

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica/PPGIT

Fernanda Virginia Barreto Mota

ESTUDO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE
NOVOS DERIVADOS ISOXAZOLINA-ACILHIDRAZONAS

UFPE – Recife

2013

Fernanda Virginia Barreto Mota

ESTUDO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE NOVOS
DERIVADOS ISOXAZOLINA-ACILHIDRAZONAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Desenvolvimento Pré-clínico de Produtos Bioativos.

Orientadora: **Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva**

Co-orientador: **Prof. Dr. Antonio Rodolfo de Faria**

UFPE – Recife

2013

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Mota, Fernanda Virgínia Barreto

Estudo das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de novos derivados isoxazolina-acilhidrazonas / Fernanda Virginia Barreto Mota. – Recife: O Autor, 2013.

98 folhas: il.

Orientadores: Teresinha Gonçalves da Silva, Antonio Rodolfo de Faria
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2013.
Inclui bibliografia

Farmacologia2. Agentes anti-inflamatórios I. Silva, Teresinha Gonçalves (orient.) II. Faria, Antonio Rodolfo de (coorient.) III. Título.

615 CDD (22.ed.) UFPE/CCB-2014-251



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Recife, 26 de fevereiro de 2013

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 26 de fevereiro de 2013, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Profa Dra Teresinha Gonçalves da Silva

(Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Antonio Rodolfo de Faria
(Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr, Rafael Matos Ximenes
(Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará)

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A minha mãe Maria José (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar a vida e todas as experiências maravilhosas que passei, por me iluminar e abençoar minhas escolhas e por me dar força através da minha fé para sempre seguir em frente e obter sucesso.

À minha orientadora, Dr^a Teresinha Gonçalves da Silva, pela oportunidade que me foi dada, pela dedicação, orientação e amizade. Seus valiosos conhecimentos contribuem para minha formação e futuro.

Aos meus avós e tios, pelo amor, carinho e educação que me prestaram. Obrigada pelo incentivo e palavras de consolo. Por vocês eu cheguei até aqui e para vocês que continuarei a seguir.

A minha irmã e meus familiares por apoiarem, por falarem de mim com orgulho e carinho. Vocês também são responsáveis por minhas conquistas, pois nunca deixaram me faltar nada.

As amigas Ana Karolina e Viviane Michele por fazerem parte da minha história e pelo carinho e amizade. Vocês fazem parte do meu alicerce.

Aos meus amigos do LBPF que estiveram junto comigo nos momentos de aflição e descontração: Aline Stamford, André Barros, Anne Cecília, Bruno Nunes, Diana Malta, Eduardo Ramos, Iane Bezerra, Ingrid Campos, Isla Bastos, Jaciana Aguiar, Jailson Oliveira, Jeyce Kelly, Larissa Cardoso, Maria do Desterro, Marília Sitônio, Sandrine Arruda, Tatiane Bezerra, Temistocles Ítalo, Tonny Cley.

Aos graduandos, nossos queridos pokemons, que me ajudaram tanto contribuindo diretamente com o trabalho ou com a descontração do ambiente: Carlson Júnior, Elizabeth Fernanda, Laís Emanuelle, Laís Nerys, Luana Laranjeira, Sandra Cabral, Simone Carneiro e Vítor Bessoni.

A Técnica em Laboratório Suzete Mendonça, pelo seu carinho, companheirismo, por estar sempre disposta a ajudar.

Ao Prof. Dr. Antonio Rodolfo de Faria, do Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada a Fármacos - LASOF, Departamento de Farmácia, da Universidade Federal de Pernambuco, por fornecer as moléculas de estudo deste trabalho.

A todos que fazem parte do Departamento de Antibióticos, por ceder o espaço e materiais para minha pesquisa.

Aos meus colegas PPGITeanos, pelo convívio agradável, por compartilhar conhecimentos e por fazerem parte da minha formação acadêmica.

A todos que fazem parte do Programa de Pós-graduação em Inovações Terapêuticas pelo convívio e disponibilidade em atender minhas solicitações.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo incentivo e apoio financeiro.

A todos meu imenso, muito obrigada!

Sonhar mais um sonho impossível
Lutar, quando é fácil ceder
Vencer o inimigo invencível
Negar, quando a regra é vender
Sofrer a tortura implacável
Romper a incabível prisão
Voar num limite improvável
Tocar o inacessível chão

É minha lei, é minha questão
Virar esse mundo, cravar esse chão
Não me importa saber
Se é terrível demais
Quantas guerras terei que vencer
Por um pouco de paz
E amanhã, se esse chão que eu beijei
For meu leito e perdão
Vou saber que valeu delirar
E morrer de paixão

E assim, seja lá como for
Vai ter fim a infinita aflição
E o mundo vai ver uma flor
Brotar do impossível chão

Chico Buarque de Hollanda

RESUMO

A inflamação é um processo complexo iniciado por vários fatores como patógenos, danos físicos, isquemia, injúrias tóxicas ou autoimunes, e tem como finalidade proteger o organismo. É um evento que envolve o reconhecimento do agente ou estímulo lesivo envolvendo a infiltração de leucócitos para a região, culminando com a remoção do estímulo e o retorno tecido ao estado de homeostase. Um dos sinais clínicos da inflamação é a dor decorrente da estimulação das fibras sensoriais, dando origem a dor inflamatória. Neste estudo, nos propomos a avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de novos derivados isoxazolina-acilhidrazonas e determinar as concentrações de NO no exsudato inflamatório de animais tratados com os compostos em estudo. Foram realizados testes para a verificação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva como: método do bolsão de ar subcutâneo; edema de pata induzida por vários agentes flogísticos; pleurisia induzida por carragenina; permeabilidade vascular induzida por ácido acético; determinação dos níveis de NO; nocicepção induzida por ácido acético e alodinia mecânica induzida por carragenina. Desta forma, pretende-se identificar uma alternativa eficaz para o tratamento da inflamação e da dor inflamatória, com provável diminuição dos efeitos adversos. No teste do bolsão de ar, os derivados R-99 e R-123 apresentaram resultados significativos em todas as doses testadas. O fármaco utilizado como padrão foi a Indometacina (10mg/kg e 63,3% de inibição). No teste da pleurisia induzida por carragenina as substâncias também inibiram a migração leucocitária, R-99 (81,9%) e R-123 (79,7%), em relação ao grupo controle. Em relação a determinação dos níveis de NO todas as doses testadas apresentaram significativa inibição na concentração de óxido nítrico quando comparados com o grupo controle no modelo de bolsão de ar. No edema de pata o derivado R-99 apresentou atividade tanto sobre as prostaglandinas quanto a histamina, ao verificar a inibição do edema nos modelos induzidos por carragenina, dextrana e histamina, enquanto que o derivado R-123 agiu sobre aminas vasoativas, pois apresentou inibição do edema nos modelos induzido por dextrana, histamina e serotonina. Na nocicepção induzida por ácido acético, as substâncias apresentaram inibição no número de contorções em relação ao grupo controle, R 99 (68,0%) e R 123 (69,4%); além de apresentaram atividade antinociceptiva no teste de alodinia mecânica. Desta forma, os resultados indicam que os derivados isoxazolina-acilhidrazona deste estudo apresentam atividades anti-inflamatória e antinociceptiva promissoras.

Palavras-chave: Atividade Anti-inflamatória, Atividade Antinociceptiva, Isoxazolinas, Acilhidrazona.

ABSTRACT

Inflammation is a complex process initiated by various factors such as pathogens, physical damage, ischemia, toxic or autoimmune injury, and it aims to protect the organism. It is an event that involves recognition of the agent or harmful stimulus involving leukocyte infiltration to the site culminating in removal of the stimulus and the tissue returns to a state of homeostasis. The clinical signs of inflammation is pain caused by stimulation of sensory fibers, also called inflammatory pain. In this study, we propose to evaluate the anti-inflammatory and antinociceptive activities of new isoxazoline-acylhydrazones and determine the concentrations of NO in the inflammatory exudate from animals treated with these compounds. Tests were conducted to verify the antinociceptive and anti-inflammatory activities as: method of subcutaneous air pouch; paw edema induced by several proinflammatory agents; carrageenan-induced pleurisy; vascular permeability induced by acetic acid; determination of NO levels; nociception induced by acetic acid, and mechanical allodynia induced by carrageenan. Thus, we intended to find effective alternatives for the treatment of inflammation and inflammatory pain, with a possible reduction in adverse effects. In air pouch test, derivatives R-99 and R-123 showed significant results at all tested doses. The standard drug was Indomethacin (10mg/kg and 63.3% inhibition). In carrageenan-induced pleurisy the substances also inhibit leukocyte migration, R-99 (81.9%) and R-123 (79.7%) compared to the control group. Determination of NO levels in all tested doses showed significant inhibition at a concentration of nitric oxide compared with the control group in the model air pouch. In the paw edema assay, derivative R-99 showed activity on both prostaglandins and histamine, since it verified the inhibition of edema induced by carrageenan, dextran and histamine, whereas the derivative R-123 acts on vasoactive amines, since it showed inhibition of the edema induced by dextran, histamine and serotonin. In nociception induced by acetic acid, the substances showed a reduction in number of writhings in the control group, R-99 (68.0%) and R-123 (69.4%); they also showed antinociceptive activity in mechanical allodynia test. These results indicate that the isoxazoline-acylhydrazone derivatives studied here have promising anti-inflammatory and antinociceptive activities.

Keywords: Activity Anti-inflammatory, antinociceptive, isoxazolines, acylhydrazone.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Exemplos de heterocíclicos pentagonais. 28
- Figura 2:** Potencias aplicações dos compostos contendo o anel isoxazolina. 29
- Figura 3:** Estrutura básica dos derivados N-acilhidrazona. 30
- Figura 4:** Migração de neutrófilos. Para alcançar o foco inflamatório, os neutrófilos da corrente sanguínea são ativados e realizam o processo de rolamento, adesão e diapedese. Uma vez atingido o sítio da inflamação, os neutrófilos fagocitam e destroem as bactérias. 31
- Figura 5:** Mediadores químicos da inflamação. 34
- Figura 6:** Esquema geral que representa as vias metabólicas que levam a produtos do ácido araquidônico envolvidos no processo inflamatório. COX = ciclooxigenase, 5-LOX = 5-lipoxigenase; LTs = leucotrienos; PGs = prostaglandinas; PLA2 = fosfolipase A2; TxA₂ = tromboxano A2. 35
- Figura 7:** Via de condução de estímulos dolorosos. 45
- Figura 8:** Diagrama esquemático dos tipos de dor. (Adaptado de SCHESTATSKY, 2008). 47
- Figura 9:** Estruturas químicas dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123. 56
- Figura 10:** Concentração de NO dos grupos R-99 e R-123 em exsudato no teste de bolsão de ar. *p < 0,01. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle. 67
- Figura 11:** Efeito dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 (15 mg/kg, v.o.) e indometacina (10 mg/kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por

carragenina em camundongos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto representa média E.P.M. de 5 animais por grupo. *p < 0,05. Significativos após análise de variância (ANOVA) por duas vias seguido pelo teste de Bonferroni quando comparados ao grupo controle. 69

Figura 12: Efeito dos compostos isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 no teste da permeabilidade vascular induzida por ácido acético. *p < 0,01. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle. 70

Figura 13: Efeito dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 (15 mg/kg, v.o.) e ciproheptadina (10 mg/kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por dextrana em camundongos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto representa média E.P.M. de 5 animais por grupo. *p < 0,05. Significativos após análise de variância (ANOVA) por duas vias seguido pelo teste de Bonferroni quando comparados ao grupo controle. 71

Figura 14: Efeito dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 (15 mg/kg, v.o.) e ciproheptadina (10 mg/kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por histamina em camundongos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto representa média E.P.M. de 5 animais por grupo. *p < 0,05. Significativos após análise de variância (ANOVA) por duas vias seguido pelo teste de Bonferroni quando comparados ao grupo controle. 72

Figura 15: Efeito dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 (15 mg/kg, v.o.) sobre o edema de pata induzido por serotonina em camundongos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto representa média E.P.M. de 5 animais por grupo. *p < 0,05. Significativos após análise de variância (ANOVA) por duas vias seguido pelo teste de Bonferroni quando comparados ao grupo controle. 73

Figura 16: Efeito dos derivados isoxazolina-acilhidrazona R-99 e R-123 (15 mg/kg, v.o.) e Indometacina (10 mg/kg, v.o.), sobre a hiperalgesia mecânica plantar induzida por carragenina em camundongos. Os resultados representam a variação do

limiar da retirada da pata em gramas (intensidade da hipnocicepção), onde cada ponto representa média E.P.M. de 5 animais por grupo. *p < 0,05. Significativos após análise de variância (ANOVA) por duas vias seguido pelo teste de Bonferroni quando comparados ao grupo controle. **77**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nome químico e características físico-químicas dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123..... **56**

Tabela 2: Total de leucócitos polimorfonucleares (média \pm desvio padrão) e percentual de inibição da inflamação dos grupos controle e tratados com os derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 no teste de bolsão de ar subcutâneo..... **66**

Tabela 3: Total de leucócitos polimorfonucleares (média \pm desvio padrão) e percentual de inibição da inflamação dos grupos controle e tratados com os derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 no teste de pleurisia induzida por carragenina..... **74**

Tabela 4: Número de contorções abdominais (média \pm desvio padrão) e percentual de inibição dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 no teste de contorções abdominais induzido por ácido acético. **75**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-HT	5-hidroxitriptamina, Serotonina
5-LOX	5-lipoxigenase
AA	Ácido Araquidônico
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrópico
ADP	Adenosina Difosfato
AP-1	Proteína Ativadora-1
ATP	Adenosina Trifosfato
AIEs	Anti-Inflamatórios Esteroidais
AINES	Anti-Inflamatórios Não Esteroidais
BK	Bradicinina
Cg	Carragenina
cNOS	Óxido Nítrico Sintase Constitutiva
COX	Cicloxigenase
Da	Dalton
DMSO-d6	Dimetil sulfóxido deuterado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
GPCR	Receptores Acoplados à Proteína G
His	Histamina
HIV	Vírus da imunodeficiência Humana
HTAB	Hexadeciltrimetil Brometo de Amônia
IASP	Associação Internacional do Estudo da Dor
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1

ICLAS	Conselho internacional de Laboratório de Animais Experimentais
IFN- γ	Interferon γ
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Indutivo
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
LASOF	Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada a Fármacos
LGIC	Canais de Íons Controlados por Ligante
LT	Leucotrieno
LTB4	Leucotrienos B4
LTC4	Leucotrienos C4
LTD4	Leucotrienos D4
LTE4	Leucotrienos E4
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócito 1
MIP-1 α	Proteína Inflamatória de Macrófago 1 alfa
MPO	Mieloperoxidase
mL	Mililitro
NAP	Neurônio Aferente Primário
NF κ B	Fator Nuclear- κ B
NGF	Fator de Crescimento Neural
NK	Células Natural Killer
NKA	Neurocinina A
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neural

PAF	Fator de Ativação Plaquetária
PBS	Solução tampão fosfato
PLA2	Fosfolipase A2
PG	Prostaglandina
PGE2	Prostaglandina E2
PGI2	Prostaciclina
PMNL	Leucócitos Polimorfonucleares
Rf.	Razão de Frente
RTK	Receptores da Tirosina Quinase
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Substância P
TNF- α	Fator De Necrose Tumoral alfa
TXA2	Tromboxano A2
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 JUSTIFICATIVA.....	25
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	27
3.1 Propriedades Biológicas das Isoxazolinias.....	28
3.2 Propriedades Biológicas das Acilhidrazonas.....	29
3.3 Fisiopatologia da Inflamação.....	30
3.3.1 Inflamação Aguda.....	32
3.3.2 Inflamação Crônica.....	32
3.3.3 Mediadores da Inflamação.....	33
3.3.3.1 Mediadores Inflamatórios derivados do Ácido Araquidônico.....	34
3.3.3.2 Aminas Vasoativas.....	37
3.3.3.3 Óxido Nítrico (NO).....	38
3.3.3.4 Resposta Imune e Inflamação.....	39
3.3.3.5 Citocinas.....	40

3.4 Fisiologia da Dor	42
3.4.1 Dor Nociceptiva	46
3.4.2 Dor Neuropática	46
3.4.3 Dor Inflamatória	48
3.4.4 Mediadores Químicos da Dor	48
3.5 Anti-inflamatórios esteroidais, não-esteroidais e Inibidores duais 5- LOX/COX	49
3.5.1 Anti-inflamatórios Esteroidais (AIES)	49
3.5.2 Anti-inflamatórios Não-Esteroidais (AINES)	50
3.5.3 Inibidores duais 5-LOX/COX	51
4 OBJETIVOS	53
4.1 Geral	54
4.2 Específicos	54
5 MATERIAIS	56
5.1 Substâncias e Reagentes	56
5.2 Equipamentos	57
5.3 Animais Experimentais	57
6 MÉTODOS	58
6.1 Procedimentos Éticos	58
6.2 Atividade anti-inflamatória	58
6.2.1 Bolsão de Ar Subcutâneo	58
6.2.2 Determinação dos Níveis de Óxido Nítrico	59
6.2.3 Edema de Pata Induzido por Carragenina em camundongos	59
6.2.4 Permeabilidade Vascular Induzida por Ácido Acético	60

6.2.5 Edema de Pata Induzido por Dextrana em camundongos.....	60
6.2.6 Edema de Pata Induzido por Histamina em camundongos.....	61
6.2.7 Edema de Pata Induzido por 5-HT em camundongos.....	61
6.2.8 Pleurisia Induzida por Carragenina.....	61
6.3 Atividade Antinociceptiva.....	62
6.3.1 Nocicepção Induzida por Ácido Acético.....	62
6.3.2 Alodinia Mecânica Induzida por Carragenina.....	62
6.4 Variáveis Analisadas.....	63
6.5 Análise dos Dados.....	63
7 RESULTADOS.....	65
7.1 Método do Bolsão de Ar Subcutâneo.....	66
7.1.1 Determinação dos Níveis de Óxido Nítrico (Método do bolsão de ar). 67	
7.2 Edema de Pata Induzido Por Carragenina.....	68
7.3 Métodos da Permeabilidade Vascular Induzida por Ácido Acético.....	70
7.4 Edema de pata Induzido por Dextrana, Histamina e 5-HT.....	71
7.5 Método da Pleurisia Induzida por Carragenina.....	73
7.6 Nocicepção Induzida por Ácido Acético.....	75
7.7 Alodinia Mecânica Induzida por Carragenina.....	76
8 CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS.....	82

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) constituem um grupo heterogêneo de moléculas com propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas eficazes, porém é elevada a incidência dos efeitos colaterais devido ao seu uso contínuo. Entretanto, à medida que a fisiopatologia dos processos inflamatórios é elucidada surgem diversas estratégias para descoberta de novos fármacos dirigidos ao controle de mecanismos específicos na resposta inflamatória (MALTA, 2011). A atividade farmacológica dos AINES está relacionada com a supressão da biossíntese das prostaglandinas pelo ácido araquidônico através da inibição da enzima cicloxigenase (COX). Com o uso crônico dos AINES um efeito adverso proeminente é a formação de úlceras gástricas, esse efeito colateral pode ser atenuado com o uso de um anti-inflamatório que além de inibir a COX também atue sobre a 5-lipoxigenase (5-LOX) (RAJAK; KHARYA; MISHRA, 2007).

A inflamação é uma resposta provocada por patógenos, danos físicos, isquemia, injúrias tóxicas ou autoimune com a finalidade de proteger o organismo. É um evento complexo que envolve o reconhecimento do estímulo lesivo, para que posteriormente seja destruído e, então, o tecido danificado reconstruído. Quando esse balanço entre inflamação e restauração tecidual é quebrado, ocorrerá o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas e auto-imunes, tais como doenças inflamatórias intestinais, artrite ou asma (SZÉLES, 2007).

O termo inflamação deriva do latim “*inflammatio*” que significa “atear fogo”. Celsius descreveu há mais de 2000 anos os quatro sinais cardinais principais da inflamação: o **rubor** e o **calor** (são resultados de um aumento da circulação na área inflamada, esse aumento deve-se à hiperemia, onde há um maior afluxo de sangue arterial), o **edema** (decorre do aumento da permeabilidade vascular), e a **dor** (causada pela irritação química nas terminações nervosas e pela compressão mecânica). No século XIX, Virchow acrescentou o quinto sinal da inflamação, a **perda da função** dos órgãos (consequência de uma série de fatores, especialmente do edema e da dor). Quando o processo reparatório se completa naturalmente, o processo inflamatório em si, e os sinais da inflamação tendem a desaparecer (ROBINS; COTRAN, KUMAR et al., 2005).

A dor, um dos quatro sinais cardinais da inflamação, decorre da estimulação das fibras sensoriais, dando origem a uma sensação desagradável que tem como função a proteção do organismo. Ela é classificada como nociceptiva, inflamatória, neurogênica ou neuropática, podendo também ser determinada de acordo com a sua duração, em aguda ou crônica. A dor aguda está associada com uma lesão recente, ativação direta ou indireta dos nociceptores e pode desaparecer até mesmo antes da cura do dano tecidual (KASSUYA, 2006). Por outro lado, a dor crônica pode perpetuar-se por meses ou anos, caracterizando-se em relação à persistência e a alterações adaptativas, o que muitas vezes dificulta o tratamento (BESSON, 1999).

Encontrar substâncias com maior eficácia e com baixa toxicidade levam os pesquisadores a uma busca incansável por novos fármacos. Entre os métodos de pesquisa, os processos de modificação molecular está entre os mais promissores (BARREIRO et al., 2002; AMARAL; MONTANARI, 2002).

Grandes vantagens são verificadas durante o planejamento e desenvolvimento de fármacos pré-existentes. Elas decorrem, entre outros fatores, do prévio conhecimento de suas ações terapêuticas e reações adversas, e respectivos mecanismos de ação, bem como mecanismos farmacocinéticos. Anéis heterocíclicos estão presentes em diferentes tipos de compostos orgânicos, os quais podem apresentar diferentes bioatividades. Dentre os sistemas heterocíclicos podem ser destacadas as isoxazolininas que apresentam atividade bactericida, fungicida, anti-inflamatória e antiviral (GAONKAR, 2007). As isoxazolininas fazem parte de uma interessante classe de compostos heteropentacíclicos. A síntese de novas moléculas contendo esse heterocíclico constitui uma importante área de investigação devido ao seu potencial aplicativo em diversas áreas do conhecimento científico (TAVARES, 2010).

O anel 2-isoxazolina possui atividades biológicas como bactericidas e fungicidas, atividade farmacológica, com destaque para os anti-inflamatórios e anti-câncer, e também atua como herbicida (DUPLANTIER et al., 2001; BASAPPA et al., 2004; HWANG et al., 2005; ALAM et al., 2011; KAMAL et al., 2011; RAJANARENDAR et al., 2012; KHAZIR et al., 2013).

