível e NO sintase endotelial. Todas as isoformas utilizam L-arginina como substrato. O óxido nítrico é um mediador importante de nociceção. No entanto, também é capaz de induzir a analgesia. O papel do óxido nítrico no controle central da dor foi demonstrado através da administração intracerebroventricular de L-arginina e do doador de óxido nítrico 3-morfolinosidnoimina em camundongos, o que produziu antinociceção. O efeito induzido pela L-arginina também foi antagonizado por um inibidor de NO sintase neuronal. 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 (CURY et al., 2011; FORSTERMANN et SESSA, 2012).

A 5-HT no corno dorsal da medula espinal contribui muito para a modulação da dor. Os receptores inibitórios 5-HT<sub>1a</sub> e os receptores excitatórios 5-HT<sub>2a/2c</sub>, 5-HT<sub>3</sub> e 5-HT<sub>7</sub> que contribuem fortemente para a transmissão nociceptiva são expressos no corno dorsal da medula espinal. Esses receptores estão presentes nos terminais pré-sinápticos das fibras nervosas aferentes primárias, interneurônios inibitórios, interneurônios excitatórios e neurônios de projeção, e modificam a transmissão nociceptiva (OBATA, 2017).

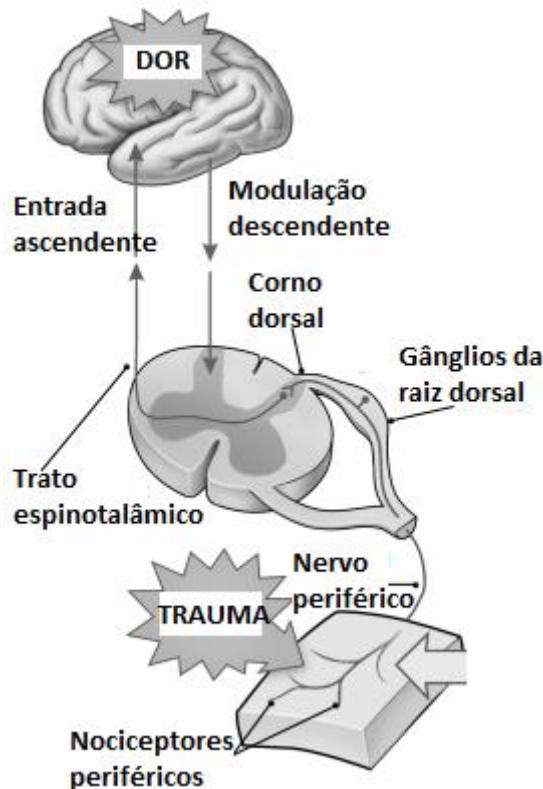
No sistema nervoso central, os receptores serotoninérgicos estão localizados principalmente no tronco encefálico nos núcleos da rafe e se projetam para a maior parte do cérebro, incluindo o mesencéfalo, regiões corticais pré-frontal, parietal e occipital, hipocampo, córtex cingulado, tálamo, cerebelo e medula espinal. A serotonina atua como um importante neuromodulador com efeitos nociceptivos e antinociceptivos. O receptor 5-HT<sub>1A</sub> no SNC de estudos em modelo de rato está associado à inibição da dor (antinocicepção) na coluna, enquanto o 5-HT periférico pode ser responsável pelo aumento da resposta inflamatória, exercendo assim um efeito nociceptivo (PAREDES et al., 2019).

### **2.2.3 Vias de condução e modulatórias da dor**

Os nociceptores são um conjunto de terminações nervosas das fibras dos neurônios nociceptivos que produzem a nocicepção. Eles transformam estímulos químicos, mecânicos e/ou térmicos em estímulo elétrico, que é transmitido ao SNC e, a partir da ativação dos nociceptores pela ação das substâncias algogênicas, ocorre o processo de nocicepção e, consequentemente, a algesia. A dor pode ser decorrente de inflamação e/ou injúria dos nervos, invasão dos nervos por neoplasias, injúria nas estruturas da medula espinal e atividades anormais nas áreas de processamento de informação da dor (KOPF et PATEL, 2010).

Os neurônios nociceptivos primários são nociceptores cutâneos encontrados nos terminais das fibras A $\delta$  e C, que são fibras finas e não mielinizadas, respectivamente. Sinais aferentes periféricos transmitem estímulos nociceptivos para a substância cinzenta do corno dorsal da medula espinal e, se esses estímulos persistirem, as fibras C aumentam

a condução sináptica nos neurônios da raiz dorsal, sensibilizando assim o SNC (Figura 6).



**Figura 6: As vias da dor (GOTTSCHALK et SMITH, 2001)**

Alguns desses neurônios se projetam para o tronco encefálico ou para o sistema tálamo-cortical e isso consequentemente leva a uma resposta consciente à dor. Essa sensibilização central é essencial para o desenvolvimento de hiperalgesia e alodinia e envolve a ativação dos receptores NMDA pelo glutamato. Por outro lado, o trato neural descendente que inibe a transmissão do sinal de dor representa o sistema antinociceptivo e inclui peptídeos opioides, serotonina, norepinefrina e dopamina. Esses neurotransmissores são liberados por neurônios intermediários no corno dorsal da medula espinal, que por sua vez são ativados pelos mecanismos opioide e gabaérgico da região cinzenta periaquedatal (RONCHETTI; MIGLIORATI et DELFINO, 2017).

Quando a sensação de dor atinge o cérebro, o sistema inibitório descendente é mobilizado a partir de uma variedade de locais no córtex cerebral e ativa a substância cinzenta periaquedatal (PAG). O PAG controla de perto o bulbo rostroventromedial (RVM) e modifica a dor através da projeção de fibras do RVM para o corno dorsal da medula espinal. O RVM inclui o núcleo magnó da rafe, que projeta abundantes fibras serotoninérgicas para o corno dorsal da medula espinal. As projeções serotoninérgicas

descendentes do RVM para o corno dorsal da medula espinal exercem efeitos inibitórios e facilitadores no processamento da dor, dependendo do estado da dor, aguda ou crônica (OBATA, 2017).

As vias modulatórias descendentes da dor podem exercer tanto um tipo de influência de inibição (inibição descendente) quanto de facilitação (facilitação descendente) no processamento da informação nociceptiva da medula espinal, e essa influência também depende do tipo de receptor onde os neurotransmissores estão atuando. Bardin et al. (2000) demonstraram em seu estudo experimental que antagonistas de receptores de 5-HT<sub>3</sub> e 5-HT<sub>2c</sub> poderiam produzir uma inibição total dos efeitos antinociceptivos de 5-HT. A ativação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> na coluna pode inibir a sensação nociceptiva, enquanto seu bloqueio potencializa a resposta pela ativação do sistema interneurônio GABAérgico (PAREDES et al., 2019)

Os mediadores envolvidos na dor, que podem ser produzidos por irritantes exógenos (formalina e ácido acético, por exemplo) são responsáveis pela multiplicidade de eventos que ocorrem durante a transmissão da dor, em ambos os sistemas nervosos periférico e central (ALAM et al., 2012).

O estímulo nocivo da periferia é transmitido, através da medula espinal, para áreas do sistema nervoso central, resultando na sensação fisiológica da dor atrelada a uma resposta emocional negativa (KHALID et TUBBS, 2017).

Ao contrário da dor fisiológica, a dor inflamatória origina-se do dano tecidual e inicia a ativação dos terminais periféricos das fibras nervosas nociceptivas. O limiar fisiológico é reduzido na presença de um estímulo nocivo, como no caso de nociceptores cutâneos que são sensibilizados a estímulos térmicos e nociceptores presentes em tecidos profundos, como músculos e articulações, que são sensibilizados a estímulos mecânicos.

Essa sensibilização engloba uma série de mediadores que se ligam diretamente a receptores localizados nos terminais das fibras periféricas. Um desses receptores é o TRPV-1, um canal iônico ativado por calor nocivo, baixo pH e capsaicina, que é fundamental para a hiperalgesia inflamatória. O TRPV-1 pode regular a dor através do SNC, e não apenas do sistema nervoso periférico, em casos de dor crônica. Também o TRPA-1, que pertence à mesma família TRP, é um ator central na sensibilização periférica (RONCHETTI; MIGLIORATI et DELFINO, 2017).

A dor fisiológica tem um caráter protetor, porém quando é persistente, se torna patológica e incapacitante. É essencial que o sistema nervoso codifique e reconheça este

estímulo doloroso o mais rapidamente possível, para assim evitar danos teciduais (KHALID et TUBBS, 2017).

No caso da dor crônica, é importante conseguir mensurá-la na clínica, para que a progressão da doença e a resposta da pessoa ou animal ao tratamento possam ser monitorados. Na área da pesquisa, também é importante a mensuração da dor, mas neste caso o objetivo é fornecer resultados significativos que irão promover a nossa compreensão dos mecanismos da dor ou como esta pode ser tratada de maneira mais adequada (JOHNSON, 2016).

Técnicas baseadas na primeira resposta de um animal frente a um estímulo progressivamente crescente são referidas como testes de limiar de dor ou teste sensorial quantitativo. Estes provaram ser muito úteis em uma variedade de situações (DICKINSON; LEACH; FLECKNELL, 2009; LOVE; MURRELL; WHAY, 2011).

As respostas aos estímulos nociceptivos têm componentes reflexos e cognitivos. Os componentes reflexos são processados na medula espinal dentro do dermatomo do estímulo (reflexos segmentares) e em associação com outros dermatomos (reflexos longos). Eles geralmente envolvem a retirada do membro estimulado ou espasmos da musculatura na área estimulada (JOHNSON, 2016).

Os componentes cognitivos são aqueles que incluem os centros superiores do sistema nervoso central, são considerados mais complexos e mais globais quando comparados aos componentes reflexos. O estado da função cognitiva de um animal é, portanto, decisivo na medida em que ele terá a percepção da dor como resultado de um estímulo nocivo específico (JOHNSON, 2016).

A partir disto, a identificação de compostos capazes de combater a dor e a inflamação com efeitos adversos limitados é um objetivo proeminente na pesquisa biomédica.

### **2.3 Composto ((2S,6S)-6-etyl-tetraidro-2H-pirano-2-IL) metanol**

As etapas envolvidas no processo de pesquisa e desenvolvimento de fármacos baseia-se, simplificadamente, no estudo de compostos para o tratamento de doenças. A primeira etapa consiste na descoberta de um composto com atividade terapêutica. Na segunda etapa são feitos testes *in vitro* para avaliação das propriedades biológicas das moléculas obtidas, por meio de bioensaios *in vivo* estudando o metabolismo e

investigando a farmacocinética e farmacodinâmica nos animais, o que é considerado o estudo pré-clínico. Na terceira e última etapa do processo são realizados estudos clínicos, em várias fases, etapa denominada estudo clínico (ZHANG et al., 2018).

Numa busca por substâncias bioativas de fontes naturais, detectou-se uma substância ativa, nas cascas de uma planta medicinal brasileira do gênero *Vitex*, com propriedades analgésicas comprovadas pelo modelo *tail-flick*. Tal substância foi então isolada, e sua estrutura foi atribuída provisoriamente como ácido (+)-cis-(6-etyl-tetrahidropirano-2-il)-fórmico. A fim de confirmar sua estrutura, e fornecer grandes quantidades desta substância para posterior ensaios farmacológicos, foi realizada a síntese laboratorial deste composto e ensaios farmacológicos demonstraram que ele também é analgésico (MIRANDA et al., 2004).

Marinho et al. (2006) avaliaram os efeitos antinociceptivos do ácido ( $\pm$ )-cis-(6-etyl-tetrahidropirano-2-il)-fórmico através de diversos testes, evidenciando que este composto pode mediar a antinocicepção em sítios periféricos, espinais e supraespinais mesmo quando administrada por via oral por meio da ativação de receptores opioides.

Capim et al. (2012) realizaram modificações químicas do composto ácido ( $\pm$ )-cis-(6-etyl-tetrahidropirano-2-il)-fórmico com o objetivo de melhoria da atividade antinociceptiva e também diminuição de efeitos adversos, obtendo-se então 10 novas moléculas derivadas, dentre estas, o composto ((2S,6S)-6-etyl-tetraidro-2H-pirano-2-il) metanol, denominado aqui de LS20, se apresentou como a mais promissora.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos Gerais**

- Avaliar a ação antinociceptiva do composto LS20 sob condições de dor aguda;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do composto LS20 sob condições de inflamação aguda;
- Elucidar os mecanismos responsáveis pelas suas atividades antinociceptiva e anti-inflamatória.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a atividade antinociceptiva do composto LS20 sobre a dor aguda através dos modelos de formalina, contorções abdominais induzidas por ácido acético, retirada da cauda e placa quente;
- Avaliar a possibilidade de interferência da performance motora sobre o efeito antinociceptivo demonstrado pelo composto LS20, através do teste de Rotarod;
- Avaliar a participação do sistema opioide sobre o efeito antinociceptivo do composto LS20, através da administração prévia de naloxona e antagonistas seletivos opioides no modelo de retirada da cauda;
- Avaliar a participação do sistema nitrérgico sobre o efeito antinociceptivo do composto LS20, através da administração prévia de L-NAME e L-arginina no modelo de retirada da cauda;
- Avaliar a participação do sistema colinérgico sobre o efeito antinociceptivo do composto LS20, através da administração prévia de atropina e mecamilamina no modelo de retirada da cauda;
- Avaliar a participação do sistema serotoninérgico sobre o efeito antinociceptivo do composto LS20, através da administração prévia de PCPA e ondansetron no modelo de retirada da cauda;
- Avaliar a atividade antiedemogênica do composto LS20 no modelo de edema de pata induzido por carragenina;
- 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;

- Avaliar a atividade enzimática das enzimas ciclooxigenases 1 e 2 frente ao composto LS20;
- Avaliar a toxicidade aguda do composto LS20;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do composto LS20;
- Avaliar o potencial de inibição da produção de citocinas e óxido nítrico em ensaio *in vitro*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos swiss machos, com peso de 20-25g. Os protocolos experimentais para este estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (CEUA/ICBS- UFRRJ) – sob nº 012/2018 (ANEXO). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 1^\circ \text{C}$ ) e ciclo claro-escuro de 12h. Água e a alimentação *ad libitum*, porém a ração foi retirada 8h antes da administração oral dos tratamentos.

### 4.2 Tratamentos

- Solução salina: Solução NaCl 0,9%. A solução foi administrada aos animais pertencentes ao grupo controle.
- Veículo: solução salina com dimetilsulfóxido, na concentração de 5% (v/v), para a solubilização do composto. Os grupos de animais tratados com veículo foram feitos para demonstrar que este não interfere na atividade antinociceptiva e/ou anti-inflamatória.
- Composto ((2S,6S)-6-etil-tetraidro-2H-pirano-2-il) metanol (LS20). Administrado por via oral (v.o) nas doses de 10, 100, 300 e 500  $\mu\text{mol/kg}$ .
- Fentanil: agonista de receptores opioides. Utilizado como controle positivo nos modelos de contorções abdominais, formalina, imersão da cauda em água quente e rotarod administrado por via subcutânea (s.c) na dose de 0,6  $\mu\text{mol/kg}$  (GONÇALVES et al., 2021).
- Dexametasona: anti-inflamatório esteroidal. Utilizado como controle positivo nos modelos de edema de pata e bolsa de ar subcutânea. Administrado por via subcutânea (s.c.) na dose de 5,7  $\mu\text{mol/kg}$  (SANTOS et al., 2015).
- Ácido acetilsalicílico: anti-inflamatório não esteroidal. Utilizado como controle positivo no modelo de formalina. Administrado por via oral (v.o) na dose de 1,11 mmol/kg (GONÇALVES et al., 2016).
- L-N6-(1-iminoetil)-lisina (LNIL): Foi utilizado como controle positivo (inibidor específico de iNOS) na quantificação de óxido nítrico celular, sendo administrado na concentração de 50  $\mu\text{g/ml}$  em cada poço.

- Ácido gálico: Foi utilizado como controle positivo na quantificação de citocinas, sendo administrado na concentração de 10 µg/ml em cada poço.

