



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA MEDICINAL E BIOMOLECULAR



JAILSON OLIVEIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA, ANTIINFLAMATÓRIA E
ANTINOCICEPTIVA DE NOVOS DERIVADOS CARBAZÔNICOS**

RECIFE

2014

JAILSON OLIVEIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA, ANTIINFLAMATÓRIA E
ANTINOCICEPTIVA DE NOVOS DERIVADOS CARBAZÔNICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Química Medicinal e Biomolecular, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profª. Dra. Silene Carneiro do Nascimento

Co-orientadora: Profª. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

RECIFE

2014

Silva, Jailson Oliveira da

Avaliação das atividades citotóxica, antiinflamatória e antinociceptividade novos derivados carbazônicos. / Jailson Oliveira da Silva- Recife: O Autor, 2014.

144 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Silene Carneiro do Nascimento

Coorientadora: Teresinha Gonçalves da Silva

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2014.**

Inclui referências e anexos

**1. Agentes antiinflamatórios 2. Testes de toxicidade 3. Citocinas
I. Nascimento, Silene Carneiro do (orient.) II. Silva, Teresinha
Gonçalves da (coorient.) III. Título**

615.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017- 413

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA, ANTIINFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE NOVOS DERIVADOS CARBAZÔNICOS

Jailson Oliveira da Silva

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Química Medicinal e Biomolecular, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

COMISSÃO EXAMINADORA

Aprovada em: 26/02/2014

MEMBROS TITULARES

Profª. Dra. Silene Carneiro do Nascimento (Orientadora) – UFPE

Prof. Dr. Sebastião José de Melo – UFPE

Profª. Dra. Gardênia Carmem Gadelha Militão – UFPE

Profª. Dra. Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho - UFPE

Prof. Dr. Onaldo Gudes Rodrigues – UFCG

MEMBROS SUPLENTE

Profª. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia – UFPE

Profª. Dra. Jaciana dos Santos Aguiar – UFPE

Recife
2014

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha querida, amada e eterna Mãe Maria José pela concepção. Por ter guiado meus primeiros passos quando eu ainda era um ser indefeso. Pelo amor e cuidado quando eu ainda não sabia quem era eu o que viria a ser. Pelos conselhos e carinho nos momentos mais difíceis da minha vida e pela alegria que sempre conduziu a vida enquanto a pode ter. Simplesmente saudades. "In memoriam"

Dedico também ao meu pai Joséildo Gonçalves, que sempre lutou para fornecer uma boa educação. A ele que, de sua maneira e tendo suas razões, me ensinou a ser um homem de caráter e dignidade. Pelos ensinamentos valiosos para ser o que me tornei hoje, o meu muito obrigado Pai.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por ser meu norte;

À minha família, pais, irmãs, avós, sobrinhos pela compreensão e apoio total nas minhas decisões e no período da vida acadêmica, principalmente nos últimos quatro anos;

A Sílvia pelo companheirismo que me dedicou e a compreensão quando eu mais precisei e principalmente nos momentos finais;

À minha orientadora Profa Dra Silene Carneiro por ter depositado em mim a confiança para realização desse trabalho e à minha có-orientadora Profa Dra Teresinha Gonçalves pela ajuda na interpretação dos resultados de inflamação e nocicepção;

Aos meus amigos pelos momentos de alegria e distrações durante esse que passei no curso de doutorado, em especial à Caroline Sanuzi pelos longos almoços, conversas e conselhos, à Marcelo Alves que mesmo sendo mais novo me dava broncas como se fosse meu Pai e me aconselhava com sua vasta experiência acadêmica;

A todos os amigos do LBPF pelos grandes momentos de “discussões científicas”, em especial a Jeyce e André que me ajudaram nos experimentos de citotoxicidade, meu sincero e forte abraço;

À Profa Dra Maria Teresa Jansem, por sua dedicação e ensinamentos em minha primeira iniciação científica, senão fosse por ela eu não teria aprendido tanto na pesquisa;

A secretária do PPGCB Adenilda pelas cobranças e lembranças de cada prazo a ser cumprido;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES, pelo apoio financeiro para realização da pesquisa;

Enfim a todos que direta, indiretamente ou porventura eu não tenha feito menção, contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

Introdução: compostos das classes semicarbazonas e tiosemicarbazonas tem sido relatados em diferentes estudos por apresentarem variadas ações biológicas de interesse farmacológico. Neste sentido, novos compostos derivados, fruto de síntese recente, têm sinalizado seu potencial terapêutico. Assim, neste estudo objetivou-se testar o efeito anti-inflamatório, antinociceptivo e antitumoral de alguns compostos derivados carbazônico. **Metodologia:** Para avaliar a atividade anti-inflamatória de VH02 os ensaios de inflamação o agente flogístico utilizado foi a carragenina, óleo de cróton e ácido acético, enquanto que em testes de nocicepção foram utilizados ácido acético e formalina. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas do colégio brasileiro de experimentação animal (COBEA) e realizados sob consentimento do comitê de ética e experimentação animal CCB/UFPE, processo: 035663/2013-90. Os animais foram mantidos sob condições de controle de temperatura 21 ± 2 °C e luminosidade 12/12h claro/escuro, com disponibilidade de água e ração a vontade. Para cada ensaio os animais foram, divididos em grupos de 6/gaiola, climatizados, mantidos em jejum por período de 4h e todos foram pré-tratados com as substâncias testes 1h antes do início de cada prática experimental. Os experimentos foram conduzidos a partir da administração de seis diferentes compostos e doses baseadas no teste de toxicidade aguda para cada substância. **Resultados:** No teste de pleurisia, os compostos VH28 e VH21 apresentaram inibição de 29 e 35% na migração de leucocitária. Os compostos VH08 (3mg/Kg), VH02 e LS18A (100mg/Kg) promoveram inibição da migração leucocitária de 80%, 86% e 64% no ensaio de peritonite. No ensaio de contorções abdominais provocadas pelo ácido acético os compostos VH21 e LS18A nas doses de 6,25; 25 e 100 mg/Kg apresentaram 62%, 79% e 68% e 50%, 65% e 58% de inibição nas contorções abdominais provocadas pelo ácido acético, quando comparadas ao controle. O teste de viabilidade celular demonstrou inibição de 71% e 77% do composto VH25 nas concentrações de 1 e 2 µg/mL para a linhagem de HL60, a doxorubicina utilizada como padrão apresentou inibição de 73%. Ainda, em teste de coloração por May-grunwald-giemsa as células apresentaram picnose, condensação da cromática e formação de corpos apoptóticos. A morte por apoptose foi comprovada em ambas as doses através da técnica de anexina5/Iodeto de propídeo por citometria de fluxo. **Conclusões:** Os resultados apresentados demonstram que houve atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, bem como ação citotóxica de alguns derivados carbazônicos. No entanto, são necessários novos testes para esclarecimento do real mecanismo de ação para as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva.

Palavras chave: anti-inflamatória. citotoxicidade. nocicepção. tiosemicarbazonas. semicarbazonas.

ABSTRACT

Introduction: compounds from thiosemicarbazones and semicarbazones classes have been reported in different studies by presenting a wide range of functions, of which we highlight the anti-inflammatory, antitumor and antifungal activities. This study aimed to identify the anti-inflammatory, antinociceptive and antitumor activities of new carbazones derivatives, and the mechanisms involved in each activity.

Methods: For the inflammation tests, the phlogistic agent used was carrageenin, croton oil and acetic acid, while in tests of nociception acetic acid and formalin were used. The experiments were conducted in accordance with the standards of the Brazilian College of Animal (COBEA) and performed under the consent of ethics and animal experimentation CCB/UFPE, process number: 035663/2013-90. The animals were kept under controlled conditions of temperature 21 ± 2 °C and luminosity 12/12h light/dark, with availability of water and feed at will. For each test, the animals were divided into groups 6/cage, air conditioned, fasted for 4h period and all were pre-treated with the test substances 1h before the beginning of each experimental practice. The experiments were conducted through the administration of six different compounds and doses, based on acute toxicity test for each substance. **Results:** For pleurisy test, VH28 and VH21 compounds were inhibited 29% and 35% in leukocyte migration. The VH08 (3mg/kg), VH02 and LS18A (100mg/kg) compounds promoted inhibition of leukocyte migration 80%, 86% and 64% in the assay of peritonitis. In the test of writhing induced by acetic acid and the VH21 and LS18A compounds in doses of 6.25, 25 and 100 mg/kg showed 62%, 79%, 68% and 50%, 65% and 58% inhibition in writhing caused by acetic acid when compared to control. The cell viability test showed inhibition of 71 % and 77 % of the compound VH25 concentrations of 1 and 2 $\mu\text{g/mL}$ for strain HL60, doxorubicin used as the control showed 73% inhibition. Even in coloring test by May-Grunwald-Giemsa cells showed pyknosis, condensation and formation of apoptotic chromatic bodies. Death by apoptosis was confirmed at both doses using the technique of annexin 5/propidium iodide by flow cytometry. **Conclusions:** The results showed that there were anti-inflammatory and antinociceptive activity and cytotoxic action of some derivatives carbazones. However, further tests to elucidate the actual mechanism for anti-inflammatory and antinociceptive activities are needed.