O composto estudado por nosso grupo possui o núcleo isoxazolinínico, além da função acilhidrazona. Essa função pertence a uma classe de moléculas que vem sendo estudadas com afinco devido as suas diversas propriedades farmacológicas. Na literatura encontram-se relatos de propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antitrombóticas (BARREIRO et al., 2002). Os mecanismos de ação desses compostos

podem envolver a inibição de enzimas pró-inflamatórias como as cicloxigenases (COX) e 5-lipoxigenase (5-LOX) (HIGGS; VANE, 1983). Alguns trabalhos também demonstraram atividades antitumoral e antiviral (ROSTOM; SHALABY; EL-DEMELLAWY, 2003).

A conjugação de características estruturais definidas de dois compostos bioativos distintos, em uma nova molécula, representa a estratégia de hibridização molecular de um composto protótipo (REIS et al., 2011). Todavia, apesar do avanço no conhecimento da fisiopatologia da inflamação, da variedade de substâncias, e do avanço nas terapias para o controle da dor e da inflamação, e da existência de medicamentos eficazes (como os coxibs), atualmente não dispomos de medicamentos que sejam eficazes, potentes e apresentem mínimos efeitos colaterais.

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Os anti-inflamatórios são fármacos utilizados no tratamento e alívio dos sintomas de uma série de doenças inflamatórias, tais como artrite reumatoide, febre reumática, osteoartrite, lúpus eritematoso, dentre outras. O mal que as doenças inflamatórias crônico-degenerativas causam a população e os relatos na literatura que atribuem efeitos adversos a alguns anti-inflamatórios não esteroidais justificam a importância de buscar novos fármacos anti-inflamatórios.

O desenvolvimento na área da síntese orgânica proporcionou o aumento de substâncias sintéticas que são utilizadas no combate, prevenção e controle de doenças infecciosas e crônico-degenerativas, prevenindo assim seu agravamento e proporcionando um aumento no tempo da sobrevivência em caso de doenças terminais (GORDON et al., 1994).

Os compostos que possuem anéis pentagonais contendo dois heteroátomos como o nitrogênio e o oxigênio na sua estrutura apresentam importante função na síntese de novos fármacos, por exibirem diferentes atividades devido a alterações que o heteroátomo causa nas propriedades estruturais e eletrônicas da molécula. Os anéis isoxazolínicos possuem atividades biológicas como bactericidas e fungicidas, anti-inflamatórias e anti-câncer (BASAPPA et al., 2004; ALAM et al., 2011; RAJANARENDAR et al., 2012; KHAZIR et al., 2013).

Por outro lado, acilhidrazonas fazem parte de uma classe de funcionalidades que vem sendo estudadas com afinco por apresentarem propriedades farmacológicas como analgésicas, anti-inflamatórias e antitrombóticas (BARREIRO et al., 2002).

Neste contexto podemos ressaltar a importância da conjugação de dois compostos bioativos distintos, em uma nova molécula como candidato a protótipo para desenvolvimento de fármacos para o alívio ou tratamento dos sintomas da inflamação e da dor.

REVISÃO DE LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Propriedades Biológicas das Isoxazolinias

Compostos heterocíclicos são de particular interesse em química medicinal. A química de compostos heterocíclicos é um dos ramos mais complexos da química e a sua aplicação é encontrada em diversos campos como medicina, agricultura, polímeros, e várias indústrias. Drogas sintéticas heterocíclicas são usadas como anticonvulsivantes, anti-sépticos, anti-câncer, antivirais e anti-histamínicos (MISHRA, 2011).

Os compostos orgânicos que possuem anéis pentagonais contendo dois ou mais heteroátomos como nitrogênio, oxigênio, selênio ou enxofre na sua estrutura apresentam uma função importante na síntese de novos fármacos (Figura 1). Diferentes atividades são apresentadas por esses compostos orgânicos devido a alterações que o heteroátomo causa nas propriedades estruturais e eletrônicas da molécula por conta da presença de pares de elétrons e da diferença de eletronegatividade entre o heteroátomo e o carbono na estrutura cíclica levando a novas propriedades físico-químicas e reatividade, as quais podem ser exploradas na preparação de compostos orgânicos com propriedades específicas (TAVARES, 2010).

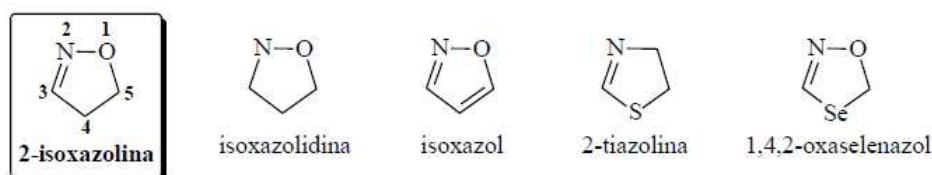


Figura 1: Exemplos de heterocíclicos pentagonais.

O anel isoxazolínicico é um representante importante do grupo dos ciclos 1,2-azóis. Tem como característica a presença de dois heteroátomos, um átomo de oxigênio na posição 1 e um átomo de nitrogênio na posição 2 do anel, com uma insaturação sp^2 entre a ligação N – C (Figura 1) (TAVARES, 2010).

A síntese de moléculas com potencial aplicação em diversas áreas da química orgânica leva em consideração os grupamentos laterais das espécies envolvidas na cicloadição. Os intermediários contendo o anel isoxazolina com grupos laterais reativos

possibilitam uma variedade de transformações em suas estruturas, possibilitando a síntese de novas moléculas (DUPLANTIER et al., 2001; BASAPPA et al., 2003; BASAPPA et al., 2004; HWANG et al., 2005; PARK et al., 2006; TAVARES et al., 2009; ALAM et al., 2011; DALLANOCE et al., 2011; KAMAL et al., 2011; KHAZIR et al., 2013) (Figura 2).

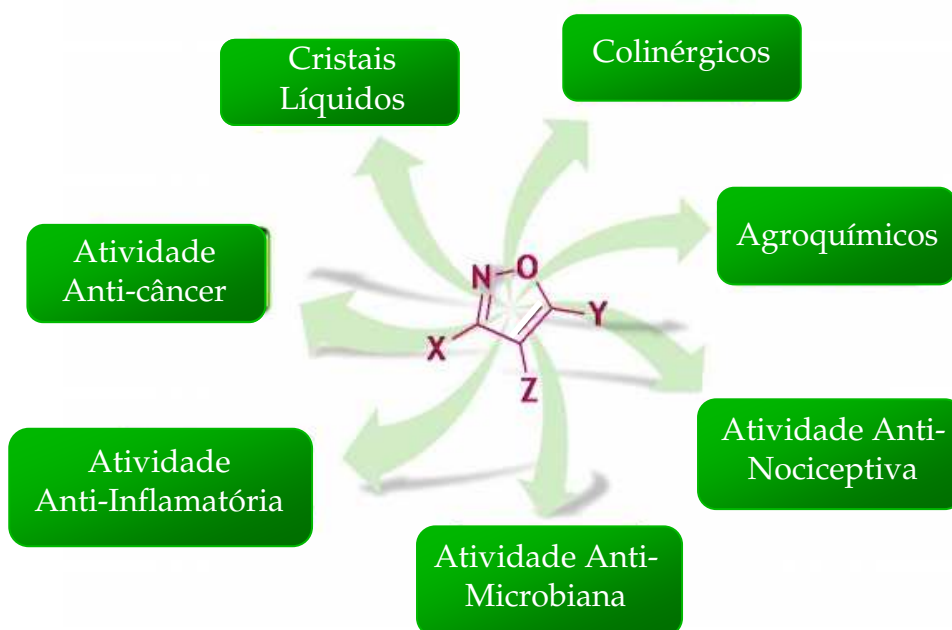


Figura 2. Potencias aplicações dos compostos contendo o anel isoxazolina.

3.2. Propriedades Biológicas das Acilhidrazonas

Moléculas contendo a função acilhidrazona vêm sendo estudadas devido as suas diversas propriedades farmacológicas. Na literatura encontram-se relatos de propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e anti-trombóticas (FRAGA et al., 2000; BARREIRO et al., 2002; CUNHA et al., 2002; LIMA et al., 2008; AVILA et al., 2010; ÜNSAL-TAN et al., 2010; SILVA et al., 2010; HERNÁNDEZ et al., 2012a). Os mecanismos de ação destes compostos podem envolver a inibição de enzimas pró-inflamatórias como as COXs e a 5-LOX (HIGGS; VANE, 1983). Alguns trabalhos também demonstram atividades antitumoral e antiviral (TIAN et al., 2009; JIN et al., 2010; CUI et al., 2010). Derivados acilhidrazônicos também são candidatos a fármacos contra doenças negligenciadas como tuberculose, doença de Chagas e leishmaniose exibindo excelentes índices de seletividade (CARVALHO et al., 2012; HERNÁNDEZ et al., 2012b), além de apresentarem atividade antibacteriana e antimalárica (MELNYK et al., 2006; WANG et al., 2012; JIN et al., 2012).

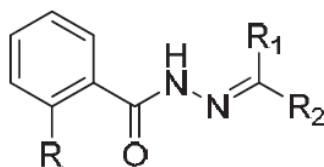


Figura 3: Estrutura básica da função N-acilhidrazona.

3.3. Fisiopatologia da Inflamação

A inflamação é uma reação complexa envolvendo componentes celulares e moleculares. É uma resposta inespecífica a uma agressão específica. O agente responsável pela agressão pode ser de natureza química, física ou biológica (ZHOU et al., 2007). A reação inflamatória envolve o reconhecimento do estímulo lesivo, para sua posterior destruição e tentativa de reconstruir o tecido danificado (NATHAN, 2002). O reconhecimento desencadeia a ativação e a amplificação do sistema imune resultando na ativação de células e na liberação de diversos mediadores responsáveis pela resposta inflamatória. No entanto, se a destruição do agente agressor e o processo de reparo não ocorrem de maneira eficiente e sincronizada, a resposta inflamatória pode levar a uma lesão tecidual persistente, induzida pelo acúmulo de leucócitos e colágeno, entre outras substâncias que podem ser prejudiciais ao organismo (NATHAN, 2002). Quando a resposta inflamatória é excessiva e prolongada pode levar a diversas desordens que resultam nas patologias mais prevalentes, como as doenças reumáticas, diabetes, doença de Alzheimer e aterosclerose (SERHAN; CHIANG, 2004).

O processo inflamatório é orquestrado por uma interação entre mediadores da inflamação e células inflamatórias (SACCA; CUFF; RUDDLE, 1997). A característica mais clássica da inflamação aguda é a vasodilatação, que é produzida por diversos mediadores como: Histamina (His), Prostaglandina E2 (PGE2), Interleucina 1 β (IL-1 β), óxido nítrico (NO), dentre outros. Primeiramente a vasodilatação é mediada pelo NO e prostaglandinas vasodilatadoras (PGE2 e PGI2). O NO é produzido a partir da L-arginina através da ação da óxido nítrico sintase (NOS). Os leucócitos ativados produzem NOS induzível (iNOS) depois da exposição a produtos microbianos e citocinas pró-inflamatórias (VALLANCE; CHAN, 2001; CHIU et al., 2011)

O edema é provocado por fluxo de proteínas, eletrólitos e água (exsudato) do leito vascular para o interstício como resultado da ação de mediadores como a His, bradicinina (BK), leucotrienos B4 (LTB4), substância P (SP), componentes do sistema complemento e fator de ativação plaquetária (PAF) (DENZLINGER et al., 1985). Estes mediadores favorecem o aumento da permeabilidade vascular ao plasma e proteínas (ARYA; KUMAR, 2005).

A vasodilatação e o edema vêm acompanhados de marginalização leucocitária, adesão e migração. O processo de migração de neutrófilos do espaço intravascular para o interstício ocorre a princípio nas vênulas pós-capilares da circulação sistêmica e capilares. Os eventos celulares são marcados pela saída das células circulantes da luz do vaso e a migração de leucócitos (principalmente neutrófilos e monócitos) para o sítio inflamatório. Esse fenômeno segue algumas fases como: rolamento dos leucócitos pelo endotélio, adesão firme, transmigração ou diapedese e quimiotaxia (Figura 4). Todas estas etapas do processo de migração leucocitária são dependentes da expressão pelos leucócitos e pelas células endoteliais de moléculas denominadas moléculas de adesão (selectinas que são formadas por três proteínas E-selectina, P-selectina e a L-selectina, as integrinas, as imunoglobulinas e as caderinas), de mediadores quimiotáticos (como a interleucina-8 (IL-8), o fator do complemento C5a e o LTB4) (KELLY; KWANG; KUBES, 2007; BILATE, 2007).

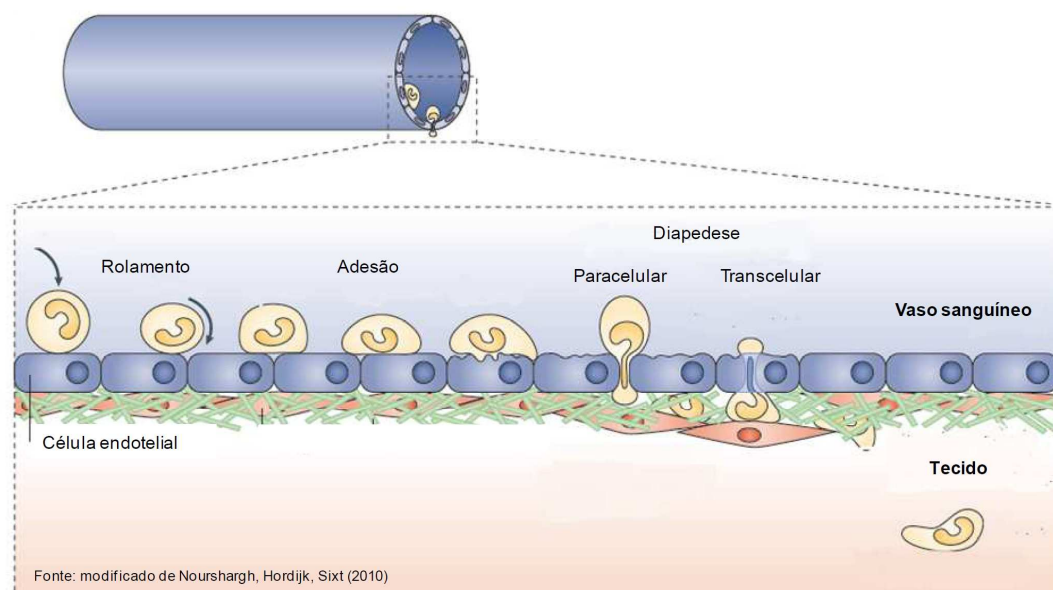


Figura 4: Migração de neutrófilos. Para alcançar o foco inflamatório, os neutrófilos da corrente sanguínea são ativados e realizam o processo de rolamento, adesão e diapedese. Uma vez atingido o sítio da inflamação, os neutrófilos fagocitam e destroem as bactérias.

Os leucócitos circulantes migram seletivamente e em número significativo para o tecido inflamado no decorrer do processo. Em uma resposta inflamatória aguda há acúmulo predominante de neutrófilos, enquanto que as células mononucleares são observadas mais tardiamente, bem como nos processos crônicos. A migração de eosinófilos também pode ocorrer em processos inflamatórios, estando principalmente associada a processos alérgicos e infecções parasitárias. Algumas das células envolvidas já estão presentes no tecido afetado tais como: células endoteliais, células mesoteliais, mastócitos, eosinófilos, macrófagos e alguns linfócitos (FRANCISCHETTI et al., 2010).

3.3.1. Inflamação Aguda

O processo inflamatório agudo pode durar minutos, horas ou dias, independe da natureza do agressor e apresenta resposta semelhante a estímulos distintos (SIQUEIRA-JÚNIOR; DANTAS, 2000). A resposta inflamatória aguda é dividida em duas fases: a primeira fase (0-1 hora), que ocorre imediatamente após um estímulo agressivo, caracteriza-se pela liberação de histamina e serotonina; a segunda fase, fase tardia da inflamação aguda (5-6 horas após a lesão), é definida pela liberação de bradicinina e prostaglandinas onde há acúmulo de células inflamatórias no local lesionado ocasionando migração de neutrófilos e formação de exsudato, finalizando assim que o estímulo causador da injúria for removido e a liberação de mediadores químicos envolvidos nesse processo seja inibida (GARCIA-PASTOR et al,1999; ZHANG, 2008). O objetivo da inflamação aguda é servir como aporte de defesa para o organismo, localizando a região afetada, para eliminar o agente agressor e remover os tecidos degenerados, preparando a área lesada para reparação, além de envolver uma série de eventos celulares e vasculares dinâmicos, bem coordenados que dependem da chegada de leucócitos inflamatórios para o local da lesão (KIRVESKARI, 2003).

3.3.2. Inflamação Crônica

A inflamação crônica ocorre quando há um estímulo agressor persistente, que ocasiona uma destruição contínua dos tecidos, tentativas de cicatrização por reparo fibroso além de respostas auto-imunes (ZHANG; CAO; ZHANG, 2009).

A inflamação crônica se prolonga por períodos bem mais extensos que a inflamação aguda e está associada com alguns processos específicos de alterações histológicas, como fibrose e necrose do tecido afetado, proliferação de vasos sanguíneos e a participação de linfócitos e macrófagos (FERREIRA; LORENZETTI; POOLE, 1993).

Ocorrendo uma injúria, os mediadores do processo inflamatório são produzidos e liberados no local onde se deflagrou o processo. Os macrófagos são responsáveis pela sinalização do local onde há material estranho ou lesão através destes mediadores que irão atrair as células circulantes (leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, eosinófilos, linfócitos), que apresentam um papel amplificador no processo inflamatório. A fase crônica, que ocorre no período de meses a anos, caracteriza-se por um acentuado aumento na produção de mediadores inflamatórios (ZHANG; CAO; ZHANG, 2009).

Outras substâncias também são responsáveis por manter e amplificar o processo inflamatório, como a serotonina, histamina, bradicinina, os metabólitos do ácido araquidônico, citocinas, NO e neuropeptídeos. As prostaglandinas e leucotrienos são responsáveis por atrair e recrutar macrófagos (quimiotaxia), que por sua vez fagocitam os leucócitos polimorfonucleares, com a consequente eliminação dos agentes agressores da inflamação. A ativação de macrófagos e linfócitos T permite o estabelecimento de uma resposta imune específica (ZHANG; CAO; ZHANG, 2009).

3.3.3. Mediadores da Inflamação

Os fenômenos da inflamação são mediados por substâncias químicas, cuja interação é complexa. Elas são oriundas do plasma, leucócitos, plaquetas, endotélio e tecido conjuntivo (Figura 5).

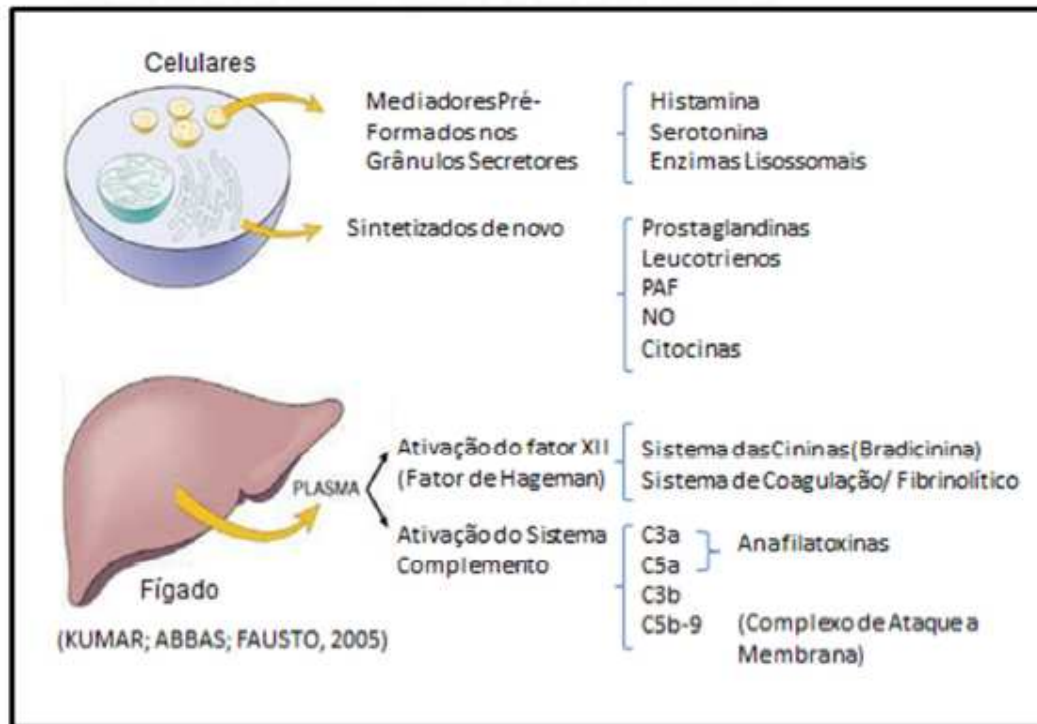


Figura 5: Mediadores químicos da inflamação

3.3.3.1. Mediadores Inflamatórios derivados do Ácido Araquidônico

Mediadores inflamatórios significantes são aqueles derivados do ácido araquidônico. Esse ácido é metabolizado por duas vias enzimáticas que levam à produção de mediadores locais e exercem expansivas ações em resposta à inflamação. A via iniciada pela cicloxigenase (COX) produz prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, enquanto que a via das lipoxigenases (LOX) leva à produção de leucotrienos e lipoxinas (Figura 6). Os metabólitos do ácido araquidônico, formados através das vias da COX e LOX, representam importantes classes de mediadores inflamatórios (SERHAN; CHIANG, 2004; SANJITA et al., 2008).

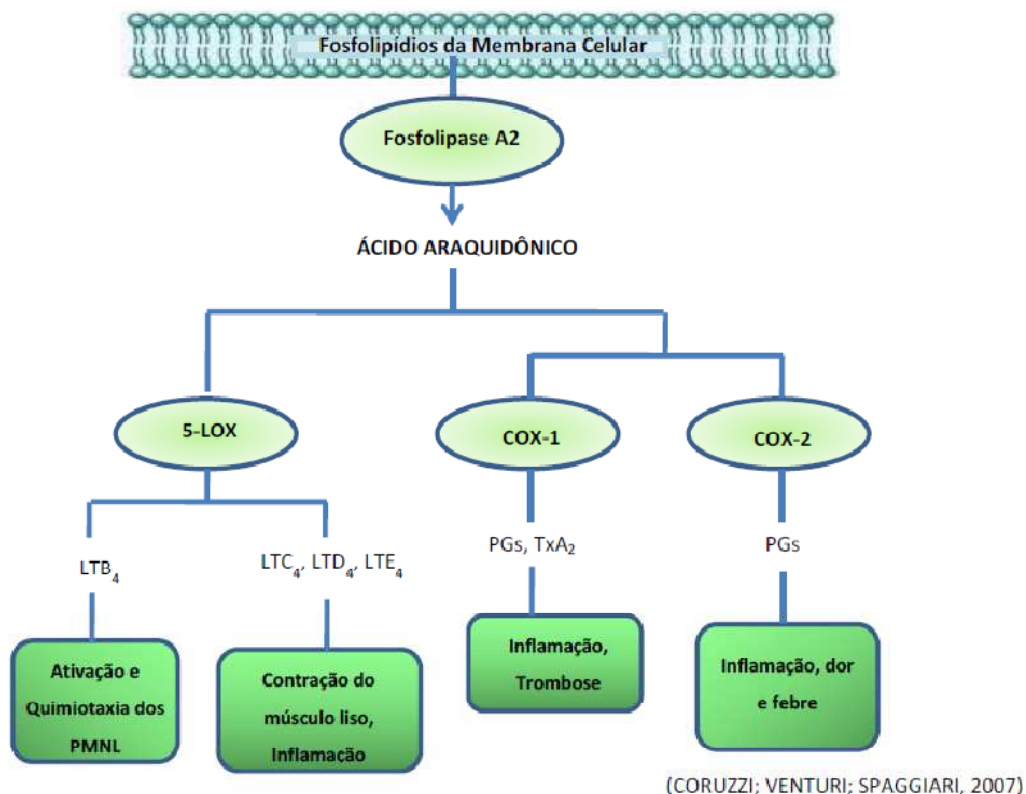


Figura 6: Esquema geral que representa as vias metabólicas que levam a produtos do ácido araquidônico envolvidos no processo inflamatório. COX = ciclooxigenase, 5-LOX = 5-lipoxigenase; LTs = leucotrienos; PGs = prostaglandinas; PLA2 = fosfolipase A2; TxA₂ = tromboxano A2.