#### 4.3 Agentes químicos

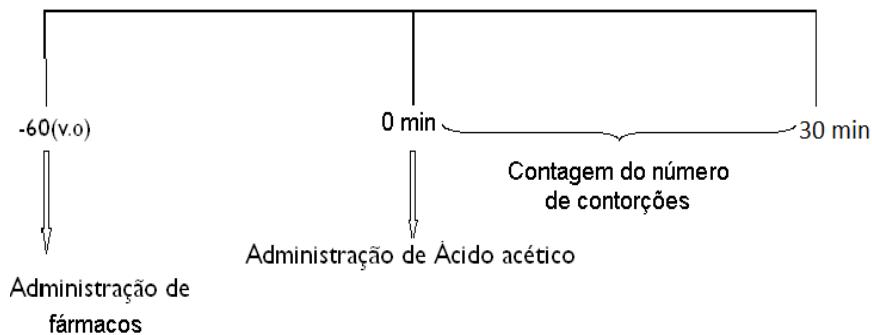
- Ácido acético: foi preparado na concentração de 0,8% (v/v) em solução salina e injetado por via intraperitoneal (i.p), 60 minutos após a administração oral dos tratamentos no modelo de contorções abdominais.
- Formalina: foi preparada na concentração de 2,5% (v/v) em solução salina e injetada em uma das patas traseiras dos animais, 60 minutos após a administração oral dos tratamentos no modelo de formalina.
- Carragenina: A carragenina foi preparada na concentração de 10 mg/ml. Administrada em volume de 0,1 mL, 60 minutos após a administração oral dos tratamentos no modelo de edema de pata e de bolsa de ar subcutâneo. No modelo de edema de pata a carragenina foi administrada em uma das patas traseiras dos animais.
- Naloxona: antagonista não-seletivo opioide. Administrado por via intraperitoneal (i.p) na dose de 15 µmol/kg no modelo de imersão da cauda em água quente (STEFANO et al., 2017).
- N-nitro-arginina-L-metil éster (L-NAME): inibidor não-seletivo da óxido nítrico sintase. Administrado por via intraperitoneal (i.p) na dose de 3,7 µmol/kg no modelo de imersão da cauda em água quente (GONÇALVES et al., 2016).
- L-arginina: Precursor do óxido nítrico. Administrado por via intraperitoneal (i.p) na dose de 20 µmol/kg no modelo de imersão da cauda em água quente (MARINHO et al., 2013).
- Naltrindol: antagonista seletivo de receptor opioide do tipo  $\delta$ . Administrado por via intraperitoneal (i.p) na dose de 7,2 µmol/kg no modelo de imersão da cauda em água quente (GONÇALVES et al., 2016).
- Metilnaltrexona: antagonista seletivo periférico de receptor opioide do tipo  $\mu$ . Administrado por via intraperitoneal (i.p) na dose de 8,4 µmol/kg no modelo de imersão da cauda em água quente (GONÇALVES et al., 2016).
- Nor-binaltorfimina: antagonista seletivo de receptor opioide do tipo  $\kappa$ . Administrado por via intraperitoneal (i.p) na dose de 4,5 µmol/kg no modelo de imersão da cauda em água quente (GONÇALVES et al., 2016).

- Atropina: antagonista não-seletivo de receptor muscarínico colinérgico. Administrado por via intraperitoneal (i.p) na dose de 17,2  $\mu$ mol/kg no modelo de imersão da cauda em água quente (ROSAS-BALLINA et al., 2011).
- Mecamilamina: antagonista não-seletivo de receptor colinérgico nicotínico. Administrado por via intraperitoneal (i.p) na dose de 9,0  $\mu$ mol/kg no modelo de imersão da cauda em água quente (ROSAS-BALLINA et al., 2011).
- Ondansetron: antagonista seletivo de receptor serotoninérgico do tipo 5-HT<sub>3</sub>. Administrado por via intraperitoneal (i.p) na dose de 1,7  $\mu$ mol/kg no modelo de imersão da cauda em água quente (ROSAS-BALLINA et al., 2011).
- 4-cloro-DL-fenilalanina (PCPA): Inibidor da síntese de serotonina. Administrado por via intraperitoneal por 3 dias consecutivos (0,5 mmol/kg) (HESS et al., 2010).
- Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT): Foi adicionado 1 mg/ml a cada poço para avaliação da viabilidade celular.

#### **4.4 Modelos experimentais**

##### **4.4.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético**

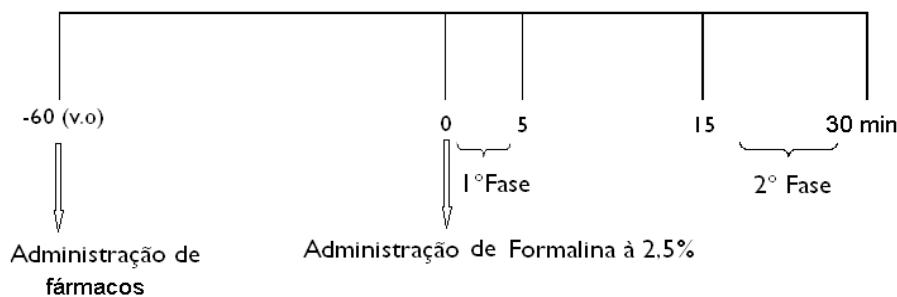
Este modelo foi usado para triagem da atividade antinociceptiva (KOSTER et al., 1959). Solução salina, veículo e o composto LS20 (10, 100 e 300  $\mu$ mol/kg) foram administrados por via oral, enquanto fentanil (0,6  $\mu$ mol/kg) foi administrado por via subcutânea. As contorções abdominais foram induzidas pela administração intraperitoneal de 0,01 ml/g de ácido acético (0,8%). A contagem do número de contorções foi iniciada imediatamente após a injeção e permaneceu por um período de 30 minutos (Figura 7). O padrão de contorção abdominal estabelecido para contagem foi 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 7: Protocolo do modelo de contorção abdominal**

#### 4.4.2 Teste da formalina

Este modelo foi utilizado para avaliação da dor inflamatória e não-inflamatória (HUNSKAAR e HOLE., 1987). Solução salina, veículo, ácido acetilsalicílico (1,11 mmol/kg), e o composto LS20 (10, 100 e 300  $\mu$ mol/kg) foram administrados por via oral, enquanto fentanil (0,6  $\mu$ mol/kg) foi administrado por via subcutânea. Injetou-se 0,02 mL de uma solução de formalina à 2,5% em uma das patas traseiras. Posteriormente, mediu-se o tempo (em segundos) que o animal permaneceu lambendo a pata em que foi administrada a solução. A medida do tempo foi 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 8).



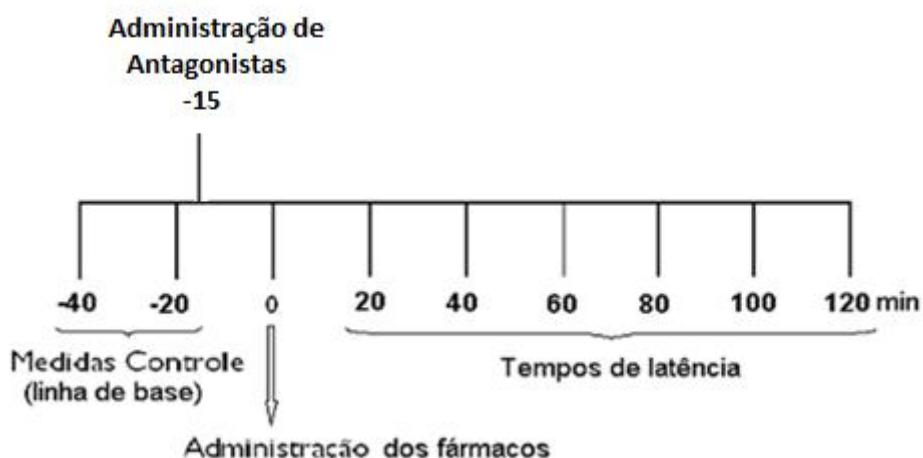
**Figura 8: Protocolo do modelo da formalina**

#### 4.4.3 Modelo de imersão da cauda em água quente

Este modelo foi utilizado para avaliação da atividade antinociceptiva não-inflamatória envolvendo circuitos espinais (BEN-BASSAT et al., 1959). Os animais foram tratados com solução salina, veículo e o composto LS20 (10, 100 e 300  $\mu$ mol/kg)

por via oral, assim como fentanil ( $0,6 \mu\text{mol}/\text{kg}$ ) no grupo controle positivo, por via subcutânea. Neste modelo, o animal foi imobilizado dentro de um recipiente cilíndrico e a cauda foi imersa (aproximadamente 2 cm) em banho-maria com água aquecida a uma temperatura de  $50 \pm 1^\circ\text{C}$ . Mediou-se o tempo (em segundos) em que o animal demorou a retirar a cauda de dentro da água, tempo este chamado de “tempo de latência”. Foram feitas oito medidas dos tempos de latência com intervalos de 20 minutos entre cada uma delas (Figura 9). As primeiras duas medidas foram realizadas antes da administração dos fármacos (chamadas de medidas controle). Para se evitar danos teciduais causados pela temperatura na cauda dos animais, calculou-se um “cut-off” de 3 vezes o valor da linha de base. Os resultados foram expressos como tempo de reatividade em segundos.

Na tentativa de elucidação do mecanismo de ação do composto LS20, grupos experimentais receberam antagonistas específicos (L-NAME, L-arginina, atropina, mecamilamina, ondansetrona, 4-cloro-DL-fenilalanina (PCPA), naloxona, metilnaltrexona, nor-binaltorfimina e naltrindol) por via intraperitoneal, 15 minutos antes da administração oral do composto.

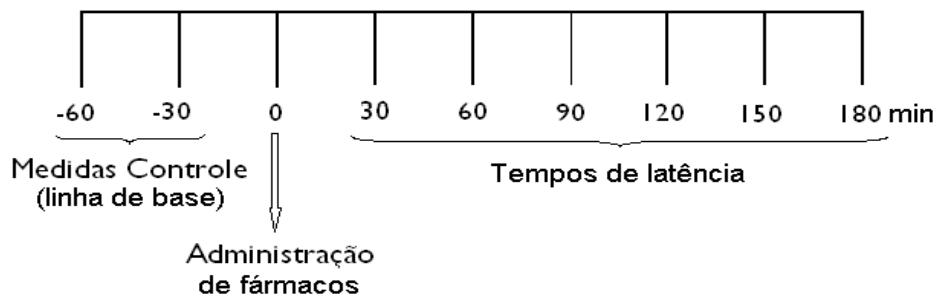


**Figura 9: Protocolo do modelo de imersão de cauda em água quente**

#### 4.4.4 Modelo da placa quente

Este modelo foi utilizado para avaliação de atividade antinociceptiva não-inflamatória envolvendo circuitos supraespinais (SAHLEY et BERNTSON, 1979). Os animais foram tratados com solução salina, veículo e o composto LS20 (10, 100 e 300  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) por via oral, assim como fentanil ( $0,6 \mu\text{mol}/\text{kg}$ ) no grupo controle positivo, por via subcutânea. Os animais foram colocados em uma placa aquecida a uma temperatura de  $55 \pm 1^\circ\text{C}$ . Registrhou-se (em segundos) o tempo que o animal leva para retirar e/ou

lamber as patas posteriores, denominado como tempo de latência (Figura 10). Foram feitas 8 medidas dos tempos de latência com intervalos de 30 minutos entre cada uma delas. As primeiras duas medidas foram realizadas antes da administração dos fármacos (medidas controle). Para se evitar danos teciduais causados pela temperatura na cauda dos animais, calculamos um “*cut-off*” de 3 vezes o valor da linha de base. Os resultados foram expressos como tempo de reatividade em segundos.

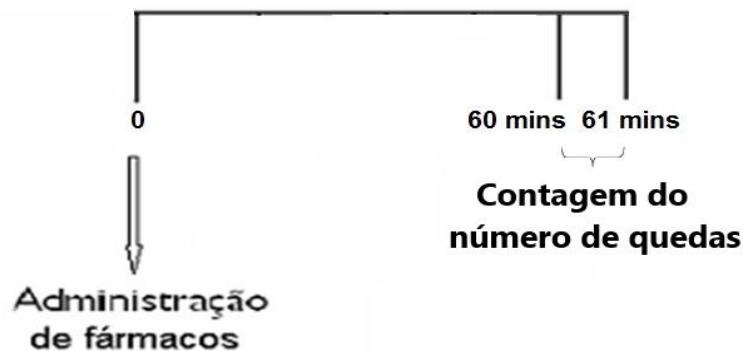


**Figura 10: Protocolo do modelo de placa quente**

#### 4.4.5 Teste de Rotarod

Este modelo foi realizado para avaliar a integridade do sistema motor dos animais. Solução salina, veículo e o composto LS20 (100  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) foram administrados por via oral, assim como fentanil (0,6  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) por via subcutânea. O procedimento da barra giratória, descrito por Dunham et Miya (1957), é capaz de detectar prejuízos neurológicos como ataxia, sedação e hiperexcitabilidade e foi executado em um aparelho composto por uma barra plástica rugosa de 3 cm de diâmetro e de 50 cm de comprimento.

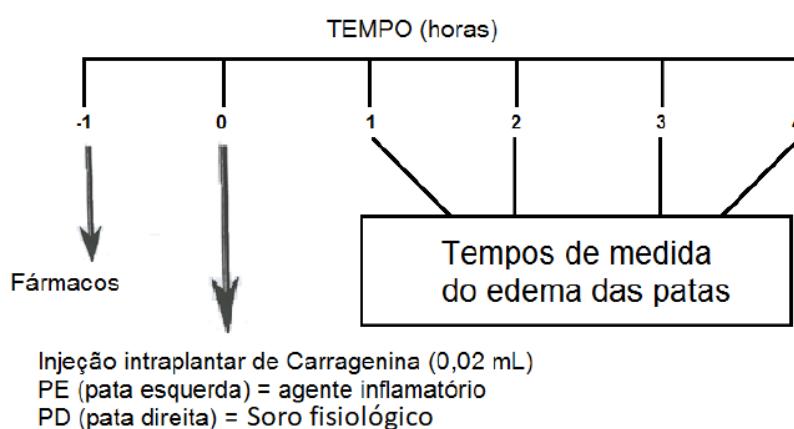
O procedimento consiste na avaliação da capacidade do animal em se manter sobre uma barra que gira a uma velocidade de 20 rpm, permitindo-se até três reconduções após queda, durante o período de avaliação que é de 1 minuto (Figura 11). Considerando que uma parcela dos animais pode não ser naturalmente apta a se manter sobre a barra giratória, procedeu-se a uma pré-seleção na qual foram descartados de todo o procedimento os animais não-aptos. Esta pré-seleção consistiu em uma sessão experimental realizada no dia anterior ao do teste. A avaliação consistiu na contagem do número de quedas no intervalo de 1 minuto.



**Figura 11: Protocolo do modelo de Rotarod**

#### 4.4.6 Modelo de edema de pata

Este modelo de avaliação edemato-gênica utiliza a técnica de pletismografia (FERREIRA et VAN ARMAN, 1979), que consiste na utilização do pletismômetro, um equipamento capaz de registrar pequenas variações no volume de líquido deslocado pela inserção da pata, até a articulação tibio-társica. Solução salina, veículo e o composto LS20 (100, 300 e 500  $\mu\text{mol/kg}$ ) foram administrados por via oral, e a dexametasona foi administrada por via subcutânea (5,7  $\mu\text{mol/kg}$ ). 60 minutos após a administração dos fármacos, o edema foi induzido pela injeção intraplantar de 0,02 mL de carragenina (1%, p/v) na pata esquerda do animal. Na pata direita injetou-se o mesmo volume de solução salina. O edema foi avaliado nos tempos de 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção da carragenina (Figura 12).

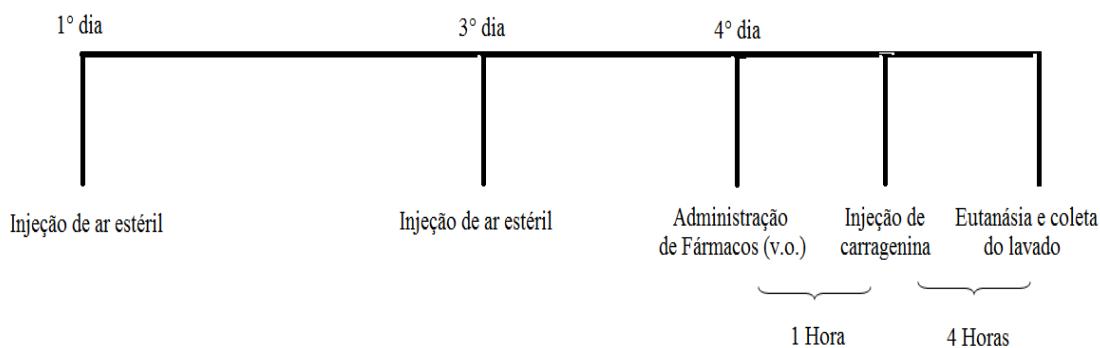


**Figura 12: Protocolo do modelo de Edema de Pata**

#### 4.4.7 Modelo da bolsa de ar subcutâneo

Solução salina, veículo e o composto LS20 (100, 300 e 500  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) foram administrados por via oral, e a dexametasona foi administrada por via subcutânea (5,7  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ). Uma área do dorso dos animais (3cm x 2,5 cm) foi desinfetada. 7 ml de ar estéril foram injetados subcutaneamente em um único ponto (VIGIL et al., 2008). As bolsas de ar foram injetadas com ar estéril em dias alternados por 3 dias. Durante este período foi feita a avaliação do modelo, em que caso não fosse observado eritema, inchaço, exsudação e vazamento de ar, seria considerado que o modelo foi estabelecido com sucesso. No quarto dia então, os animais receberam 1 ml de solução de carragenina (1%) administrada por via subcutânea no interior da bolsa de ar subcutâneo e 4 horas depois foram eutanasiados com uma sobredose de pentobarbital (Figura 13).

Os animais foram então fixados em uma mesa cirúrgica e uma incisão na pele foi feita para perfurar a bolsa de ar. A cavidade subcutânea foi lavada com 1 ml de tampão fosfato salina estéril (pH 7,6 contendo NaCl (130 mM), Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5 mM) e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 mM) e heparina (20 UI/mL) em água destilada. As amostras de lavado subcutâneo foram coletadas e uma alíquota de 20 $\mu\text{L}$  do lavado subcutâneo de cada animal foi transferida para um Eppendorf® contendo 380 $\mu\text{L}$  de líquido de Türk, possibilitando assim a coloração dos leucócitos e sua posterior contagem em câmara de Neubauer sob microscopia óptica.



**Figura 13: Protocolo do modelo de bolsa de ar subcutâneo**

#### **4.4.8 Quantificação de mediadores inflamatórios**

Objetivando quantificar as citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 presentes nos exsudatos, estes foram centrifugados a 170 x g por 10 min à 4° C, os sobrenadantes foram coletados 4 horas após a realização do modelo de bolsa de ar subcutâneo. Se procedeu então a determinação da concentração destas citocinas em alíquotas (50 $\mu$ L) do lavado subcutâneo. Para isto, foram utilizados kit's de imunoensaio enzimático (ELISA Kit Mouse, Cayman Chemical®), os quais mensuram as concentrações de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e, IL-10 na amostra através do método de ELISA, semelhante ao estudo de RAMANA et al. (2007).