Keywords: anti-inflammatory. cytotoxicity. nociception. thiosemicarbazones. semicarbazones.

Lista de Figuras – Capítulo 1

Figura 1 - Estrutura geral de uma Semicarbazona e Tiosemicarbazona	25
Figura 2 - Reação em cadeia, a partir da atuação da MPO e NADPH na formação de ROS no processo inflamatório	27
Figura 3 - Interação de citocinas e fator de transcrição nuclear (NFκβ) no processo inflamatório	29
Figura 4 - Principais citocinas inflamatórias da fase aguda: origem e função	33
Figura 5 - Produção de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico	36
Figura 6 - Formação de eicosanoides a partir de diferentes estímulos em COX-1 e COX-2	36
Figura 7 - Efeitos fisiológicos causados pelos produtos gerados a partir do ácido araquidônico pelas enzimas COX-1 e COX-2 no organismo	38
Figura 8 - Mecanismos da dor nociceptiva e inflamatória	40
Figura 9 - Mortalidade proporcional por câncer no Brasil entre 1980 e 2011	43
Figura 10 - Anos potenciais de vida perdidos por câncer	43
Figura 11 - Diferenças morfológicas celulares entre os processos de morte celular por necrose e apoptose	46

Lista de Figuras – Capítulo 2.

- Figura 1** - Determinação da curva padrão para o produto VH25 nos tempos de 24 e 72 horas 71
- Figura 2** - Efeito do composto VH25 em cultura de células HL60 para determinação da viabilidade celular através do método de exclusão por azul de tripan no tempo de 24 h 72
- Figura 3** - Análise de células de linhagem HL60 por coloração diferencial May-grunwald-giemsa 74
- Figura 4.** Análise do tamanho/granularidade celular em citometria de fluxo 75
- Figura 5.** Avaliação da via de indução da morte celular, utilizando marcação com Anexina V/ Iodeto de propídeo 76

Lista de Figuras – Capítulo 3

- Figura 1** – Avaliação da migração celular de PMNs em exsudato extraído de bolsa de ar subcutânea em camundongos 92
- Figura 2** – Avaliação da diminuição de edema produzido por óleo de cróton em orelha de camundongos 93
- Figura 3** - Atividade dos derivados tiosemicarbazônicos VH08 e VH02 na permeabilidade vascular 94
- Figura 4** – Quantificação dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-10 no exsudato inflamatório de bolsa de ar induzido por carragenina 95
- Figura 5** – Determinação da presença de MPO no exsudato inflamatório da bolsa de ar induzido por carragenina e no fragmento de orelha obtido no teste de edema gerado por óleo de cróton 97
- Figura 6** – Quantificação de NO no exsudato inflamatório de bolsa de ar induzido por carragenina e no fragmento de orelha obtido no teste de edema gerado por óleo de cróton 98

Lista de Figuras – Capítulo 4

- Figura 1** – Diminuição das contorções abdominais a partir do tratamento com os compostos VH21 e LS18A. 115
- Figura 2** – Determinação da resposta nociceptiva frente aos compostos VH21 e LS18A e verificação da participação dos canais de potássio no modelo de contorções abdominais 116
- Figura 3** – Determinação da atividade antinociceptiva dos compostos VH21 e LS18A (25 MG/Kg) frente ao teste de formalina 117

Lista de tabelas – Capítulo 2

Tabela 1 - Resultados do efeito inibidor do crescimento celular sobre as linhagens de HL-60, MCF-7, NCI-H292 e HEP 70

Tabela 2 - Determinação da CI_{50} (concentração em $\mu\text{g/mL}$ com capacidade de inibição de 50% do crescimento da população celular) do derivado VH25 frente a linhagem de células HL60, realizado pelo teste de MTT 71

Lista de tabelas – Capítulo 3

Tabela 1 - Atividade dos derivados tiosemicarbazônicos VH08 e VH02 na migração celular de leucócitos PMNs no exsudato inflamatório obtido no teste de bolsa de ar 92

Tabela 2 - Atividade dos derivados tiosemicarbazônicos VH08 e VH02 na permeabilidade vascular 94

Lista de tabelas – Capítulo 4

Tabela 1 - Determinação do percentual de inibição das contorções abdominais 114

Tabela 2 - Determinação do percentual de inibição das contorções abdominais e participação dos canais de potássio na nocicepção 116

Tabela 3 – Demonstração do percentual de inibição da nocicepção no teste de formalina 118

Lista de abreviações

µL	Microlitro
µM	Micromol
AAS	Ácido Acetilsalicílico
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
APVP	Anos Potenciais de Vida Perdidos
CL ₅₀	Concentração Letal para Matar 50% da População Celular
CO ₂	Gás Carbônico
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX	Ciclo-oxigenase
DC	Células Dendríticas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
eNOS	Óxido Nítrico Sintetase Endotelial
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
FSC	Desvio de Luz para Frente
g	Grama
HEp-2	Linhagem de Células Tumorais Derivadas de Carcinoma Laríngeo Humano
HETE	Ácido hidroxieicosatetraenóico
HL60	Leucemia Promielocítica
HOCl	Ácido hipocloso
IASP	International Association for the Study of Pain
IFN-γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-17A	Interleucina 17A
IL-1RA	Interleucina 1RA
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6

IL-8	Interleucina 8
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iNOS	Óxido Nítrico Sintetase Induzível
IP	Via Intraperitoneal
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
Kg	Kilograma
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrienos
MCF-7	Adenocarcinoma e Carcinoma de Mama
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MPO	Enzima Mieloperoxidase
MR	Receptor de Manose
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico
Na ⁺	Íon Sódio
NADPH	Nicotinamida Adenosina Dinucleotídeo Fosfato
NCI	Carcinoma mucoepidermóide de pulmão
NF- $\kappa\beta$	Fator Nuclear kappa beta
NK	Células Natural Killer
nm	Nanômetro
nNOS	Oxido Nítrico Sintetase Neuronal
NO	Óxido Nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
°C	Grau Centígrado
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OH ⁻	Íon hidroxila
PAPVP	Taxa de Anos Potenciais de Vida Perdidos
PBS	Tampão Salino Fosfato
pg	Picogramas
PG	Prostaglandina
PMNs	Células Polimorfonucleares

RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SBED	Sociedade Brasileira de Estudos da Dor
SNC	Sistema Nervoso Central
SSC	Desvio de Luz para o Lado
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TX	Tromboxano
VEGF- α	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VO	Via Oral

SUMÁRIO

Introdução	21
Capítulo 1 - Revisão da literatura	24
1 Compostos semicarbazônicos e tiossemicarbazônicos	24
2 O processo inflamatório	25
2.1 Interleucinas e o processo inflamatório	31
2.1.1 Interleucina 1β (il-1β)	31
2.1.2 Interleucina 6 (il-6).....	32
2.1.3 Fator de necrose tumoral (tnf)	32
3 Fármacos anti-inflamatórios	34
3.1 Anti-inflamatórios esteroidais	34
3.2 Anti-inflamatórios não-esteroidais	35
4 Fisiopatologia da dor.....	38
4.1 Mecanismo da dor.....	39
5 Neoplasias.....	41
5.1 Epidemiologia do câncer	42
5.2 Morte celular.....	44
5.3 Tipos de morte celular.....	45
5.3.1 Necrose	45
5.3.2 Apoptose.....	45
5.4 Terapias para o câncer.....	46
6 Referências	50
Capítulo 2 - vh-25 um novo derivado tiossemicarbazônico induz a morte por apoptose em leucemia promielocítica aguda.	65
Resumo.....	66
1 Introdução	66
2 Material e métodos	68
2.1 Substâncias químicas.....	68
2.2 Material biológico	68
2.3 Teste do mtt	69