Os mediadores resultantes da via da COX e o papel das prostaglandinas no processo inflamatório têm sido exaustivamente estudados. Além disso, há uma crescente evidência de que a complexa via do metabolismo do ácido araquidônico na inflamação envolve uma variedade de outros mediadores além dos derivados da COX, onde cada qual possui um papel no processo inflamatório. Os leucotrienos, segunda principal família dos derivados do ácido araquidônico, são sintetizados pela via da 5-LOX e têm um papel importante no processo inflamatório (MARTELL-PELLETIER et al., 2003).

A COX é a enzima chave que está envolvida na biossíntese de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, que por sua vez, estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, além dos processos patológicos, como a inflamação (LEVAL et al., 2000). As isoformas da COX são classificadas como COX-1 (constitutiva), COX-2 (indutiva), além de existir a COX-3, que é uma variante da COX-1. Estas enzimas são inibidas por substâncias anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs) (ZHANG, 2009).

A COX-1 é constitutivamente expressa em quase todos os tecidos e fornece prostaglandinas para manter as funções fisiológicas como a citoproteção do estômago e na regulação do fluxo sanguíneo renal (VANE et al. 1998). Em contraste, a COX-2 é induzida em células do sistema imunológico, tais como macrófagos, em resposta à lesão, infecção ou outros tipos de estresse produzindo prostaglandinas que atuam para sensibilizar os nociceptores e induzir inflamação (ZHANG; CAO; ZHANG, 2009).

Parece evidente que COX-1 desempenha um papel imprescindível na homeostase, enquanto que a COX-2 atuaria em condições patológicas como a inflamação. Entretanto essa afirmação mostrou-se equivocada pelo simples fato da COX-2 também apresentar uma função constitutiva em tecidos normais (KUMMER et al., 2002; REIS et al., 2011).

As lipoxigenases (LOXs) são enzimas responsáveis pela produção de leucotrienos (LTs). Entre as lipoxigenases existentes nos tecidos dos mamíferos, a 5-LOX é encontrada principalmente em células de origem mielóides, como por exemplo, leucócitos polimorfonucleares (PMNL), mastócitos, macrófagos e basófilos (GOMES et al., 2009).

Os leucotrienos são importantes mediadores químicos em uma variedade de condições inflamatórias e alérgicas. Estas moléculas de sinalização podem ser divididas em dois grupos: o leucotrieno pró-inflamatório (LTB₄) e leucotrienos espasmogênicos (LTC₄, LTD₄ e LTE₄). Entre os leucotrienos, geralmente o LTE₄ é menos potente do que LTC₄ e LTD₄. Inúmeras evidências experimentais sugerem que os leucotrienos e alguns dos seus metabólitos contribuem para a fisiopatologia da resposta inflamatória através de uma grande variedade de efeitos, incluindo principalmente a contratilidade da musculatura lisa (LTC₄, LTD₄, LTE₄); agregação, degranulação e quimiotaxia de neutrófilos (LTB₄); aumento na permeabilidade vascular (LTC₄, LTD₄, LTE₄); atividade sobre linfócitos e hiperalgesia (LTB₄) (HAEGGSTRÖM, 2000).

O LTB₄ parece desempenhar um papel fundamental no recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão tecidual (HAEGGSTRÖM, 2000) e pode causar exsudação de plasma, exigindo a presença de leucócitos polimorfonucleares. Estas ações têm implicado os leucotrienos em atuarem como mediadores na asma, reações de hipersensibilidade imediata, reações inflamatórias e infarto do miocárdio (DAVIES et al., 1984; NEEDLEMAN, et al., 1986).

3.3.3.2. Aminas Vasoativas

As aminas vasoativas, histamina e serotonina (5-hidroxitriptamina – 5-HT), são as primeiras substâncias a serem liberadas durante a ativação da cascata da inflamação. Estas substâncias são armazenadas em vesículas no interior de macrófagos, mastócitos e plaquetas, e são responsáveis por alterações vasculares como: vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e exsudação plasmática. Essas alterações ocorrem durante as primeiras horas após o estímulo inflamatório (PARADA et al., 2001). Essas aminas atuam sinergicamente com a bradicinina induzindo a hiperalgesia térmica, e participam dos processos de nocicepção em diversas condições inflamatórias, bem como na formação do edema (KAY, 2001; LAVICH et al, 2003).

A histamina é um importante mediador das respostas alérgica imediata e inflamatória. Sua fonte mais abundante são os mastócitos, onde se encontra pré-formada nos grânulos mastocitários, porém também são encontradas em outros tecidos como basófilos, plaquetas e nos neurônios. Esta substância é um forte estimulante das terminações nervosas sensitivas e está fortemente associada à produção da sensação de prurido. Algumas pesquisas têm associado o bloqueio de receptores de histamina no sistema nervoso central e a produção de potente analgesia (HOUGH, 2000; HAAS, 2008).

Vários estímulos podem gerar a degranulação dos mastócitos, liberando histamina, como: lesão física, frio, calor, anticorpos ligados aos mastócitos, fragmentos do complemento (anafilatoxinas C3a e C5a), proteínas de liberação da histamina derivadas dos leucócitos, neuropeptídeos (substância P) e citocinas (COTRAN; KUMAR; ROBINS, 2005).

A histamina é o mediador dos primeiros eventos da inflamação aguda; está envolvida no desenvolvimento do eritema, devido à vasodilatação das pequenas arteríolas e esfíncteres pré-capilares, e do edema ao aumentar a permeabilidade das vênulas pós-capilares. A extensão da liberação de outros mediadores como prostaglandinas e NO é determinada pela liberação primária de histamina. A histamina exerce ação biológica pela ativação de receptores H1 expressos, que causa separação das células endoteliais e permitem a transudação de líquidos e moléculas do tamanho de pequenas proteínas para o tecido perivascular (MCDONALD et al., 1999). Ela é considerada o principal mediador na fase aguda de aumento da permeabilidade vascular no processo inflamatório (COTRAN; KUMAR; ROBINS, 2005). A ativação desses

receptores permite o aumento do cálcio intracelular capazes de ativar nociceptores e promover a síntese de prostaglandinas (CLOUGH, 1999).

A serotonina (5-HT) é uma amina derivada do aminoácido triptofano. Assim como a histamina, a 5-HT possui propriedades vasoativas. Está presente apenas nos mastócitos de certas espécies, como o rato e o camundongo. No homem está localizada nas plaquetas e é ativada pelo PAF (COTRAN; KUMAR; ROBINS, 2005).

A 5-HT é liberada a partir das plaquetas durante o processo de agregação, após contato com o colágeno, trombina, adenosina difosfato (ADP) e complexo antígeno-anticorpo. Essa amina vasoativa tem um importante papel na alteração do tônus e permeabilidade vascular o que contribui para o extravasamento de fluídos (COLE et al., 1994). A 5-HT é também um poderoso agente estimulante das terminações nervosas sensitivas para dor e prurido, sendo responsável por alguns dos sintomas causados por picadas de insetos e irritantes vegetais (YAMAGUCHI et al., 1999). A 5-HT produz rubor, uma das características da inflamação e a possível explicação para esse fato é constrição venosa com conseqüente aumento no enchimento capilar (KATZUNG, 2005).

A bradicinina é um peptídeo vasoativo derivado do cininogênio (precursor inativo) que afeta a musculatura, promovendo dilatação de vasos sanguíneos e aumento da permeabilidade vascular. A bradicinina tem um papel importante também na dor, por possuir um potente efeito algico (SIQUEIRA-JUNIOR, DANTAS, 2000).

Os eventos vasculares produzidos por essas aminas promovem uma elevação da perfusão local e extravasamento de líquido para o espaço intercelular, causando edema, hiperemia e elevação da temperatura, observados no sítio da inflamação. Tais eventos associados à liberação de substâncias quimiotáticas induzem a migração de leucócitos para o tecido inflamado (BILATE, 2007).

3.3.3.3. Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico é sintetizado a partir de L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) em diferentes tecidos e células animais. Pelo menos três isoformas de NOS foram identificadas, incluindo NOS endotelial (eNOS), NOS neural (nNOS) e NOS induzível (iNOS). A pequena quantidade de NO produzido pela NOS constitutivas (cNOS), das quais fazem parte a eNOS e nNOS, é um importante regulador da homeostase física (presente tanto no coração como na parede dos vasos, apresentando

papel fisiológico), enquanto que a grande quantidade de NO produzido por iNOS foi estreitamente correlacionado com fisiopatologia de uma variedade de doenças e inflamação (ZHANG, CAO; ZHONG, 2009).

A iNOS é induzida por citocinas pró-inflamatórias, resultando em aumento na produção de NO que pode aumentar exsudação de sangue e plasma, como observado na asma e outras doenças inflamatórias e ampliar a resposta inflamatória, como um agente quimiotático para eosinófilos e para o aumento da sobrevivência dos mesmos (BARNES, 1998).

O importante papel do NO na inflamação está relacionado a várias ações: relaxamento do músculo liso vascular (vasodilatação), redução da agregação e aderência plaquetária, redução do recrutamento de leucócitos, ação citostática e citotóxica através de mecanismos mediados por radicais livres que são protetores contra agentes infecciosos e células tumorais, mas que também podem ser lesivos para o próprio organismo, contribuindo para o estabelecimento de doenças inflamatórias (RIBBONS et al., 1997).

3.3.3.4. Resposta Imune e Inflamação

O sistema imune é responsável pelos processos de reparo tecidual como também pela defesa do organismo e a resposta imune pode ser classificada em imunidade inata e adquirida. Estes dois tipos de imunidade atuam de maneira independente; na imunidade inata as células atuantes são as fagocitárias mononucleares e os granulócitos, enquanto que na imunidade adquirida as células em atuação são os linfócitos (JANEWAY et al., 2005).

Na imunidade inata, os macrófagos entram em ação secretando diversos mediadores, tais como óxido nítrico (NO), citocinas (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , etc), quimiocinas (IL-8, MIP-1 α , MCP-1), entre outros (KONSMAN et al, 2002). A indução para a ativação dos macrófagos pode ocorrer tanto pelo estímulo lesivo ou pela ação de outras citocinas, principalmente interferon gama (IFN- γ), que são liberadas por linfócitos (JANEWAY et al., 2005; PARSLOW et al., 2004). Dentre os mediadores que atuam como vasodilatadores e contribuem para a migração leucocitária está a bradicinina. Ela estimula a produção de uma cascata de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-8, IL-6 e IL-1 β) e a liberação de prostaglandinas e aminas

simpaticomiméticas, que induzem a hipernocicepção e a dor (CUNHA et al., 1992; VERRI, 2007).

Os neutrófilos são participantes cruciais no processo inflamatório devido a sua rápida ativação e resposta ao estímulo quimiotático. Ao serem ativados secretam enzimas, tais como a elastase e mieloperoxidase, que promovem lesão endotelial e o seu extravasamento. Estão implicados na liberação de citocinas inflamatórias, mediadores lipídicos e enzimas capazes de promover dano tecidual (WEISS, 1989; COSTA; RUFINO; SILVA, 2009).

Os mastócitos são importantes células atuantes na imunidade e em condições patológicas do homem e de animais. Participam da indução da inflamação aguda e da reparação tecidual na fase crônica do processo inflamatório. São responsáveis pela produção de mediadores como histamina e serotonina (essa última somente em ratos e camundongos), enzimas (triptase, hidrolases ácidas e fosfolipase) e proteoglicanos (heparina e sulfato de condroitina). Outros mediadores sintetizados incluem IL-1, IL-8, TNF α , IL-12, IL-13, IL-15, quimiocinas, fatores de crescimento e de angiogênese (VEGF e PDGF), bem como prostaglandinas e leucotrienos (McNEIL, 1996; SCOTT; STOCKHAM, 2000; ROBBIE-RYAN; BROWN, 2002). Os mastócitos estão intimamente envolvidos com a patogenia da inflamação aguda, principalmente pela liberação da histamina que produz a vasodilatação venular e PAF que promove a adesão leucocitária dependente de CD18 (McNEIL, 1996; BOCHSLER; SLAUSON, 2002).

Na imunidade adquirida as células em atuação são os linfócitos. Estas células são primeiramente produzidas no timo ou na medula óssea, depois sofrem amadurecimento nos órgãos linfóides periféricos (baço, linfonodos e amígdalas), para então serem liberadas durante a resposta imune (WALKER et al., 1999; MARTIN-FONTECHA et al., 2004). Os linfócitos T efetores quando chegam ao local da injúria liberam diversas citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF- α) e quimiocinas. Estas são responsáveis pela ativação de células B, quimiotaxia de leucócitos, ativação dos macrófagos, deposição de fibrina e dor (WATKINS et al., 1995).

3.3.3.5. Citocinas

As citocinas representam um grupo de substâncias multifuncionais que estão envolvidas em muitos passos da resposta inflamatória. São moléculas que interligam, amplificam e propagam a resposta imune, recrutando células para áreas de inflamação,

estimulando sua divisão, proliferação e diferenciação. Possuem uma variedade de efeitos, incluindo expressão da molécula de adesão, quimiotaxia e ativação de outras vias inflamatórias (coagulação, complemento, cininas e fibrinólise) (SAYERS, RD, 2002; TORRE-AMIONE, 2005). São produzidas por macrófagos residentes e células circulantes, tais como mastócitos, macrófagos e neutrófilos, que após serem liberadas, atuam tanto local quanto sistemicamente. Devido as suas ações pleiotrópicas e redundantes, as citocinas formam uma rede na qual uma citocina pode induzir sua própria produção ou a produção de outras citocinas (TORRE-AMIONE, 2005).

As citocinas são um grupo diversificado de peptídeos e glicoproteínas de sinalização intercelular, que podem estar ligadas a membranas, e possuem pesos moleculares situados entre 6000 e 60000 Da. Mais de 200 citocinas foram identificadas e estão divididas em subgrupos, por exemplo: interleucinas, quimiocinas, interferon, fatores de crescimento, fatores estimuladores de colônias e hematopoiéticas.

As citocinas são produzidas durante o processo inflamatório e são estimuladoras da produção de proteínas de fase aguda. Tradicionalmente foram divididas em citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- β) e anti-inflamatórias (por exemplo, IL-1Ra, IL-4, IL-10, IL-13) (PARSLOW et al., 2004; BANERJEE; SAXENA, 2012).

As interleucinas anti-inflamatórias inibem a liberação de citocinas pró-inflamatórias e reduzem a expressão da COX-2 (CUNHA, 2004). Enquanto que as interleucinas pró-inflamatórias migram e atuam na área lesionada, sinalizando a inflamação. Estas interleucinas também estão associadas com a indução e manutenção da dor aguda e crônica (CUNHA et al., 2000; VALE et al., 2003). A interleucina IL-6 é o principal estimulador da produção de proteínas da fase aguda (GAULDIE et al., 1987; GABAY, 2006), enquanto que as outras citocinas envolvidas influenciam subgrupos de proteínas dessa fase. IL-6 exibe duas características contrastantes. Em modelos de inflamação crônica, tais com a artrite, a IL-6 é pró-inflamatória (ALONZI et al., 1998; YAMAMOTO et al., 2000), enquanto que nos modelos de inflamação aguda a IL-6 apresenta um perfil anti-inflamatório (XING et al., 1998; GABAY, 2006).

A função principal da IL-1 é servir como mediadora da resposta inflamatória do hospedeiro a infecções e outros estímulos, promovendo a proliferação e a diferenciação das células do sistema imune inato e adaptativo (ABBAS et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008). A IL-1 β é produzida por neutrófilos e monócitos/macrófagos, atua como importante desencadeador da migração leucocitária (BENINCÁ et al., 2007). É uma das

responsáveis por induzir a expressão da molécula de adesão ICAM-1. Além de estar relacionada à pirogenicidade, é responsável pela síntese de outras citocinas como IL-6 pelos monócitos, atuando sinergicamente com o TNF- α (LEMAY et al., 1990). A IL-1 β estimula a expressão de COX-2 e, como consequência, a formação e liberação de prostanoídes que têm importante papel na sensibilização dos nociceptores. Desta forma, indiretamente, a IL-1 β atua como mediador hipernociceptivo (OLIVEIRA et al., 2008; CUNHA et al., 2007).

TNF- α é sintetizado e liberado no local da lesão a partir de diversas células, como: macrófagos, linfócitos Th1, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, células NK e células do sistema nervoso (MEYERS et al., 2005). Trata-se de um agente quimiotático para neutrófilos e monócitos, estimula a fagocitose, adesão ao endotélio e produção de superóxido por estas células, além de estimular a produção de outras citocinas pró-inflamatórias como as quimiocinas KC e MIP 2 (CAMUSSI, 1991; ZHANG, 2001). O TNF- α também está intimamente relacionado com a promoção de hipernocicepção inflamatória, sendo o seu principal efeito fisiológico promover a resposta imune e inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção, além de ativá-los (CUNHA et al., 2007).

3.4. Fisiologia da Dor

A dor é uma sensação desagradável que tem a função primária de proteção do organismo; em contrapartida, na cronicidade não auxilia evidentemente a sobrevivência (FEIN, 2011). É uma experiência complexa que envolve não apenas a transdução da informação gerada pelo estímulo nocivo, mas também o processamento cognitivo e emocional pelo cérebro. Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 1983), a dor é uma experiência sensorial e emocional associada com potenciais ou reais lesões, que tem uma conotação individual e sofre influências de experiências anteriores. Já o termo “nocicepção” refere-se somente a percepção do sinal no sistema nervoso central evocado pela ativação de receptores sensoriais especializados (os nociceptores), existentes no local da lesão, que fornecem informações sobre a lesão tecidual ocasionada por estímulos nocivos (FÜRST, 1999; FEIN, 2011).

As fibras aferentes de primeira ordem, relacionadas com a condução do estímulo doloroso são classificadas de acordo com sua estrutura, diâmetro e velocidade de condução em três tipos: fibras C, fibras A- β , fibras A- δ (RANG et al., 2001).

As fibras tipo C caracterizam-se por serem amielinizadas, possuem diâmetro de 0,4 a 1,2 μm e velocidade de condução que varia de 0,5 a 2,0 m/s. Estas fibras apresentam receptores termosensíveis (que respondem ao frio e ao calor), mecanociceptores de baixo limiar e receptores específicos para substâncias alogênicas (tais como íons potássio, acetilcolina, enzimas proteolíticas, serotonina, prostaglandinas, substância P e histamina). Muitas fibras C, com receptores de alto limiar, estão associadas a nociceptores do tipo polimodais (MENSE, 1983; MILLAN, 1999).

As fibras A- δ são mielinizadas, têm diâmetro que varia de 2,0 a 6,0 μm , conduzindo a uma velocidade de 12 a 30 m/s. Elas transmitem informações de alta intensidade e baixa latência, promovendo a sensação dolorosa rápida da primeira fase da dor aguda, desencadeando o reflexo de retirada. As fibras A- δ dividem-se em dois grupos. O primeiro (tipo I), corresponde às fibras com receptores de limiar alto, que respondem a estímulos mecânicos de alta intensidade e a estímulos térmicos ou químicos de baixa intensidade. O segundo grupo (tipo II) apresenta receptores que são estimulados por altas temperaturas (45-53°C) e alguns receptores para frio intenso (-15°C) (WILLIS; WESTLUND, 1997; ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004).

As fibras A- β possuem diâmetro maior que 10 μm e velocidade de condução que varia entre 30 e 100 m/s. Estas fibras não propagam estímulos potencialmente nocivos em situações normais, além de estarem relacionadas à alodinia (WILLIS; WESTLUND, 1997; MILLAN, 1999).

Quatro classes de nociceptores foram descritos: *mecânicos*, *térmicos*, *polimodais* e *silenciosos*. Os nociceptores *mecânicos* respondem a pressão intensa, enquanto os nociceptores *térmicos* respondem às temperaturas extremas (quentes, > 45 °C, ou frias, < 5 °C) e possuem fibras A mielinizadas, que conduzem impulsos na velocidade de 3 m/s a 40 m/s. Em conjunto, esses nociceptores de fibra A δ - β são denominados *nociceptores mecanotérmicos* (FEIN, 2011).

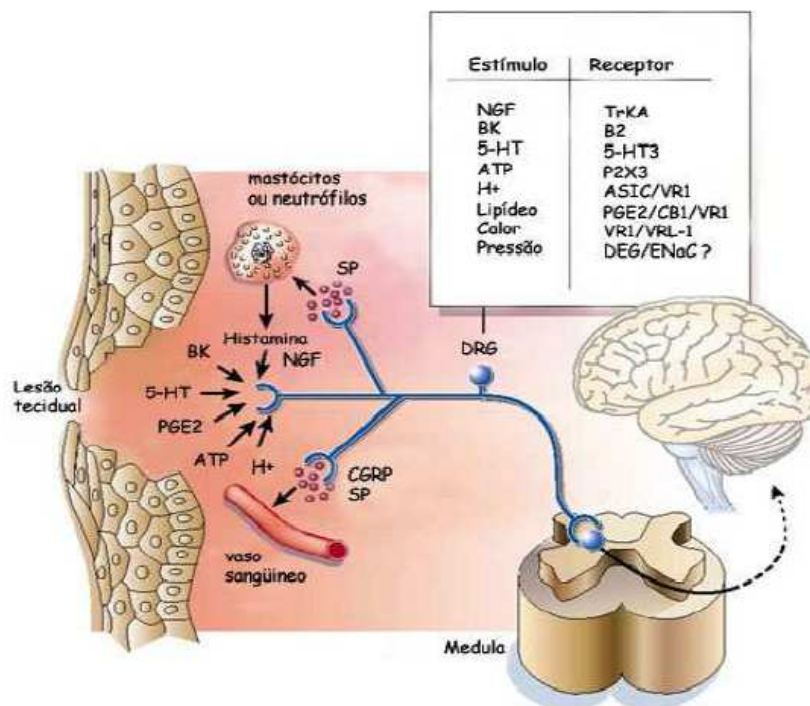
Os nociceptores *polimodais* respondem aos estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos; possuem pequenas fibras C amielinizadas que conduzem impulsos em velocidade menor que 3 m/s. Vale ainda lembrar que as pequenas fibras

A δ - β mielinizadas carregam informação de nocicepção responsável pela sensação de dor acentuada em *picada* e as pequenas fibras C amielinizadas carregam informação responsável pela sensação fraca em *queimação* (FEIN, 2011).