#### **4.4.9 Cultura de células**

Monócitos-macrófagos de camundongo RAW 264.7 (ATCC® TIB-71TM) foram cultivados em frascos com meio *Institute Roswell Park Memorial-1640* (RPMI-1640) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina e 15 mM de HEPES em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar a 37° C. Quando as culturas formaram uma monocamada confluente, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e adicionadas a uma placa de 96 poços com RPMI a uma densidade de 2 x 10<sup>6</sup> células/ml.

#### **4.4.10 Avaliação de citotoxicidade *in vitro***

O método colorimétrico MTT proposto por Mosmann (1983) foi utilizado para análise de citotoxicidade. Duas linhagens celulares diferentes foram usadas: RAW 264.7 (de macrófagos) e L929 (de fibroblastos). Aproximadamente 1 x 10<sup>4</sup> células/poço foram semeadas em placas de 96 poços incubadas na presença de 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C durante a noite. As células foram expostas a diferentes concentrações de amostra (7,8 - 500,0  $\mu$ g/ml). Após 24 h de incubação, 100  $\mu$ l de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (1 mg/ml) foram adicionados a cada poço e incubados por mais 2 h (Figura 14). Após o meio ser aspirado, 0,1 ml de DMSO foi adicionado às células para dissolver o formazan. A absorbância de cada grupo foi medida em leitor de microplaca em comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade e os experimentos foram realizados em triplicata.



**Figura 14: Protocolo experimental do modelo de avaliação de citotoxicidade**

#### 4.4.11 Determinação indireta *in vitro* de óxido nítrico

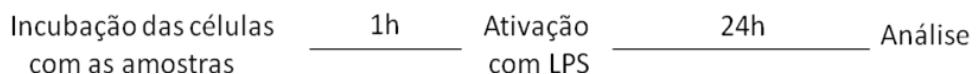
A fim de determinar a produção de NO em cultura de células, a concentração de nitrito nos sobrenadantes de células aderentes RAW 264.7 foi medida usando a reação de Griess. Os macrófagos foram semeados em placas de 96 poços a uma densidade de  $1,2 \times 10^4$  células/poço e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  na presença de 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 h. As células foram expostas a diferentes concentrações de LS20 (0-100,0  $\mu\text{g/ml}$ ) durante uma hora seguido por 1  $\mu\text{g/ml}$  de ativação com LPS durante 20 h. L-N6-(1-iminoetil)-lisina (L-NIL - um inibidor específico de iNOS - 50  $\mu\text{g/ml}$ ) foi usado como controle positivo. Após 20 h, o nitrito foi quantificado no sobrenadante da célula usando o reagente de Griess (GREEN et al., 1982) (Figura 15). A absorvância foi determinada em um leitor de microplaca a 540 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como média  $\pm$  EPM da concentração de nitrito ( $\mu\text{M}$ ).



**Figura 15: Protocolo experimental do modelo de determinação indireta de óxido nítrico**

#### 4.4.12 Determinação *in vitro* de citocinas

Para quantificação de citocinas, as células RAW 264.7 foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de  $1,2 \times 10^4$  células/poço e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  na presença de 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 h. As células foram expostas a diferentes concentrações de LS20 (1,0 - 100,0  $\mu\text{g/ml}$ ) e estimuladas com LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ). O ácido gálico (10  $\mu\text{g/ml}$ ) foi usado como controle positivo. Após 24 h, o sobrenadante celular foi removido e utilizado para quantificação das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  por ELISA, e para anticorpos e padrões específicos para cada citocina (Figura 16). A absorvância foi determinada em um leitor de microplaca a 450 e 570 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em pg/ml.



**Figura 16: Protocolo experimental do modelo de determinação de citocinas**

#### 4.4.13 Ensaio de inibição de COX *in vitro*

A atividade inibitória direta de LS20 - em várias concentrações - nas atividades COX-1 e COX-2 foi medida com um *kit* de ensaio de triagem de inibidor COX (Cayman Chemical®) de acordo com as instruções do fabricante, com base na medição de prostaglandina (PG) por ELISA e sua absorbância foi determinada através de leitor de ELISA.

#### 4.4.14 Avaliação toxicológica oral aguda

Foi realizado modelo de toxicidade aguda, ou chamado também de dose fixa de acordo com o modelo experimental descrito por Lorke (1983) a fim de determinar os valores de DL<sub>50</sub>. Uma única dose oral de LS20 (5 mmol/kg) foi administrada a um grupo de animais. Foi considerada a dose de acordo com os critérios de classificação da comunidade Europeia (OGA et CAMARGO, 2003). Os animais foram colocados posteriormente em uma câmara de observação onde foram observados parâmetros comportamentais além de outros como convulsão, hiperatividade, perda do reflexo, alteração da frequência respiratória e sedação.

### 4.5 Análise estatística

Todos os resultados foram quantificados e expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Grupos experimentais de 6 animais foram usados para todos os ensaios biológicos. A suposição de distribuição normal de dados foi avaliada com o teste de Shapiro-Wilk. Para os dados que passaram no teste de normalidade, comparações paramétricas foram realizadas. Nesse caso, a significância estatística entre os grupos foi realizada pela aplicação de análise de variância (ANOVA) em uma via para os modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, formalina, rotarod, bolsa de ar subcutâneo, viabilidade celular, determinação *in vitro* de citocinas e óxido nítrico, e de duas vias para o modelo de edema de pata, imersão de cauda e placa quente, ambos

acompanhados pelo teste post hoc de Bonferroni. Os valores de  $p$  menores que 0,05; 0,01 e 0,001 foram usados como referência. Em adição, o método de regressão não linear foi utilizado para calcular  $CI_{50}$  na atividade COX. Todos os testes estatísticos foram feitos utilizando o Software GraphPad 6.0 (San Diego, CA, USA).

## 5 RESULTADOS

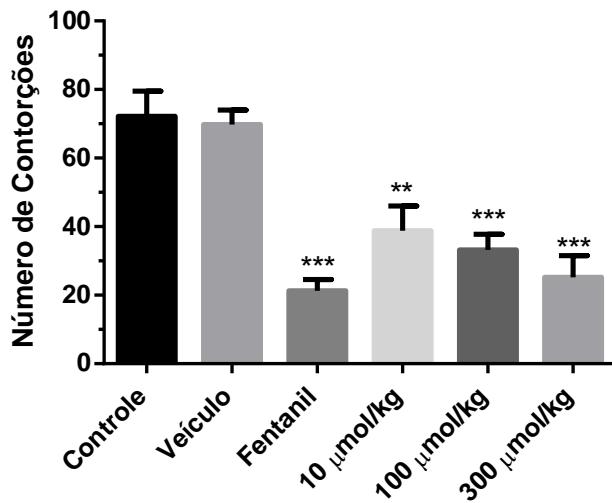
### 5.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

A administração de 0,1ml/g de ácido acético (0,8%) por via intraperitoneal (i.p.) produziu  $72,2 \pm 7,3$  contorções em um intervalo de 30 minutos no grupo controle. A administração oral do composto LS20 nas doses de 10, 100 e 300  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  e fentanil (0,6  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) foi capaz de inibir o número de contorções abdominais em relação ao grupo experimental controle de forma dose-dependente, indicando a atividade antinociceptiva deste composto (Tabela 1) (Figura 17). Os percentuais de inibição do número de contorções abdominais obtidos foram: 46,3% ( $38,8 \pm 7,2$  contorções), 54,0% ( $33,2 \pm 4,6$  contorções) e 65,1% ( $25,2 \pm 6,3$  contorções), respectivamente para as doses de 10, 100 e 300  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ . A administração subcutânea de fentanil (0,6  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) inibiu o número de contorções abdominais em aproximadamente 70,5%, quando comparada ao grupo controle. Com relação ao grupo veículo, houve inibição de 3,3% do número de contorções abdominais ( $69,8 \pm 4,2$ ) quando comparado com grupo controle, não apresentando entre si diferença estatística.

**Tabela 1: Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético**

Tratamentos	Número de contorções (Média $\pm$ EPM)	Inibição (%)
<b>Controle</b>	$72,2 \pm 7,3$	---
<b>Veículo</b>	$69,8 \pm 4,2$	3,3%
<b>Fentanil</b>	$21,3 \pm 3,2^{***}$	70,5%
<b>LS20 10 <math>\mu\text{mol}/\text{kg}</math></b>	$38,8 \pm 7,2^{**}$	46,3%
<b>LS20 100 <math>\mu\text{mol}/\text{kg}</math></b>	$33,2 \pm 4,6^{***}$	54,0%
<b>LS20 300 <math>\mu\text{mol}/\text{kg}</math></b>	$25,2 \pm 6,3^{***}$	65,1%

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



**Figura 17: Efeito antinociceptivo do composto LS20 no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os animais foram tratados por via oral com solução salina, veículo, fentanil (0,6  $\mu\text{mol/kg}$ ) e LS20 – 10, 100 e 300  $\mu\text{mol/kg}$ . Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 6$ ) do número de contorções. A significância estatística (\*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com fentanil, veículo 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 LS20 (10, 100 e 300  $\mu\text{mol/kg}$ ; v.o.). O fentanil (0,6  $\mu\text{mol/kg}$ ; s.c.) e o ácido acetilsalicílico (1,11 mmol/kg; v.o.) foram utilizados como controle positivo para antinocicepção. Nos grupos de animais tratados somente com a salina (controle negativo) e o veículo, o tempo de lambedura (em segundos) obtido na 1<sup>º</sup> fase foi de  $76,4 \pm 11,2$  e  $77,34 \pm 12,3$ , e o tempo de lambedura (em segundos) obtido na segunda fase foi de  $180,1 \pm 10,1$  e  $171,2 \pm 32,1$ , respectivamente. Não houve diferença estatística entre os grupos.

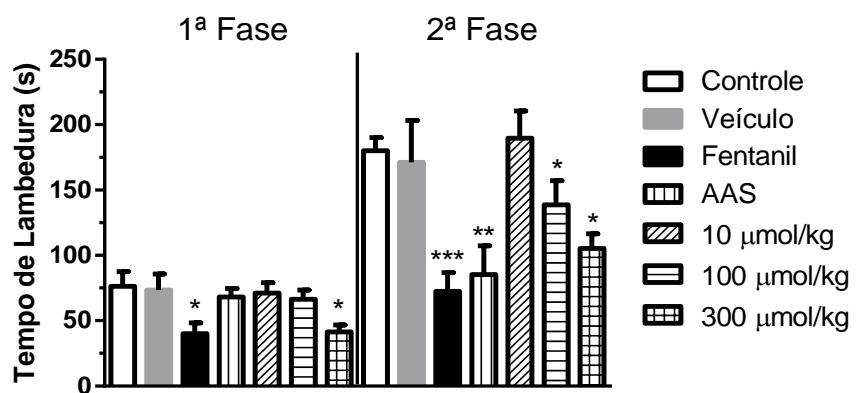
Na 1<sup>º</sup> fase do modelo, os percentuais de redução do tempo de lambedura foram de aproximadamente 6,8% ( $71,2 \pm 7,8$  segundos), 13,2% ( $66,3 \pm 7,2$  segundos) e 45,9% ( $41,3 \pm 5,4$  segundos) para as doses de 10, 100 e 300  $\mu\text{mol/kg}$ , respectivamente, apresentando diferença significativa em relação ao grupo controle somente com a maior dose. O percentual de redução do tempo de lambedura proporcionado pelo fentanil e pelo ácido acetilsalicílico foi, respectivamente, 47,3% ( $40,2 \pm 8,2$  segundos) e 10,6% ( $68,3 \pm 6,3$  segundos), apresentando diferença significativa em relação ao grupo controle somente com o grupo fentanil.

Com relação a 2º fase do modelo, os percentuais de redução do tempo de lambedura foram de aproximadamente 22,9% ( $138,7 \pm 18,5$  segundos) e 41,5% ( $105,3 \pm 11,2$  segundos) para as doses de 100 e 300  $\mu\text{mol/kg}$ , ambos apresentando diferença significativa em relação ao grupo controle. A dose de 10  $\mu\text{mol/kg}$  não apresentou redução no tempo de lambedura. O percentual de redução do tempo de lambedura proporcionado pelo fentanil e pelo ácido acetilsalicílico foi, respectivamente, 59,8% ( $72,3 \pm 14,5$  segundos) e 52,6% ( $85,3 \pm 22,1$  segundos), ambos apresentando diferença significativa em relação ao grupo controle (Tabela 2) (Figura 18).

**Tabela 2: Tempos de lambedura, em segundos, no modelo de formalina**

Tratamentos	Tempo de Lambedura (segundos – Média $\pm$ EPM)			
	1º Fase		2º Fase	
	Tempo (s)	%	Tempo (s)	%
Controle	$76,4 \pm 11,2$	---	$180,1 \pm 10,1$	---
Veículo	$77,34 \pm 12,3$	---	$171,2 \pm 32,1$	---
<b>Fentanil</b>	$40,2 \pm 8,2^*$	47,3%	$72,3 \pm 14,5^{***}$	59,8
Ácido acetilsalicílico	$68,3 \pm 6,3$	10,6	$85,3 \pm 22,1^{**}$	52,6
<b>LS20 10 <math>\mu\text{mol/kg}</math></b>	$71,2 \pm 7,8$	6,8	$189,6 \pm 21,0$	---
<b>LS20 100 <math>\mu\text{mol/kg}</math></b>	$66,3 \pm 7,2$	13,2	$138,7 \pm 18,5^*$	22,9
<b>LS20 300 <math>\mu\text{mol/kg}</math></b>	$41,3 \pm 5,4^*$	45,9	$105,3 \pm 11,2^*$	41,5

\*  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, fentanil, ácido acetilsalicílico e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.



**Figura 18: Efeito antinociceptivo do composto LS20 no modelo de formalina.** Os animais foram tratados por via oral com solução salina, veículo, fentanil (0,6  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ; s.c.), Ácido acetilsalicílico (AAS - 1,11 mmol/kg) e LS26 – 10, 100 e 300  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ . Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 6$ ) do tempo de lambedura. A significância estatística (\*  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, fentanil, ácido acetilsalicílico e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni

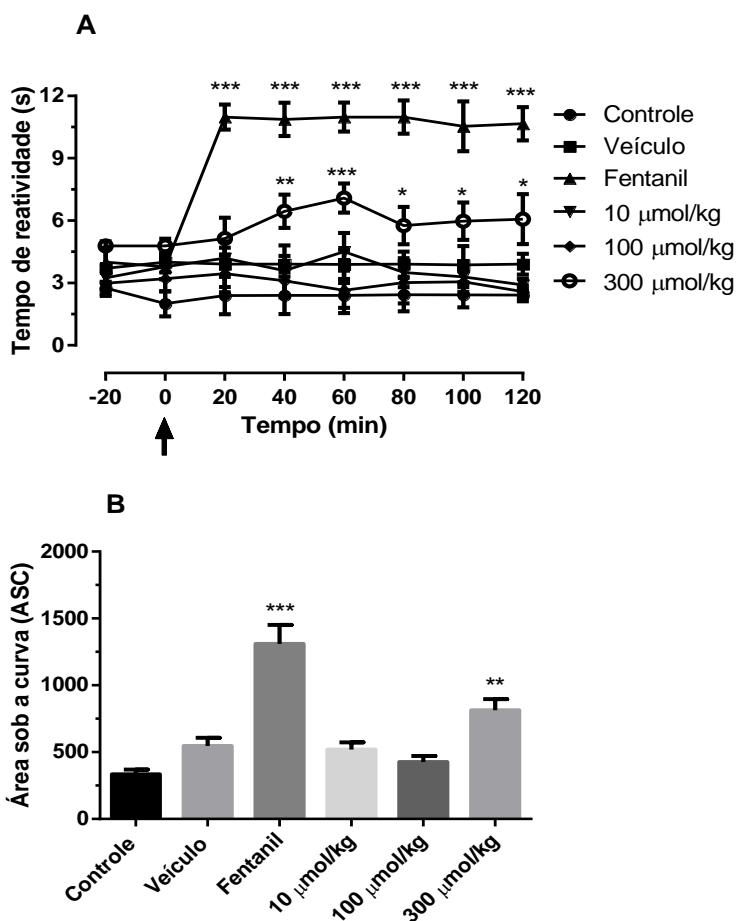
### 5.3 Modelo de imersão da cauda em água quente

Neste teste, os animais foram tratados com o composto LS20 (10, 100 e 300  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ; v.o). O fentanil (0,6  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) foi utilizado como controle positivo. A figura 19 demonstra que a administração de 300  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  do composto LS20 apresenta diferença significativa em relação ao grupo controle, apresentando 143,6% de aumento em relação a área sob a curva, enquanto o fentanil mostrou 292,6% de aumento, confirmando assim o seu efeito antinociceptivo no modelo. O composto LS20 na maior dose demonstrou efeito a partir do tempo de 40 min, enquanto o fentanil demonstrou em todas as medidas feitas (Tabela 3).