2.4	Viabilidade celular (teste de exclusão pelo azul de tripan)	69
2.5	Análise morfológica (may-grunwald-giemsa)	70
2.6	Análise morfológica (citometria de fluxo)	71
2.7	Anexina v-fitc/ iodeto de propídio	71
3	Resultados e discussão.....	71
3.1	Ensaio de citotoxicidade em células tumorais	71
3.2	Teste de viabilidade celular pelo teste de exclusão por azul de tripan	74
3.3	Análise morfológica – may-grunwald-giemsa	75
3.4	Análise morfológica (citometria de fluxo)	76
3.5	Anexina v-fitc / iodeto de propídeo	77
4	Conclusões	80
5	Agradecimentos	81
6	Referências	81
Capítulo 3 - Atividade Anti-inflamatória de VH02 e VH08 Novos Derivados Tiossemicarbazônicos		88
Resumo.....		89
1	Introdução	89
2	Materiais e métodos.....	90
2.1	Drogas	90
2.2	Animais	90
2.3	Teste de bolsa de ar subcutânea induzida por carragenina.....	91
2.3	Edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	91
2.3	Permeabilidade vascular induzida por ácido acético	92
2.3	Quantificação dos níveis de tnf- α , il-1 β e il-10	92
2.3	Determinação dos níveis de mpo	92
2.3	Quantificação dos níveis de no.....	93
3	Resultados	93
3.1	Teste de bolsa de ar subcutânea induzida por carragenina.....	93
3.2	Edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	95
3.3	Permeabilidade vascular induzida por ácido acético	95
3.4	Quantificação dos níveis de tnf- α , il-1 β e il-10	97
3.5	Determinação dos níveis de mpo	98
3.6	Quantificação dos níveis de no.....	100

4	Discussão	101
5	Conclusão	105
6	Agradecimentos	106
7	Referências	106
	Capítulo 4 - Atividade Antinociceptiva de um Novo Derivado Semicarbazônico e um Tiosemicarbazônico	112
	Resumo	113
1	Introdução	113
2	Materiais e métodos	114
2.1	Drogas	114
2.2	Animais	114
2.3	Contorções abdominais induzidas por ácido acético	114
2.4	Participação dos canais de potássio (k_{atp})	115
2.5	Teste de formalina	115
3	Resultados	116
3.1	Contorções abdominais induzidas por ácido acético	116
3.2	Participação dos canais de potássio (k_{atp})	118
3.3	Teste de formalina	119
4	Discussão	120
4.1	Atividade antinociceptiva	121
5	Conclusão	122
6	Agradecimentos	123
	Referências	126
	Conclusões	127
	Anexo 1 – Resultados extras	128
	Anexo 2 - Tabela 423 OECD utilizada como modelo para os testes de toxicidade aguda	136
	Anexo 3 – Documento de aprovação do comitê de ética animal da ufpe	137
	Anexo 4 - Normas da revista <i>biomedicine & pharmacology</i>	138
	Anexo 5 - Normas da revista <i>inflammation research</i>	140
	Anexo 6 - Normas da revista <i>interfaces científicas</i>	141

Introdução

Civilizações primitivas já utilizavam o conhecimento popular na tentativa de encontrar alívio para suas moléstias através da utilização de unguentos e extração rudimentar de óleos a partir de plantas medicinais (VEIGA JUNIOR, PINTO e MACIEL, 2005). Atualmente, como o uso de tecnologias mais avançadas, fármacos vem sendo desenvolvidos com a finalidade de tratamento e cura das doenças que afligem a humanidade contemporânea. Estudos recentes têm mostrado que a química medicinal orgânica tem ganhado prestígio por contribuir no progresso da ciência e descoberta de novas drogas anti-inflamatórias, analgésicas e antitumorais mais modernas. Os avanços atribuídos à farmacologia têm sido possíveis graças aos recentes conhecimentos dos mecanismos moleculares da fisiopatologia das doenças, com ênfase principalmente na atividade de enzimas, canais iônicos, receptores e modulação da liberação de mediadores químicos (DONNICI et al., 2008).

Compostos semicarbazônicos e tiosemicarbazônicos tem sido relatados em diversos estudos por sua atividade, anti-inflamatória, antitumoral e antifúngica (DOBEK et al., 1980; KALINOWSKI et al., 2007; SMEE e SIDWELL, 2003) antimalárica (WEST et al, 1993) e antichagásica (CARECETTO, 2000). Segundo Do campo (1990), compostos da classe das semicarbazonas e tiosemicarbazonas possuem outras propriedades medicinais com capacidade na inibição do crescimento de alguns organismos patogênicos. De modo geral o mecanismo de ação dos compostos semicarbazônicos e tiosemicarbazônicos pode estar relacionado a inibição enzimática, interação com a molécula de DNA e ou inibição da síntese de DNA (BERALDO, 2004). Apesar da grande versatilidade farmacológica apresentada por esta classe de compostos, diferenças estruturais podem ocasionar manifestação específica na atividade. Por isso a tentativa de descoberta dos mecanismos de ação de novos derivados dessa classe com perspectiva de que algum seja forte candidato a protótipo de fármaco.

Capítulo 1

Capítulo 1 - REVISÃO DA LITERATURA

1 Compostos Semicarbazônicos e Tiosemicarbazônicos

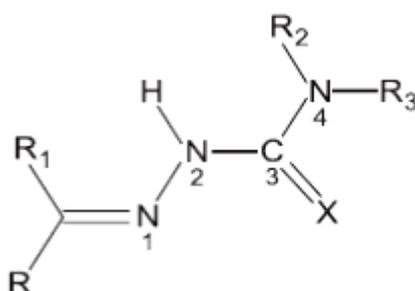
As semicarbazonas pertencem a uma classe de substâncias com amplo espectro de atividades biológicas, no entanto não possui nenhum uso clínico. Estudos já demonstraram que as semicarbazonas apresentam ação analgésica (BERALDO, 2004), hipotensiva (WARREN; WOODWARD; HARGREAVES, 1977), antineoplásica (ASÍS et al., 1996), anticonvulsivante (DIMMOCK, 1993) entre outras. As semicarbazonas que possuem em sua estrutura grupos aril, arilideno, ariloxi (aril) têm sido estudadas. Através das observações experimentais, acredita-se que os compostos semicarbazônicos possam interagir em dois locais no alvo molecular: 1) uma área de ligação de hidrogênio e 2) uma região hidrofóbica (DIMMOCK et al., 1995; DIMMOCK et al., 1996). Segundo Thirumurugan (2006) o uso de semicarbazonas levam a um aumento nos níveis de ácido gama-aminobutírico (GABA) em diferentes áreas do sistema nervoso central e também reduzem a concentração de glutamato no fluido cérebro-espinhal (MATTEI, 1999), talvez essas alterações levam a pensar sobre a atividade anticonvulsivante desses compostos.

Estudos realizados por Ilyin (2005) demonstram que 4-[4-fluorfenoxi] benzaldeído semicarbazona bloqueia os canais de sódio sensíveis à voltagem, o bloqueio desses canais leva a atividade antinociceptiva. Alguns fármacos com perfil anticonvulsivante promovem alterações no processo inflamatório e derivados semicarbazônicos também apresentam esse perfil.

Os compostos moleculares conhecidos como tiosemicarbazonas são considerados cientificamente interessantes, uma vez que possuem propriedades importantes nas áreas química e biológica, como na atividade antitumoral (FEUN et al 2002), antiviral (TEITZ et al, 1994), antibacteriana (KASUGA et al., 2003) e citotóxica (KARAH et al., 2002) entre outras. Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), as tiosemicarbazonas normalmente são obtidas por reação de condensação quimioseletiva de tiosemicarbazidas com aldeídos e cetonas. De acordo com a reação de condensação do grupo aldeído ou cetona estes compostos recebem o nome da tiosemicarbazona correspondente (CASAS; TASENDE e SORDO, 2000) e a partir desta reação a numeração atômica é realizada (Figura 1).

Por possuírem excelentes propriedades organometálicas, esses compostos também são conhecidos como agentes quelantes (ANTONINI et al, 1981; CASAS; TASENDE e SORDO,2000). Sinteticamente as tiossemicarbazonas apresentam principalmente boa versatilidade para obtenção, não obstante apresenta vasta aplicação como intermediários de muitos núcleos importantes. De forma geral, apresentam economia do processo de síntese, pequena utilização de átomos, pois todos aqueles dos reagentes estão presentes na molécula final, a não ser a água que é eliminada na síntese (DU et al., 2002).

Figura 1 - Estrutura geral de uma Semicarbazôna e Tiossemicarbazôna, mostrando a ordem da enumeração dos átomos na molécula.



Os radicais R1, R2, R3 e R4 = H, grupo Alquila ou arila

X = O, S

Fonte: adaptado de BERALDO, 2004, p. 1

2 O PROCESSO INFLAMATÓRIO

A reação inflamatória é caracterizada por um conjunto de eventos complexos que envolvem desde o reconhecimento do estímulo ou do agente lesivo até a sua destruição e consequente reparação do tecido lesado. A ativação do sistema de defesa é desencadeada após o reconhecimento do agente lesivo, que por sua vez amplifica a resposta do sistema imune inato resultando na ativação de células e liberação de mediadores químicos inflamatórios que promovem vasodilatação, exsudação e migração leucocitária (SCHMID-SCHONBEIN, 2006; MEDZHITOV, 2008).

O sistema imunitário humano é dividido conceitualmente em sistema imune inato e sistema imune adaptativo. A imunidade inata é caracterizada por uma resposta

estereotipada a um grande número de estímulos, porém rápida e limitada. Não requer contato prévio com qualquer imunógeno, não altera sua constituição após sua sensibilização e é composta por barreiras químicas, físicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis (CRUVINEL, 2010).