Os nociceptores *silenciosos* são ativados por estímulos químicos e mediadores inflamatórios, respondendo a estímulos mecânicos e térmicos somente depois de serem ativados. Estes nociceptores também possuem pequenas fibras C amielinizadas que conduzem impulsos em velocidade menor que 3 m/s (FEIN, 2011).

A percepção dolorosa a um determinado estímulo nocivo tem como propósito biológico alertar o organismo sobre algum perigo no ambiente, incluindo a resposta comportamental de proteger o organismo contra possível lesão (CHENG et al., 2002).

A dor se inicia em áreas periféricas fora do sistema nervoso central (cérebro e medula espinhal) (BASBAUM; JULIUS, 2006). Estímulos dolorosos são detectados por receptores fisiológicos tais como os nociceptores, que conduzem impulsos pelas fibras C, que respondem a estímulos químicos, como por bradicinina ou prostaglandina, bem como pelas fibras A- δ , que respondem a estímulos de pressão intensa ou térmicos (DESPOPOULOS; SILBERNAGL, 2000). Essas fibras se inserem na raiz dorsal da medula espinhal, e então são conduzidas ao cérebro. Quando o agente nocivo é detectado pela extremidade periférica dos nociceptores, na pele ou algum outro órgão, um impulso elétrico é disparado e propagado por toda a fibra nervosa até atingir uma região da medula espinhal (BASBAUM; JULIUS, 2006) (Figura 7).



(SCHOLZ; WOOLF, 2002)

Figura 7: Via de condução de estímulos dolorosos.

A percepção da sensação nociceptiva tem início a nível periférico, através dos nociceptores e das fibras a eles associados, sendo então transmitida até o sistema nervoso central (SNC). Para tanto os nociceptores fazem sinapse no corno dorsal com neurônios de segunda ordem. Esses neurônios cruzam a medula espinhal para ascender através do trato espinotalâmico, com suas fibras terminando principalmente no tálamo. No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios através da cápsula interna ao córtex somatosensor, onde ocorre a somatização do estímulo nocivo, ou emitem axônios para o giro cingulado anterior, onde existe o componente emocional da dor. Esta é a chamada via clássica e é também a principal via de condução da dor, apesar de existirem outros possíveis caminhos envolvendo diferentes estruturas nervosas (BESSION, 1999).

A dor pode ser classificada como nociceptiva, neurogênica, neuropática, psicogênica ou inflamatória que são resultantes, respectivamente, da estimulação excessiva dos nociceptores, lesão do tecido neural, disfunção de um nervo, fatores psicológicos, ou resultante de processos inflamatórios (MILLAN, 1999).

3.4.1. Dor Nociceptiva

O componente sensorial da dor é denominado nocicepção, que pode ser definida como a resposta fisiológica a uma lesão tecidual (RUSSO; BROSE, 1998). Os nociceptores representam as terminações livres do axônio periférico do Neurônio Aferente Primário (NAP), e muitos deles são “silenciosos” em condições normais, sendo ativados apenas em condições patológicas (por exemplo, em processos inflamatórios). Estão localizados em todo o corpo, exceto no cérebro, tecido ósseo, e fígado (MENDES, 2010).

A sensação dolorosa é comumente acompanhada de alterações sensoriais descritas na literatura como hiperalgesia (sensibilidade aumentada para um estímulo doloroso), e alodinia (dor provocada por um estímulo previamente não nocivo) (BESSON, 1999). A hiperalgesia envolve mediadores armazenados (substância P e aminoácidos excitatórios) e induzidos (óxido nítrico e metabólitos do ácido araquidônico), liberados por neurônios aferentes primários ou sintetizados na medula espinhal (MELLER et al., 1994; MELLER et al., 1996).

A alodinia é caracterizada por uma sensibilidade aumentada para um estímulo normalmente inócuo. Um exemplo é uma autossensibilidade da pele queimada pelo sol ao leve toque. A alodinia pode resultar de duas diferentes condições; responsividade aumentada de neurônios transmissores da dor, da coluna espinhal (sensibilização central) ou diminuição dos limiares de ativação dos nociceptores (sensibilização periférica) (DRAY; URBAN; DICKENSON, 1994; BASBAUM; JESSELL, 2000; ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004).

3.4.2. Dor Neuropática

A dor neuropática segundo o comitê de Taxonomia da IASP é definida como “uma consequência direta de lesão ou doença que afete o sistema somatosensorial” (LOESER; TREEDE, 2008; ANTONIALLI, 2009). A dor neuropática pode resultar de lesão ou disfunção de estruturas centrais ou periféricas do sistema nervoso. Esta dor caracteriza-se por dor espontânea, provocada por estímulos normalmente inócuos (alodinia) ou por uma sensibilidade exacerbada a estímulos nocivos ou não nocivos (hiperalgesia). O termo hipernocicepção refere-se à sensibilização dos nociceptores, isto

é, a diminuição do seu limiar de ativação e tem sido empregado para designar alodinia ou hiperalgesia em animais de experimentação (CUNHA et al., 2004).

Embora sua etiologia seja bastante variada, incluindo trauma, desordens metabólicas e vasculares, infecções virais ou bacterianas, entre outros fatores, o denominador comum destas patologias é o dano neural, o qual é seguido por algumas alterações que também parecem ser comuns a diversos tipos de dor neuropática (DEVOR, 2006). No sistema nervoso periférico, as principais consequências da lesão de nervos são alterações nas fibras aferentes primárias e na excitabilidade das mesmas. Estes fenômenos vão contribuir para as alterações que ocorrem no SNC, que incluem: excitabilidade aumentada, inibição diminuída e reestruturação organizacional das células (DICKENSON; MATTHEWS; SUZUKI, 2002; WOOLF, 2004; SILVA, 2007).

As dores nociceptiva e neuropática muitas vezes podem coexistir, contudo, a dor neuropática requer abordagens analgésicas específicas, diferentes das abordagens analgésicas destinadas às dores nociceptivas (SCHESTATSKY, 2008) (Figura 8).

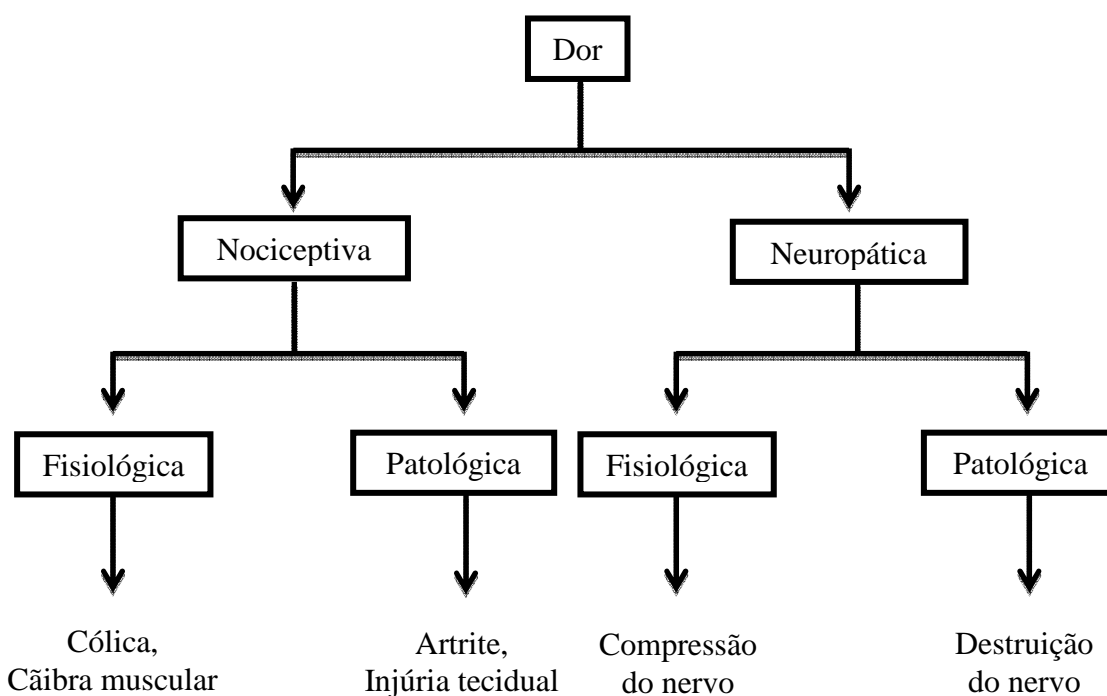


Figura 8: Diagrama esquemático dos tipos de dor. (Adaptado de SCHESTATSKY, 2008)

3.4.3. Dor Inflamatória

As células envolvidas no processo inflamatório produzem uma série de mediadores químicos como bradicinina, serotonina, histamina; mediadores lipídicos como os produtos da cascata do ácido araquidônico, além de citocinas. Estes mediadores sensibilizam os nociceptores, conseqüentemente diminuindo no limiar de percepção do estímulo doloroso (MEYER; CAMPBELL; RAJA, 1994; CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

A estimulação de nociceptores produz um reflexo axônico local, resultando na liberação de neuropeptídeos (substância P – SP, e neurocinina A - NKA), o que contribui para o aumento do processo inflamatório e da hiperalgesia. Os neuropeptídeos liberados provocam vasodilatação, aumento da produção de enzimas lisossômicas, liberação de prostaglandinas e interleucinas, além da síntese de NO, estimulando e sensibilizando os nociceptores (RANG et al., 2007).

3.4.4. Mediadores Químicos da Dor

Os mediadores químicos interagem com canais de íons na membrana plasmática do nociceptor utilizando os mecanismos de sinalização, como os usados em outra parte do sistema nervoso. Esses mediadores podem agir diretamente nos canais de íons controlados por ligante (LGICs) – os ionotrópicos ou indiretamente via receptores acoplados à proteína G (GPCRs) ou receptores da tirosina quinase (RTKs) – os metabotrópicos (FEIN, 2011). Os neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, macrófagos são células capazes de produzir vários mediadores inflamatórios e/ou nociceptivos como histamina, serotonina, prostaglandinas, leucotrienos, PAF, citocinas, quimiocinas, TNF- α , adenosina trifosfato (ATP), proteases, fator de crescimento neural (NGF), entre outros (SILVA, 2007; FEIN, 2011). Esses mediadores podem estar relacionados tanto com a inflamação quanto com a dor.

O tratamento da dor aguda e da crônica é multimodal e envolve o uso de intervenções farmacológicas, psíquicas, físicas, a utilização de bloqueios anestésicos regionais e métodos neurocirúrgicos (KRAYCHETE, 2002). Uma das principais classes de substâncias antinociceptivas são os opióides. Eles são utilizados tanto em nível central (inibindo a percepção da dor), como em nível periférico (suprimindo a transmissão do impulso nervoso em nível medular). Outra importante classe de

substâncias analgésicas são os inibidores da COX, que possuem ação sobre a produção de prostaglandinas frente a estímulos dolorosos (MENDES, 2010).

3.5. Anti-inflamatórios esteroidais, não-esteroidais e Inibidores duais 5-LOX/COX

3.5.1. Anti-inflamatórios Esteroidais (AIES)

Os glicocorticoides são hormônios sintetizados e liberados pelas glândulas adrenais, sob influência do ACTH (Hormônio Adrenocorticotrópico), que é secretado pela adeno-hipófise. Exercem importantes ações sobre o metabolismo intermediário de carboidratos, proteínas e lipídeos, além de exibirem atividade anti-inflamatória e imunossupressora e, por essas ações, são comumente utilizados na terapia. Alguns exemplos de glicocorticoides utilizados na clínica incluem: dexametasona, prednisona, betametasona, budesonida, beclometasona.

O mecanismo de ação dos AIEs envolve interações com receptores intracelulares pertencentes à superfamília dos receptores que controlam a transcrição gênica. Ao serem ativados, esses receptores podem levar à indução (desencadeamento de transcrição) ou à repressão (inibição de transcrição) de genes particulares (CHROUSOS; MARGIORIS, 2001).

A repressão é obtida através da inibição da ação de diversos fatores de transcrição, como o AP-1 e NFκB e, dessa forma, não há expressão de genes como os que controlam a síntese da COX-2, citocinas, moléculas de adesão, dentre outras. Por outro lado, a indução envolve a formação de RNAs específicos, que dirigem a síntese de proteínas específicas, como a lipocortina-1 (ou anexina-1), que desempenha a importante função de inibir a fosfolipase A2 (PLA2), enzima responsável pela liberação do ácido araquidônico a partir de fosfolipídeos da membrana plasmática (TOMMASINI; CANTONI, 2004). Dessa forma, indiretamente, impedem a formação das prostaglandinas e dos leucotrienos (CLARK, 1997; MENEZES et al., 2009).

Os AIEs exercem ações mais amplas que os AINEs sobre o processo inflamatório e, atualmente, são as drogas mais potentes utilizadas no tratamento da inflamação apresentando dessa forma, um amplo espectro de efeitos adversos.

3.5.2. Anti-inflamatórios Não-Esteroidais (AINES)

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) são utilizados para o tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas. O principal mecanismo de ação dos AINES ocorre através da inibição da COX fazendo com que haja uma redução da conversão do ácido araquidônico (AA) em prostaglandinas (MONTEIRO et al., 2008).

A aspirina e os demais AINES inibem a síntese de PG mediante a inativação da COX. A aspirina acetila as isoenzimas cicloxigenase 1 (COX-1) e cicloxigenase 2 (COX 2) covalentemente, inativando-as de forma irreversível e não seletiva. Em contraste, os AINES, como ibuprofeno ou indometacina inibem a COX reversivelmente competindo com o substrato, ácido araquidônico, para o sítio ativo da enzima. A maioria dos AINES age de forma reversível e não seletiva sobre as mesmas enzimas. Convém salientar que tanto a aspirina quanto os outros AINES não bloqueiam a via da lipoxigenase, conseqüentemente não inibindo a produção de leucotrienos (VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998; MONTEIRO et al., 2008).

Infelizmente, a inibição da produção de prostaglandinas em órgãos como estômago e rim pode resultar em lesões gástricas, nefrotoxicidade e aumento de hemorragias (MASFERRER et al.,1994; FABIOLA et al., 2001; RAJAKARIAR et al., 2006). Todos AINES convencionais têm a tendência de causar efeitos adversos gastrointestinais que podem variar de dispepsia a sangramentos de estômago e duodeno, ativar doenças inflamatórias intestinais quiescentes e causar dano tecidual (como úlceras) no trato gastrointestinal baixo, geralmente, após um longo período de uso (MONTEIRO et al., 2008).

Mesmo com administração intramuscular ou intravenosa os AINES podem causar úlceras gástricas ou duodenais. Por inibirem a COX 1, os AINES impedem a síntese de prostaglandinas gástricas, especialmente PGI₂ e PGE₂, que servem como agentes citoprotetores da mucosa gástrica. Estes eicosanóides agem inibindo a secreção ácida pelo estômago, aumentando o fluxo sanguíneo na mucosa gástrica e promovendo a secreção de muco citoprotetor. A inibição da sua síntese, portanto, acarreta ao estômago uma maior suscetibilidade às lesões. Além disso, diminui a adesividade plaquetária, aumentando os riscos de sangramento. A indometacina, por exemplo, apresenta acentuada recirculação enterohepática, o que aumenta os efeitos tóxicos deste fármaco (BRENOL et al., 2000).

Com a descoberta da COX 2 e da crença original de que é expressa apenas nos

locais de inflamação, levantou-se a possibilidade de inibir seletivamente esta isoforma, explorando, então, os efeitos benéficos dos AINEs sem apresentarem seus efeitos colaterais (RAJAKARIAR et al., 2006). Os inibidores seletivos da COX 2, assim como os inibidores da COX 3 preservam a proteção mediada por PGs gástricas. Todavia, os inibidores seletivos da COX 2 em altas doses podem perder sua especificidade e também bloquear a COX 1 no estômago e duodeno causando danos (BLOT; MCLAUGHLIN, 2000; HAWORTH; BUCKLEY, 2007).

Estudos mostraram que a COX 2 possui função fisiológica e protetora do organismo, regulando a função homeostática tecidual do SNC, coração, rins, vias aéreas, entre outros. Porém a sua inibição seletiva pode acarretar sérios efeitos cardiovasculares (MARTEL-PELLETIER et al., 2003; CORUZZI; VENTURI; SPAGGIARI, 2007; GONZÁLEZ-PÉRIZ; CLÀRIA, 2007).

AINEs clássicos agem como inibidores não seletivos da COX e são utilizados como anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos. No entanto, AINEs não seletivos podem causar efeitos colaterais relacionados com a inibição da COX 1 como irritação gastrointestinal (REIS et al., 2011). Como consequência, tem havido um direcionamento para uma melhor compreensão das vias LOX e COX e o desenvolvimento de novas drogas. Por isso, novos inibidores duais 5-LOX/COX estão sendo estudados como novas drogas em potencial para tratar os processos inflamatórios (MARTEL-PELLETIER et al., 2003).

3.5.3. Inibidores duais 5-LOX/COX

A obtenção de inibidores duais para a COX/LOX podem contornar ou minimizar efeitos colaterais indesejáveis (MAHY et al., 1993). A justificativa para o desenvolvimento de inibidores duais da COX e 5-LOX foi baseado tanto a atividade pró-inflamatória dos leucotrienos (LTs), como nos efeitos prejudiciais que causam na mucosa gástrica. Além disso, estes compostos parecem ser os principais produtos do ácido araquidônico na mucosa gástrica quando há inibição da COX (CELOTTI; LAUFER, 2001; ATAY; TARNAWSKI; DUBOIS, 2006). Inibidores duais 5-LOX/COX devem, teoricamente, apresentar aumento dos efeitos anti-inflamatórios e melhor tolerabilidade gástrica (FIORUCCI et al., 2001; JULÉMONT et al., 2004). Recentemente, grande interesse surgiu sobre as lipoxinas, que podem ser consideradas

como produtos de contra-regulação do ácido araquidônico, responsáveis pela ação anti-inflamatória e gastroprotora (CORUZZI; VENTURI; SPAGGIARI, 2007).

Os leucotrienos têm um papel essencial no desenvolvimento e na persistência do processo inflamatório, e ficou mais explícito que tanto os leucotrienos, como as prostaglandinas têm efeitos complementares, enquanto que a produção de lipoxinas se opõem as ações inflamatórias dos leucotrienos. Em vista desses conceitos, sugere-se o bloqueio tanto da produção de prostaglandina quanto de leucotrieno por apresentarem efeitos sinérgicos alcançando dessa forma a atividade anti-inflamatória ideal. Além disso, a inibição do processo inflamatório pela via dual 5-LOX/COX pode produzir um espectro mais amplo de efeitos anti-inflamatórios (MARTEL-PELLETIER et al., 2003).

Os derivados da isoxazolína-acilhidrazonas apresentam-se como um protótipo inibidor dual da 5-LOX/COX por possuir dois núcleos ativos com sítios de ação distintos, pois como relatado, os derivados isoxazolínicos agem inibindo a formação de PGs, e os derivados acilhidrazônicos inibem tanto PGs quanto LTs (HABEEB et al, 2001; HERNÁNDEZ et al, 2012). Hipoteticamente a junção desses núcleos criaria uma molécula ideal de ação dual e que teria, conseqüentemente, uma ação mais eficaz e com reduzidos efeitos colaterais. O nosso trabalho tem como objetivo comprovar a possível atividade dual desses derivados e conseqüentemente o seu mecanismo de ação.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Avaliar as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva dos derivados isoxazolínico-acilhidrazonas R-99 e R-123 como novos protótipos para o desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios e analgésicos.

4.2. Específicos

- ❑ Avaliar a atividade anti-inflamatória dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123, utilizando modelos experimentais de inflamação aguda como bolsão de ar, pleurisia induzida por carragenina, edema de pata induzido por carragenina, dextrana, histamina e serotonina, e permeabilidade vascular induzida por ácido acético;
- ❑ Determinar a concentração de NO no exsudato inflamatório de animais tratados com os compostos em estudo no modelo experimental de bolsão de ar subcutâneo;
- ❑ Avaliar a atividade antinociceptiva dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 nos modelos experimentais de nocicepção induzida por ácido acético e alodinia mecânica induzida por carragenina.

MATERIAIS E MÉTODOS

5. MATERIAL

5.1. Substâncias e reagentes

Os derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 foram fornecidos pelos colaboradores do Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada a Fármacos da UFPE (Figura 9). As características físico-químicas dos compostos estão descritas na tabela 1.

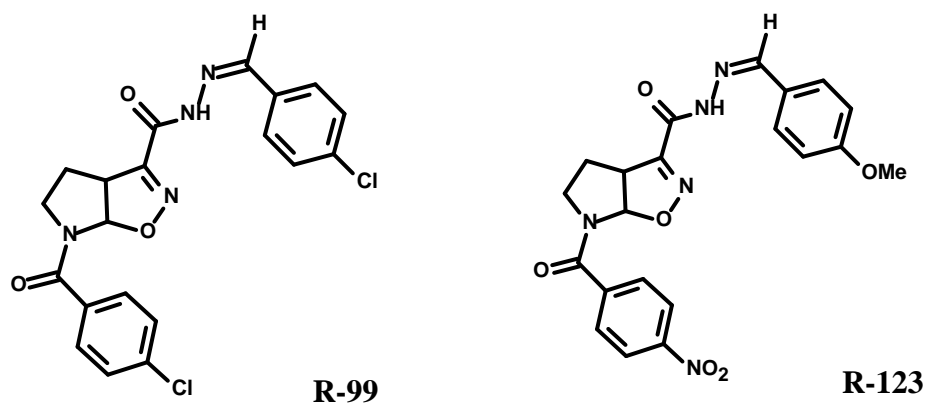


Figura 9: Estruturas químicas dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123.

Tabela 1: Nome químico e características físico-químicas dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123

Código	Nome Químico	Rf.	Ponto de fusão
R-99	(4-CLOROBENZILIDENO)-	0,38	Carbonizou à 215°C
	HIDRAZIDA DO ÁCIDO-6-(4-CLORO-BENZOIL)-4,5,6,6a-TETRAHIDRO-3aH-PIRROLO[3,2-d]ISOXAZOL-3-CARBOXÍLICO	(AcOEt/hexano 7:3)	
R-123	(4-METOXIBENZILIDENO)-	0,18	Carbonizou à 240°C
	HIDRAZIDA DO ÁCIDO-6-(4-NITRO-BENZOIL)-4,5,6,6a-TETRAHIDRO-3aH-PIRROLO[3,2-d]ISOXAZOL-3-CARBOXÍLICO	(AcOEt/hexano 7:3)	

Fonte: ALMEIDA, 2008.