**Tabela 3: Tempos de latência, em segundos, no modelo de imersão da cauda em água quente**

Tratamentos	Linha de Base	Tempo de Latência (segundos – Média ± EPM)							
		20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min		
<b>Controle</b>		2,38 ± 0,3	2,39 ± 0,9	2,41 ± 0,6	2,41 ± 0,8	2,44 ± 0,6	2,43 ± 0,6	2,42 ± 0,3	±
<b>Veículo</b>		3,75 ± 0,6	3,91 ± 1,1	3,91 ± 0,4	3,89 ± 0,7	3,90 ± 0,6	3,87 ± 0,9	3,90 ± 0,5	±
<b>Fentanil</b>		3,89 ± 0,7	10,98 ± 0,6***	10,87 ± 0,8***	10,98 ± 0,7***	10,98 ± 0,8***	10,54 ± 1,2***	10,66 ± 0,8***	+
<b>LS20 10 µmol/kg</b>		3,52 ± 0,6	4,20 ± 0,5	3,60 ± 1,2	4,50 ± 0,9	3,50 ± 0,7	3,30 ± 0,5	2,90 ± 0,3	±
<b>LS20 100 µmol/kg</b>		3,09 ± 0,6	3,45 ± 0,9	3,11 ± 0,8	2,65 ± 1,1	3,02 ± 1,0	3,06 ± 0,5	2,58 ± 0,3	±
<b>LS20 300 µmol/kg</b>		4,78 ± 0,6	5,14 ± 1,0	6,45 ± 0,8**	7,08 ± 0,7***	5,76 ± 0,9*	5,97 ± 0,9*	6,07 ± 1,2*	±

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



**Figura 19: Efeito antinociceptivo do composto LS20 (LS26 - 10, 100 e 300  $\mu\text{mol/kg}$ ) no modelo de imersão da cauda em água quente. Em A, os animais foram tratados por via oral com solução salina, veículo, fentanil (0,6  $\mu\text{mol/kg}$ ; s.c.) e doses crescentes do composto (10, 100 e 300  $\mu\text{mol/kg}$ ). Em B, representação do cálculo da área sob a curva. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 6$ ) do tempo de reatividade. Em A, a significância estatística ( $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$ ) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, fentanil e doses crescentes do composto, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Em B, a significância estatística ( $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$ ) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, fentanil e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni**

### 5.3.1 Avaliação do sistema opioide e do sistema nitrérgico sobre o efeito antinociceptivo do composto LS20 no modelo de retirada da cauda

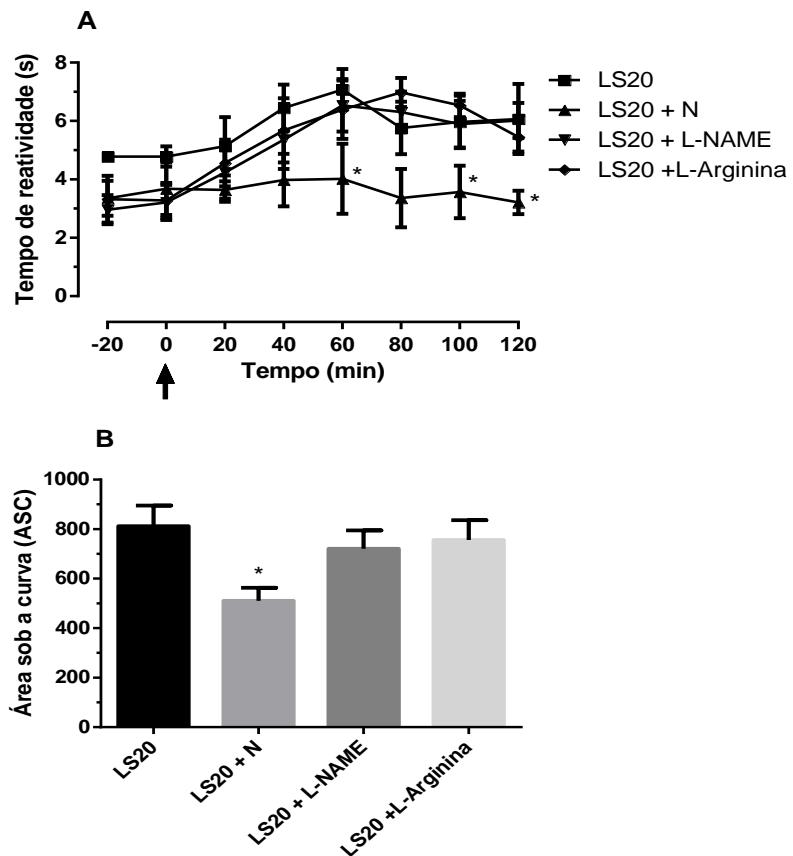
A figura 20 mostra o efeito induzido pela administração isolada do composto LS20 na dose de 300  $\mu\text{mol/kg}$  e combinada com a prévia administração de naloxona (15  $\mu\text{mol/kg}$ ; antagonista não-seletivo de receptor opioide), L-NAME (3,7  $\mu\text{mol/kg}$ ; inibidor

não seletivo da óxido nítrico sintase) e L-arginina (20  $\mu$ mol/kg; precursor do óxido nítrico). Podemos observar uma redução do efeito antinociceptivo produzido pelo composto LS20 com a prévia administração de naloxona, na ordem de 37,1% de redução da área sob a curva, não sendo observada redução do efeito antinociceptivo pela administração de L-NAME e L-arginina, de modo a apresentar uma possível participação do sistema opioide na ação do composto (Tabela 4).

**Tabela 4: Avaliação da influência da administração prévia de Naloxona, L-NAME e L-arginina sobre os tempos de latência induzidos pelo LS20 no modelo de imersão da cauda em água quente**

Tratamentos	Linha de Base	Tempo de Latência (segundos - Média $\pm$ EPM)						
		20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min	
<b>LS20</b>		4,78 $\pm$ 0,6	5,14 $\pm$ 1,0	6,45 $\pm$ 0,8	7,08 $\pm$ 0,7	5,76 $\pm$ 0,9	5,97 $\pm$ 0,9	6,07 $\pm$ 1,2
<b>LS20 + N</b>		3,52 $\pm$ 0,7	3,64 $\pm$ 0,3	3,98 $\pm$ 0,9	4,02 $\pm$ 1,2*	3,36 $\pm$ 1,0	3,57 $\pm$ 0,9*	3,21 $\pm$ 0,4*
<b>LS20 + L-NAME</b>		3,09 $\pm$ 0,4	4,23 $\pm$ 1,0	5,36 $\pm$ 1,0	6,54 $\pm$ 0,9	6,31 $\pm$ 0,7	5,89 $\pm$ 0,8	6,02 $\pm$ 0,6
<b>LS20 + L-arginina</b>		3,30 $\pm$ 0,3	4,56 $\pm$ 0,8	5,68 $\pm$ 1,1	6,39 $\pm$ 1,0	6,98 $\pm$ 0,5	6,54 $\pm$ 0,4	5,45 $\pm$ 0,5

\*  $p < 0,05$  entre o composto isolado e o composto associado a naloxona, L-NAME e L-arginina por Two-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.



**Figura 20: Influência da administração prévia de naloxona (N), N-nitro-arginina-L-metil éster (L-NAME) e L-arginina sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto LS20 (300  $\mu$ mol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente. Em A, Os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com naloxona (15  $\mu$ mol/kg), L-NAME (3,7  $\mu$ mol/kg), e L-arginina (20  $\mu$ mol/kg) 15 minutos antes da administração do composto. Em B, representação do cálculo da área sob a curva. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 6$ ) do tempo de reatividade. Em A, a significância estatística (\* $p < 0,05$ ) foi calculada entre o composto isolado e o composto combinado a naloxona, L-NAME e L-arginina por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Em B, a significância estatística (\* $p < 0,05$ ) foi calculada entre o composto isolado e o composto combinado a naloxona, L-NAME e L-arginina por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni**

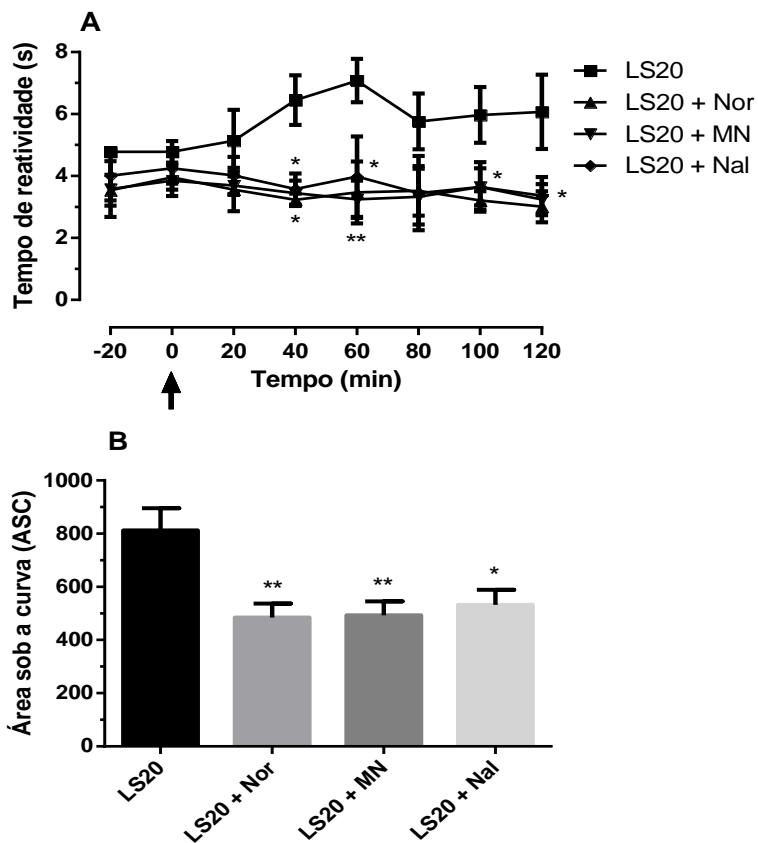
Considerando a possível participação do sistema opioide no mecanismo de ação do composto, foi então avaliada a participação seletiva de receptores opioides ( $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ ). Na figura 21 foi avaliada a interferência da administração prévia de metilnaltrexona (8,4  $\mu$ mol/kg; antagonista seletivo do receptor  $\mu$  opioide), de naltrindol (7,2  $\mu$ mol/kg; antagonista seletivo do receptor  $\delta$  opioide) e de nor-binaltorfimina (4,5  $\mu$ mol/kg; antagonista seletivo do receptor  $\kappa$  opioide) sobre o efeito antinociceptivo do composto LS20, sendo observado que todos os antagonistas foram capazes de reduzir o efeito do composto em 39,3%, 34,4% e 40,3% no cálculo da área sob a curva, respectivamente;

revelando a possibilidade no envolvimento de receptores opioides  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$  no efeito antinociceptivo de LS20 (Tabela 5).

**Tabela 5: Avaliação da influência da administração prévia de Metilnaltrexona, Naltrindol e Nor-Binaltorfimina sobre os tempos de latência induzidos pelo LS20 no modelo de imersão da cauda em água quente**

Tratamentos	Linha de Base	Tempo de Latência (segundos - Média $\pm$ EPM)						
		20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min	
<b>LS26</b>	4,78 $\pm$ 0,6	5,14 $\pm$ 1,0	6,45 $\pm$ 0,8	7,08 $\pm$ 0,7	5,76 $\pm$ 0,9	5,97 $\pm$ 0,9	6,07 $\pm$ 1,2	
<b>LS26 + MN</b>	3,72 $\pm$ 0,5	3,69 $\pm$ 0,3	3,45 $\pm$ 0,4*	3,25 $\pm$ 0,6**	3,33 $\pm$ 0,9	3,65 $\pm$ 0,8	3,24 $\pm$ 0,5*	
<b>LS26 + Nal</b>	4,13 $\pm$ 0,4	4,02 $\pm$ 0,6	3,58 $\pm$ 0,5*	3,98 $\pm$ 1,3*	3,45 $\pm$ 1,2	3,65 $\pm$ 0,6	3,37 $\pm$ 0,6*	
<b>LS26 + Nor</b>	3,75 $\pm$ 0,4	3,56 $\pm$ 0,7	3,23 $\pm$ 0,2*	3,47 $\pm$ 1,0*	3,52 $\pm$ 0,8	3,21 $\pm$ 0,3*	3,01 $\pm$ 0,5*	

\*p < 0,05 e \*\* p < 0,01 entre o composto isolado e o composto associado a Metilnaltrexona, Naltrindol e Nor-Binaltorfimina por Two-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.



**Figura 21: Influência da administração prévia de metilnaltrexona (MN), Naltrindol (Nal) e Nor-Binaltorfimina (Nor) sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto LS20 (300 µmol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente.** Em A, Os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com metilnaltrexona (8,4 µmol/kg), Naltrindol (7,2 µmol/kg) e Nor-Binaltorfimina (4,5 µmol/kg) 15 minutos antes da administração do composto. Em B, representação do cálculo da área sob a curva. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. ( $n = 6$ ) do tempo de reatividade. Em A, a significância estatística (\* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ ) foi calculada entre o composto isolado e o composto combinado a metilnaltrexona, Naltrindol e Nor-Binaltorfimina por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Em B, a significância estatística (\* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ ) foi calculada entre o composto isolado e o composto combinado a metilnaltrexona, Naltrindol e Nor-Binaltorfimina por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni

### 5.3.2 Avaliação do sistema colinérgico e serotoninérgico sobre o efeito antinociceptivo do composto LS20 no modelo de retirada da cauda

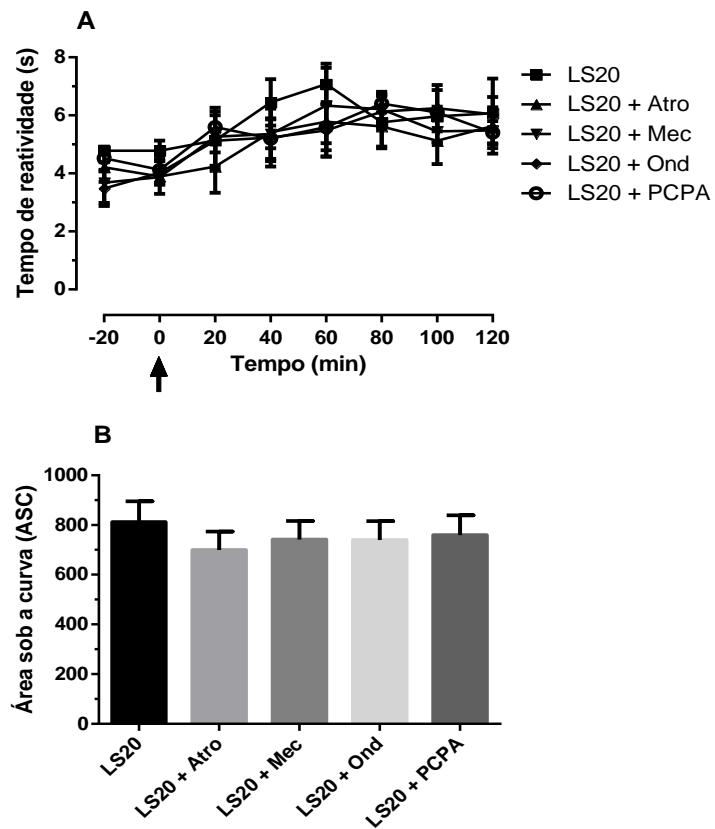
Na figura 22 foi avaliada a interferência da administração prévia de atropina (17,2 µmol/kg; antagonista não seletivo de receptor colinérgico muscarínico), de mecamilamina (9 µmol/kg; antagonista não seletivo de receptor colinérgico nicotínico), de ondansetron (1,7 µmol/kg; antagonista seletivo de receptor serotoninérgico 5-HT<sub>3</sub>) e

PCPA (0,5 mmol/kg; inibidor da síntese de serotonina) sobre o efeito antinociceptivo do composto LS20, sendo observado que nenhum dos compostos foi capaz de reduzir o efeito antinociceptivo do LS20 (Tabela 6).