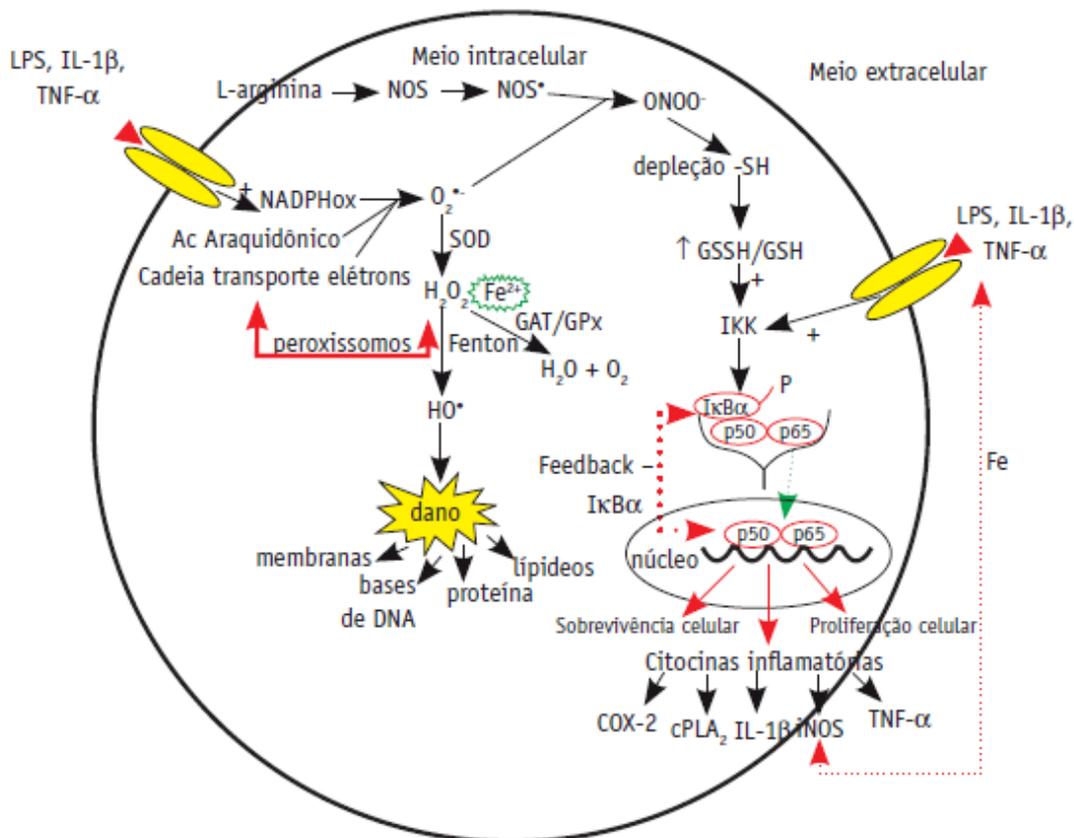
As principais células do sistema imune inato, compreendem os polimorfonucleares (PMNs) neutrófilos, macrófagos, mastócitos, células dendríticas (DC) e células Natural Killer (NK), vários mediadores solúveis segregados por estas células e o sistema complemento (KUMAR e SHARMA, 2010). O conjunto de células e dos mediadores formam uma linha eficaz na defesa do organismo contra agentes xenobióticos e microrganismos patogênicos. A primeira e principal linha de defesa da imunidade inata é formada pelos neutrófilos (GORSKA et al., 2010; KUMAR e SHARMA, 2010). No entanto, os neutrófilos não atuam como agentes fagocíticos solitários, e além de ser os principais responsáveis pela contenção e eliminação do agente lesivo, estas células ainda promovem liberação de moléculas químicas que funcionam como sinais para o recrutamento de novas células para o local da inflamação (NATHAN, 2006).

A eliminação do agente inflamatório ocorre por meio da atividade hidrolítica de algumas enzimas, proteínas bactericidas e espécies reativas de oxigênio (ROS), que ficam armazenadas no interior de grânulos dos polimorfonucleares (CASCAO et al., 2009).

Entre as enzimas hidrolíticas de maior destaque está a mieloperoxidase (MPO), uma protease contida nos grânulos azurófilos de monócitos e PMNs (HANSSON et al., 2006; KUMAR e SHARMA, 2010).

A MPO vinculada a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH), desencadeia a liberação de ROS. A NADPH oxidase, por sua vez reduz o oxigênio molecular a um ânion superóxido o qual é convertido em peróxido de hidrogênio pela enzima superóxido dismutase. Uma vez formado, o peróxido de hidrogênio, atua diretamente na destruição de bactérias (figura 2). A enzima MPO, ainda é responsável pela formação de íons hidroxila ou ácido hipocloroso a partir do peróxido de hidrogênio, essas substâncias são extremamente tóxicas o que torna ainda mais eficiente esse sistema de destruição microbicida e possui papel importante na defesa do hospedeiro contra a invasão de novas bactérias, fungos e vírus (HANSSON et al., 2006; KLEBANOFF, 2005).

Figura 2 - Reação em cadeia, a partir da atuação da MPO e NADPH na formação de ROS no processo inflamatório.



Fonte: FILIPPIN et al., 2008

Além da liberação de MPO que agredem diretamente o tecido, os PMNs promovem a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias (LEFKOWITZ, 2001). Não bastando o dano tecidual provocado pelo aumento dos níveis de MPO, esta enzima ainda é captada por macrófagos residentes os quais expressam receptores de manose (MR).

A interação da enzima MPO e dos MR leva a intensificação na liberação de espécies reativas de oxigênio, juntamente com outras citocinas pró-inflamatória como, TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 a partir de macrófagos. O aumento dos níveis tissulares de

neutrófilos ativados, a liberação excessiva de enzimas como a MPO, proteinase 3, elastases e catepsina G, induzem a liberação de maiores quantidades de ROS que, por sua vez, promovem importantes lesões em tecidos do próprio hospedeiro (MEDZHITOV, 2008).

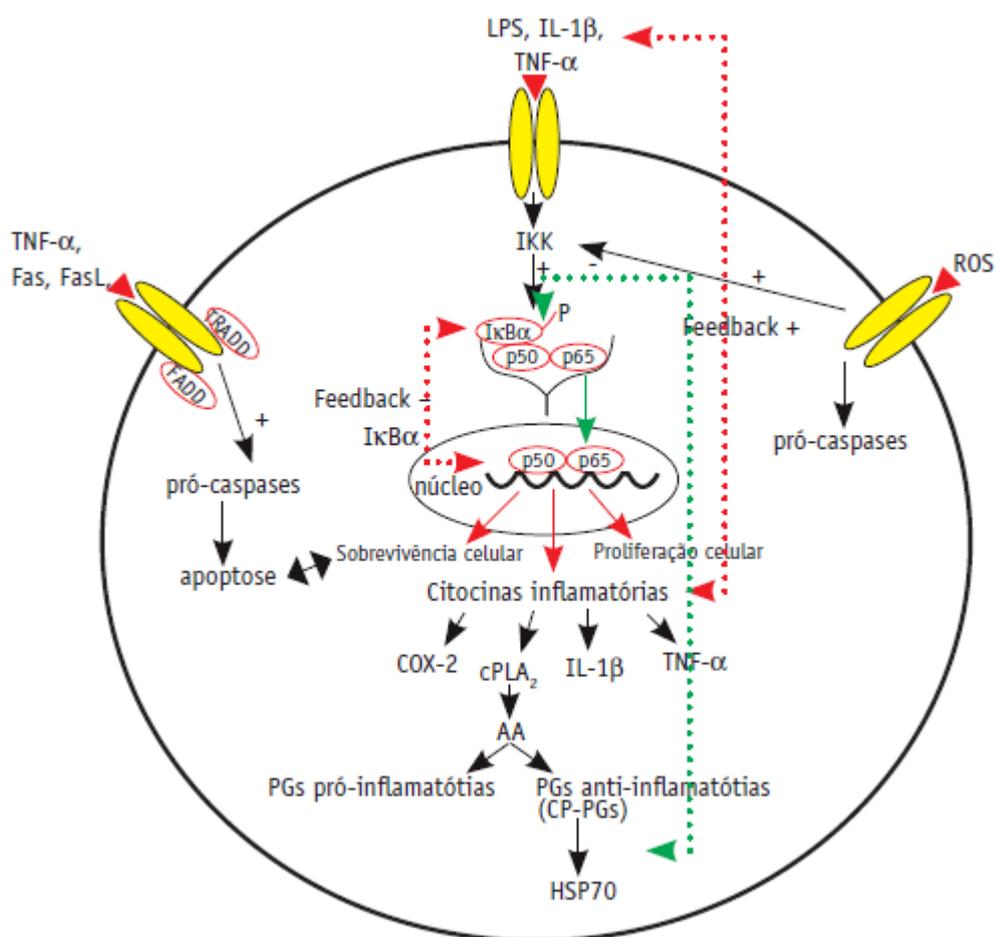
Ainda na resposta inflamatória o óxido nítrico (NO) destaca-se como um importante mediador. Esta substância é um gás e se apresenta na forma solúvel estando relacionado a diversas funções fisiológicas, incluindo imunomodulação, transmissão neuronal, relaxamento vascular e citotoxicidade (TSUCHIYA et al., 2007). Este mediador é liberado a partir da reação de conversão da L-arginina em L-citrulina, através da atividade catalisadora da enzima óxido nítrico sintetase (NOS). São conhecidas três isoformas desta enzima e estas são classificadas como sendo constitutivas e induzida. A óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) e a óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS) constituem as isoformas constitutivas e estas estão presentes em condições fisiológicas normais enquanto, que em condições fisiopatológicas, como nas respostas inflamatórias é encontrada a óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), ou seja a isoforma induzida (TAKEUCHI et al., 2004; MARIOTTO et al., 2007).