Reagentes: ácido acético glacial $C_2H_4O_2$ (VETEC), citrato de fentanila (Cristalia), heparina sódica 5.000 UI/mL (Cristalia), evans blue (Sigma), HEMSTAB EDTA 15 g/dL (Labtest), cloridrato de cetamina (Vetbrands), cloridrato de xilazina (Vetbrands); reagente de Griess (Sigma), álcool iodado, álcool 70%, solução salina 9%, PBS, placas de 96 poços; vidraria; seringas; agulhas; bisturis; luvas; mascaras; óculos de proteção.

5.2. Equipamentos

Balança analítica, câmara de fluxo laminar, câmara de CO_2 , centrífuga, analisador hematológico ABX micros 60 - Horiba, aparelho de ELISA, pletismômetro (Ugo Basile, Itália) e analgesímetro digital von Frey (INSIGHT, Brasil).

5.3. Animais experimentais

Neste trabalho foram utilizados 245 camundongos machos adultos (com cerca de 60 dias de nascidos) albinos swiss (*Mus musculus*), pesando entre 20 e 25g - provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polietileno com grades de aço inoxidável e maravalha como cobertura, tendo acesso livre à água e ração balanceada, mantidos num ambiente com temperatura de $22 \pm 2^\circ C$ e luminosidade controlada, proporcionando um ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os animais foram submetidos a jejum, com a retirada da ração cerca de 4 horas antes do início do experimento. Durante o experimento os animais tiveram livre acesso à ingestão de água. Os animais foram mantidos de acordo com as normas internacionais do Conselho de Laboratório de Animais Experimentais (ICLAS).

6. MÉTODOS

6.1. Procedimentos éticos

Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animal de Laboratório (SBCAL) e com as normas estabelecidas pelo *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE), sob protocolo de número 23076.018987/2012-82. Este projeto encontra-se em concordância com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605- art. 32 e decreto 3.179- art. 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

6.2. Atividade anti-inflamatória

Para a avaliação da atividade anti-inflamatória dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 foram utilizadas as técnicas de bolsão de ar subcutâneo, edema de pata induzida por carragenina, dextrana, histamina e serotonina, permeabilidade vascular induzida por ácido acético e pleurisia induzida por carragenina, com determinação dos níveis de NO para o experimento de bolsão de ar.

6.2.1. Bolsão de ar subcutâneo

A indução de uma bolsa de ar no dorso dos camundongos foi feita através da injeção de ar estéril. No primeiro dia injetou-se 2,5 mL de ar estéril no dorso do animal, repetindo-se o procedimento após 72 horas. No sétimo dia do ensaio os animais receberam, por via oral, os derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 nas doses de 0,3, 3,0 e 30 mg/kg, indometacina (10 mg/kg) e um grupo controle recebeu o veículo (salina + DMSO 5%). Para indução da inflamação foi injetado 1,0 mL de uma solução de carragenina a 1% dentro da bolsa de ar uma hora após a administração dos compostos. Decorridas 6 horas após a aplicação do agente flogístico, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e as bolsas lavadas com 3,0 mL de solução salina

contendo EDTA como líquido de arraste. A contagem de leucócitos totais foi realizada em analisador hematológico ABX micros 60 (KIM et al., 2006; GUERRA et al., 2011). Os exsudatos foram centrifugados e o sobrenadante guardado a -20°C para análise de NO.

6.2.2. Determinação dos níveis de óxido nítrico

Para avaliar a produção de óxido nítrico (NO), as concentrações de nitrito (metabolito estável do NO) foram medidas no sobrenadante do exsudato do bolsão de ar. Uma alíquota de 50 µL de amostra foi transferida para uma microplaca e incubada com 50 µL de reagente de Griess modificado (sulfanilamida 1%, N-(1-naftil) etilenodiamina dicloridrato 0,1%, H₃PO₄ 5%) por 10 min em temperatura ambiente protegido da luz. A absorbância foi medida em 540 nm em leitor de microplacas e a concentração de nitrato foi calculada usando uma curva padrão de nitrito de sódio (GIUSTARINI et al., 2008).

6.2.3. Edema de pata induzido por carragenina em camundongos

Esta é uma metodologia que permite a observação do efeito sistêmico da substância teste através da indução de um estímulo inflamatório local. Neste ensaio, os animais receberam por via oral os derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 na dose de 15 mg/kg, cada. A dose dos compostos foi escolhida de acordo com os resultados do experimento anterior. O padrão utilizado foi a indometacina (droga anti-inflamatória não esteroideal) na dose de 10 mg/kg. O grupo controle recebeu apenas o veículo (salina + DMSO 5%). Uma hora após o tratamento, a inflamação foi induzida por uma injeção intra-plantar (i.pl.) de 50 µL de carragenina (1%) na pata posterior direita (WINTER et al., 1962; HENRIQUES et al., 1987). Um volume igual de salina (NaCl 0,9%) foi injetado na pata contralateral. O volume da pata foi medido antes da indução do agente flogístico e em 2, 4 e 6 horas após a administração de carragenina.

O volume do edema, em mililitros (mL), foi registrado através de um pletismômetro (Ugo Basile, Itália). A pata posterior do animal foi submersa até a junção tíbio-tarsal, na câmara de leitura do aparelho. O volume de líquido deslocado foi registrado digitalmente e correspondeu ao volume da pata. Os resultados foram

expressos como a diferença de volume (mL) entre a pata que recebeu carragenina e a pata contralateral que recebeu salina.

6.2.4. Permeabilidade vascular induzida por ácido acético

Os efeitos das substâncias testes no aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético em camundongos foram determinados de acordo com o método descrito por Whittle, 1964. Cada amostra em estudo foi administrada por via oral. Para os animais do grupo controle foi administrado o veículo (salina + DMSO 5%). Uma hora após, os animais foram anestesiados com uma solução associada de cetamina e xilazina, (8:2; v/v), por via intraperitoneal. Imediatamente foi injetado no plexo retro-orbital 0,2 mL/camundongo do corante Azul de Evans a 1% (Sigma, St. Louis, Missouri, USA). Em seguida, administrou-se 0,5 mL da solução de ácido acético (1%) na cavidade peritoneal. Após um intervalo de 30 minutos, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂, a cavidade peritoneal foi lavada com 2,0 mL de salina e o exsudato foi coletado e centrifugado a 2000 rpm durante 10 min. A absorbância do sobrenadante foi lida em filtro de 610 nm com um leitor de microplaca (termo plate).

6.2.5. Edema de pata induzido por dextrana em camundongos

Neste ensaio, os animais receberam por via oral os derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 na dose de 15 mg/kg, cada. A ciproheptadina, um anti-histamínico, foi administrada via oral na dose de 10 mg/kg. O grupo que recebeu apenas o veículo (salina + DMSO 5%) foi utilizado como controle. Uma hora após o tratamento, a inflamação foi induzida por uma injeção i.pl. de 50 µL de dextrana (0,2%) na pata posterior direita (PARRAT; WEST, 1958; WINTER et al., 1962). Um volume igual de salina (NaCl 0,9%) foi injetado na pata contralateral. O volume da pata foi medido antes da indução do agente flogístico e a cada 60 minutos até a quarta hora após a administração de dextrana.

O volume do edema, em mililitros (mL), foi registrado através de um pletismômetro (Ugo Basile, Itália). A pata posterior do animal foi submersa até a junção tíbio-tarsal, na câmara de leitura do aparelho. O volume de líquido deslocado foi registrado digitalmente e correspondeu ao volume da pata. Os resultados foram

expressos como a diferença de volume (mL) entre a pata que recebeu dextrana e a pata contralateral que recebeu salina.

6.2.6. Edema de pata induzido por histamina em camundongos

Para verificar a participação da histamina no efeito dos compostos em estudo foi realizado o edema induzido por histamina. Neste ensaio, os animais receberam por via oral os derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 na dose de 15 mg/kg, cada. A ciproheptadina, um anti-histamínico, foi administrada via oral na dose de 10 mg/kg. O grupo controle recebeu apenas o veículo (salina + DMSO 5%). Uma hora após o tratamento, a inflamação foi induzida por uma injeção i.pl. de 50 µL de histamina (100 µg) na pata posterior direita. Um volume igual de salina (NaCl 0,9%) foi injetado na pata contralateral. O volume da pata foi medido antes da indução do agente flogístico e em 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração da histamina.

O volume do edema, em mililitros (mL), foi registrado através de um pletismômetro (Ugo Basile, Itália), como descrito anteriormente.

6.2.7. Edema de pata induzido por 5-HT em camundongos

Para verificar se há envolvimento de receptores 5-HT no mecanismo de ação dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas foi utilizado o edema induzido diretamente por este mediador. Neste ensaio, os animais receberam via oral os derivados R-99 e R-123 na dose de 15 mg/kg. O grupo controle recebeu apenas o veículo (salina + DMSO 5%). Uma hora após o tratamento, a inflamação foi induzida por uma injeção i.pl. de 50 µL de serotonina (100 µg) na pata posterior direita. Um volume igual de salina (NaCl 0,9%) foi injetado na pata contralateral. O volume da pata foi medido antes da indução do agente flogístico e em 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração da serotonina.

O volume do edema, em mililitros (mL), foi registrado através de um pletismômetro (Ugo Basile, Itália), como descrito anteriormente.

6.2.8. Pleurisia induzida por carragenina

Os animais foram pré-tratados por via oral com os derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 (15 mg/kg), dexametasona (0,5 mg/kg) ou veículo (salina

+ DMSO 5%). Após uma hora, os animais foram anestesiados com uma solução associada cetamina e xilazina (2:1; v/v). A pleurisia foi induzida pela injeção intrapleural de 0,1 mL de carragenina (1%) (FRODE; MEDEIROS, 2001). Após 4 h os animais foram sacrificados, o tórax aberto e a cavidade pleural foi lavada com 1,0 mL de uma solução tampão fosfato estéril contendo heparina (20 UI/mL). A contagem total de leucócitos foi feita em analisador hematológico ABX micros 60.

6.3. Atividade antinociceptiva

Para a avaliação da atividade antinociceptiva dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123, os animais foram submetidos a estímulo químico, para a realização do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, e estímulo mecânico para a execução do teste de alodinia mecânica induzida por carragenina.

6.3.1. Nocicepção induzida por ácido acético

Neste ensaio os animais receberam tratamento por via oral com os derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 na dose de 15 mg/kg, ibuprofeno na dose de 10 mg/kg (substância padrão) e o veículo (salina + DMSO 5%). Após uma hora, o ácido acético 1% foi injetado (0,1 mL/10g do peso do animal) na cavidade peritoneal dos animais para induzir contrações da musculatura abdominal e/ou alongamento dos membros posteriores. Dez minutos após a aplicação do ácido os camundongos foram colocados em gaiolas de polietileno transparentes, onde foram observados e registrou-se o número de contorções abdominais durante 20 minutos. A porcentagem de inibição das contorções abdominais foi calculada comparando a média de contorções do grupo tratado com o a média do grupo controle (KOSTER, 1959; GUERRA et al., 2011).

6.3.2. Alodinia mecânica induzida por carragenina

A alodinia mecânica foi avaliada através do teste de pressão crescente na pata, conhecido como método von Frey eletrônico (MÖLLER et al., 1998). Os camundongos foram colocados sobre uma plataforma com fundo de tela de arame durante 30 minutos para a aclimatização, sendo a reatividade basal ou a alodinia mecânica avaliadas pelo

contato da pata traseira com o analgesímetro digital von Frey (CUNHA et al., 2004). Deve-se aplicar, por entre as malhas da tela, uma força linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo até que o animal produza uma resposta de retirada e “sacudida” da pata estimulada. Os estímulos são repetidos até seis vezes, em geral até que o animal apresente três medidas similares com uma nítida resposta de “sacudida” após a retirada da pata (GRAVA et al., 2010).

Para a avaliação da medida do limiar nociceptivo, os camundongos foram tratados via oral com os derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 na dose de 15 mg/kg, indometacina 10 mg/kg e com o veículo (salina + DMSO 5%). Uma hora depois, os animais receberam na pata direita, 50 µL de carragenina (1%). A medição da alodinia ocorreu em intervalos de 60 minutos até a 5ª hora (QUINTÃO et al., 2012).

6.4. Variáveis Analisadas

Neste estudo, foi analisada a migração de leucócitos nos testes de bolsão de ar e de pleurisia induzida por carragenina, e a produção de NO no teste de bolsão de ar. Nos testes de edema de pata induzido por vários agentes flogísticos foram analisadas as diferenças do volume da pata inflamada com a pata contra-lateral. Nos testes de atividade antinociceptiva, os animais foram submetidos a estímulos químicos e mecânicos no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético e no teste de alodinia mecânica induzida por carragenina, respectivamente.

6.5. Análise dos Dados

Os experimentos de edema de pata induzido por vários agentes flogísticos, e de alodinia mecânica induzida por carragenina foram estatisticamente avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) por duas vias seguido pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de 95%, utilizando-se o software Graph Pad prism. 5.0. Valores de “p” menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância.

Os demais experimentos e a mensuração da concentração de NO foram estatisticamente avaliados através da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls com intervalo de confiança de 99%, utilizando-se

o software Graph Pad prism. 5.0. Valores de “p” menores que 0,01 ($p < 0,01$) foram considerados como indicativos de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Método do Bolsão de Ar Subcutâneo.

Os resultados da atividade anti-inflamatória para este teste encontram-se na tabela 2. Todos os compostos apresentaram atividade anti-inflamatória indicada por uma diminuição significativa na migração celular quando comparados ao controle. As doses testadas de 3,0 e 30 mg/kg apresentaram-se estatisticamente semelhantes ao fármaco padrão, a Indometacina.

Tabela 2: Total de leucócitos polimorfonucleares (média \pm desvio padrão) e percentual de inibição da inflamação dos grupos controle e tratados com os derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 no teste de bolsão de ar subcutâneo.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Nº de leucócitos/mL ($\times 10^6$)	Inibição %
Controle	-	13,64 \pm 0,50	-
R-99	0,3	9,54 \pm 0,98*	30,1
	3,0	8,02 \pm 0,95*	41,2
	30	4,52 \pm 1,24*	65,7
R-123	0,3	10,38 \pm 2,53*	23,9
	3,0	7,46 \pm 1,71*	45,3
	30	7,14 \pm 0,61*	45,8
Indometacina	10	4,84 \pm 0,45*	63,3

*p < 0,01. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle.

O modelo experimental de bolsão de ar é um importante teste para estudar a inflamação aguda. A administração de carragenina por via subcutânea, na bolsa de ar, induz uma rápida resposta inflamatória caracterizada pelos altos níveis de prostaglandinas e leucotrienos no exsudato presente. A carragenina é amplamente utilizada por induzir a migração de neutrófilos e por ter uma intensa ação quimiotática, desencadeando uma inflamação aguda associada à hiperalgesia envolvendo liberação sequencial de vários mediadores inflamatórios, como por exemplo, histamina,

serotonina, cininas, prostaglandinas e tromboxanos (SCOGNAMILLO-SZABÓ, BECHARA; CUNHA, 2005, ROCHA et al., 2007).

Esse protocolo experimental tem sido usado por assemelhar-se histologicamente com a membrana da cavidade sinovial e quando induzida a inflamação por uma injeção de carragenina a reação é semelhante à observada em uma inflamação sinovial crônica, a artrite reumatoide (SEDGWICK; LEES, 1986). Pelo fato das substâncias testadas neste trabalho terem apresentado resultados promissores no teste do bolsão de ar, acredita-se que estes compostos podem ser potenciais candidatos a fármacos antiartríticos.

Para a realização de testes posteriores foi escolhida a dose de 15 mg/kg por ser intermediária e ter apresentado uma melhor uniformidade e reprodutibilidade nos resultados. Essa dose foi escolhida baseada em testes realizados anteriormente.

7.1.1. Determinação dos níveis de óxido nítrico

Os grupos tratados com R-99 e R-123 reduziram significativamente os níveis de NO em todas as doses testadas quando comparadas com o grupo controle (Figura 10).

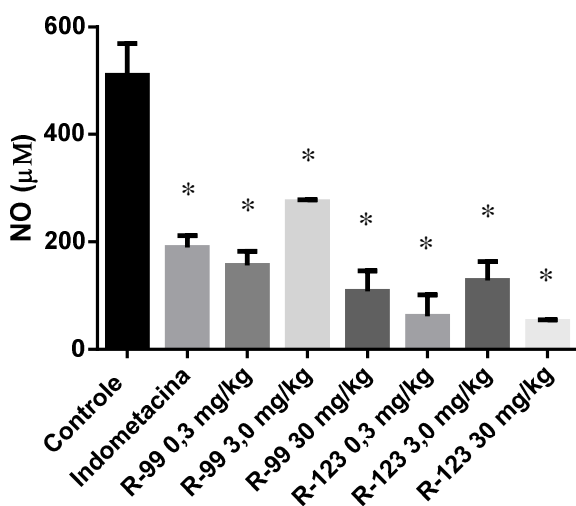


Figura 10: Concentração de NO dos grupos R-99 e R-123 em exsudato no teste de bolsão de ar. * $p < 0,01$. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle.

A formação do óxido nítrico foi verificada através da dosagem dos produtos de oxidação estáveis do seu metabolismo (nitritos). No processo inflamatório o NO é

produzido principalmente pela iNOS, que é induzida por vários mecanismos relacionados com as citocinas inflamatórias (IFN- γ , IL-1 e TNF- α), e está relacionado com a vasodilatação que ocorre nas fases iniciais do processo. É encontrada em macrófagos, neutrófilos e plaquetas (VANNI et al., 2007).

Na literatura derivados de isoxazolina representam uma importante classe de agentes anti-inflamatórios (HABEEB et al., 2001). Estudos realizados por Basappa et al. (2004) e Park et al. (2006) demonstraram que esses derivados podem ser potentes inibidores da fosfolipase A2 (PLA2) apresentando uma boa resposta inibitória da enzima tanto *in vitro* como no modelo de edema de pata. Habeeb e colaboradores demonstraram que os seus derivados exibiram uma potente e seletiva atividade inibidora da COX-2 e excelente atividade analgésica.

Moléculas com a função acilhidrazona são amplamente concebidas e estudadas como novos candidatos a fármacos anti-inflamatórios e analgésicos (CUNHA et al., 2002; SILVA et al., 2010; ÜNSAL-TAN et al., 2010). Estudos realizados por Hernández et al. (2012) demonstraram que derivados acilhidrazônicos inibem a produção de NF κ B e IL-8, *in vitro*, e LOX, COX-1, COX-2 e IL-8, em ensaios *in vivo*, apresentando também atividade antinociceptiva.

Portanto, para dar prosseguimento a pesquisa, e verificar como agem os compostos testados por nosso grupo, realizamos o modelo experimental de edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos.

7.2. Edema de pata induzido por carragenina

Os animais que receberam injeção intraplantar de carragenina tiveram indução de edema, verificado pelo aumento no volume das patas que receberam o estímulo em diferentes intervalos de tempo. O grupo de animais pré-tratados apenas com veículo (salina + DMSO 5%) apresentou edema significativamente maior quando comparado com os grupos tratados com os compostos isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 ou indometacina nos tempos correspondentes. O composto R-99 foi capaz de diminuir o edema causado pela carragenina, em todos os tempos observados, enquanto o R-123 não apresentou diferença significativa em comparação ao grupo controle (Figura 11).

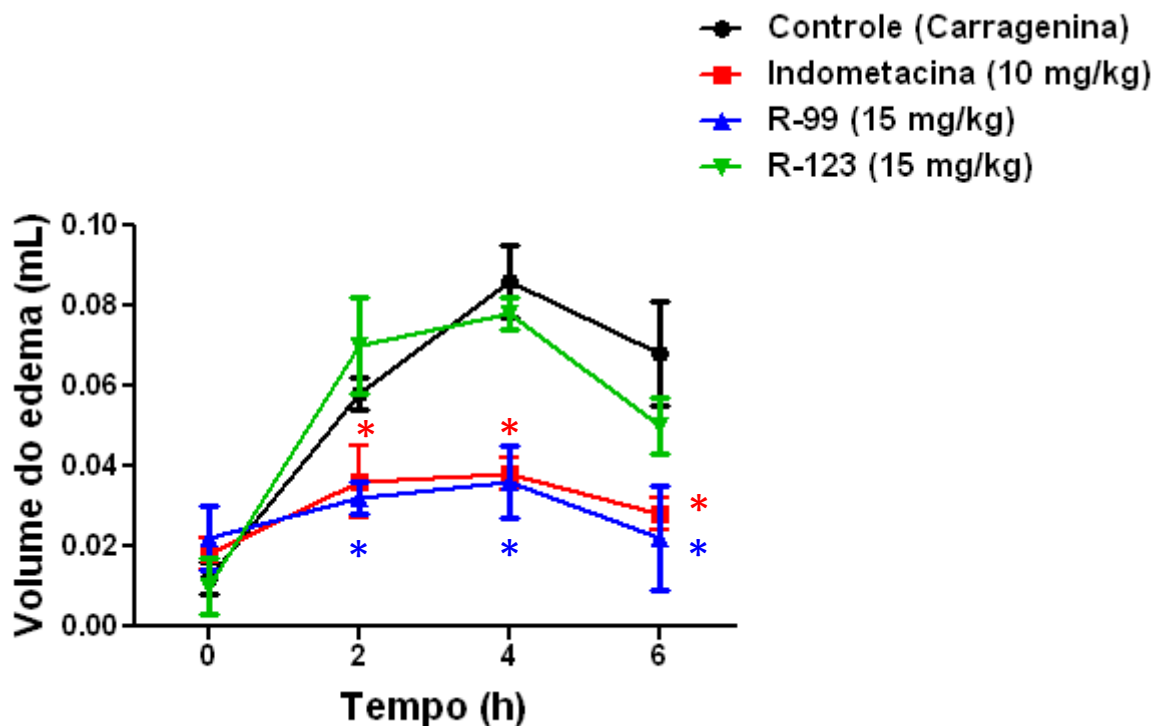


Figura 11. Efeito dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 (15 mg/kg, v.o.) e indometacina (10 mg/kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto representa média E.P.M. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$. Significativos após análise de variância (ANOVA) por duas vias seguido pelo teste de Bonferroni quando comparados ao grupo controle.

Neste modelo de edema de pata realizado em camundongos o derivado isoxazolina-acilhidrazona R-99 reduziu de maneira significativa o volume do edema apresentando uma inibição estatisticamente similar à indometacina, enquanto que o derivado R-123 não apresentou redução do volume da pata edemaciada.

O edema de pata induzido por carragenina em ratos está associado com a produção de diferentes mediadores inflamatórios, incluindo histamina, serotonina, bradicinina, óxido nítrico e prostaglandinas, cuja liberação é intimamente associada com a migração de leucócitos para o sítio inflamatório (FRANÇA et al., 2001; HAJARE et al., 2001). É caracterizado pela liberação sequencial de mediadores inflamatórios: nos primeiros 90 minutos ocorrem a liberação concomitante de histamina e serotonina (responsáveis pela vasodilatação e aumento da permeabilidade); a segunda fase, que se estende até aproximadamente 150 minutos é desencadeada por cininas (induzindo um aumento na permeabilidade dos vasos sanguíneos); enquanto na terceira fase que começa a partir de 150 minutos, ocorre a liberação de PGs com um pico máximo na terceira hora (ocorrendo infiltração maciça de leucócitos polimorfonucleares) (DI ROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971; POSADAS et al., 2004).