**Tabela 6: Avaliação da influência da administração prévia de Mecamilamina, Atropina, Ondansetron e PCPA sobre os tempos de latência induzidos pelo LS20 no modelo de imersão da cauda em água quente**

Tratamentos	Linha de Base	Tempo de Latência (segundos - Média $\pm$ EPM)						120 min
		20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min	
<b>LS20</b>	4,78 $\pm$ 0,6	5,14 $\pm$ 1,0	6,45 $\pm$ 0,8	7,08 $\pm$ 0,7	5,76 $\pm$ 0,9	5,97 $\pm$ 0,9	6,07 $\pm$ 1,2	
<b>LS20 + Mec</b>	3,78 $\pm$ 0,7	5,26 $\pm$ 1,0	5,36 $\pm$ 0,5	6,34 $\pm$ 1,3	6,21 $\pm$ 0,6	5,45 $\pm$ 0,4	5,48 $\pm$ 0,8	
<b>LS20 + Atro</b>	4,05 $\pm$ 0,9	4,23 $\pm$ 0,9	5,42 $\pm$ 1,0	5,78 $\pm$ 1,2	5,62 $\pm$ 0,7	5,12 $\pm$ 0,8	5,63 $\pm$ 0,6	
<b>LS20 + Ond</b>	3,75 $\pm$ 0,4	5,12 $\pm$ 0,4	5,23 $\pm$ 1,0	5,48 $\pm$ 0,9	6,13 $\pm$ 0,6	6,25 $\pm$ 0,8	6,03 $\pm$ 0,6	
<b>LS20 + PCPA</b>	4,32 $\pm$ 0,8	5,60 $\pm$ 0,4	5,20 $\pm$ 0,7	5,60 $\pm$ 0,8	6,40 $\pm$ 0,3	6,10 $\pm$ 0,2	5,40 $\pm$ 0,4	

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



**Figura 22: Influência da administração prévia de Mecamilamina (Mec), Atropina (Atro), Ondansetron (Ond) e 4-cloro-DLfenilalanina (PCPA) sobre o efeito antinociceptivo induzido pelo composto LS20 (300  $\mu$ mol/kg) no modelo de imersão da cauda em água quente. Em A, Os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com Mecamilamina (9  $\mu$ mol/kg), Atropina (17,2  $\mu$ mol/kg) e Ondansetron (1,7  $\mu$ mol/kg) 15 minutos antes da administração do composto. PCPA (0,5 mmol/kg) foi administrado intraperitonealmente por 3 dias consecutivos. Em B, representação do cálculo da área sob a curva. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 6) do tempo de reatividade. Em A, a significância estatística ( $*p < 0,05$ ) foi calculada entre o composto isolado e o composto combinado a Mecamilamina, Atropina, Ondansetron e PCPA por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Em B, a significância estatística ( $*p < 0,05$ ) foi calculada entre o composto isolado e o composto combinado a Mecamilamina, Atropina, Ondansetron e PCPA por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni**

#### 5.4 Modelo da placa quente

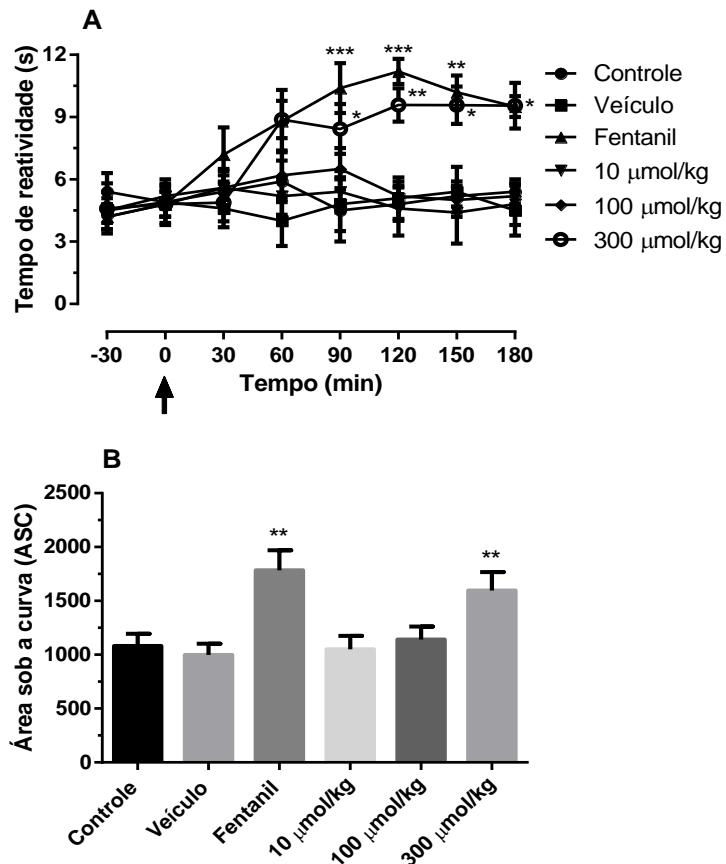
Neste teste, os animais foram tratados com o composto LS20 (10, 100 e 300  $\mu$ mol/kg; v.o). O fentanil (0,6  $\mu$ mol/kg) foi utilizado como controle positivo. A figura 23 demonstra que a administração de 300  $\mu$ mol/kg do composto LS20 apresenta diferença significativa em relação ao grupo controle, apresentando aumento de 47,4% na área sob a curva, enquanto o fentanil mostrou 64,7% de aumento, confirmando assim o

seu efeito antinociceptivo (Tabela 7). O composto e o fentanil iniciaram seus efeitos no tempo de 90 min após sua administração.

**Tabela 7: Tempos de latência, em segundos, no modelo de placa quente**

Tratamentos	Linha de Base	Tempo de Latência (segundos – Média ± EPM)						180 min
		30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	
<b>Controle</b>	5,15 ± 0,5	5,40 ± 1,0	5,90 ± 1,0	4,50 ± 1,5	4,80 ± 0,8	5,20 ± 0,5	5,40 ± 0,6	±
<b>Veículo</b>	4,75 ± 0,6	4,60 ± 0,9	4,00 ± 1,2	4,80 ± 1,3	5,10 ± 1,0	5,40 ± 1,2	4,50 ± 1,2	±
<b>Fentanil</b>	4,50 ± 0,5	7,20 ± 1,3	8,80 ± 1,5	10,4 ± 1,2***	11,2 ± 0,6***	10,2 ± 0,8**	9,50 ± 0,5*	+
<b>LS20 10 µmol/kg</b>	4,85 ± 0,8	5,60 ± 0,6	5,20 ± 0,9	5,40 ± 1,0	4,60 ± 1,3	4,40 ± 1,5	4,80 ± 1,0	±
<b>LS20 100 µmol/kg</b>	4,50 ± 0,7	5,60 ± 0,9	6,20 ± 1,2	6,50 ± 1,0	5,20 ± 0,5	5,00 ± 0,6	5,20 ± 0,6	±
<b>LS20 300 µmol/kg</b>	4,70 ± 0,7	4,88 ± 0,9	8,88 ± 0,9	8,43 ± 1,2*	9,58 ± 0,8**	9,57 ± 0,9*	9,55 ± 1,1*	±

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



**Figura 23: Efeito antinociceptivo do composto LS20 (LS20 - 10, 100 e 300  $\mu\text{mol/kg}$ ) no modelo de placa quente. Em A, os animais foram tratados por via oral com solução salina, veículo, fentanil (0,6  $\mu\text{mol/kg}$ ; s.c.) e doses crescentes do composto (10, 100 e 300  $\mu\text{mol/kg}$ ). Em B, representação do cálculo da área sob a curva. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 6$ ) do tempo de reatividade. Em A, a significância estatística ( $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$ ) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, fentanil e doses crescentes do composto, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Em B, a significância estatística ( $**p < 0,01$ ) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, fentanil e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni**

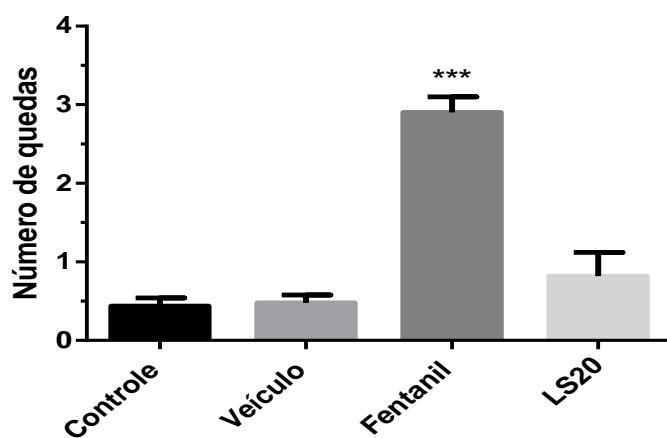
## 5.5 Teste de Rotarod

Neste modelo, os animais foram tratados por via oral com o composto LS20 (300  $\mu\text{mol/kg}$ ; v.o), controle e fentanil (0,6  $\mu\text{mol/kg}$ ; s.c.). A figura 24 demonstra que esta dose de 300  $\mu\text{mol/kg}$  não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, comprovando que os resultados obtidos nos modelos algesimétricos não foram produzidos por influência de déficit motor induzido pelo composto. O grupo fentanil apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, demonstrando comprometimento motor (Tabela 8).

**Tabela 8: Avaliação no modelo de Rotarod**

Tratamentos	Número de quedas (Média $\pm$ EPM)	Aumento (%)
Controle	0,44 $\pm$ 0,1	---
Veículo	0,48 $\pm$ 0,1	9,1%
Fentanil	2,90 $\pm$ 0,2***	559,1%
LS20 300 $\mu$ mol/kg	0,82 $\pm$ 0,3	86,3%

\*\*\*p < 0,001 entre os grupos veículo, fentanil e LS20 (300  $\mu$ mol/kg) com o grupo controle, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.



**Figura 24: Avaliação do composto LS20 no teste de Rotarod.** Os tratamentos com solução salina, veículo e LS20 (300  $\mu$ mol/kg) foram realizados por via oral e Fentanil (0,6  $\mu$ mol/kg) por via subcutânea. A significância estatística (\*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, fentanil e LS20, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni

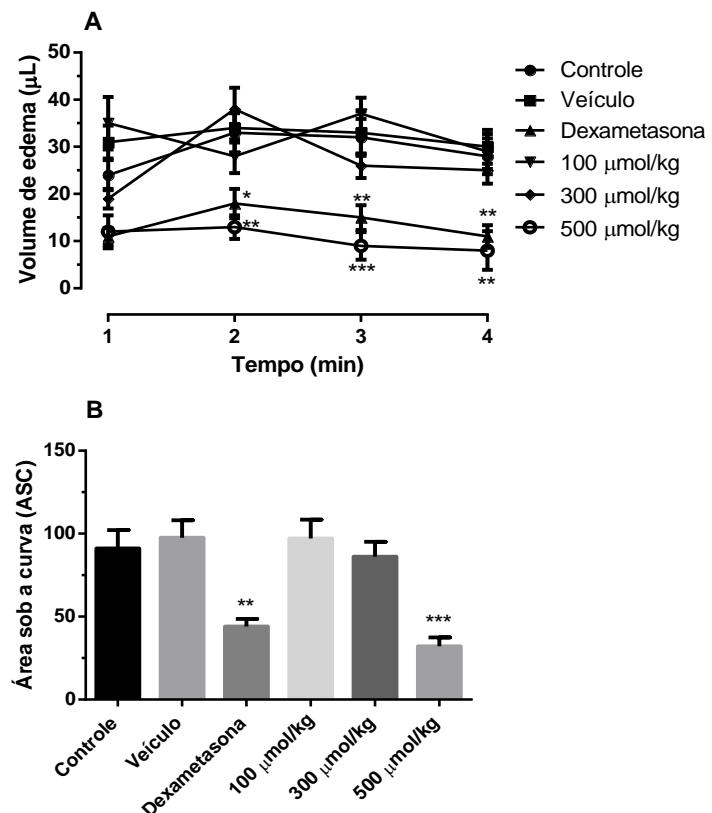
## 5.6 Modelo de edema de pata

Neste teste, os animais foram tratados com o composto LS20 (100, 300 e 500  $\mu$ mol/kg; v.o). O fármaco padrão dexametasona (5,7  $\mu$ mol/kg; s.c) foi utilizado como controle positivo. Os animais receberam carragenina 1% (0,02 mL; intraplantar). A figura 25 demonstra que apenas a dose de 500  $\mu$ mol/kg apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, indicando efeito antiedemogênico do composto, assim como a dexametasona nos tempos de 2, 3 e 4h (Tabela 9). A dexametasona e o composto na maior dose apresentaram redução na área sob a curva na ordem de 51,6% e 64,8%, respectivamente.

**Tabela 9: Avaliação no modelo de edema de pata induzido por carragenina**

<b>Tratamentos</b>	<b>Volume de edema (µL)</b>			
	<b>1 Hora</b>	<b>2 Horas</b>	<b>3 Horas</b>	<b>4 Horas</b>
<b>Controle</b>	24,5 $\pm$ 3,9	33,7 $\pm$ 4,1	32,4 $\pm$ 4,5	28,8 $\pm$ 4,4
<b>Veículo</b>	31,2 $\pm$ 4,0	34,5 $\pm$ 3,5	33,5 $\pm$ 5,4	30,7 $\pm$ 4,1
<b>Dexametasona</b>	11,2 $\pm$ 2,2	18,8 $\pm$ 3,2*	15,7 $\pm$ 3,0**	28,7 $\pm$ 3,2**
<b>LS20 100 µmol/kg</b>	35,7 $\pm$ 6,6	28,5 $\pm$ 4,1	37,8 $\pm$ 3,9	29,9 $\pm$ 4,1
<b>LS20 300 µmol/kg</b>	19,5 $\pm$ 2,1	38,7 $\pm$ 5,5	26,7 $\pm$ 3,5	25,3 $\pm$ 3,7
<b>LS20 500 µmol/kg</b>	12,3 $\pm$ 4,3	13,3 $\pm$ 3,8**	9,3 $\pm$ 3,3***	8,4 $\pm$ 4,4**

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



**Figura 25: Avaliação do composto LS20 no modelo de edema de pata.** Em A, os tratamentos com solução salina, veículo, dexametasona (5,7  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ; s.c.) e doses crescentes de LS20 (100, 300 e 500  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) foram realizados por via oral. Em B, representação do cálculo da área sob a curva. A solução de carragenina (1%) foi aplicada nas patas dos animais em todos os grupos. Em A, a significância estatística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes do composto, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Em B, a significância estatística (\*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes do composto, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni

## 5.7 Modelo da bolsa de ar subcutâneo

O tratamento foi realizado com o composto LS20 (100, 300 e 500  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ; v.o.). A dexametasona (5,7  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ; s.c) administrada por via subcutânea foi usada como controle positivo. E o grupo controle foi tratado com solução salina ou com carragenina 1% (1mL; s.c).

### **5.7.1 Recrutamento de Leucócitos**

Observamos que houve uma diminuição na quantidade de leucócitos totais nos grupos tratados com LS20 nas doses de 300 e 500  $\mu\text{mol/kg}$ , além da dexametasona, na ordem de 54,3%, 77,2% e 67,4%, respectivamente, indicando que o composto LS20 e a dexametasona foram capazes de reduzir a migração leucocitária induzida pela carragenina existente na bolsa de ar subcutâneo (Figura 26).

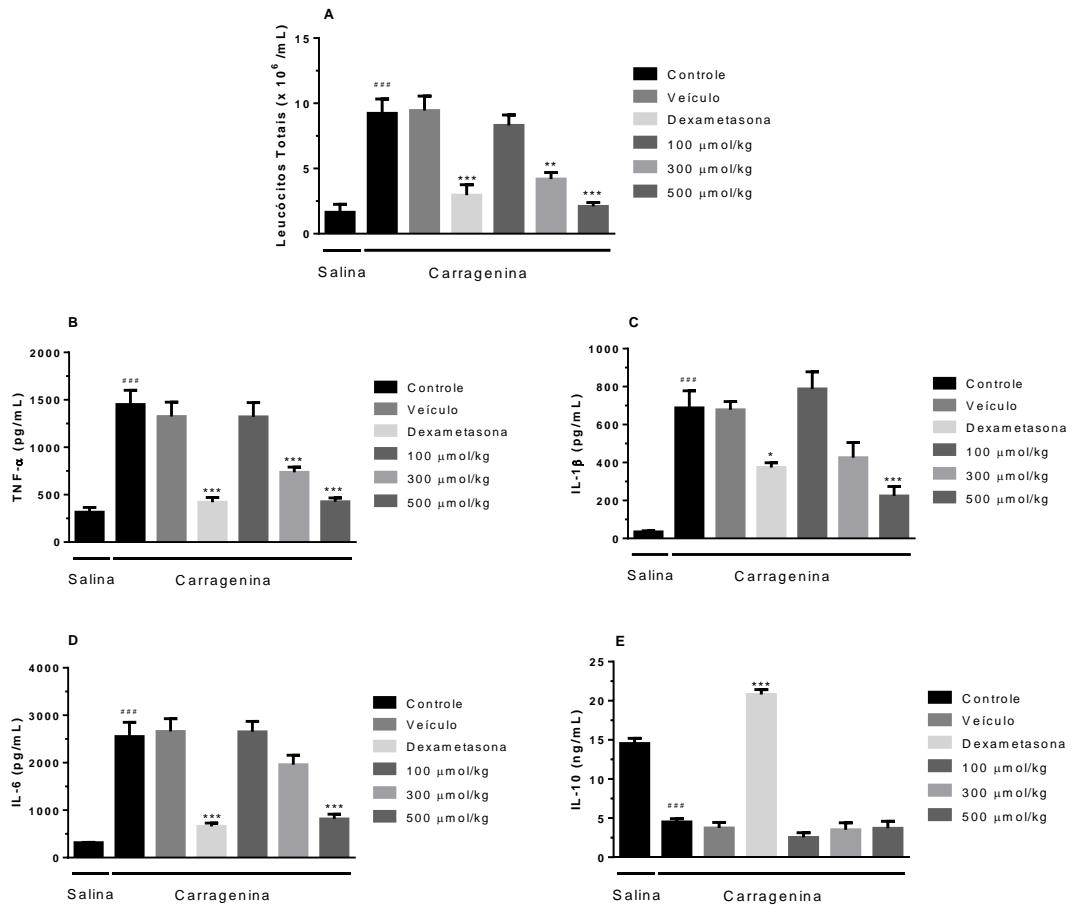
### **5.7.2 Quantificação de citocinas**

Na determinação da produção de TNF- $\alpha$ , observamos que a administração do composto LS20 foi capaz de inibir a produção desta citocina com as doses de 300 e 500  $\mu\text{mol/kg}$  em 49,2% e 70,6%, respectivamente (Figura 26). Com relação a produção de IL-1 $\beta$  e IL-6, observou-se que apenas a dose de 500  $\mu\text{mol/kg}$  de LS20 apresentou redução significativa com relação ao controle negativo em 67,3% e 68%, respectivamente (Figura 26). Com relação a produção de IL-10, observamos que a administração de LS20 não teve impacto algum na concentração desta citocina (Figura 26). A administração subcutânea de dexametasona reduziu a concentração das citocinas pró-inflamatórias (71% - TNF- $\alpha$ , 45,6% - IL-1 $\beta$  e 74,2% - IL-6) e aumentou a da citocina anti-inflamatória (362,2% - IL-10) (Tabela 10).