A iNOS é ativada em respostas inflamatórias por mediadores endógenos, como por exemplo: citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β - interleucina-1, TNF- α - fator de necrose tumoral alfa, IFN- γ - interferon gama entre outros), quimiocinas ou mesmo por fatores exógenos como endotoxinas bacterianas, tumores, agentes alérgenos e etc. (BOVE e VAN DER VLIET, 2006). Uma vez liberada, no local do estímulo inflamatório, a iNOS catalisa reações e promove a liberação rápida de grandes quantidades de NO, o que pode acontecer por horas ou até mesmo vários dias dependendo do estímulo inflamatório (KORHONEN et al., 2005). A iNOS é expressa principalmente por células epiteliais (HEMMRICH et al., 2005), no entanto ocorre também em eosinófilos (KORHONEN et al., 2005) e macrófagos (WU e TSAI, 2007). Em decorrência da interação do NO com ROS, existe formação de novas espécies reativas, as chamadas ERNS – Espécies reativas de nitrogênio que promovem maiores efeitos deletérios. Estudos recentes tem demonstrado o envolvimento de NO em doenças neuro-degenerativas e também na aterosclerose (RYTER et al., 2007; VALKO et al., 2007), além de proporcionar a ativação do fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B), (figura 3). Na expressão de vários

mediadores pró-inflamatórios o NF- κ B se apresenta como um dos principais fatores de regulação desses fatores. (OKAMOTO et al., 2004; KELLEHER et al., 2007).

Dentre os mediadores que participam do processo inflamatório ainda temos as citocinas. Essas moléculas são agrupamentos proteicos solúveis ou representantes de membrana plasmática, ou glicoproteínas mensageiras, que atuam com de forma parácrina.

Figura 3 - Interação de citocinas e fator de transcrição nuclear (NF κ B) no processo inflamatório.



Fonte: FILIPPIN et al., 2008

Através dos estudos nessa área, já foram encontradas muitas citocinas distintas, as quais podem ser classificadas através dos subgrupos dos fatores de crescimento,

interferons, fatores estimuladores de colônia, quimiocinas e as interleucinas. Quando referidas ao processo inflamatório, as citocinas são divididas naturalmente em: pró-inflamatórias das quais podemos citar a IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β , IL-17A e as citocinas anti-inflamatórias que são bem representadas pela IL-10, IL-4, IL-1Ra: antagonista de receptor de IL-1. As citocinas anti-inflamatórias ainda estão relacionadas ao crescimento, diferenciação e ativação celular das células imunológicas e no processo de reparo tecidual, além de apresentarem outras funções (BUDHU e WANG, 2006; COMMINS et al., 2010; HIPPE et al., 2010). As respostas inflamatórias incluem a liberação das citocinas, estas são ativadas através de diversos estímulos que podem ser estímulos físicos, necrose tecidual, ativação de células da resposta imune, presença de bactérias, vírus, tumores e vários outros (BUDHU e WANG, 2006).

As citocinas são mediadas pela ativação de receptores de superfície expressas nas membranas das células alvo. Sua função é especificamente celular, portanto esses mediadores solúveis apresentam não só a atividade parácrina como apresentado anteriormente, mas possuem também função autócrina e sistêmica (COMMINS et al., 2010; HIPPE et al., 2010). No processo inflamatório as citocinas podem atuar como agentes estimuladores, as chamadas citocinas pró-inflamatórias, ou como agentes inibidores, aquelas conhecidas como citocinas anti-inflamatórias. O trabalho conjunto dessas moléculas tem por finalidade a regulação da atividade inflamatória de modo que deva ser mantida a homeostase. Um desequilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias durante o processamento de uma resposta imunológica pode acarretar problemas ao organismo como necrose tecidual ou mesmo inadequação do processo inflamatório (CORSINI et al., 2005).

Merecem destaque como mediadores pró-inflamatórios o TNF- α , a IL-1 β , o VEGF- α , e ainda IL-17. Estudos realizados por Fröde e colaboradores (2001) indicam a participação marcante do TNF- α e da IL-1 β como mediadores com papel central na inflamação aguda induzida por carragenina, em camundongos, no modelo da pleurisia. Outras pesquisas apontam que o controle de secreção dessas citocinas é realizado através do fator de transcrição nuclear NF-kappa B (NF- κ B). Além disso, outras pesquisas relatam a participação dessas citocinas em vários tipos de doenças inflamatórias, como o envolvimento do TNF- α no lupus eritematoso sistêmico (ZHU et al., 2010), ainda a participação do TNF- α e da IL-1 β na artrite reumatoide (MA et al., 2010; YANG et al.,

2010), além da participação do TNF- α , da IL-1 β e do VEGF- α na asma brônquica (CHAROKOPOS et al., 2009; FUJISAWA et al., 2009).

2.1 Interleucinas e o Processo Inflamatório

2.1.1 Interleucina 1 β (IL-1 β)

A interleucina 1 é uma citocina pró-inflamatória liberada por diversos tipos celulares. Essas moléculas possuem três isoformas IL-1 α (Interleucina 1 alfa), IL-1 β (Interleucina 1 beta) e IL-1 γ (Interleucina 1 gama). Liberada principalmente por monócitos e macrófagos a IL-1 β está intimamente relacionada a processos inflamatórios agudos, atuando como uma citocina pró-inflamatória (VARELLA, 2001). Segundo Dinarello (1989), células endoteliais, miócitos, células de Langerhans, fibroblastos e linfócitos B e T são potencialmente produtoras de IL-1. Macrófagos quando expostos a antígenos virais, LPS, TNF- α , IFN- α , β e γ , produzem IL-1 em grande quantidade (MONROY, 1992).

As isoformas α e β apresentam funções semelhantes, atuando como citocinas pró-inflamatórias, no entanto a isoforma γ , apresenta atividade antagônica a essas duas, atuando como agente inibidor competitivo do receptor de IL-1, consequentemente bloqueando os efeitos da IL-1 (AREND, 1991). Além de apresentar ação direta, a IL-1 (α e β) pode ser estimulada pela presença de outros mediadores inflamatórios, como IL-6, IL-8, PGE₂ entre outros (MONROY, 1992). As principais funções apresentadas pela IL-1 incluem proliferação de linfócitos B, macrófagos, neutrófilos e estimulação de linfócitos CD4⁺ para produção de IL-2.

De acordo com Dinarello (1989) e Arend (1991) a adesão leucocitária, o aumento da expressão de moléculas de adesão por células endoteliais, a inibição da proliferação das células endoteliais e o aumento da atividade angiogênica na coagulação são atribuições da participação da IL-1. Segundo estudos realizados por Monroy (1992) e Thomson (2003) a produção, de proteínas de fase aguda na inflamação, por hepatócitos também está ligada a presença de IL-1 no sítio inflamatório.

2.1.2 Interleucina 6 (IL-6)

No sítio inflamatório em uma resposta aguda, a presença de macrófagos aumenta a concentração de Interleucina 6 (IL-6), mostrando que estas células são produtoras dessa citocina. Além da síntese e liberação por macrófagos, a IL-6 também é produzida por linfócitos Te B, sendo estimulada pela presença de IL-1, TNF e LPS. No entanto, hormônios glicocorticóides promovem inibição da produção de IL-6, enquanto, que mediadores como TGF- β apenas diminuem sua síntese (ROTNEWELL, 1991).

Pesquisas realizadas por Heinrich (1990) demonstraram que a IL-6 é uma das principais citocinas presente nas reações inflamatórias de fase aguda e resposta imune específica, sendo responsável pelo estímulo de hepatócitos para produção de importantes proteínas que agem no foco da inflamação, além de serem responsáveis pela atração de granulócitos eosinófilos nas inflamações persistentes. Semelhante a IL-1, a síntese de ACTH pela adenohipófise também é estimulada pela IL-6, através de mecanismo de retroalimentação negativa entre os sistemas neuroendócrino e imunitário (ROTNEWELL, 1991, THOMSON, 2003).