O edema de pata induzido por carragenina em camundongos, embora menos sensível, também responde a este agente flogístico. Estudos demonstraram que o extravasamento de albumina nos camundongos continua por mais de 24h após o estímulo. O edema de pata induzido por carragenina em camundongos é desenvolvido em duas fases características: a 1ª fase (0 – 24 h), e a 2ª fase (após 24 h). Durante a 1ª fase os neutrófilos são as células predominantes, e elas são potencialmente capazes de liberar agentes inflamatórios como a histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas (HENRIQUES et al., 1987). O processo de inibição do edema envolve mecanismo relacionado com a síntese de PGs, sendo comparável a ação exercida pelos AINEs, onde a via da COX é inibida impedindo a formação de PGs. O fármaco padrão de referência para nosso modelo experimental foi a indometacina (BOTTING, 2006).

7.3. Permeabilidade Vascular Induzida por Ácido Acético

Com o intuito de avaliar a participação de aminas vasoativas na resposta anti-inflamatória dos derivados foi feito o teste de permeabilidade vascular. Os compostos isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 produziram uma significativa inibição da permeabilidade vascular induzida por ácido acético em relação ao grupo controle. Os derivados não apresentaram diferença significativa entre si, apresentando inibição da permeabilidade similar da indometacina (Figura 12).

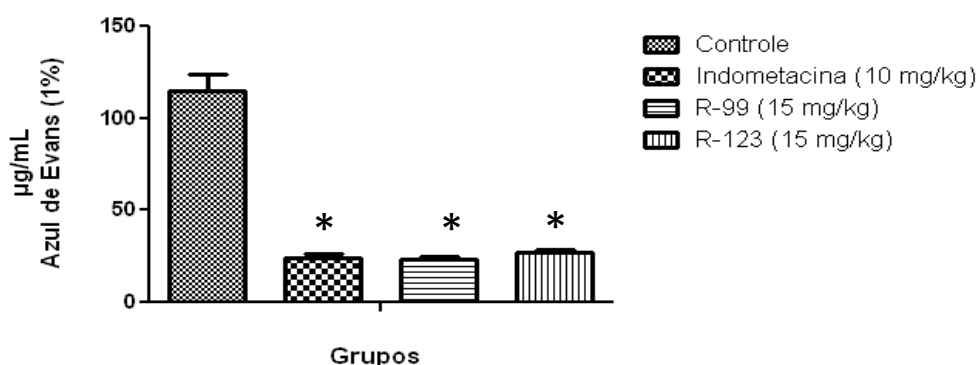


Figura 12: Efeito dos compostos isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 no teste da permeabilidade vascular induzida por ácido acético. * $p < 0,01$. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle.

Com a finalidade de avaliar a ação dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas na liberação de aminas vasoativas (histamina, bradicinina, serotonina) e formação de edema, utilizou-se o teste de permeabilidade vascular induzida por ácido acético. Os derivados R-99 e R-123 produziram significativa inibição da permeabilidade vascular. Este efeito provavelmente envolve a diminuição na liberação de aminas vasoativas, com consequente redução do edema. A indometacina foi utilizada como fármaco padrão.

Para comprovar a ação desses derivados sobre a liberação de aminas vasoativas foram realizados modelos experimentais de edema de pata induzidos por dextrana, histamina e 5-HT.

7.4. Edema de pata induzido por dextrana, histamina e 5-HT

Os animais que receberam injeção intraplantar de dextrana na pata direita traseira tiveram indução de edema, verificado pelo aumento no volume das patas que receberam o estímulo em diferentes intervalos de tempo. O grupo de animais pré-tratados com veículo apresentou edema significativamente maior que os demais grupos tratados com os compostos R-99 e R-123 ou ciproheptadina. O R-99 foi capaz de diminuir o edema associado à injeção intraplantar de dextrana, em todos os tempos observados, porém o R-123 só apresentou inibição na terceira e quarta hora (Figura 13).

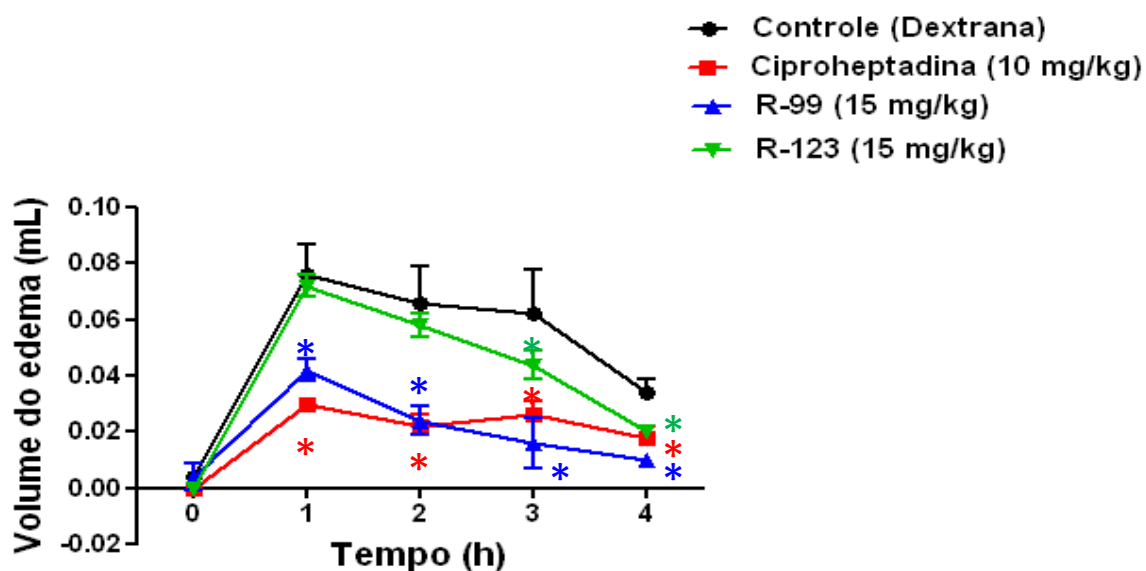


Figura 13. Efeito dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 (15 mg/kg, v.o.) e ciproheptadina (10 mg/kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por dextrana em camundongos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto representa média E.P.M. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$. Significativos após análise de variância (ANOVA) por duas vias seguido pelo teste de Bonferroni quando comparados ao grupo controle.

O edema de pata induzido por dextrana envolve a desgranulação de mastócitos, e consequentemente a liberação de histamina e serotonina, as quais contribuem para aumentar a permeabilidade vascular e o extravasamento de fluido (PARRAT et al., 1957; BASTOS et al., 2001). Os derivados R-99 e R-123 apresentaram inibição do edema de pata induzido por dextrana. Dessa forma é possível associar a atividade anti edematogênica da droga com a interferência na síntese/liberação ou bloqueio das ações da histamina e/ou 5-HT.

Com o objetivo de aprofundar esse estudo e verificar qual o mecanismo de ação, realizamos o edema de pata induzido diretamente por histamina e serotonina.

Os animais que receberam injeção intraplantar de histamina tiveram indução de edema, verificado pelo aumento no volume das patas que receberam o estímulo em diferentes intervalos de tempo. O grupo de animais pré-tratados com R-99 e R-123 na dose de 15 mg/kg tiveram diferença estatística nos quinze primeiros minutos quando comparado ao veículo (Salina + DMSO 5%), demonstrando que os compostos são efetivos em reduzir o edema de pata induzido por histamina (Figura 14).

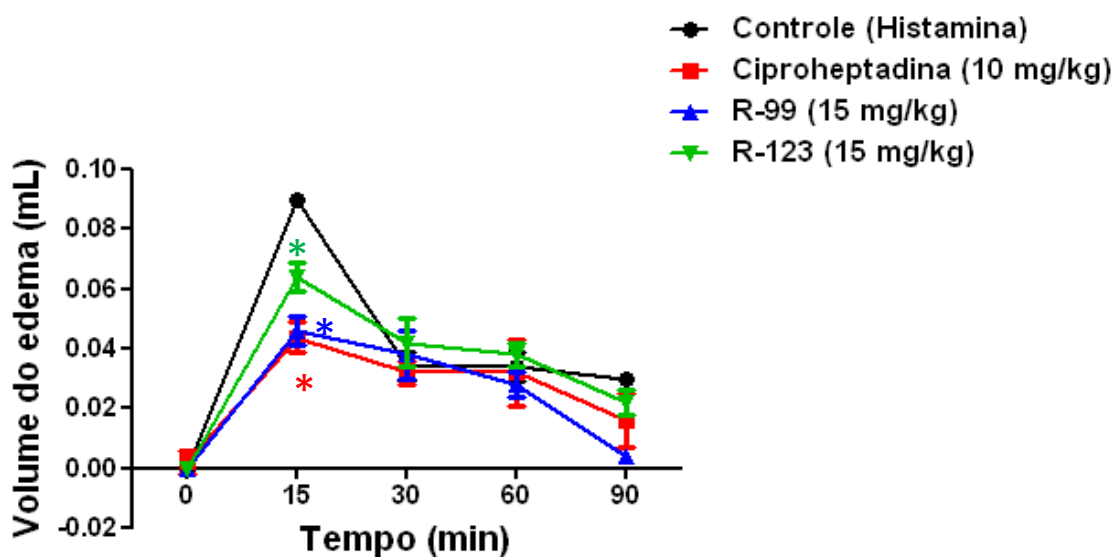


Figura 14. Efeito dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 (15 mg/kg, v.o.) e ciproheptadina (10 mg/kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por histamina em camundongos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto representa média E.P.M. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$. Significativos após análise de variância (ANOVA) por duas vias seguido pelo teste de Bonferroni quando comparados ao grupo controle.

Os animais que receberam injeção intraplantar de 5-HT tiveram indução de edema verificado pelo aumento no volume das patas que receberam o estímulo em diferentes intervalos de tempo. O composto R-123 conseguiu diminuir o volume do

edema em todos os tempos observados quando comparado ao veículo (salina + DMSO 5%) demonstrando assim que foi mais efetivo em reduzir o edema de pata induzido por 5-HT do que o composto R-99 que apenas inibiu o edema no tempo 30 min (Figura 15).

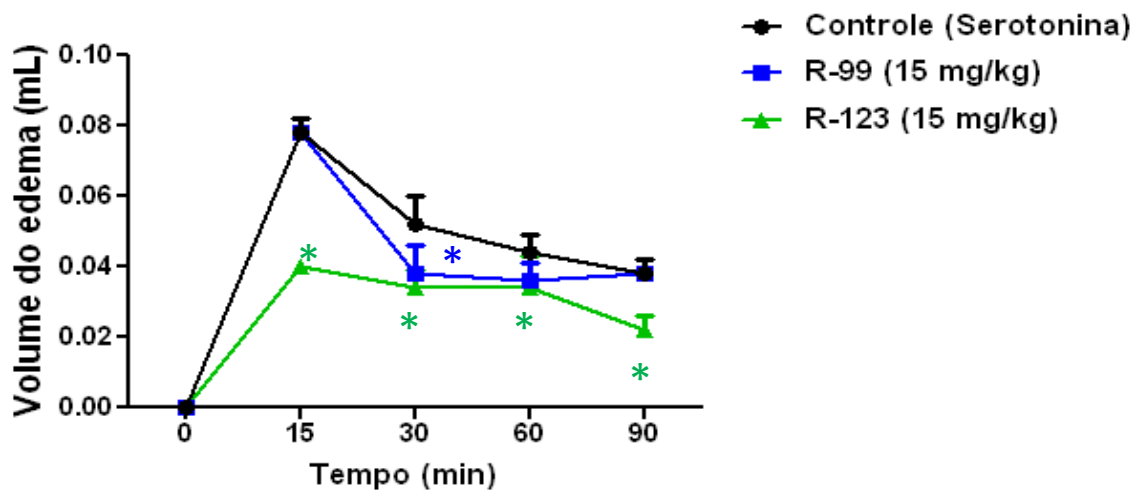


Figura 15. Efeito dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 (15 mg/kg, v.o.) sobre o edema de pata induzido por serotonina em camundongos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto representa média E.P.M. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$. Significativos após análise de variância (ANOVA) por duas vias seguido pelo teste de Bonferroni quando comparados ao grupo controle.

Essas substâncias desempenham importante papel na alteração do tônus e permeabilidade vascular, contribuindo para o extravasamento de fluídos. O derivado R-99 apresentou inibição no edema induzido por histamina, porém não reduziu o edema induzido por 5-HT, enquanto que o R-123 apresentou inibição do edema induzido por ambos os agentes. Cole et al. (1994) mostraram que drogas bloqueadoras dos receptores de 5-HT reduzem a formação de edema formado pela serotonina, e que este efeito é mais evidente com os bloqueadores específicos de receptores 5-HT₂.

7.5. Pleurisia induzida por carragenina.

Os resultados da atividade anti-inflamatória pelo teste da pleurisia induzida por carragenina encontram-se na tabela 3. Todos os compostos apresentaram atividade anti-inflamatória indicada por uma diminuição significativa na migração celular quando comparados ao grupo controle. Não há diferença significante entre os dois derivados isoxazolina-acilhidrazonas. Os compostos R-99 e R-123 na dose de 15 mg/kg

apresentaram inibição de 81,9 e 79,7 %, respectivamente, sobre a migração leucocitária na cavidade torácica.

Tabela 3: Total de leucócitos polimorfonucleares (média \pm desvio padrão) e percentual de inibição da inflamação dos grupos controle e tratados com os derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 no teste de pleurisia induzida por carragenina.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Nº de Leucócitos/mL (x10⁶)	Inibição %
Controle	-	11,42 \pm 1,12	-
R 99	15	2,06 \pm 0,11*	81,9
R 123	15	2,32 \pm 0,66*	79,7
Dexametasona	0,5	3,88 \pm 0,13*	66,0

*p < 0,01. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle.

A pleurisia está associada a uma acentuada reação inflamatória, nas vias respiratórias, semelhante ao que ocorre na asma humana (DALMARCO; FRODE, 2007). Estudos anteriores demonstraram que a pleurisia induzida por carragenina em ratos constitui um interessante modelo experimental, caracterizado por duas fases distintas: uma no início (4 h) caracterizada pela liberação de mediadores químicos como a histamina, bradicinina e prostaglandinas, e uma fase tardia (48 h), que envolve principalmente PAF e leucotrienos. Na primeira fase ocorre um aumento de leucócitos polimorfonucleares, da atividade da enzima mieloperoxidase, dos níveis dos metabólitos do óxido nítrico (nitrato e nitrito), exsudação em nível local e ainda há a participação de citocinas do tipo pró-inflamatórias (DALMARCO, FRODE, MEDEIROS, 2004; DA SILVA, FARGES, FRÖDE, 2004; KOO et al., 2006).

Portanto, os resultados do presente estudo sugerem que a atividade anti-inflamatória do composto R-99 está relacionada à capacidade de inibir a ação da histamina, e provavelmente das prostaglandinas, enquanto que o R-123 parece inibir processos inflamatórios suprimindo a ação e/ou liberação de aminas vasoativas. Apesar do derivado R-123 possuir atividade na inibição da migração leucocitária nos modelos de bolsão de ar e pleurisia, ele não apresentou atividade no edema de pata induzido por carragenina, a hipótese mais provável seria a inibição da via 5-LOX, conseqüentemente inibindo a produção de LTB₄, entretanto estudos sobre esta enzima serão realizados para confirmar esta hipótese.

7.6. Nociceção Induzida por Ácido Acético

Para avaliar o possível efeito antinociceptivo dos derivados R-99 e R-123 o modelo de contorções abdominais foi utilizado como triagem em várias doses, cuja finalidade foi comprovar o efeito antinociceptivo e definir a dose que apresenta a melhor resposta na inibição do número de contorções. Os resultados da atividade antinociceptiva dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas no teste de nociceção induzida por ácido acético estão demonstrados na tabela 4. As substâncias testadas, R-99 e R-123 nas doses de 7,5, 15, 30 e 60 mg/kg promoveram redução significativa no número de contorções abdominais em comparação ao grupo controle e nenhuma das doses apresentaram diferenças significativas em comparação ao fármaco padrão, ibuprofeno. Essa redução ao estímulo algíco do ácido acético demonstra que os derivados em estudo possuem atividade antinociceptiva frente a nociceção visceral.

A dose escolhida para a realização de testes posteriores foi a de 15 mg/kg, por ser uma dose intermediária e ter apresentado uma melhor uniformidade e reprodutibilidade nos resultados.

Tabela 4: Número de contorções abdominais (média \pm desvio padrão) e percentual de inibição dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 no teste de contorções abdominais induzido por ácido acético.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Contorções Abdominais (n ^o /20 min)	Inibição %
Controle	-	82,4 \pm 3,0	-
R-99	7,5	28,4 \pm 4,3*	65,5
	15	26,4 \pm 3,8*	68,0
	30	24,8 \pm 3,0*	69,9
	60	34,4 \pm 2,4*	58,3
R-123	7,5	22,6 \pm 2,8*	72,6
	15	25,2 \pm 4,9*	69,4
	30	35,4 \pm 4,0*	57,0
	60	34,8 \pm 3,9*	57,8
Ibuprofeno	10	27,4 \pm 1,1*	66,7

*p < 0,01. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle.

Neste modelo avalia-se a ação analgésica por dor neurogênica (periférica), central ou inflamatória, de maneira não específica. É um modelo sensível a substâncias analgésicas de ação central ou periférica dotada dos mais variados mecanismos de ação (SHAFIEE et al., 2003; CERVERO; LAIRD, 1999). O ácido acético causa a liberação de mediadores endógenos como PGE₂ e PGF₂α, histamina, bradicinina e serotonina, além de estimular as terminações nervosas diretamente pela redução do pH (FRANÇA et al., 2001, GUO et al., 2008). Contudo, a inibição ou redução do número de contorções abdominais em resposta ao ácido acético é obtida com uma variedade muito grande de substâncias, agindo de diferentes maneiras, como por exemplo: anti-inflamatórios não-esteróides, anticolinérgicos, narcóticos, anti-histamínicos bloqueadores de receptores H1 e H2 e anticonvulsivantes (STEPANOVIC-PETROVIC et al., 2008; ZANBOORI et al., 2008). Dessa forma, o teste é caracterizado pela baixa especificidade de resposta a um tipo específico de droga, além de sofrer influência de substâncias que comprometem a habilidade motora normal dos animais em teste.

7.7. Alodinia Mecânica Induzida por Carragenina

Objetivando verificar os efeitos dos nossos compostos frente à resposta hipernociceptiva de origem inflamatória, realizamos o modelo de alodinia mecânica induzida por carragenina. A injeção i.pl. de carragenina foi capaz de induzir alodinia mecânica na pata de camundongos, induzindo a hiperalgesia mecânica plantar de forma significativa. Observa-se que o tratamento dos animais com os derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123, quando administrados na dose de 15 mg/kg foi capaz de reduzir de maneira significativa a frequência de respostas ao estímulo mecânico, quando comparados com o grupo pré-tratado apenas com o veículo (salina + DMSO 5%). A indometacina também foi capaz de inibir a hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina (Figura 16).

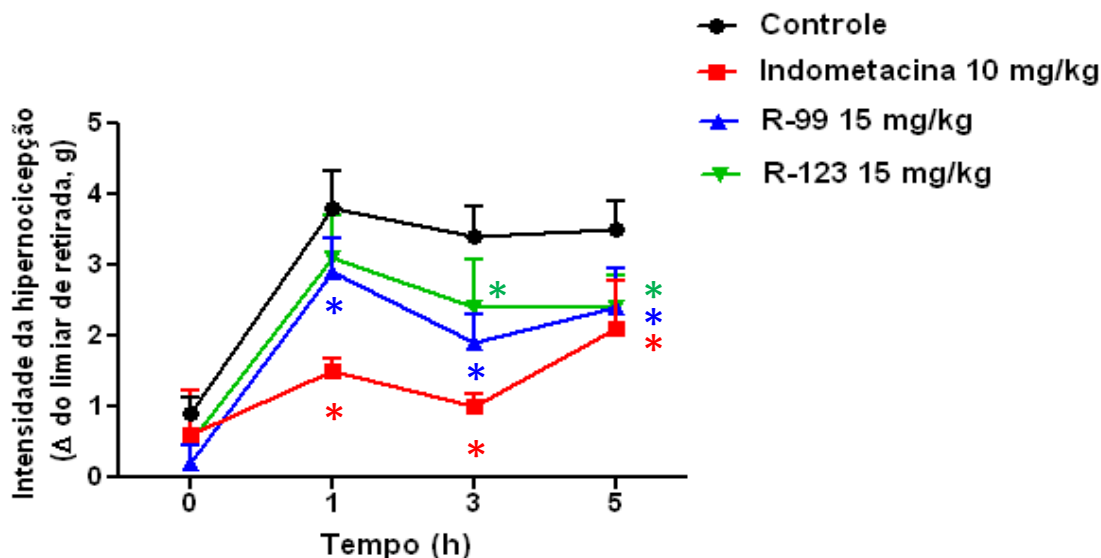


Figura 16. Efeito dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 (15 mg/kg, v.o.) e Indometacina (10 mg/kg, v.o.), sobre a hiperálgia mecânica plantar induzida por carragenina em camundongos. Os resultados representam a variação do limiar da retirada da pata em gramas (intensidade da hipernocicepção), onde cada ponto representa média E.P.M. de 5 animais por grupo. * $p < 0,05$. Significativos após análise de variância (ANOVA) por duas vias seguido pelo teste de Bonferroni quando comparados ao grupo controle.

Os efeitos apresentados pelos compostos testados, R-99 e R-123, frente a resposta hipernociceptiva foram significantes, demonstrando que possuem atividade modulando a resposta nociceptiva sobre as fibras A- δ e C. Essa atividade pode ser possível devido a inibição de mediadores químicos que atuam sobre esses receptores, como a histamina, serotonina, NO e prostaglandinas.

O método algométrico do von Frey eletrônico é utilizado para determinar parâmetros como limiar tátil e limiar mecânico nociceptivo (HARTRICK et al., 1997, STUBHAUG et al., 1997; PEDERSEN et al., 1998). Os modelos experimentais baseados em testes mecânicos permitem a avaliação do aumento da sensibilidade do nociceptor a estímulos inócuos (alodinia) ou nocivos (hiperalgesia).

Portanto, para a elucidação do mecanismo de ação nociceptivo dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas faz-se necessário a realização de testes que envolvam receptores de ação central e neurogênicos.

Em conjunto, os dados obtidos nos experimentos mostram que os compostos isoxazolina-acilhidrazonas testados apresentam propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas promissoras. A atividade anti-inflamatória foi evidenciada pela diminuição da migração celular em vários modelos experimentais, e sua atuação talvez se deva pela diminuição do NO, além da inibição da liberação de aminas vasoativas. O

efeito antinociceptivo apresentado pelos compostos parece envolver mecanismos periféricos e mecânicos, atuando na dor inflamatória.