**Tabela 10: Quantificação de citocinas no modelo de bolha de ar subcutâneo**

Tratamentos	Número de leucócitos totais ( $\times 10^6/\text{mL}$ )	IL-1 $\beta$ (pg/mL) (Média ± EPM)	TNF- $\alpha$ (pg/mL) (Média ± EPM)	IL-6 (pg/mL) (Média ± EPM)	IL-10 (pg/mL) (Média ± EPM)
Controle solução salina	1,7 ± 0,6	34,2 ± 6,0	315,2 ± 50,0	314,6 ± 6,1	14,5 ± 0,7
Controle solução carragenina	9,2 ± 1,1###	688,2 ± 90,6###	1450,7 ± 150,6###	2550,5 ± 300,9###	4,5 ± 0,4###
Veículo	9,5 ± 1,1	678,3 ± 43,4	1324,1 ± 152,7	2658,2 ± 270,4	3,7 ± 0,7
Dexametasona	3,0 ± 0,8***	374,5 ± 25,7*	420,5 ± 50,5***	658,7 ± 70,4***	20,8 ± 0,6***
LS20 100 $\mu\text{mol/kg}$	8,3 ± 0,8	788,8 ± 90,4	1320,8 ± 150,5	2650,0 ± 220,1	2,5 ± 0,6
LS20 300 $\mu\text{mol/kg}$	4,2 ± 0,5***	425,2 ± 80,3	736,3 ± 55,5***	1958,8 ± 200,2	3,5 ± 0,9
LS20 500 $\mu\text{mol/kg}$	2,1 ± 0,3***	224,7 ± 50,1***	426,6 ± 40,2***	815,4 ± 100,5***	3,7 ± 0,9

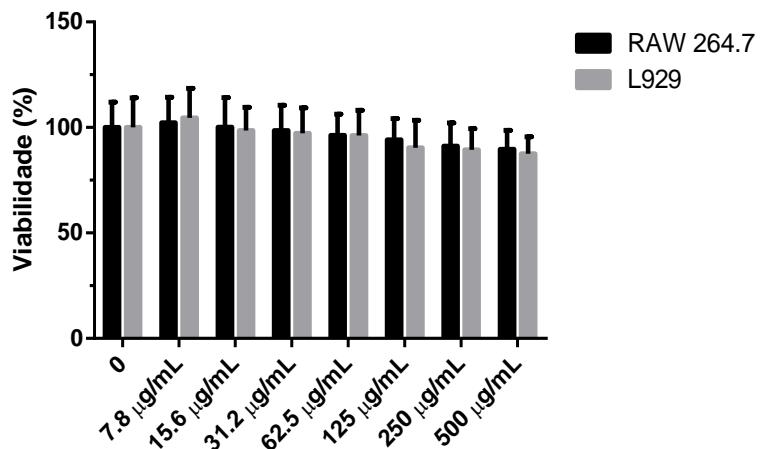
\*p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001 entre os grupos veículo, dexametasona e doses crescentes do composto com o grupo controle solução carragenina, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni. ###p < 0,001 entre os grupos controle solução salina e o grupo controle carragenina, por One-Way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



**Figura 26: Efeito do composto LS20 na quantificação de leucócitos totais (A), e de citocinas (B- TNF- $\alpha$ , C- IL-1 $\beta$ , D- IL-6 e E-IL-10) a partir do teste bolsa de ar subcutâneo. Os animais foram pré-tratados com solução salina, veículo, dexametasona (5,7  $\mu$ mol/kg; s.c.) e o LS20 (100, 300 e 500  $\mu$ mol/kg). Na bolsa de ar subcutâneo foram aplicadas solução salina e carragenina. Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 6$ ) da concentração de leucócitos ou de citocinas. A significância estatística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ) foi calculada entre o grupo controle que recebeu solução carragenina por via subcutânea e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes do composto e a significância estatística (### $p < 0,001$ ) foi calculada entre o grupo que recebeu solução salina e o grupo controle que recebeu solução carragenina por via subcutânea, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni**

## 5.8 Avaliação de citotoxicidade *in vitro*

Com relação a citotoxicidade *in vitro*, foram avaliadas concentrações de 7,8 a 500  $\mu$ g/ml, e em nenhuma das concentrações testadas se verificou citotoxicidade, isto é, não houve diferença estatística para o grupo controle (Figura 27).



**Figura 27: Viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 e Fibroblastos L929 após 24h de exposição a concentrações de 7,8 – 500,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de LS20 determinado pelo ensaio colorimétrico MTT. Os valores foram expressos como percentual de viabilidade celular, sendo representado como média  $\pm$  EPM de dois experimentos independentes. A significância estatística ( $^*p < 0,05$ ) foi calculada entre as diferentes concentrações de LS20 e o controle basal das células, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni**

### 5.9 Determinação indireta *in vitro* de óxido nítrico e citocinas

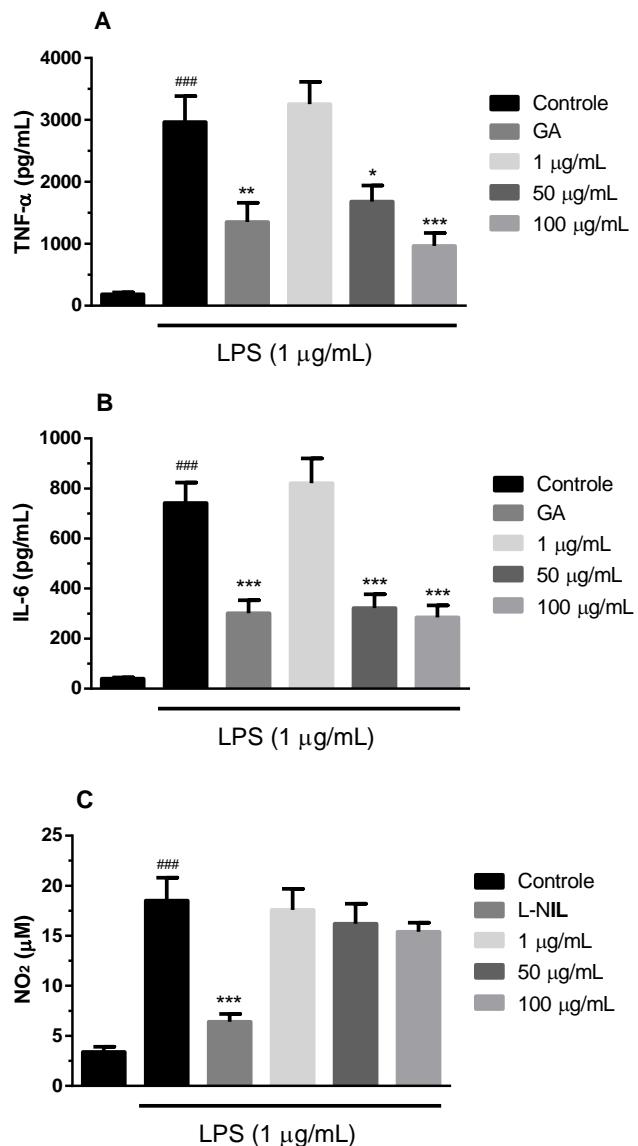
A produção de óxido nítrico em cultura de células também foi avaliada. Para tal foram testadas as concentrações 1, 50 e 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , e observou-se que nenhuma dessas doses foi capaz de reduzir a produção de óxido nítrico pelos macrófagos. Somente o L-NIL reduziu a concentração de NO (65,4%) (Figura 28) (Tabela 11).

Com relação a produção de citocinas pelo cultivo de células, foram avaliadas três concentrações de LS20, a saber 1, 50 e 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Observou-se que as concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  apresentaram redução da produção de TNF- $\alpha$  (43,3% - 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e 67,4% - 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) e IL-6 (56,6% - 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e 61,5% - 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) neste modelo além do ácido gálico (TNF- $\alpha$  - 54,4% e IL-6 - 59,3%) (Figura 28) (Tabela 11).

**Tabela 11: Quantificação das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 e óxido nítrico em cultura de células**

Tratamentos	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	NO ( $\mu$ M)
<b>Controle sem LPS</b>	185,5 $\pm$ 30,3	40,6 $\pm$ 6,1	3,4 $\pm$ 0,5
<b>Controle com LPS</b>	2965,2 $\pm$ 420,4 <sup>###</sup>	742,5 $\pm$ 82,0 <sup>###</sup>	18,5 $\pm$ 2,3 <sup>###</sup>
<b>GA</b>	1350,7 $\pm$ 310,3 <sup>**</sup>	302,2 $\pm$ 52,6 <sup>**</sup>	---
<b>L-NIL</b>	---	---	6,4 $\pm$ 0,8 <sup>***</sup>
<b>LS20 (1 <math>\mu</math>g/ml)</b>	3254,2 $\pm$ 360,6	821,9 $\pm$ 99,8	17,6 $\pm$ 2,1
<b>LS20 (50 <math>\mu</math>g/ml)</b>	1680,4 $\pm$ 260,6 <sup>*</sup>	322,4 $\pm$ 56,7 <sup>**</sup>	16,2 $\pm$ 2,0
<b>LS20 (100 <math>\mu</math>g/ml)</b>	965,2 $\pm$ 210,0 <sup>***</sup>	285,8 $\pm$ 48,5 <sup>**</sup>	15,4 $\pm$ 0,9

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  foi calculado entre o grupo controle + LPS e os grupos tratados +LPS, por One-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. ### $p < 0,001$  foi calculada entre o grupo controle sem LPS e o grupo controle com LPS, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.



**Figura 28:** Efeito de LS20 na produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  (A) e IL-6 (B) e de óxido nítrico (C) em cultura de células. Células RAW 264.7 foram expostas a diferentes concentrações do composto na presença e ausência de LPS. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. A significância estatística ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,001$ ) foi calculada entre o grupo controle + LPS e os grupos tratados +LPS, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni. A significância estatística ( $###p < 0,001$ ) foi calculada entre o grupo controle sem LPS e o grupo controle com LPS, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni

### 5.10 Ensaio de inibição de COX *in vitro*

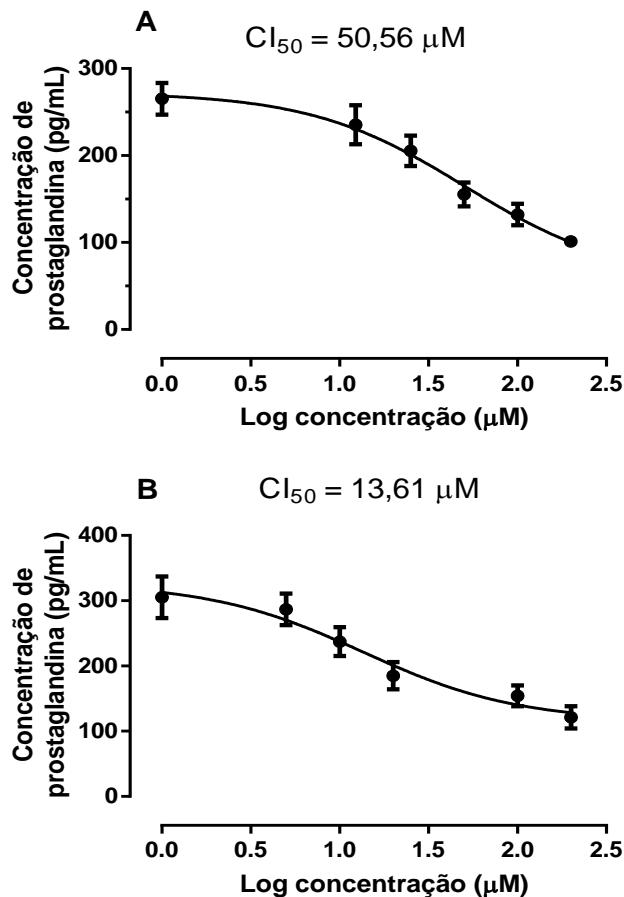
Observou-se o potencial do composto em inibir a enzima cicloxigenase (COX), tendo como consequência uma redução na síntese de prostaglandina. A partir do cálculo dos percentuais de inibição enzimática, obtidos a partir da concentração de prostaglandina

sintetizada, construiu-se os gráficos para determinação do CI50 (concentração inibitória de 50%). A CI50 do composto LS20 frente à COX-1 foi de 50,56  $\mu\text{M}$ , já a CI50 do composto frente à COX-2 foi de 13,61  $\mu\text{M}$ .

Esta inibição enzimática promovida pelo composto se dá de forma preferencial para a isoforma COX-2, pois apresenta um CI50 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 (Tabela 12) (Figura 29). O índice de seletividade (IS) obtido para o composto foi de 3,71; sendo que  $\text{IS} = \text{CI50COX-1}/\text{CI50COX-2}$ ;  $\text{IS} < 1$  – seletividade para COX-1,  $\text{IS} > 1$  – COX-2 preferencial,  $\text{IS} > 100$  – COX-2 preferencial e  $\text{IS} > 1000$  – COX-2 específica.

**Tabela 12: Influência de concentrações crescentes de LS20 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 (%)
<b>0</b>	$265,3 \pm 18,3$	$305,4 \pm 32,6$	0	0
<b>12,5</b>	$235,4 \pm 22,4$	$286,9 \pm 24,6$	11,3%	6,1%
<b>25</b>	$205,4 \pm 17,5$	$237,4 \pm 22,7$	22,6%	22,3%
<b>50</b>	$155,3 \pm 13,7$	$185,1 \pm 21,2$	41,5%	39,4%
<b>100</b>	$132,2 \pm 12,4$	$154,2 \pm 16,2$	50,2%	49,5%
<b>200</b>	$101,2 \pm 5,2$	$121,3 \pm 17,4$	61,9%	60,3%



**Figura 29:** Efeito de concentrações crescentes de LS20 sobre a atividade enzimática de COX-1 e COX-2. Os resultados são expressos como concentração de prostaglandina. Foi utilizado o método de regressão não-linear para o cálculo de  $IC_{50}$ . O índice de seletividade (IS) obtido para o composto foi de 3,71; sendo que  $IS > 1$  – seletividade para COX-2,  $IS < 1$  – seletividade para COX-1

### 5.11 Avaliação toxicológica oral aguda

O composto LS20 não produziu toxicidade após administração oral aguda, demonstrando que a  $DL_{50}$  é maior que 5 mmol/kg ( $DL_{50} > 5$  mmol/kg). Os animais submetidos a avaliação toxicológica aguda não demonstraram nenhum sintoma de intoxicação (convulsão, hiperatividade, perda de reflexo, alteração da frequência respiratória e sedação).

## 6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do composto (2s,6s)-6-etyl-tetraidro-2H-pirano-2-Il) metanol (LS20) foram testadas em modelos *in vivo* e *in vitro* de nocicepção e inflamação.

De acordo com Mohamad et al. (2010) o modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético é o modelo indicado para a avaliação do potencial antinociceptivo de novos compostos analgésicos, por isto é considerado um modelo de triagem.

O ácido acético, por via intraperitoneal, é capaz de gerar algesia e inflamação aguda na região abdominal, o que cursa com a clínica apresentada pelos camundongos – as contorções abdominais. Este quadro de algesia é secundário a liberação de substâncias endógenas, como PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> e PGI<sub>2</sub>, bem como produtos da lipoxigenase (PARVEEN et al., 2007). Estes mediadores estimulam então nociceptores, que uma vez estimulados, ativam as vias de transmissão da dor (ALVARENGA et al., 2013). Verri et al. (2006) observaram que ao utilizar anticorpos anti-TNF-α e anti-IL-1β, havia a redução do número de contorções induzidas pelo ácido acético, concluindo que existe ainda participação destes mediadores durante as respostas inflamatórias e nociceptivas.

O composto LS20 foi capaz de reduzir o número de contorções abdominais em relação ao grupo controle em todas as doses administradas (10, 100 e 300 μmol/kg), demonstrando sua atividade antinociceptiva. Porém este teste apresenta limitações, uma vez que este não consegue distinguir a atividade antinociceptiva inflamatória e não-inflamatória (NESS et GEBHART, 1990).

Sendo assim, o teste da formalina foi utilizado com o intuito de discriminar a ação antinociceptiva sobre a dor inflamatória e não-inflamatória. O mecanismo responsável pela ação nociceptiva da 1<sup>a</sup> 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 et al., 2007). Tem sido também relatado que mediadores como substância P e bradicinina participam deste mecanismo neurogênico (PARADA et al., 2001). Opioides de ação central, como o fentanil, são fármacos que atuam na fase neurogênica da nocicepção (FERREIRA et al., 2006).

Na 2<sup>a</sup> 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 et HOLE, 1987; TORNOS et al., 1999; MILANO et al., 2008). Agentes analgésicos que atuam sobre componentes não-inflamatórios inibem ambas as fases, entretanto agentes que atuam sobre componentes inflamatórios, inibem somente a 2<sup>a</sup> fase (FISCHER et al., 2008).

Os resultados apresentados sugerem que apenas a maior dose avaliada do composto LS20 (300  $\mu$ mol/kg), assim como o fentanil, demonstraram atividade antinociceptiva sobre as duas fases do modelo, sugerindo atividade antinociceptiva central. Já o ácido acetilsalicílico e o LS20 numa dose menor (100  $\mu$ mol/kg) demonstraram atividade somente na 2<sup>o</sup> fase, sugerindo atividade inflamatória.