2.1.3 Fator de Necrose Tumoral (TNF)

O Fator de Necrose Tumoral (TNF) é uma citocina pró-inflamatória liberada, principalmente na fase aguda do processo inflamatório, por macrófagos. No entanto, ainda pode ser produzida por neutrófilos, linfócito T e células NK a partir da estimulação por lipopolissacarídeos (LPS). Estímulos como IL-1, IL-2, bradicinina, IFN, entre outros foram descritos por Tracey (1993) como agentes estimuladores para expressão de TNF. Essa citocina apresenta duas isoformas TNF- α e TNF- β que possuem ligação para o mesmo tipo de receptor, no entanto após a endocitose exercem funções diferentes. Ainda segundo Tracey (1993) a presença de PGE₂, IL-6, antagonistas de fator ativador de plaquetas (PAF), dexametasona e ciclosporina inibem a produção de TNF. Uma vez inibida sua produção, a resposta inflamatória contra patógenos virais e bacterianos pode ser prejudicada (CORSINI et al., 2005), No entanto, ensaios experimentais com animais demonstraram que concentrações elevadas do TNF podem levar a choque séptico (KUNKEL, 1991).

De acordo com trabalhos realizados por Nair e colaboradores (2006) o TNF α está relacionado a patogênese de doenças inflamatórias crônicas, uma vez que atua na regulação do crescimento, proliferação e diferenciação de leucócitos ativados, como também estimula a liberação de outros mediadores inflamatórios. Desta maneira é uma das potentes citocinas no recrutamento de células leucocitárias (ALBA-LOUREIRO et al., 2004).

Figura 4 - Principais citocinas inflamatórias da fase aguda: origem e função.

Tabela 1 - CARACTERÍSTICAS DAS CITOCINAS			
Citocina	Célula que origina	Alvo celular	Efeitos primários
IL-1 β	Monócitos Macrófagos Fibroblastos Células epiteliais Células endoteliais Astrócitos	Células T, Células B, Células endoteliais, Hipotálamo Fígado	Molécula co-estimulatória Ativação (inflamação) Febre Reactantes de fase aguda
IL-6	Células T; Macrófagos Fibroblastos	Células T; Células B maduras Fígado	Molécula co-estimulatória Crescimento (em humanos) Reactantes de fase aguda
TNF- α	Macrófagos; Células T	Semelhante a IL-1	Semelhante a IL-1

IL = interleucina GM-CSF = fator estimulador de colônia de granulocito-macrófago
IFN = interferon TNF = fator de necrose tumoral
TGF = fator de transformação de crescimento

3 FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS

O uso de compostos químicos no auxílio para amenização da dor e da inflamação é uma necessidade da humanidade desde tempos mais remotos. A tentativa de controlar os processos inflamatórios e a dor fazem parte dos objetivos mais primários do homem. Desde 1829, quando Leraux descobriu a salicilina e demonstrou os seus efeitos antipiréticos, pesquisas são realizadas com objetivo de desvendar a complexidade do processo inflamatório (OLIVEIRA Jr. et al., 2007; CHAHADE et al., 2008).

Em 1875 o salicilato de sódio foi usado como agente pirético no tratamento da gota e da febre reumática, os excelentes resultados do fármaco levou à produção de um novo composto chamado de Ácido Acetilsalicílico (AAS). Um longo caminho de pesquisa foi desencadeado e, em 1899, por Dresser, o AAS foi introduzido no mercado e ficou conhecido como aspirina, sendo este termo utilizado e perpetuado ao longo dos anos (OLIVEIRA Jr. et al., 2007; SOLOMON et al., 2007). No entanto, os estudos demonstraram que o AAS promovia uma alta toxicidade gástrica e intestinal. Neste sentido, a procura por substâncias com efeito anti-inflamório e analgésico e menores efeitos adversos, teve continuidade tendo por base a síntese de novos compostos a partir do AAS. Através de novas pesquisas, surge em meados de 1950 a fenilbutazona, primeiro anti-inflamatório não-salicilato (CHAHADE et al., 2008).

Atualmente diferentes fármacos vêm sendo utilizados como potenciais agentes antiinflamatórios. Estes estão divididos em dois grupos básicos, os anti-inflamatórios esteroidais e os anti-inflamatórios não esteroidais - AINES.

3.1 Anti-inflamatórios Esteroidais

As drogas utilizadas como anti-inflamatórios esteroidais, possuem mecanismo de ação que envolve o bloqueio da fosfolipase A2 na cascata do ácido araquidônico (AA), inibindo assim a formação de prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TX) e leucotrienos (LT) (VANE e BOTTING, 1987).

Segundo Miller, Stanton e Derery (2001) o uso constante e prolongado destes fármacos para o tratamento de doenças inflamatórias promove imunossupressão e

predisposição a infecções nos indivíduos que utilizam este tratamento. Outros estudos ainda mostraram que o uso contínuo da cortisona e seus derivados diminui a produção de prostaglandinas, podendo causar ulceração gástrica e provoca aumento na retenção de sódio o que conseqüentemente pode gerar um quadro de hipertensão arterial (CASTRO e GODINHO, 2003). A predinisona, a hidrocortisona, a predinisolona e a dexametasona são os principais representantes desta classe de moléculas.

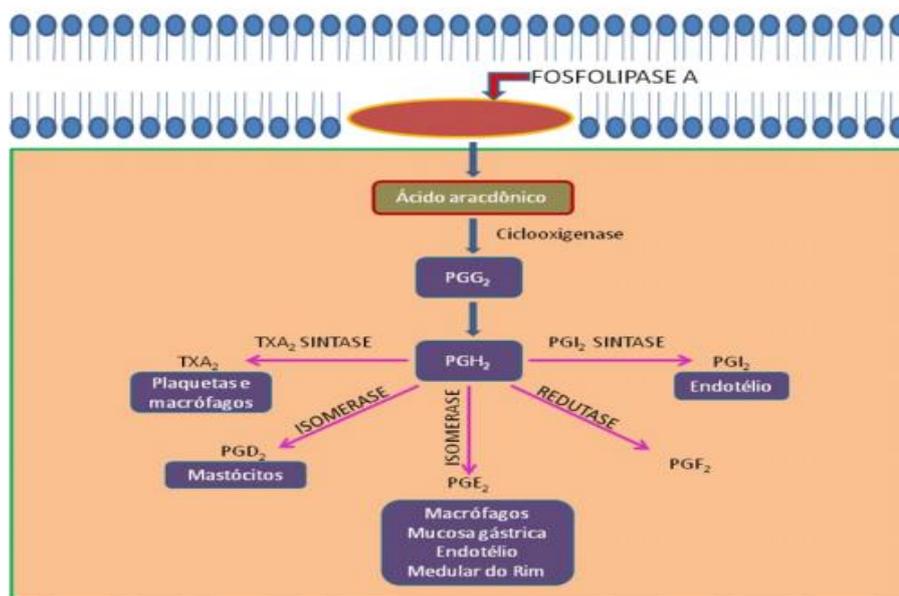
3.2 Anti-inflamatórios Não-esteroidais

Os AINES compreendem uma série de componentes heterogêneo, que consiste em um grupo ácido funcional ligado a um ou mais anéis aromáticos. Neste grupo, o principal mecanismo de ação envolve inibição específica da cicloxigenase (COXs) e conseqüente redução de prostaglandinas pela ausência de conversão do ácido araquidônico. Os AINES são classificados quimicamente como ácidos orgânicos fracos de atuação principal em tecidos inflamados se ligando significativamente à albumina plasmática (OLIVEIRA Jr. et al., 2007; SOLOMON et al., 2007). Uma característica dos AINEs é que todos são excretados predominantemente pela urina, após serem convertidos em metabólitos inativos pelo fígado (KLIPPEL et al., 2001).

Os AINEs constituem um grupo, sendo na maioria agentes com ação anti-inflamatória, analgésica e antitérmica combatendo assim os principais sintomas gerados pela produção de prostaglandinas. Esses fármacos são amplamente utilizados no combate a agentes causadores de dor aguda crônica e febre. Desta maneira, são os medicamentos mais prescritos e usados pela maioria das pessoas no mundo inteiro, em conjunto com os analgésicos e antitérmicos (HILÁRIO et al., 2006).

De acordo com Brasileiro Filho (2006) e Oliveira Jr. e colaboradores (2007) O ácido araquidônico é obtido através da dieta ou do ácido linoleico e se apresenta em todos os tecidos animais. As prostaglandinas são substâncias que apresentam diferentes funções orgânicas. Estas moléculas, fazem parte de um grupo conhecido como eicosanóides derivados do metabolismo do ácido araquidônico e liberados de fosfolípídeos de membrana de células lesadas por ação catalítica da fosfolipase A2 (figura 5).