CONCLUSÕES

8. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo podemos concluir que:

Isoxazolina-acilhidrazona R-99:

- ❑ O derivado isoxazolina-acilhidrazona R-99 apresentou atividade anti-inflamatória frente aos experimentos de bolsão de ar subcutâneo e pleurisia induzida por carragenina, com redução significativa da migração leucocitária;
- ❑ O derivado R-99, em todas as doses testadas, inibiu a produção de óxido nítrico;
- ❑ O derivado isoxazolina-acilhidrazona R-99 apresentou atividade antiedematogênica no modelo do edema de pata induzido por carragenina;
- ❑ O derivado em estudo inibiu significativamente a permeabilidade vascular induzida por ácido acético;
- ❑ O derivado R-99 apresentou inibição no edema induzido dextrana e histamina, sem apresentar atividade no modelo induzido por 5-HT, demonstrando que possui atividade inibitória sobre a ação/liberação de histamina;
- ❑ Os resultados nos testes de ácido acético e alodinia mecânica induzida por carragenina indicam que o composto R-99 possui atividade antinociceptiva;
- ❑ Os resultados nos testes de ácido acético e alodinia mecânica induzida por carragenina sugerem que o composto em estudo atua por mecanismos periféricos e mecânicos, atuando na dor inflamatória.

Isoxazolina-acilhidrazona R-123:

- ❑ O derivado isoxazolina-acilhidrazona R-123 apresentou atividade anti-inflamatória frente aos experimentos de bolsão de ar subcutâneo e pleurisia induzida por carragenina, com redução significativa da migração leucocitária;
- ❑ O derivado R-123, em todas as doses testadas, inibiu a produção de óxido nítrico;
- ❑ O derivado isoxazolina-acilhidrazona R-123 não apresentou redução do volume da pata edemaciada no modelo do edema de pata induzido por carragenina;
- ❑ O derivado em estudo inibiu significativamente a permeabilidade vascular induzida por ácido acético;
- ❑ O derivado R-123 inibiu significativamente a formação do edema nos modelos induzidos por dextrana, histamina e, principalmente, 5-HT, demonstrando atividade sobre essas aminas vasoativas;
- ❑ Os resultados nos testes de ácido acético e alodinia mecânica induzida por carragenina indicam que o composto R-123 possui atividade antinociceptiva;
- ❑ Os resultados nos testes de ácido acético e alodinia mecânica induzida por carragenina sugerem que o composto em estudo atua por mecanismos periféricos e mecânicos, atuando na dor inflamatória.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ALAM, A.; PAL, C.; GOYAL, M.; KUNDU, M. K.; KUMAR, R.; IQBAL, M. S.; DEY, S.; BINDU, S.; SARKAR, S.; PAL, U.; MAITI, N. C.; ADHIKARI, S.; BANDYOPADHYAY, U. Synthesis and bio-evaluation of human macrophage migration inhibitory factor inhibitor to develop anti-inflammatory agent. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 7365–7373. 2009.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**. v.1000, n. 1-2, p. 40-56. 2004.

ALMEIDA, F. R. C.; OLIVEIRA F. S. Avaliação de drogas analgésicas de ação central. In: **Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 179-188.

ALMEIDA, V. M. Síntese assimétrica de 3-carboxamidas enantiomericamente puras e de hidrazidas e aril-hidrazonas, derivadas do novo heterociclo 7-(benzoi)-2-isoxazolina[5,4-b] pirrolidina. Avaliação das atividades biológicas". Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2008.

ALONZI, T.; FATTORI, E.; LAZZARO, D.; COSTA, P.; PROBERT, L.; KOLLIAS, G.; DE BENEDETTI, F.; POLI, V.; CILIBERTO, G. Interleukin-6 is required for the development of collagen-induced arthritis. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 187, p.461-468. 1998.

AMARAL, E. T.; MONTANARI, C. A.; Química Medicinal: 25 Anos De Planejamento Racional De Farmacos. **Química Nova**. v. 25, Supl. 1, p. 39-44. 2002.

ANTONIALLI, C. S. Avaliação do efeito do ácido mirsinóico b em diferentes modelos de hipernocicepção inflamatória e neuropática persistentes em camundongos. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmaceuticas) Universidade do vale do Itajaí, Santa Catarina. 2009.

ARYA, S.; KUMAR, V. L. Antiinflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. **Mediators of Inflammation**.v.2005, n. 4, p. 228-232. 2005.

AVILA, C. M.; LOPES, A. B.; GONÇALVES, A. S.; DA SILVA, L. L.; ROMEIRO, N. C.; MIRANDA, A. L.; SANT'ANNA, C. M.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. Structure-based design and biological profile of (E)-N-(4-Nitrobenzylidene)-2-naphthohydrazide, a novel small molecule inhibitor of I κ B kinase- β . **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 46, p. 1245-1253. 2010.

ATAY, S.; TARNAWSKI, A. S.; DUBOIS, A. Eicosanoids and the stomach. **Prostaglandins Other Lipid Mediator**. v. 61, p. 105-124. 2000.

BANERJEE, M.; SAXENA, M. Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: Role in Type 2 Diabetes. **Clinica Chimica Acta** v. 413, p. 1163–1170. 2012.

BARNES, P. J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. **Clinical Science**, v. 94, p. 557-572. 1998.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; MIRANDA RODRIGUES A. L. P. C. R. A química medicinal de N-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, anti-inflamatórios e anti-trombóticos. **Química Nova**. v. 25, p. 129-148. 2002.

BASAPPA; SADASHIVA, M. P.; MANTELINGU, K.; SWAMY, S. N.; RANGAPPA, K. S. Solution-Phase Synthesis of Novel Δ^2 -Isoxazoline Libraries via 1,3-Dipolar Cycloaddition and Their Antifungal Properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 4539–4544. 2003.

BASAPPA; KUMAR, M. S.; SWAMY, S. N.; MAHENDRA, M.; PRASAD, J. S.; VISWANATH, B. S.; RANGAPPA, K. S. Novel δ^2 -isoxazolines as group II phospholipase A2 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v. 14, p. 3679–3681. 2004.

BASBAUM, A. I.; JESSEL, T. M. The perception of pain. In: Kandel, E. R.; Schwartz, J. H.; **Jessel, T. M. Principles of neural science**. New York: McGraw Hill; 2000. p. 472-91.

BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. Toward better pain control. **Scientific American**. v. 294, n.6, p. 60-67. 2006.

BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C. T.; SOUZA, G. H. B.; PEDRAZZI, A. H. P.; SARTI, S. J. Anti-inflammatory activity of cubebin, a lignan from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo* Griseb. **Journal of Ethnopharmacology**, v.75, p. 279–282. 2001.

BENINCÁ, J. P.; MONTANHER, A. B.; ZUCOLOTTO, S. M.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. **Food Chemistry**. v. 104, n. 3, p. 1097-1105. 2007.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**. v. 8, n. 353 (9164), p. 1610-1615. 1999.

BILATE, A. M. B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas de reumatologia clínica**, v. 8, n. 2, p. 47-50. 2007.

BLOT, W. J.; McLAUGHLIN, J. K. Over the counter non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of gastrointestinal bleeding. **Journal of Epidemiology and Biostatistics**, v. 5, n. 2, p. 137-142. 2000.

BOCHSLER, P. N.; SLAUSON, D. O. Inflammation and repair of tissue. In: SLAUSON, D. O.; COOPER, B. J. **Mechanisms of disease: a textbook of comparative pathology**. 3. ed. St Louis: Mosby, 2002. p. 140-245.

BOTTING, R. M. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927–2004). **Journal of Thermal Biology**, v. 31, p. 208-219. 2006.

BRENOL, J. C. T.; XAVIER, R. M.; MARASCA, J. Antiinflamatórios não hormonais convencionais. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 57. 2000.

CAMUSSI, G.; ALBANO, E.; TETTA, C.; BUSSOLINO, F. The molecular action of tumor necrosis factor- α . **European Journal Biochemistry**. v. 202, n. 1, p. 3-14. 1991.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos Centrais de Transmissão e de Modulação da Dor. Atualização Terapêutica. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 48, n. 3, p. 221- 241. 1998.

CARVALHO, S. A.; FEITOSA, L. O.; SOARES, M.; COSTA, T. E.; HENRIQUES, M. G.; SALOMÃO, K.; DE CASTRO, S. L.; KAISER, M.; BRUN, R.; WARDELL, J. L.; WARDELL, S. M.; TROSSINI, G. H.; ANDRICOPULO, A. D.; DA SILVA, E. F.; FRAGA, C. A. Design and synthesis of new (E)-cinnamic N-acylhydrazones as potent antitrypanosomal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 54, p. 512-521. 2012.

CELOTTI, F.; LAUFER S. Antiinflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept. **Pharmacological Research**. v. 43, p. 429-436, 2001.

CERVERO, F.; LAIRD, J.M. Visceral pain. **Lancet**. v.19, n. 353, p. 2145-2148. 1999.

CHENG, H. Y.; PITCHER, G. M.; LAVIOLETTE, S. R.; WHISHAW, I. Q.; TONG, K. I.; KOCKERITZ, L. K.; WADA, T.; JOZA, N. A.; CRACKOWER, M.; GONCALVES, J.; SAROSI, I.; WOODGET, J. R.; OLIVEIRA DOS – SANTO, A. J.; IKURA, M.; VAN DER KOOY, D.; SALTER, M. W.; PENNINGER, J. M. DREAM is a critical transcriptional repressor for pain modulation. **Cell**. v. 108, n. 1, p. 31-43. 2002.

CHIU, Y.; HUANG, T.; CHIU, C.; LU, T.; CHEN, Y.; PENG, W.; CHEN, C. Analgesic and Antiinflammatory Activities of the Aqueous Extract from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Both In Vitro and In Vivo. **Evidenc-Based Complementary Alternative Medicine**. 2012, p.1-11. 2011.

CHROUSOS, G. P.; MARGIORIS, A. N. Adrenocorticosteroides e antagonistas córticosuprarrenais. In: Katzung, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001, p.574-589.

CLARK A. R. Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 275, n. 1-2, p. 79-97. 2007.

CLOUGH, G. Experimental models of skin inflammation. **Clinical and Experimental Allergy**. v.29, Sup. 3, p 105-108. 1999.

COLE, H. W.; BROWN, C. E.; MAGEE, D. E.; MAGEE, C.; ROUDEBUSH, R. E.; BRYANT, H. U. Serotonin-induced paw edema in the rat: pharmacological profile. **General Pharmacology**. v. 26, n. 2, p 431-436. 1995.

CORUZZI, G.; VENTURI, N.; SPAGGIARI, S. Gastrointestinal safety of novel nonsteroidal antiinflammatory drugs: selective COX-2 inhibitors and beyond. **Acta Biomedica**, v, 78, n. 2, p. 96-110. 2007.

COSTA, C. H.; RUFINO, R.; SILVA, J. R. L. Células inflamatórias e seus mediadores na patogênese da DPOC. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 55, n. 3, p. 347-54. 2009.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. T. Robbins & Cotran, **Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

CUI, Z.; LI, Y.; LING, Y.; HUANG, J.; CUI, J.; WANG, R.; YANG, X. New class of potent antitumor acylhydrazone derivatives containing furan. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 45, p. 5576-5584. 2010.

CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**. v. 107, n. 3, p. 660-664. 1992.

CUNHA, J. M.; CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. **British Journal of Pharmacology**. v. 130, n. 7, p. 1418-1424. 2000.

CUNHA, A. C.; TRIBUTINO, J. L.; MIRANDA, A. L.; FRAGA, C. A.; BARREIRO, E. J. Synthesis and pharmacological evaluation of novel antinociceptive Nsubstituted-phenylimidazolyl-4-acylhydrazone derivatives. **IL Farmaco** v. 57, p. 999-1007. 2002.

CUNHA, T. M.; VERRI, J. R. W. A.; VIVANCOS, G. G.; MOREIRA, I. F.; REIS, S.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**. v. 37, p. 401-407. 2004.

CUNHA, T.; VERRI, W. A.; SILVA, J. S.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 102, n. 5, p. 1755-60. 2005.

CUNHA, T.; VERRI, W. TNF-alpha and IL-1beta mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by B1 but not B2 kinin receptor. **European Journal of Pharmacology**. v. 573, n. 1-3, p. 221-229. 2007.

D'AMOUR, F. E.; SMITH, D. L. A method for determining loss of pain sensation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 72 n. 1, p. 74-79. 1941.

DALLANOCE, C.; FRIGERIO, F.; GRAZIOSO, G.; MATERA, C.; VISCONTI, G. L.; DE AMICI, M.; PUCCI, L.; PISTILLO, F.; FUCILE, S.; GOTTI, S.; CLEMENTI, F.; DE MICHELI, C. New spirocyclic Δ^2 -isoxazoline derivatives related to selective agonists of $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 5790-5799. 2011.

DALMARCO, E. M.; FRÖDE, T. S.; MEDEIROS, Y. S.. Additional evidence of acute anti-inflammatory effects of cyclosporin A in a murine model of pleurisy. **Transplant Immunology**, v. 12, p. 151-157. 2004.

DALMARCO, E. M.; FRODE, T.S. In vivo effects of cyclosporin A on expression of adhesion molecules in tissues in mice. **Frontiers of Medical & Biological Engineering**. v. 9, p. 111-123. 2007.

DA SILVA, M. J.; DE SALES, M. F. O gênero *Phyllanthus* L. (Phyllanthaceae - Euphorbiaceae Juss.) no bioma Caatinga do estado de Pernambuco – Brasil. **Rodriguésia** v. 55, n. 84, p. 101-126. 2004.

DAVIES, P.; BAILEY, P. J.; GOLDENBERG, M. M.; FORD-HUTCHINSON, A. W. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. **Annual Review of Immunology**. v. 2, p. 335-337. 1984.

DENZLINGER, C.; RAPP, S.; HAGMANN, W.; KEPPLER, D. Leukotrienes as mediators intissue trauma. **Science**. v.230, p.330-332. 1985.

DESPOPOULOS, A.; SILBERNAGL, S. **Color Atlas of Physiology**. 5 ed. Stuttgart: Thieme, 2000, p. 318.

DEVOR , M. Sodium channels and mechanisms of neuropathic pain. **Journal of Pain**. v. 7, Suppl 1, p. S3-S12. 2006.

DICKENSON, A. H.; MATTHEWS, E. A.; SUZUKI, R. Neurobiology of neuropathic pain: mode of action of anticonvulsants. **European Journal of Pain**. v. 6, p. 51-60. 2002.

DINARELLO, C. A.; CANNON, J. G.; MANCILLA, J.; BISHAI, I.; LEES, J.; COCEANI, F. Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E2

in brain but not in peripheral blood mononuclear cells. **Brain Research**, v. 562, n. 2, p. 199-206. 1991.

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

DRAY, A.; URBAN, L.; DICKENSON, A. Pharmacology of chronic pain. **Trends in Pharmacological Sciences**. v.15, p. 190-197. 1994.

DUNCAN, A. J.; HEALES, S. J. R. Nitric oxide and neurological disorders. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 26, p. 67-96. 2005.

DUPLANTIER, A. J.; BECKIUS, G. E.; CHAMBERS, R. J.; CHUPAK, L. S.; JENKINSON, T. H.; KLEIN, A. S.; KRAUS, K. G.; KUDLACZ, E. M.; MCKECHNEY, M. W.; PETTERSSON, M. P.; WHITNEY, C. A.; MILICI, A. J. Isoxazolyl, Oxazolyl, and Thiazolylpropionic Acid Derivatives as Potent $\alpha\beta 1$ Integrin Antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v. 11, p. 2593–2596. 2001.

FABIOLA, G. F.; DAMODHARAN, L.; PATTABHI, V.; NAGARAJAN, K. Cyclooxygenase-2- An attractive target for fruitful drug design. **Current Science**, v. 80, n. 1. 2001.

FEIN, A. NOCICEPTORES: As células que sentem dor. PETROV, P.; FRANCISCHI, J. N.; FERREIRA, S. H. et al. tradutores. Ribeirão Preto – SP: Dor On Line; 2011. 106 p. Disponível em: <<http://www.dol.inf.br/nociceptores>>

FERREIRA S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine mediated inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**. v. 110, n. 3, p.1227–1231. 1993.

FIORUCCI, S.; MELI, R.; BUCCI, M.; CIRINO, G. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? **Biochemical Pharmacology**. v. 62, p. 1433-1438. 2001.

FRANÇA, D. S.; SOUZA, A. L.; ALMEIDA, K. R.; DOLABELLA, S. S.; MARTINELLI, C.; COELHO, M. M. B Vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**. v. 421, n. 3, p. 157-164. 2001.

FRANCISCHETTI, I.; MORENO, J. B.; SCHOLZ, M.; YOSHIDA, S. M. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperusão. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**. v. 25, n.4, p.575-584. 2010.

FRÖDE, T. S.; MEDEIROS, Y. S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators of Inflammation**. v. 10, n. 4, p. 223-227. 2001.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**. v. 15, n. 2, p. 129-141. 1999.

GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Research & Therapy**. v. 8, Suppl 2, p. S3. 2006.

GAONKAR, S.; RAÍ, K.; PRABHUSWAMY, E. Synthesis of novel 3-[5-ethyl-2-(2-phenoxy-ethyl)-pyridin]-5-substituted isoxazoline libraries via 1,3-dipolar cycloaddition and evaluation of antimicrobial activities. **Medicinal Chemistry Research**. v.15, p.407–417. 2007.

GAULDIE, J.; RICHARDS, C.; HARNISH, D.; LANSDORP, P.; BAUMANN, H. Interferon γ /B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 84, p. 7251-7255. 1987.

GARCIA-PASTOR, P.; RANDAZZO, A.; GOMEZ-PALOMA, L.; ALCARAZ, M. J.; PAYA, M. Effects of petrosaspongiolide M, a novel phospholipase A2 inhibitor, on acute and chronic inflammation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 289, p. 166–172. 1999.

GIUSTARINI, D.; ROSSI, R.; MILZANI, A.; DALLE-DONNE, I. Nitrite and Nitrate Measurement by Griess Reagent in Human Plasma: Evaluation of Interferences and Standardization. **Methods in Enzymology**. v. 440, p. 361-380. 2008.

GONZÁLEZ-PÉRIZ, A; CLÀRIA, J. New Approaches to the Modulation of the Cyclooxygenase-2 and 5-Lipoxygenase Pathways. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. v. 7, p. 297-309. 2007.

GORDON, E. M; BARRETT, R. W.; DOWER, W. J.; FODOR, S. P. A.; GALLOP, M.A. Applications of Combinatorial Technologies to Drug Discovery. 2. Combinatorial Organic Synthesis, Library Screening Strategies, and Future Directions. **Journal of medicinal chemistry**. v. 37, n. 10, p. 1385-1401. 1994.

GRAVA, A. L. S.; FERRARI, L. F.; PARADA, C. A.; DEFINO, H. L. A. Tratamento farmacológico da hiperalgesia experimentalmente induzida pelo núcleo pulposo. **Revista Brasileira de Ortopedia**. v. 45, n. 6 p. 569-576. 2010.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; SILVA, A. M.; PINTO, D. C.; SANTOS, C. M.; CAVALEIRO, J. A.; LIMA, J. L. Anti-inflammatory potential of 2-styrylchromones regarding their interference with arachidonic acid metabolic pathways. **Biochemical Pharmacology** v, 78, p. 171–177. 2009.

GUERRA, A. S. H. S.; MALTA, D. J.; LARANJEIRA, L. P.; MAIA, B. M.; COLAÇO, N. C.; LIMA, M. C.; SILVA, T. G. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indole-imidazolidine derivatives. **International Immunopharmacology**. v. 11, p. 1816-22. 2011.

GUO, L.; LI, J.; YE, H.; ZHENG, R.; HAO, X. J.; CHEN, W. Y.; JÜ, R.; YAO, Y. R.; YANG, H. F.; YU, X. L.; YE, C. Y.; ZHANG, D. C. Anti-inflammatory and analgesic potency of carboxyamidotriazole, a tumoristatic agent. **American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 325, p. 10-16. 2008.

HAAS, H. L.; SERGEEVA, O. A.; SELBACH, O. Histamine in the nervous system. **Physiological Reviews**. v. 88, p. 1183-241. 2008.

HABEEB, A. G.; PRAVEEN RAO, P. N.; KNAUS, E. E. Design and synthesis of 4, 5-Diphenyl-4-isoxazolines: Novel Inhibitors of cyclooxygenase-2 with analgesic and antiinflammatory activity. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 44, p. 2921-2927. 2001.

HAEGGSTRÖM, J. Z. Structure, Function, and Regulation of Leukotriene A4 Hydrolase. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 161, p. S25-S31. 2000.

HARTRICK, C. T.; WISE, J. J.; PATTERSON, J. S. Preemptive intrathecal ketamine delays mechanical hyperalgesia in the neurophatic rat. **Anesthesia and Analgesia**. v.86, suppl 1, p.557-560. 1997.

HAWORTH, O.; BUCKLEY, C. D. Resolving the problem of persistence in the switch from acute to chronic inflammation. **PNAS**, v. 104, n. 52, 20647-20648. 2007.

HENRIQUES, M. G.; SILVA, P. M.; MARTINS, M. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; ASSEREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R. S. Mouse paw edema. A new model for inflammation? **Brazilian Journal of medicine and Biological Research**. v. 20, n. 2, p. 243-249. 1987.

HERNÁNDEZ, P.; ROJAS, R.; GILMAN, R. H.; SAUVAIN, M.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H. Hybrid furoxanyl *N*-acylhydrazone derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 7, n. 59C, p. 64-74. 2012.

HIGGS, G. A.; VANE J. R. Inhibition of cyclo-oxygenase and lipoxygenase. *British Medical Bulletin*. v. 39, p. 265-270. 1983.

HOUGH, L. B.; NALWALK, J. W.; LEURS, R.; MENGE, W. M.; TIMMERMAN, H. Antinociceptive activity of derivatives of improgran and burimamide. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 65, p. 61-66. 2000.

HWANG, I. T.; KIM, H. R.; JEON, D. J.; HONG, K. S.; SONG, J. H.; CHO, K. Y. 5-(2,6-Difluorobenzyl)oxymethyl-5-methyl-3-(3-methylthiophen-2-yl)-1,2-isoxazoline as a Useful Rice Herbicide. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 8639-8643. 2005.

IASP - International Association for the Study of Pain. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**. v. 16, p. 109–110, 1983.

JANEWAY, J. R.; CHARLES, A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

JIN, Y.; TAN, Z.; HE, M.; TIAN, B.; TANG, S.; HEWLETT, I.; YANG, M. SAR and molecular mechanism study of novel acylhydrazone compounds targeting HIV-1 CA. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v. 18, p. 2135–2140. 2010.

JULÉMONT, F.; DOGNÉ, J. M.; PIROTTE, B.; DE LEVAL, X. Recent development in the field of dual COX / 5-LOX inhibitors. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. v. 4, p. 633-638. 2004.

KAMAL, A.; REDDY, J. S.; RAMAIAH, M. J.; DASTAGIRI, D.; BHARATHI E. V.; AZHAR, M. A.; SULTANA, F.; PUSHPAVALLI, S. N.; PAL-BHADRA, M.; JUVEKAR, A.; SEN, S.; ZINGDE, S. Design, synthesis and biological evaluation of 3,5-diaryl-isoxazoline/isoxazole-pyrrolobenzodiazepine conjugates as potential anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 45, p. 3924-3937. 2010.