O teste de retirada da cauda foi utilizado com o intuito de avaliar a atividade antinociceptiva central do composto LS20. Este teste avalia os mecanismos espinais 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 espinal rápido e vigoroso (CAMARATA et YAKSH, 1985). Esse teste é considerado um reflexo espinal, mas também pode envolver estruturas neurais superiores e, portanto, identifica principalmente analgésicos de ação central (LE BARS et al., 2001).

O composto LS20 produziu atividade antinociceptiva no teste de retirada da cauda apenas com a maior dose utilizada (300  $\mu$ mol/kg), assim como o fentanil. Estes resultados sugerem que o LS20 possui atividade antinociceptiva central, tal como o fentanil. Observou-se, porém, que o efeito do fentanil foi mais precoce, iniciando seu efeito no tempo de 20 minutos, enquanto o LS20 iniciou seu efeito a partir de 40 minutos, o que pode ser justificado pela via de administração (oral para o LS20 e subcutânea para o fentanil), ou mesmo pela possibilidade de ambas drogas apresentarem tempo de início de ação distintos.

Com o objetivo de avaliar os mecanismos responsáveis pela ação antinociceptiva do composto LS20, foi realizado o ensaio da retirada de cauda utilizando a naloxona (antagonista opioide não seletivo) e observou-se que o efeito antinociceptivo do LS20 foi reduzido, evidenciando a participação do sistema opioide. No aprofundamento da investigação sobre o envolvimento da participação do sistema opioide, antagonistas opioides seletivos  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$  foram administrados previamente ao composto, e estes foram capazes de induzir uma redução no efeito antinociceptivo anteriormente demonstrado pelo composto LS20 administrado isoladamente. Estes resultados indicam uma possível ação agonista opioide direta (ativação direta de receptores opioides) ou indireta (liberação de opioides endógenos) do composto LS20.

Os receptores opioides  $\mu$  estão localizados no córtex, tálamo, substância cinzenta periaquedal, substância gelatinosa, trato gastrointestinal, e suas principais funções são analgesia supraespinal, depressão respiratória, miose, euforia e redução da motilidade gastrointestinal. Os receptores  $\delta$  estão localizados nos núcleos da ponte, amígdala, bulbos olfatórios e região paracortical, suas principais funções são analgesia e efeitos antidepressivos. Os receptores  $\kappa$  estão presentes no hipotálamo, substância cinzenta periaquedatal, claustro e substância gelatinosa, e suas principais funções são analgesia espinal, sedação, miose, inibição da liberação de hormônio vasopressina e disforia (FOX, 2014).

De maneira geral, após a ativação por opioides exógenos ou endógenos, os receptores opioides acoplam-se a proteínas G inibitórias, levando à supressão direta ou indireta das correntes de cátions e subsequente atenuação da liberação da substância P (sP). A ligação de agonistas opioides resulta em hiperpolarização neuronal mediada por canais para  $K^+$ , atenuação da entrada de  $Ca^{+2}$ , através de canais para  $Ca^{+2}$  voltagem-dependentes, e redução da disponibilidade de monofosfato de adenosina cíclico, com redução resultante na atividade do nociceptor (MELZACK et WALL, 1965).

A redução do influxo de cálcio nas fibras nervosas acarreta na inibição da liberação de neurotransmissores, contribuindo para a diminuição da transmissão sináptica do impulso nervoso (DICKENSON et SULLIVAN, 1987; LAW et al., 2000). A literatura tem relatado que a ativação do receptor opioide  $\kappa$  é diretamente responsável pelo fechamento de canais de sódio (SU et al., 2002; SU et al., 2009) e pela abertura de canais de potássio sensíveis ao ATP, que é responsável pela analgesia induzida pelo receptor opioide  $\mu$  (OCANA et al., 2004). Além disso, os receptores opioides  $\kappa$  têm demonstrado ativar vias inibitórias de condução da dor no sistema nervoso central (PAN et al., 1997).

O mecanismo de ação dos receptores opioides é bastante complexo e os seus efeitos analgésicos envolvem também a participação de outros mediadores como o óxido nítrico (NO) e o GMPc (FERREIRA, 1990). Os 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 (AMARANTE et DUARTE, 2002).

Soares et Duarte (2001) demonstram que a síntese de GMPc pelo NO, promove a abertura de canais para potássio sensíveis à ATP. 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 et al., 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  $\text{Ca}^{+2}$ , além de estimular a atividade da  $\text{Ca}^{+2}$  ATPase e de canais de  $\text{K}^{+}$  ATP (SACHS et al., 2004).

Com o objetivo de avaliar a participação da via nitrérgica na atividade antinociceptiva do composto LS20, foi realizado o ensaio da retirada de cauda com a administração prévia de L-NAME e a L-arginina (inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase e precursor do óxido nítrico, respectivamente). E observou-se que o uso do L-NAME e da L-arginina não implicaram em redução da atividade antinociceptiva do composto, evidenciando então que não há participação do sistema nitrérgico através da metodologia realizada.

A acetilcolina (Ach) atua como um dos neurotransmissores mais proeminentes no sistema nervoso central e periférico. Perifericamente, os neurônios colinérgicos controlam os ramos simpático e parassimpático do sistema nervoso autônomo no nível ganglionar. No sistema nervoso central (SNC), Ach atua como um neurotransmissor e neuromodulador após a liberação de grupos-chave de projeção colinérgica e interneurônios no cérebro e na medula espinal (NASER et KUNER, 2018). Os receptores colinérgicos regulam profundamente a transmissão nociceptiva na medula espinal via mecanismos pré e pós-sinápticos. Evidências cumulativas implicam uma forte relevância clínica para os mecanismos colinérgicos espinais. A elevação dos níveis de Ach na medula espinal induz analgesia. Sendo assim, a potencial participação das vias colinérgicas no efeito antinociceptivo do LS20 também foi avaliada (ZHUO et GEBHART, 1991; MATSUMOTO et al., 2007).

Enquanto a corrente despolarizante dos receptores colinérgicos nicotínicos é amplamente transportada pelo sódio, o influxo de cálcio desempenha um papel importante na sinalização metabólica intracelular a jusante (DANI, 2015). Os receptores colinérgicos muscarínicos são acoplados à proteína G. Os receptores M1, M3 e M5 demonstraram acoplar a Gq/11, levando ao aumento no  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular. Os receptores M2 e M4 sinalizam preferencialmente via Gi/o, inibindo a atividade da adeniliciclase, inibindo canais de  $\text{Ca}^{+2}$  dependentes de voltagem (WEISS et al., 2007). A despeito destes dados, nossos resultados não demonstraram a participação do sistema colinérgico no efeito antinociceptivo gerado pelo LS20, uma vez que o pré-tratamento com atropina ou mecamilamina (antagonistas colinérgicos muscarínicos e nicotínicos, respectivamente) não atenuaram o efeito antinociceptivo de LS20.

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, tal depleção serotoninérgica não interferiu com os efeitos demonstrados pelo composto LS20; a administração de ondansetron, antagonista seletivo de receptor serotoninérgico 5-HT<sub>3</sub>, também não influenciou no efeito antinociceptivo proporcionada pelo LS20, indicando que não há envolvimento da via serotoninérgica sobre o efeito do composto.

Outro modelo realizado para determinar a origem da atividade antinociceptiva foi o teste da placa quente, este modelo envolve a participação de circuitos supraespinais, enquanto o teste da imersão da cauda, discutido anteriormente reflete o envolvimento de circuitos espinais (LANGERMAN et al., 1995; YAKSH; RUDY, 1977; JINSMAA et al., 2004). Este modelo caracteriza-se por produzir resposta rápida ao estímulo nocivo, mediada pela ativação de nociceptores das fibras C e das fibras A $\delta$ . As fibras nociceptoras respondem após a ativação dos receptores vaniloides, especificamente o receptor do tipo TRPV-1, sendo os receptores mais importantes na medição da resposta aos estímulos térmicos nocivos (JINSMAA et al., 2004; DICKENSON; BESSON, 1997; JULIUS; BAUSBAUM, 2001).

No ensaio da placa quente, o estímulo térmico ativa nociceptores que transmitem a informação ao corno dorsal da medula espinal e, posteriormente, aos centros corticais, produzindo resposta nociceptiva (MOGIL; ADHIKARI, 1999). Por este motivo este modelo é muito utilizado no estudo de fármacos analgésicos, principalmente de fármacos que possuem ação no sistema nervoso central, tais como os opioides. O tratamento com o LS20 (300  $\mu$ mol/kg) e com fentanil, analgésico opioide, alteraram significativamente o tempo de latência no teste de placa quente em comparação ao grupo controle negativo.

Este resultado sugere que a atividade antinociceptiva de LS20 envolve também a participação de mecanismos supraespinais.

Drogas 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 et al., 2002). Considerando que alguns dos métodos escolhidos no presente estudo (contorções abdominais, teste de retirada de cauda, placa quente e formalina) para a avaliação da atividade antinociceptiva, exigem respostas motoras dos animais, resultados falso positivos poderiam ser obtidos, caso ocorresse perda da coordenação motora dos animais por sedação e/ou relaxamento muscular.

Para descartar tal possibilidade foi realizado o teste de Rotarod (cilindro giratório). Esse modelo é bastante utilizado para avaliar déficit motor provocado por disfunções cerebelares, injúrias cerebrais provocadas por trauma ou doenças degenerativas induzidas em animais (HAMM, 1994; MONVILLE; TORRES; DUNNETT, 2006; SHIOTSUKI et al., 2010). O tratamento com o LS20 (300  $\mu\text{mol/kg}$ ) não afetou o desempenho motor dos animais no teste do cilindro giratório. O fármaco utilizado como referência, fentanil, diminuiu显著mente o tempo de permanência dos animais no cilindro giratório. Os resultados mostraram que as doses do composto que tiveram ação antinociceptiva não alteraram o desempenho motor dos camundongos.

No estudo da atividade anti-inflamatória, o composto LS20 foi avaliado no modelo do edema de pata induzido por carragenina, onde o mesmo foi capaz de reduzir significativamente o edema com a maior dose avaliada (500  $\mu\text{mol/kg}$ ) quando comparado ao grupo controle. Este é um modelo experimental amplamente utilizado para triagem de substâncias de caráter anti-inflamatório e tem sido frequentemente utilizado para avaliar o efeito antiedemogênico (THOMAZZI et al., 2010).

O teste do edema de pata induzido pela carragenina envolve a participação de uma série de mediadores inflamatórios, tais como histamina e serotonina (principalmente na primeira fase), responsáveis pelo desenvolvimento de eventos vasculares, e citocinas (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ), prostaglandinas e óxido nítrico (importantes durante a segunda fase) (DI ROSA et al., 1971; ZHU et al., 2011). O edema também é caracterizado por um intenso infiltrado de células, onde a presença de neutrófilos se destaca (WINTER et al., 1962; DAWSON et al., 1991).

Para melhor caracterizar o efeito anti-inflamatório do composto LS20, foi executado o modelo da bolsa de ar subcutâneo. Este modelo permite quantificar a resposta inflamatória a partir da avaliação do volume e composição do exsudato (DUARTE et al.,

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 et al., 2012; JAIN et al., 2011).

O recrutamento leucocitário a partir do sangue para o sítio da inflamação representa um passo indispensável na resposta inflamatória. Reações inflamatórias são caracterizadas inicialmente por um influxo de neutrófilos para o tecido inflamado, enquanto mais tarde ocorre um intenso fluxo de eosinófilos e células mononucleares. A administração de carragenina induz uma significativa migração leucocitária na bolsa de ar 4h após a aplicação. Esta migração foi inibida pela administração do composto LS20 nas doses de 300 e 500  $\mu\text{mol/kg}$ .

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. Tal fenômeno é inibido pela administração de anti-inflamatórios (MENEGAZZI et al., 2008).

O composto LS20 nas doses de 300 e 500  $\mu\text{mol/kg}$  foi capaz de reduzir a concentração de TNF- $\alpha$  no exsudato inflamatório. TNF- $\alpha$  é uma citocina que desempenha um papel chave na resposta imune inata e está associada com migração celular e exsudação (VIGIL et al., 2008). O composto LS20 (500  $\mu\text{mol/kg}$ ) foi capaz também de reduzir as concentrações de IL-1 $\beta$  e IL-6 no exsudato inflamatório. Tais citocinas promovem a expressão de moléculas de adesão, migração leucocitária e aumento da permeabilidade vascular, atuando como importantes mediadores pró-inflamatórios (HALLEGUA et WEISMAN, 2002). A inibição da migração leucocitária observada pode estar relacionada à redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias induzida pelo LS20. Em contrapartida, o LS20 não foi capaz de estimular o aumento da IL-10, uma citocina anti-inflamatória, demonstrando assim que os efeitos do LS20 se restringem a atenuar a liberação de algumas citocinas pró-inflamatórias.

Com relação a citotoxicidade *in vitro*, nossos resultados demonstraram segurança em todas as doses testadas, demonstrando que o composto LS20 não interferiu na viabilidade de macrófagos e fibroblastos. Tais dados são extremamente importantes, pois ambas as células estão envolvidas no processo inflamatório, os macrófagos no

desencadeamento e desenvolvimento do processo inflamatório e os fibroblastos na resolução e desfecho do processo.

A determinação *in vitro* de óxido nítrico e citocinas é importante para se determinar a ação do composto LS20 a nível celular. Observou-se que as doses de 50 e 100 µg/ml de LS20 foram capazes de atenuar a liberação de TNF- $\alpha$  e de IL-6 por macrófagos, demonstrando a ação do composto sobre estas células. Como o composto não alterou a viabilidade de macrófagos, podemos concluir que realmente o composto é capaz de inibir a produção destas citocinas por ação sobre os macrófagos. A administração de LS20 nas concentrações avaliadas, não foi capaz de promover nenhuma alteração na produção de óxido nítrico pelos macrófagos. Aliando este dado ao obtido nos ensaios de teste de retirada de cauda, em que o composto LS20 não teve seu efeito atenuado pelos antagonistas L-NAME e L-arginina, acredita-se que o LS20 não apresente ação antinociceptiva, nem anti-inflamatória intermediada pelo sistema nitrérgico.

Nossos resultados também mostram a atividade inibitória preferencial do composto LS20 sobre a enzima cicloxigenase-2 (COX-2) em ensaio *in vitro*. A enzima cicloxigenase, também chamada de prostaglandina H sintase, é uma enzima bifuncional exibindo atividades cicloxigenase e peroxidase. O componente cicloxigenase converte ácido araquidônico em prostaglandina G2, e o componente peroxidase reduz o endoperóxido no álcool correspondente (prostaglandina H2), o precursor das prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclinas (NUGTEREN et HAZELHOF, 1973).

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 et al., 2014). Desta forma, podemos observar um menor potencial do composto LS20 em desenvolver efeitos adversos devido a sua seletividade pela isoforma COX-2.

Desta forma, observamos que o composto LS20 demonstrou atividade antinociceptiva em modelos *in vivo* de dor aguda induzidos por estímulos químicos e térmicos. Esta atividade antinociceptiva se mostrou ser de caráter central, através de sua ação agonista direta ou indireta opioide, e de caráter inflamatório, uma vez que o composto também demonstrou propriedades anti-inflamatórias. A atividade anti-inflamatória do composto LS20 está relacionada a sua capacidade de reduzir a migração leucocitária, inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos e inibir a

atividade da enzima cicloxigenase de maneira COX-2 preferencial. Além disso o composto demonstrou segurança em sua utilização, já que nos ensaios de toxicidade aguda *in vivo* não induziu alterações e no ensaio de viabilidade celular não induziu citotoxicidade.

## 7 CONCLUSÕES

Podemos pontuar as seguintes conclusões:

- O composto LS20 possui atividade contra a nocicepção aguda induzida quimicamente, conforme observado no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético;
- O efeito antinociceptivo do composto LS20 tem atuação sobre a dor inflamatória e não inflamatória, como observado no modelo de injeção intraplantar de formalina;
- O composto LS20 possui atividade antinociceptiva em modelo envolvendo circuitaria espinal e supraespinal, conforme observado pela ação no modelo de retirada de cauda e no modelo de placa quente, respectivamente;
- O mecanismo de ação antinociceptivo do composto LS20 envolve participação do sistema opioide de maneira não seletiva;
- A atividade antinociceptiva observada pelo composto LS20 não parece envolver diretamente as vias nitrérgica, colinérgica e serotoninérgica;
- A atividade observada nos modelos algesimétricos não foi influenciada por déficit motor induzido pelo composto, conforme demonstrado pelo teste de Rotarod.
- O composto LS20 apresenta efeito antiedemogênico, conforme demonstrado pelo modelo de edema de pata induzido por carragenina 1%.
- O composto LS20 possui atividade anti-inflamatória, conforme constatado pela sua capacidade em reduzir a migração leucocitária e a produção das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 durante a inflamação induzida pela carragenina no modelo de bolsa de ar subcutâneo.
- O composto LS20 apresentou segurança no ensaio *in vitro*, não demonstrando citotoxicidade sobre linhagem de macrófagos e fibroblastos, nas concentrações avaliadas.
- Em ensaios *in vitro*, o LS20 também inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos, como TNF- $\alpha$  e IL-6, não sendo capaz, no entanto, de reduzir a produção de óxido nítrico.
- O composto LS20 inibiu de forma preferencial a atividade da enzima COX-2, conforme avaliação *in vitro* da atividade enzimática de COX.

- O composto LS20 não desenvolveu sintomas e sinais de intoxicação aguda , nem mortalidade em animais tratados com dose de 5 mmol/kg.
- O composto LS20 desponta como uma molécula que tem potencial para o tratamento de dor de origem inflamatória e nociceptiva, relacionado a poucos efeitos colaterais.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Basic Immunology**: Functions and Disorders of the Immune System. 5.ed. Saint Louis, Missouri: Elsevier, 2016. 335p.