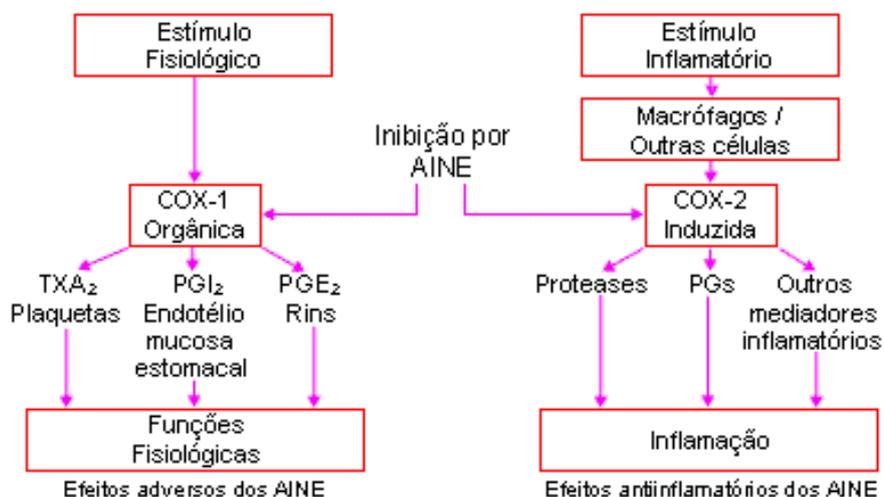
Figura 5. Produção de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico.



Fonte: Adaptado de BRASILEIRO FILHO (2006)

As enzimas COX-1, COX-2 e hidroxiperoxidase catalisam as etapas sequenciais de síntese de prostanóides, enquanto as lipoxigenases transformam o ácido araquidônico em LT e outros compostos mostrados na figura -- (BRENOL et al., 2000; OLIVEIRA Jr. et al., 2007).

Figura 6. Formação de eicosanóides a partir de diferentes estímulos em COX-1 e COX-2.

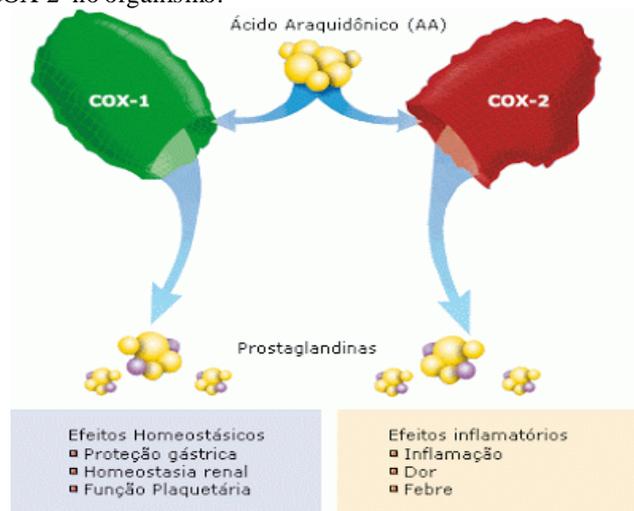


De acordo com Rang e colaboradores (2007), as principais ações farmacológicas dos AINES compreendem atividade antipirética, anti-inflamatória e analgésica, estas características os deixa na frente do ranking dos medicamentos mais usados hoje em dia. Podemos encontrar no mercado mais de 50 diferentes AINES, no entanto, nenhum deles possui a atividade de um fármaco ideal no combate dos sinais da inflamação, uma vez que na sua maioria promovem inibição não seletiva da COX. Segundo Palaska e colaboradores (2002) nesta classe de fármacos estão inclusos diversos grupos, como os salicilatos (ex. aspirina), os derivados do ácido propiônico (ibuprofeno), os derivados indolacéticos (indometacina e diclofenaco); os oxicans (piroxican e meloxican) entre outros.

Os efeitos colaterais gástricos e extragástricos provocados pelos AINES, ocorrem devido a inibição da COX, característica essa que os tornam medicamentos anti-inflamatórios. A enzima COX-1 está envolvido nos processos fisiológicos, enquanto o que enzima COX-2 é induzida pela presença de PGs liberadas por processos inflamatórios. Essa diferença foi de fundamental importância para a busca e desenvolvimento novas drogas anti-inflamatórias com efetividade na COX-2 (TURINI; DUBOIS, 2002). A partir da descoberta que o meloxican, AINE não específico, possuía habilidade 10X maior de inibição da COX-2 quando comparado a COX-1 contribuiu a aceitação de uma droga com atividade analgésica e anti-inflamatória e ainda menor agressão gástrica (RIOJA et al., 2002). A partir de estudos com este fármaco, surgiram os medicamentos conhecidos como coxibs, AINEs seletivos da COX-2. O desenvolvimento destes compostos tinha o intuito de prevenção aos efeitos adversos apresentados pelos AINEs convencionais, evitando os danos gastrointestinais devido a uma baixa inibição de prostaglandinas gastroprotetoras derivadas da ação da COX-1 e ainda permanecendo eficiência anti-inflamatória (SINGH et al., 2004).

Os representantes coxibs, como: celecoxibe, rofecoxibe, etorocoxibe, lumiracoxibe, paraminofenol, fazem parte de uma grande gama de compostos seletivos de COX-2. Porém, apesar da eficiência, estudos demonstraram que os inibidores seletivos da COX-2 podem promover hipertensão arterial. Por aumentar os risco de enfarto do miocárdio, o rofecoxibe, o celecoxibe e o valdecoxibe tiveram seu uso suspenso e foram retirados de circulação (RAO, CHEN; KNAUS, 2006;).

Figura 7. Efeitos fisiológicos causados pelos produtos gerados a partir do ácido araquidônico pelas enzimas COX-1 e COX-2 no organismo.



Fonte: <http://biocolesterol.blogspot.com.br>, Dez 2013

4 FISIOPATOLOGIA DA DOR

De acordo com Lee e colaboradores (2005) a dor é um processo pelo qual o organismo entra em estado de alerta para perigos reais ou iminentes, induzindo reflexos de coordenação e respostas comportamentais para que o dano seja o menor possível aos tecidos. Uma vez instalado o dano, alterações do sistemas nervoso periférico e central estabelecem modificações no aumento da sensibilidade, gerando dor no tecido lesado e zonas adjacentes. Segundo Usunnoff e colaboradores (2006) o objetivo desta ação, reside na proteção da região danificada até que haja o reparo total da lesão. Apesar da ação protetora, caso os danos atinjam as vias nervosas centrais ou mesmo periféricas, dores persistentes podem ser desencadeadas acarretando em sofrimento e nenhum benefício biológico.

A Associação Internacional para o Estudo da dor (IASP) define a dor como sendo uma experiência sensorial desagradável associada ao fator emocional gerada por dano tecidual (IASP, 1979). Nasser e colaboradores (2004) definiram a nocicepção como sendo o mecanismo de transmissão neurofisiológico específico do nervo não envolvendo a dor psicológica.

Por apresentar influência dos fatores emocionais, ambientais e a experiência pessoal, a sensação de dor torna-se de difícil percepção e conseqüentemente apresenta dificuldades para o tratamento clínico (JULIOS; BASBAUM, 2001; CALVINO, 2006).

A expressão de dor é variável quando consideramos indivíduos distintos, ou mesmo com diferenças culturais (COLLINS, 1978; STEEDS, 2009). Segundo a Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor - SBED (2005) a dor caracteriza a principal razão da procura aos consultórios médicos. Publicações de Teixeira (1995) já relataram que no Brasil mais de 70% da população que procura ajuda médica sofre de dor e que mais da metade dos indivíduos portadores da dor tornam-se total ou parcialmente incapacitados para atividades rotineiras transitória ou permanentemente. Nos últimos 30 anos, as pesquisas em dor tem-se revelado mais intensas no intuito de minimizar os sintomas e diminuir a taxa de mortalidade causadas por esta doença (YENG; TEIXEIRA, 2005).

4.1 Mecanismo da Dor

Um complexo conjunto de vias periféricas captam mensagens ambientais que são codificadas em potencial de ação e transmitidos através das fibras aferentes de ordem primária, secundária e terciária ao sistema nervoso central -SNC (SBED, 2005; STEEDS, 2009). Os nociceptores são terminações nervosas livres presentes em fibras mielínicas do tipo "A- δ " e as amielínicas do tipo "C". A atividade nociceptiva é modulada através da ação de compostos algogênicos (SMIDERLE, 2008). Estes promovem o estado de hiperalgesia termomecânica e pela vasodilatação observada em lesões mecânicas, inflamatórias e isquêmicas.

O mecanismo de percepção da dor, pode ser dividido em três tipos: a) transdução -fenômeno pelo qual os nociceptores são ativados através de estímulo mecânico, térmico ou químico; b) transmissão - conjunto de nervos pelos quais o impulso nervoso, gerado ao nociceptor, se propaga até o SNC e c) A modulação - processo de supressão da dor ativado pelas próprias vias nociceptivas (VANDERMEULEN, 2000).