KASSUYA, C. A. L. Atividade antiinflamatória e antinociceptiva de extratos e lignanas isolados de *Phyllanthus amarus*. Tese (Doutorado em Farmacologia) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2006.

KATZUNG, B.G. Histamina, Serotonina e Alcalóides do esporão de centeio. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia: básica e clínica**. 9ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 219-237. 2005.

KAY, A. B. Allergy and allergic diseases. First of two parts. **The New England Journal of Medicine**. v. 344, n. 1, p.30-37. 2001.

KELLY, M.; KWANG, J. M.; KUBES, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.120, p.3-10. 2007.

KHAZIR, J.; SINGH, P. P.; REDDY, D. M.; HYDER, I.; SHAFI, S.; SAWANT, S.D.; CHASHOO, G.; MAHAJAN, A.; ALAM, M.S.; SAXENA, A.K.; ARVINDA, S.; GUPTA, B.D.; KUMAR, H. M. S. Synthesis and anticancer activity of novel spiro-isoxazoline and spiro-isoxazolidine derivatives of α -santonin. **European Journal of Medicinal Chemistry**. Available online 2013.

KIM, J.Y.; HWANG, Y.P.; KIM, D.H.; HAN, E.H.; CHUNG, Y.C.; ROH, S.H.; JEONG, H.G. Inhibitory Effect of the Saponins Derived from Roots of *Platycodon grandiflorum* on Carrageenan-Induced Inflammation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, n. 4, p. 858–864, 2006.

KIRVESKARI, J.; HELINTO, M.; SAAREN-SEPPALA, H.; RENKONEN, R.; TERVO, T. Leukocyte rolling and extravasation in surgical inflammation after mechanical and laser-induced trauma in human patients. **Experimental Eye Research**, v. 77, n. 3, p. 387-390, setembro. 2003.

KOO, H.J.; LIM, K.H.; JUNG, H.J.; PARK, E.H.. Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 3, p. 496-500. 2006.

KONSMAN, J. P.; PARNET, P.; DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: Mechanisms and implications. **Trends in Neurosciences**, v. 25, p. 154–159. 2002.

KOSTER, R.; BEER, A. M. Acetic acid for analgesic screening. **Fed Proc**, v. 18, p. 412. 1959.

KRAYCHETE, D. Antiinflamatórios não-hormonais. In: SILVA, P. **Farmacologia**, 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 556. 2002.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 4, p. 498–512. 2002.

LAVICH, T. R.; CORDEIRO, R. S.; CALIXTO, J. B.; SILVA, P. M.; MARTINS, M. A. Combined action of vasoactive amines and bradykinin mediates allergen-evoked thermal hyperalgesia in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 462, n. 1-3, p.185-192, 2003.

LEE, J.; KIM, K. A.; JEONG, S.; LEE, S.; PARK, H. J.; KIM, N. J.; LIM, S. Anti-inflammatory, anti-nociceptive, and anti-psychiatric effects by the rhizomes of *Alpinia officinarum* on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.12, n. 126(2), p. 258-264. 2009.

LEVAL, X.; DELARGE, J.; SOMERS, F.; DE TULLIO, P.; HENROTIN, Y.; PIROTTE, B.; DOGNE, J. M. Recent advances in inducible cyclooxygenase (COX-2) inhibition. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 10, p. 1041-1062. 2000.

LEMAY, L. G.; VANDER, A. J.; KLUGER, M. J. Role of interleukin 6 in fever in rats. **American Journal of Physiology**, v. 258, n. 3, p. 798-R803. 1990.

LIMA, L. M.; FRATTANI, F. S.; DOS SANTOS, J. L.; CASTRO, H. C.; FRAGA, C. A.; ZINGALI, R. B.; BARREIRO, E. J. Synthesis and anti-platelet activity of novel arylsulfonate-acylhydrazone derivatives, designed as antithrombotic candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 43, p. 348e356. 2008.

LIMA, G. R. M.; MONTENEGRO, C. A.; ALMEIDA, C. L. F.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Database Survey of Anti-Inflammatory Plants in South America: A Review. **Internacional Journal of Molecular Sciences**. v.12, p. 2692-2749. 2011.

LO, T. N.; ALMEIDA, A. P.; BEAVEN, M. A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, v. 221, n. 1, p. 261-267. 1982.

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

MAHY, J. P.; GASPARD, S.; MANSUY, D. Phenylhydrazones as new good substrates for the dioxygenase and peroxydase reactions of prostaglandin synthase: formation of Iron (III)- π -phenyl complexes. **Biochemistry**. v. 32, p. 4014–4021. 1993.

MALTA, D. J. N. Avaliação do potencial anti-inflamatório e antinociceptivo de derivados tiazolidinônicos 3,5-dissubstituídos. Tese (Doutorado em Farmacologia) Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2011.

MARTEL-PELLETIER, J.; LAJEUNESSE, D.; REBOUL, P.; PELLETIER, J. P. Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Annals of the Rheumatic Diseases**. v. 62, p. 501–509. 2003.

MARTIN-FONTECHA, A.; THOMSEN, L. T.; BRETT, S.; GERARD, C.; LIPP, M.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for TH1 priming. **Nature Immunology**. v. 5, n. 12. 2004.

MASFERRER, J. L.; ZWEIFEL, B. S.; MANNING, P. T.; HAUSER, S. D.; LEAHY, K. M.; SMITH, W. G.; ISAKSON, P. C.; SEIBERT, K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 *in vivo* is antiinflammatory and nonulcerogenic. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 91, p. 3228-3232. 1994.

MCDONALD, D. M.; THURSTON, G.; BALUK, P. Endothelial gaps as sites for plasma leakage in inflammation. **Microcirculation**. v. 6, p. 7-22. 1999.

McNEIL, H. P. The mast cell and inflammation. **Australian & New Zealand Journal of Medicine**. v. 26, p. 216-225. 1996.

MELLER, S. T.; CUMMINGS, C. P.; TRAUB, R. J.; GEBHART, G. F. The role of nitric oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenan in the rat. **Neuroscience**. v.60, p. 367-374, 1994.

MELLER, S. T.; DYKSTRA, C.; GEBHART, G.F. Acute thermal hyperalgesia in the rat is produced by activation of N- methyl- D . aspartato receptors and protein kinase C and production of nitric oxide. **Neuroscience**. v.71, p. 327-335. 1996.

MELNYK, P.; LEROUX, V.; SERGHERAERT, C.; GRELLIER, P. Design, synthesis and in vitro antimalarial activity of an acylhydrazone library. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v. 16, p. 31–35. 2006.

MENDES, C. C. B. Síntese e avaliação das atividades antinociceptiva e antichagásica de hidrazonas e semicarbazona derivadas do novo heterociclo pirrolidina[1,2-d][1,2,4]-2-oxadiazolina. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2010.

MENEZES, G. B.; REZENDE, R. M.; AMARAL, S. S.; CASTRO, C. H. B. C.; CARA, D. C. Estudo da eficácia da associação entre dexametasona, piroxicam, cianocobalamina e orfenadrina (Rheumafim®) em modelos experimentais de inflamação em ratos. **Odontologia. Clínica Científica**. v. 8, n. 4, p. 319- 324. 2009.

MENSE, S. Basic neurobiology mechanisms of pain and analgesic. **American Journal of Medicine**. v.75, p. 4-14. 1983.

MEYER, R. A.; CAMPBELL, F. N.; RAJA, S. N. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: Wall P. D.; Melzack R. **Textbook of Pain**, 3 ed., p. 13-44. 1994.

MEYERS, C.; ALBITAR, M.; ESTEY, E. Cognitive impairment, fatigue, and cytokine levels in patients with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. **Cancer**. v. 104, n. 4, p. 788-793. 2005.

MISHRA, R. R. Studies on 5-(phenyloxymethyl)-2-thioxo- 1,3,4-oxadiazole derivatives. Tese (Doutorado em Química) SHRI JAGDISH PRASAD JHABARMAL TIBREWALA UNIVERSITY, Rajasthan, 2011.

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

MÖLLER, K. A.; JOHANSSON, B.; BERGE, O. G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 84, p. 41-47. 1998.

MONTEIRO, E. C. A.; TRINDADE, J. M. F.; DUARTE, L. B. P.; CHAHADE, W. H. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 9, n. 2, p. 53-63. 2008.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**. v. 420, n. 26, p. 846-852. 2002.

NEEDLEMAN, P.; TURK, J.; JAKSCHIK, B. A.; MORRISON, A. R.; LEFKOWITH, J. B. Arachidonic acid metabolism! **Annual Review of Biochemistry**. v. 55, p. 69-102. 1986.

OLIVEIRA, S. H. P.; CANETTI, C.; RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F. Q. Neutrophil migration induced by IL-1 β depends upon LTB₄ released by macrophages and upon TNF- α and IL-1 β released by mast cells. **Inflammation**. v. 31, n.1, p.36-46. 2008.

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, n. 4, p. 937-944. 2001.

PARK, K. K.; KO, D. H.; YOU, Z.; KHAN, M. O.; LEE, H. J. In vitro anti-inflammatory activities of new steroidal antedugs: [16 α ,17 α -d] Isoxazoline and [16 α ,17 α -d]-3'-hydroxy-iminoformyl isoxazoline derivatives of prednisolone and 9 α -fluoroprednisolone. **Steroids** v. 71, n. 3, p. 183-188. 2006.

PARRAT, J. R.; WEST, G. B. Inhibition by various substances of oedema formation in the hind-paw of the rat induced by 5-hydroxytryptamine, histamine, dextran, eggwhite and compound 48/80. **British Journal of Pharmacology**. v. 3, n.1, p 65-70. 1958.

PARSLOW, T. G. **Imunologia Médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

PEDERSEN, J. L.; GALLE, T. S.; KEHLET, H. Peripheral analgesic effects of ketamine in acute inflammatory pain. **Anesthesiology**. v.89, suppl 1, p. 58-66. 1998.

QUINTÃO, N. L. M.; ANTONIALLI, C. S.; SILVA, G. F.; ROCHA, L. W.; SOUZA, M. M.; MALHEIROS, A.; MEYRE-SILVA, C.; RUTH M. LUCINDA-SILVA, R. M.; BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. Aleurites moluccana and its main active ingredient, the flavonoid 2''-O-rhamnosylswertisin, have promising antinociceptive effects in experimental models of hypersensitivity in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 102, p. 302–311. 2012.

RAO T. S.; CURRIE J. L.; SHAFFER A. F.; ISAKSON P. C. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. **Mediators of Inflammation**. v. 2, n. 5, p. 357-362. 1993.

RAJAK, H.; KHARYA, M.D.; MISHRA, P. Synthesis of some oxadiazole and oxadiazoline analogues for their anti-inflammatory activity. **Yakugaku Zasshi**. v. 127, n. 10, p. 1757-1764. 2007.

RAJAKARIAR, R.; YAQOUB, M. M.; GILROY, D. W. COX-2 in Inflammation and Resolution. **Molecular Interventions**, v. 6, n. 4, p. 199-207. 2006.

RAJANARENDAR, E.; NAGI REDDY, M.; RAMA KRISHNA, S.; RAMA MURTHY, K.; REDDY, Y. N.; RAJAM, M. V. Design, synthesis, antimicrobial, anti-inflammatory and analgesic activity of novel isoxazolyl pyrimido[4,5-b]quinolines and isoxazolyl chromeno[2,3-d] pyrimidin-4-ones. **European Journal of Medicinal Chemistry** v.55, p. 273-283. 2012.

RAKESH R. SOMANI, R. R.; SHIRODKAR, P. Y. Oxadiazole: A biologically important heterocycle Rakesh R. Somani*a, Prabhakar Y. Shirodkarb. **Der Pharma Chemica**. v. 1, n. 1, p. 130-140. 2009.

RANG, H. P.; DALE, M. M. Rang And Dale Farmacologia. 7. ed. São Paulo: Elsevier, 2001, p. 202.

REIS, S. L. G. B.; ALMEIDA, V. M.; ALMEIDA, G. C.; BOAVIAGEM, J. M.; MENDES, C. C. D. B.; FARIA, A. R.; GÓES, A. J. S.; MAGALHÃES, L. R.; SILVA, T. G. Síntese e avaliação preliminar da atividade antinociceptiva de novas isoxazolil-aryl-hidrazonas. **Quimica Nova**, v. 34, n. 1, p.76-81. 2011.

RIBBONS, K. A.; CURRIE, M. G.; MANNING, P. T.; ALLEN, P. C.; DIDIER, P.; RATTERREE, M. S.; CLARK, D. A.; MILLER, M. J. The effect of inhibitors of inducible nitric oxide synthase on chronic colitis in the rhesus monkey. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 280, p. 1008-1115. 1997.

ROBBIE-RYAN, M.; BROWN, M. A. The role of mast cells in allergy and autoimmunity. **Current Opin in Immunology**. v. 14, p. 728-733. 2002.

ROBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, K. **Patologia estrutural e funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

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

ROSTOM, S. A.; SHALABY, M. A.; EL-DEMELLAWY, M. A. Polysubstituted pyrazoles, part 5. Synthesis of new 1-(4-chlorophenyl)-4-hydroxy-1H-pyrazole-3-carboxylic acid hydrazide analogs and some derived ring systems. A novel class of potential antitumor and anti-HCV agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 38, n. 11-12, p. 959-74. 2003.

RUSSO, C. M., BROSE, W. G. Chronic pain. **Annual Review Medicine**. v.49, p.1234-133. 1998.

SACCA, R.; CUFF, C. A.; RUDDLE, N. H. Mediators of inflammation. **Current Opin in Immunology**. v. 9, n. 6, p. 851-857. 1997.

SAGIN, F. G.; SOZMEN, E. Y.; ERSOZ, B.; MENTES, G. Link Between Monoamine Oxidase and Nitric Oxide. **NeuroToxicology**. v. 25, n. 1-2, p. 91-99. 2004.

SALEH, T. S. F.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, p. 811-819. 1996.

SANJITA, D.; DINAKAR, S.; SAUMYA, P. B. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of arbortristoxide-A. **Journal Ethnopharmacology**. v. 116, p. 198–203. 2008.

SAYERS, R. D. Aortic aneurysm, inflammatory pathway and nitric. **Annals of the Royal College of Surgeons of England**. v. 84, p. 239-246. 2002.

SCHESTATSKY, P. Definition, diagnosis and treatment of neuropathic pain. **HCPA**. v.28, n.3, p.177-187. 2008.

SCOGNAMILLO-SZABÓ, M. V. R.; BECHARA, G. H.; CUNHA, F. Q. Efeito inibitório da acupuntura sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos. **Ars Veterinária**. v. 21, n. 1, p. 91-95. 2005.

SCOTT, M.A.; STOCKHAM, S.L. Basophils and Mast Cells. In: FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G., JAIN, N.C. **Schalm's: Veterinary hematology**. 5. ed. Baltimore:Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 308-317.

SEDGWICK, A. D.; LEES, P. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. **Agents and Actions**. v. 18, p. 439-446. 1986.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N. Novel endogenous small molecules as the checkpoint controllers in inflammation and resolution: entrée for resoleomics. **Rheumatic Disease Clinics of North America**. v. 30, p. 69-95. 2004.

SHAFIEE, A.; BAGHERI, M.; SHEKARCHI, M.; ABDOLLAHI, M. The antinociceptive activities of 1-(4-aryl-2-thiazolyl)-3,5-disubstituted-2 pyrazolines in mouse writhing test. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 6, n. 3, p. 360-362. 2003.

SILVA, K. A. B. S. Caracterização dos efeitos do Plumierídeo, um iridóide isolado de *Allamanda cathartica* L. (Apocynaceae), em modelos de inflamação e dor. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Universidade Fedreal de Santa Catarina, Florianópolis. 2007.

SILVA, Y. K.; AUGUSTO, C. V.; DE CASTRO BARBOSA, M. L.; DE ALBUQUERQUE MELO, G. M.; DE QUEIROZ, A. C.; DE LIMA MATOS FREIRE DIAS, T.; JÚNIOR, W. B.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Synthesis and pharmacological evaluation of pyrazine N-acylhydrazone derivatives designed as novel analgesic and anti-inflammatory drug candidates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v. 18, p. 5007–5015. 2010.

SIQUEIRA JUNIOR, J. F.; DANTAS, C. J. S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. 1 ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica Ltda., 2000, p. 25.

STEPANOVIC-PETROVIC, R. M.; TOMIC, M. A.; VUCKOVIC, S. M.; PARANOS, S.; UGRESIC, N. D.; PROSTRAN, M. S.; MILOVANOVIC, S.; BOSKOVIC, B. The antinociceptive effects of anticonvulsants in a mouse visceral pain model. **Anesthesia and Analgia**. v. 106, n. 6, p. 1897-1903. 2008.

STUBHAUG, A.; BREIVIK, H.; EIDE, P. K.; KREUNEN, M.; FOSS, A. Mapping of punctuate hyperalgesia surrounding a surgical incision demonstrates that ketamine is a powerful suppressor of central sensibilisation to pain following surgery. **Acta Anesthesiologica Scandinavica**. v.41, n. 1, p.1124-1132. 1997.

SZÉLES, L.; TÖRÖCSIK, D.; NAGY, L. PPAR γ in immunity and inflammation: cell types and diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1771, n. 8, p. 1014-1030. 2007.

TAVARES, A.; LIVOTTO, P. R.; GONÇALVES, P. F. B.; MERLO, A. A. 3-Arylisoxazolyl-5-Carboxylic Acid and 5-(Hydroxymethyl)-3-Aryl-2-Isoxazoline as Molecular Platforms for Liquid-Crystalline Materials **The Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 20, N. 9, p. 1742-1752. 2009.

TAVARES, A. Isoxazolinás. Uma classe de materiais avançados revistada. Tese (Doutorado em Farmacologia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2010.

TIAN, B.; HE, M.; TANG, S.; HEWLETT, I.; TAN, Z.; LI, J.; JIN, Y.; YANG, M. Synthesis and antiviral activities of novel acylhydrazone derivatives targeting HIV-1 capsid protein. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v. 19, p. 2162–2167. 2009.

TOMMASINI, I.; CANTONI, O. Dexamethasone promotes toxicity in U957 cells exposed to otherwise nontoxic concentrations of peroxynitrite: pivotal role for lipocortine 1-mediated inhibition of cytosolic phospholipase A2. **Mol Pharmacol**. v. 65, n. 4, p. 964-972. 2004.

TORRE-AMIONE G. Immune activation in chronic heart failure. **American Journal of Cardiology**. v. 95, p. 3C-8C. 2005.

UNSAI-TAN, O.; OZDEN, K.; RAUK, A.; BALKAN, A. Synthesis and cyclooxygenase inhibitory activities of some N-acylhydrazone derivatives of

isoxazolo[4,5-d]pyridazin-4(5H)-ones. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 45, p. 2345–2352. 2010.

VALE, M. L.; MARQUES, J. B.; MOREIRA, C. A.; ROCHA, F. A.; FERREIRA, S. H.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 304, p. 102–108. 2003.

VALLANCE, P.; CHAN, N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. **Heart**. v.85, p.342-350. 2001.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 38, p. 97–120. 1998.

VANNI, D. S.; HORSTMANN, B.; BENJO, A. M.; DAHER, J. P. L.; KANAAN, S.; SLAIMAN, M. Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo. **J Bras Patol Med Lab**. v. 43, n. 3, p. 181-189. 2007.

VERRI, W. A.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; LIEW, F. Y.; FERREIRA, S. H. Antigen-induced inflammatory mechanical hypernociception in mice is mediated by IL-18. **Brain, Behavior and Immunity**. v. 21, p. 535–543. 2007.

VILELA, F. C.; DE MESQUITA PADILHA, M.; DOS SANTOS-E-SILVA, L.; ALVES-DA-SILVA, G.; GIUSTI-PAIVA, A. Evaluation of the antinociceptive activity of extracts of *Sonchus oleraceus* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 124, n. 2, p. 306-310. 2009.

WALKER, P. S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; KRIEG, A. M.; LOVE-HOMAN, L.; ROWTON, E. D.; UDEY, M. C.; VOGEL, J. C. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12- and IFN- γ -dependent mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 96, p. 6970–6975. 1999.

WANG, X. L.; ZHANG, Y. B.; TANG, J. F.; YANG, Y. S.; CHEN, R. Q.; ZHANG, F.; ZHU, H. L. Design, synthesis and antibacterial activities of vanillic acylhydrazone derivatives as potential β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 57, p. 373-382. 2012.

WATKINS, L. R.; GOEHLER, L. E.; RELTON, J.; BREWER, M. T.; MAIER, S. F. Mechanisms of tumor necrosis factor- α (TNF- α) hyperalgesia. **Brain Research**. v. 692, p. 244–50. 1995.

WEISS, S. J. Tissue destruction by neutrophils. **The New England Journal of Medicine**. v. 320, p. 365-376. 1989.

WENDE, C.; MARGOLIN, S. Analgesic test based upon experimentally induced acute abdominal pain in rats. **Fed Proc**. v. 15, p 494-499. 1956.

WHITTLE, B. A. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. **British Journal of Pharmacology Chemotherapy**. v. 22, p. 246–253. 1964.

WILLIS, W. D.; WESTLUND, K. N. Neuroanatomy of the pain system that modulate pain. **Journal of clinical Neuropsychology**. v.14, p. 2-31. 1997.

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

WOOLF, C. J. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. **Life Sciences**. v. 74, n. 21, p. 2605-2610. 2004.

XING, Z.; GAULDIE, J.; COX, G.; BAUMANN, H.; JORDANA, M.; LEI, X. F.; ACHONG, M. K. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. **Journal of Clinica Investigation**. v. 101, p. 311-320. 1998.

YAMAGUCHI, T.; NAGASAWA, T.; SATOH, M.; KURAIISHI, Y. Itch-associated response induced by intradermal serotonin through 5-HT₂ receptors in mice. **Neuroscience Research**. v. 35, p. 77-83. 1999.

YAMAMOTO, M.; YOSHIZAKI, K.; KISHIMOTO, T.; ITO, H. IL-6 is required for the development of Th-1 cell-mediated murine colitis. **Journal of Immunology**. v. 164, p. 4878-4882. 2000.

ZANBOORI, A.; TAMADDONFARD, E.; MOJTAHEDEIN, A.; Effect of chlorpheniramine and ranitidine on the visceral nociception induced by acetic acid in rats: role of opioid system. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. v. 11, n. 20, p. 2428-2432. 2008.

ZHANG, C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. **Basic Research in Cardiology**. v. 103, n. 5, p. 398-406. 2008.

ZHANG, X.; CAO, J.; ZHONG, L. Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells Naunyn-Schmied. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. V. 379, p. 581–586. 2009.

ZHOU, H. Y.; SHIN, E. M.; GUO, L. Y.; ZOU, L. B.; XU, G. H.; LEE, S. H.; ZE, K. R.; KIM, E. K.; KANG; S. S.; KIM, Y. S. Anti-inflammatory activity of 21 (α , β)-methylmelianodiol, novel compounds from *Poncirus trifoliata* Rafinesque. **Eur Journal of Pharmacology**. v. 572, p. 239-248. 2007.