ALAM M.B.; RAHMAN M.S.; HASAN M.; KHAN M.M.; NAHAR K.; SULTANA S. Anti-nociceptive and antioxidant activities of the *Dillenia indica* Bark. **International Journal of Pharmacology**, v.8, n.4, p. 243–251, 2012.

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**, v.150, p.280–284, 2013.

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. **European Journal of Pharmacology**, v.454, n.1, p. 19-23, 2002.

BANNON, A.; MALMBERG, A.B. Models of Nociception: Hot-Plate, Tail-Flick, and Formalin Tests in Rodents. In: CRAWLEY, J.N. **Current Protocols in Neuroscience**. John Wiley & Sons, 2007. Capítulo 8, unidade 8.9.

BARDIN, L.; LAVARENNE, J.; ESCHALIER, A. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. **Pain**, v.86, n.1-2, p.11-18, 2000.

BEN-BASSAT, J.; PERETZ, E.; SULMAN, F.G. Analgesimetry and ranking of analgesic drugs by; the receptacle method. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v.122, p.434-447, 1959.

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 Research**, v.336, n.1, p.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**, v.58, p.1-11, 2012.

CERRETTI, D.P.; KOZLOSKY, C.J.; MOSLEY, B.; NELSON, N.; NE, K.V.; GREENSTREET, T.A.; MARCH, C.J.; KRONHEIM, S.R.; DRUCK, T.; CANNIZZARO, L.A.; HUEBNER, K.; BLACK, R.A. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. **Science**, v.256, p.97-100, 1992.

CLYSDESDALE, G.J.; DANDIE, G.W.; MULLER, H.K. Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. **Immunology and Cell Biology**, v.79, p.547-568, 2001.

COMMINS, S.P.; BORISH, L.; STEINKE, J.W. Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.125, n.2, p.53-72, 2010.

CURY, Y.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, V.P.; FERREIRA, S.H. **Nitric Oxide**, v.25, p.243-254, 2011.

DANI, J.A. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor structure and function and response to nicotine. **International Review of Neurobiology**, v.124, p.3-19, 2015.

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.

DEL PRETE, G.; DE CARLI, M.; ALMERIGOGNA, F.; GIUDIZI, M.G.; BIAGIOTTI, R.; ROMAGNANI, S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. **The Journal of Immunology**, v.150, n.2, p.353-360, 1993.

DICKENSON, A.; BESSON, J. M. **The Pharmacology of Pain**: Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin: Spring Verlag, 1997. 501p.

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

DICKINSON, A.L.; LEACH, M.C.; FLECKNELL, P.A. Influence of early neonatal experience on nociceptive responses and analgesic effects in rats. **Laboratory Animals**, v.43, p.11-16, 2009.

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**, v.104, n.1, p.15-29, 1971.

DOAN, T.; LIEVANO, F.; SWANSON-MUNGERSON, M.; VISELLI, S.M. **Lippincott Illustrated Reviews: Immunology**. 3ed. Wolters Kluwer Health, 2021. 408p.

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.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of American Pharmacy**, v.46, p.208-209, 1957.

DZIKITI, T.B.; JOUBERT, K.E.; VENTER, L.J.; DZIKITI, L.N. Comparison of morphine and carprofen administered alone or in combination for analgesia in dogs undergoing ovariohysterectomy. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.77, p.120-126, 2006.

EVERS, A.S.; MAZE, M.; KHARASCH, E.D. **Anesthetic Pharmacology**. 2ed. Cambridge University Press, 2011. 1207p.

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. In: SANDLER, M.; COLLINS, G.M. **Migraine: A Spectrum of Ideas**. 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. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, p.148–153, 2006.

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. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.31, n.2, p.235-239, 2008.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, v.33, p.829-837, 2012.

FOX, S.M. **Pain Management in Small Animal Medicine**. 1.ed. CRC Press, 2014. 416p.

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

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

GOTTSCHALK, A.; SMITH, D.S. New Concepts in Acute Pain Therapy: Preemptive Analgesia. **American Family Physician**, v.63, n.10, p.1979-1984, 2001.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, p.131–138, 1982.

HALLEGUA, D.S; WEISMAN, M.H. Potential therapeutic uses of interleukin1receptor antagonists in human diseases. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.61, p.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. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.25, p.22140-22147, 2001.

HELLYER, P.; RODAN, I.; BRUNT, J.; DOWNING, R.; HAGEDORN, J.E.; ROBERTSON, S.A. AAHA/AAFP pain management guidelines for dogs and cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.9, p.466-480, 2007.

HESS, S.; PADOANI, C.; SCORTEGANHA, L.C.; HOLZMANN, I.; MALHEIROS, A.; YUNES, R.A.; MONACHE, F.D.; SOUZA, M.M. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by Myrsinoic Acid B. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.33, n.2, p.209-215, 2010.

HOSSAIN, M.S.; ALAM M.B.; CHOWDHURY N.S.; ASADUJJAMAN M.; ZAHAN R.; ISLAMET M.M.; MAZUMDER, M.E.H.; HAQUE, M.E.; ISLAM, A. Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory activities of the herb Eclipta prostrata. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, v.6, n.5, p.468-480, 2011.

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

IMAGAWA, V.H.; FANTONI, D.T.; TATARUNAS, A.C.; MASTROCINQUE, S.; ALMEIDA, T.F.; FERREIRA, F.; POSSO, I.P. The use of different doses of metamizol for post-operative analgesia in dogs. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v.38, p.385-393, 2011.

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 Journal**, v.60, p.483-491, 2011.

JINSMAA, Y.; MIYAZAKI, A.; FUJITA, Y.; LI, T.; FUJISAWA, Y.; SHIOTANI, K.; TSUDA, Y.; YOKOI, T.; AMBO, A.; SASAKI, Y.; BRYANT, S.D.; LAZARUS, L.H.; OKADA, Y. Oral bioavailability of a new class of micro-opioid receptor agonists containing 3,6-bis[Dmt-NH(CH(2))(n)]-2(1H)-pyrazinone with central-mediated analgesia. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.47, n.2, p.2599-2610, 2004.

JOHNSON, C. Research Tools for the Measurement of Pain and Nociception. **Animals**, v.6, n.71, p.1-10, 2016.

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

KEITA, H.; GEACHAN, N.; DAHMANI, S.; COUDERC, E.; ARMAND, C.; QUAZZA, M.; MANTZ, J.; DESMONTS, J.M. Comparison between patient-controlled analgesia and subcutaneous morphine in elderly patients after total hip replacement. **British Journal of Anaesthesia**, v.90, p.53–57, 2003.

KHALID, S.; TUBBS, R. Neuroanatomy and Neuropsychology of Pain. **Cureus**, v.9, n.10, p.1-14, 2017.

KOCH, C. **Consciousness**: confessions of a romantic reductionist. 1ed. Massachusetts: The MIT press, 2012. 200p.

KONGARA, K. Pharmacogenetics of opioid analgesics in dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.41, p.195-204, 2018.

KOPF, A.; PATEL, N.B. **Guide to Pain Management in Low-Resource Settings**. 1. ed. International Association for the Study of Pain, 2010. 372p.

KOSTER, R; ANDERSON, M; DE BEER, EJ. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v.18, p.412-417, 1959.

LAINE, L. Gastrointestinal effects of NSAIDs and coxibs. **Journal of Pain and Symptom Management**, v.25, p.32-40, 2003.

LANGERMAN, L. et al. Hot plate versus tail flick: evaluation of acute tolerance to continuous morphine infusion in the rat model. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.34, n.1, p.23–27, 1995.

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. **Journal of Biological Chemistry**, 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.

LOMAS, A.L.; GRAUER, G.F. The Renal Effects of NSAIDs in Dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 51, p.197-203, 2015.

LORKE D. A new approach to practical acute toxicity testing. **Archives of Toxicology**, v.54, p.275-287, 1983.

LOVE, E.J.; MURRELL, J.; WHAY, H.R. Thermal and mechanical nociceptive threshold testing in horses: A review. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v.38, n.1, p.3–14, 2011.

MAJNO, G. **Cells, Tissues, and Disease**: Principles of General Pathology. 2ed. Oxford University Press, 2004. 1040p.

MALE, D.; BROSTOFF, J.; ROTH, D.B.; ROITT, I.M. **Imunologia**. 5ed. GEN Guanabara Koogan, 2020. 435p.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, v.25, n.12, p.677–686, 2004.

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 ( $\pm$ )-cis-(6-ethyl-tetrahydropyran-2-yl)-formic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v.550, p.47-53, 2006.

MARINHO, B.G.; MIRANDA, L.S.M.; COSTA, J.S.; LEITÃO, S.G.; VASCONCELLOS, M.L.A.A.; PEREIRA, V.L.P.; FERNANDES, P.D. The antinociceptive properties of the novel compound ( $\pm$ )-trans-4-hydroxy-6-propyl-1-oxocyclohexan-2-one in acute pain in mice. **Behavioural Pharmacology**, v.24, n.1, p.10-19, 2013.

MATSUDA, M.; HUH, Y.; JI, R. Roles of inflammation, neurogenic inflammation, and neuroinflammation in pain. **Journal of Anesthesia**, v.33, p.131-139, 2019.

MATSUMOTO, M.; XIE, W.; INOUE, M.; UEDA, H. Evidence for the tonic inhibition of spinal pain by nicotinic cholinergic transmission through primary afferents. **Molecular Pain**, v.3, n.41, p.1-11, 2007.

McDOUGALL, J.J. Arthritis and pain. Neurogenic origin of joint pain. **Arthritis Research and Therapy**, v.8, p.220-226, 2006.

McMAHON A.D. Observation and experiment with the efficacy of drugs: A warning example from a cohort of nonsteroidal antiinflammatory and ulcer-healing drug users. **American Journal of Epidemiology**, v.154, p.557-562, 2001.

McNAMARA, C.R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D.M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K.L.; ZHAO, M.; HAYWARD, N.J.; CHONG, J.A.; JULIUS, D.; MORAN, M.M.; FANGER, C.M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, p.1352-3530, 2007.

MEDZHITOY, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v.454, p.428-435 2008.

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. **Pharmacological Research**, v.58, p.22-31, 2008.

MELZACK, R.; WALL, P.D. Pain Mechanisms: A new theory. **Science**, v.150, n.3699, p.971-979, 1965.

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. **European Journal of Pharmacology**, v.581, p.86-96, 2008.

MIRANDA, L.S.M.; MARINHO, B.G.; LEITÃO, S.G.; MATHEUS, M.E.; FERNANDES, P.D.; VASCONCELLOS, M.L.A.A. ( $\pm$ )-cis-(6-Ethyl-tetrahydropyran-2-yl)-formic acid: a novel substance with antinociceptive properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.14, p.1573-1575, 2004.

MOGIL, J. S.; ADHIKARI, S. M. Hot and cold nociception are genetically correlated. **Journal of Neuroscience**, v.19, n.13, p.21-25, 1999.

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.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55–63, 1983.

MURPHY, K. **Imunologia de Janeway**. 8 ed. Artmed, 2014. 888p.

NASER, P.V.; KUNER, R. Molecular, Cellular and Circuit Basis of Cholinergic Modulation of Pain. **Neuroscience**, v.387, p.135-148, 2018.

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

NICHOLSON, B. Responsible prescribing of opioid for the management of chronic pain. **Drugs**, v.63, n.1, p.13–32, 2003.

NUGTEREN, D.H; HAZELHOF, E. Isolation and properties of intermediates in prostaglandin biosynthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.326, p.448-461, 1973.

OBATA, H. Analgesic Mechanisms of Antidepressants for Neuropathic Pain. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, n.11, p.2483-2494, 2017.

OCANA, M; CENDRAN, C.M; COBOS, E.J; ENTRENA, J.M; BAEYENS, J.M. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. **European Journal of Pharmacology**, v.500, p.203–219, 2004.

OGA, S.; SIQUEIRA, M.E.P.B. Introdução à toxicologia. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

PAN, Z.Z; TERSHNER, S.A; FIELDS, H.L. Cellular mechanism for anti-analgesic action of agonists of the kappa-opioid receptor. **Nature**, v.389, p.382–385, 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**, v.102, p.937-944, 2001.

PAREDES, S.; CANTILLO, S.; CANDIDO, K.D.; KNEZEVIC, N.N. An Association of Serotonin with Pain Disorders and Its Modulation by Estrogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, p.5729-5749, 2019.

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, kaampferol and kaempferol-3-O-glucoside. **Yakugaku Zasshi**, v.127, p.1275-1279, 2007.

PATRONO, C. Cardiovascular Effects of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. **Current Cardiology Reports**, v.18, p.1-8, 2016.

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

POSSO, I.P.; GROSSMANN, E.; DA FONSECA, P.R.B.; PERISSINOTTI, D.M.N.; OLIVEIRA JUNIOR, J.O.; DE SOUZA, J.B.; SERRANO, S.C.; VALL, J. **Tratado de Dor**. 1ed. Atheneu, 2017. 2596p.

PUNT, J.; STRANFORD, S.; JONES, P.; OWEN, J.A. **Kuby Immunology**. 8ed. W.H.Freeman & Co Ltd, 2018. 944p.

RAJA, S.N.; CARR, D.B.; COHEN, M.; FINNERUP, N.B.; FLOR, H.; GIBSON, S.; KEEFE, F.; MOGIL, J.S.; RINGKAMP, M.; SLUKA, K.A.; SONG, X.; STEVENS, B.; SULLIVAN, M.; TUTELMAN, P.; USHIDA, T.; VADER, K. The Revised IASP definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, v.161, n.9, p.1976-1982, 2020.

RAMANA, K.V.; TAMMALI, 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**, v.148, n. 9, p.4371-4384, 2007.

RIZKI, T.M.; RIZKI, R.M. Lamellocyte differentiation in *Drosophila* larvae parasitized by Leptopilina. **Developmental & Comparative Immunology**, v.16, p.103-110, 1992.

RONCHETTI, S.; MIGLIORATI, G.; DELFINO, D.V. Association of inflammatory mediators with pain perception. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.96, p.1145-1152, 2017

ROSAS-BALLINA, M.; OLOFSSON, P.S.; OCHANI, M.; VALDES-FERRER, S.I.; LEVINE, Y.A.; REARDON, C.; TUSCHE, M.W.; PAVLOV, V.A.; ANDERSSON, U.; CHAVAN, S.; MAK, T.W.; TRACEY, K.J. Acetylcoline-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. **Science**, v.334, n.6052, p.98-101, 2011.

SACHS, D.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, n.10, p.3680-3685, 2004.

SAHLEY, T. L.; BERNSTON, G. G. Antinociceptive effects of central and systemic administration of nicotine in the rat. **Psychopharmacology**, v.65, p.279-283, 1979.

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

SIMS, J.E.; GAYLE, M.A.; SLACK, J.L.; ALDERSON, M.R.; BIRD, T.A.; GIRI, J.G.; COLOTTA, F.; RE, F.; MANTOVANI, A.; SHANEBECK, K.; GRABSTEIN, K.H.; DOWER, S.K. Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor.

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.90, p.6155-6159, 1993.

SOARES, A.C.; DUARTE, I.D. Dibutyryl-cyclic GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the rat PGE2-induced hyperalgesic paw. **British Journal of Pharmacology**, v.134, p.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.

STEFANO, G.B.; SCHARRER, B.; SMITH, E.M.; HUGHES, T.K.J.; MAGAZINE, H.I.; BILFINGER, T.V.; HARTMAN, A. R.; FRICCHIONE, G.I.; LIU, Y.; MAKMAN, M.H. Opioid and opiate immunoregulatory processes. **Critical Reviews™ in Immunology**, v.37, n.2-6, p.231-270, 2017.

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. **Journal of Neurophysiology**, v.87, p.1271–1279, 2002.

SU, X.; CASTLE, N.A.; ANTONIO, B.; ROELOFFS, R.; THOMAS, J.B.; KRAFT, D.S.; CHAPMAN, L.M. The effect of kappa-opioid receptor agonists on tetrodotoxin-resistant sodium channels in primary sensory neurons. **Anesthesia & Analgesia**, v.109, p.632–640, 2009.

TEIXEIRA, M.J.; FIGUEIRÓ, J. A. B. **Dor - epidemiologia e evolução histórica da dor**. São Paulo: Moreira Jr, 2001.

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*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.68, p.229-234, 1999.

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? **Pharmacology & Therapeutics**, v.112, n.1, p.116-38, 2006.

VIGIL, S.V.G.; DE LIZ, R.; MEDEIROS, Y.S.; FRÖDE, T.S. Efficacy of tacrolimus in inhibiting inflammation caused by carrageenan in a murine model of air pouch. **Transplant Immunology**, v.19, p.25-29, 2008.

WESS, J.; EGLEN, R.M.; GAUTAM, D. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.6, n.9, p.721-733, 2007.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.111, p.544-547, 1962.

YAKSH, T. L.; RUDY, T. A. Studies on direct spinal action of narcotic in the production of analgesia in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.202, p.411-428, 1977.

ZHANG, M.J.; SU, H.; YAN, J.Y.; LI, N.; SONG, Z.Y.; WANG, H.J.; HUO, L.G.; WANG, F.; JI, W.S.; QU, X.J.; QU, M.H. Chemopreventive effect of Myricetin, a natural occurring compound, on colonic chronic inflammation and inflammation-driven tumorigenesis in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.97, p.1131-1137, 2018.

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.

ZHUO, M.; GEBHART, G.F. Tonic cholinergic inhibition of spinal mechanical transmission. **Pain**, v.46, n.2 p.211-222, 1991.