Neste contexto a dor pode ser entendida por três diferentes formas: a dor de origem nociceptiva, a dor de origem inflamatória e a dor origem neuropática.

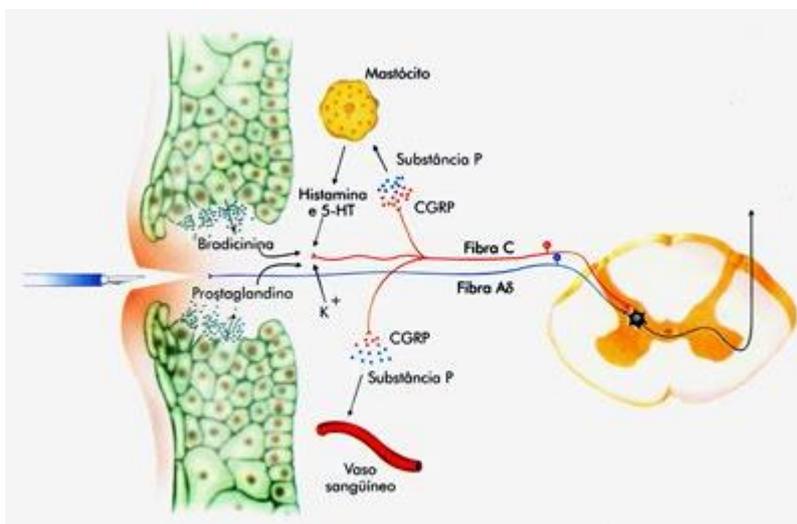
A dor nociceptiva resulta da ativação de nociceptores primários, àqueles cuja função está intimamente ligada a percepção de dor para proteção da área tecidual lesada.

A dor inflamatória é decorrente da liberação de mediadores químicos na região lesada, independentemente do tipo de inflamação ocorrida.

E a dor neuropática: origina-se de lesões que atingem os nervos periféricos e centrais e de neurônios. Este tipo de manifestação dolorosa é acompanhada por dor intensa e espontânea e por dor provocada por leve estímulo.

Segundo Zeilhofer (2007) Quando a dor inflamatória e neuropática excedem a causa primária, a dor pode se tornar crônica, o que é caracterizado pela constante sensibilização do nervo em produzir um potencial de ação traduzido como dor, ou seja a resposta ao estímulo doloroso não é proporcional à intensidade da agressão caracterizando a hiperalgesia ou estímulos antes considerados inócuos agora são percebidos como dolorosos o que é conhecido como alodinia (KRAYCHETE, 2006).

Figura 8. Mecanismos da dor nociceptiva e inflamatória



Fonte: ACUPUNTURA DE CHAKRA, Jan 2014

5 NEOPLASIAS

As neoplasias são caracterizadas por desordens do processo de divisão celular, como por exemplo proliferação descontrolada e autônoma. Alguns genes estão envolvidos na regulação do crescimento e diferenciação celular, consequentemente alterações nestes genes levam ao descontrole nos mecanismos de regulação do ciclo celular promovendo à célula perda ou redução da capacidade de diferenciação (BOGLIOLO e BRASILEIRO FILHO, 2006).

Células integras apresentam mecanismo de regulação e reconhecimento normais e boa aderência tecidual. O núcleo se apresenta sem alterações morfológicas dentre outras características. Enquanto, que células cancerígenas apresentam independência dos fatores de crescimento, perda de inibição por contato o que leva a tumorigênese, perda do controle de apoptose e imortalidade (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Alterações de membrana, citoplasma e núcleo, são visíveis e marcantes em células cancerígenas, como perda de adesividade e mudança superficial de antígenos da membrana, aumento da relação núcleo-citoplasma e anormalidades no tamanho da célula. Entre as características mais marcantes estão as anormalidades nucleares, como: hiperploídia, multiplicidade nuclear, hiperplasia e nucléolos mais visíveis (APTISIAURI, 2007).

A carcinogênese é conhecida como o desenvolvimento neoplásico a qual é entendida como um complexo processo que envolve as etapas de iniciação, promoção e progressão celular.

A iniciação caracteriza-se por um desvio permanente do genoma por um agente oncogênico, que por sua vez faz com que a célula torne-se menos controlável pelos fatores de crescimento, indutores da diferenciação celular ou a morte programada. Agentes carcinogênicos possuem alta atração aos compostos nucleofílicos, como os ácidos nucleicos DNA e RNA e proteínas (KUMMAR, 2005).

A promoção consiste na proliferação da célula já iniciada devido a interação de fatores de crescimento e citocinas aos seus receptores. De forma lenta e gradual, a célula mutada, transforma-se em uma célula maligna e a formação de clones e desordem tissular é estimulada pela presença dos oncopromotores. Fenóis e Ésteres de forbol são bem conhecidos como agentes promotores (SILVA e HARTMANN, 2006) Esses agentes cancerígenos provocam a irritação tecidual e reação inflamatória, no entanto, uma vez

afastados podem cessar o processo de promoção (BOGLIOLO e BRASILEIRO FILHO, 2006).

A etapa de progressão está relacionada ao acúmulo de diversas modificações biológicas e agressividade celular aumentada, que por sua vez promove a proliferação celular descontrolada e disseminação da célula maligna através de metástase, processo este irreversível. A evolução do tumor possui íntima relação a resposta imunitária e fatores hormonais do hospedeiro (BOGLIOLO e BRASILEIRO FILHO, 2006).

Objetivando um tratamento com eficiência para o câncer, várias formas terapêuticas têm sido desenvolvidas, como: cirurgias, radioterapias e quimioterapia (GUIDA et al., 2008; REINER et al., 2008). No entanto, a busca da terapia com novos agentes químicos tem despertado o interesse dos pesquisadores uma vez, que essas substâncias possuem espectro de ação no bloqueio do desenvolvimento da célula cancerígena ou mesmo sua destruição, agindo através de uma grande variedade de mecanismo celulares. Enquanto que os métodos com radionuclídeos e ou cirúrgicos são efetivos para tumores sólidos, no tratamento de tumores disseminados, atuam apenas de forma paliativa. Por essa especificidade, a quimioterapia é mantida como escolha no tratamento de diversos tipos de câncer, apesar de seus efeitos tóxicos e não seletivo por células mutadas ser um fator limitante no uso dos agentes quimioterápicos (BAXEVANIS et al., 2009).

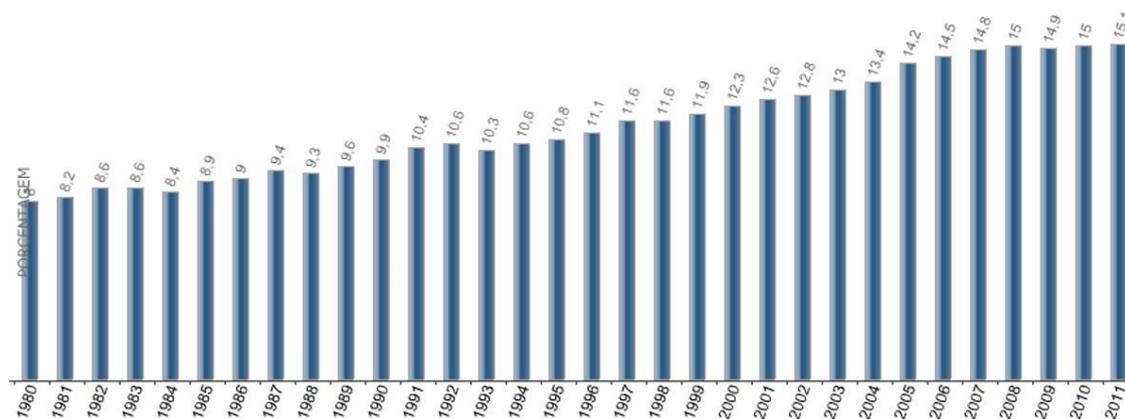
5.1 Epidemiologia do Câncer

Hoje o câncer se apresenta como um dos grandes vilões da saúde pública, seja em países em desenvolvimentos ou mesmo os desenvolvidos. O número de casos de neoplasias malignas torna-se crescente em nível mundial. Pesquisas mostraram que no ano de 2000 foram contabilizados 4,7 milhões de novos casos em mulheres e 5,3 milhões de casos de câncer em homens. Mais de 6 milhões de pessoas foram vítimas fatais do câncer e deste valor mais da metade foram do sexo masculino. Dentre todos os tipos de causa de morte, o câncer foi responsável por 12 % de casos (INCA, 2012).

Se a atual tendência de câncer continuar, estima-se que daqui a duas décadas a incidência da doença tenha aumento considerável em mais de 50 % no número de casos. São estimados cerca de 24 milhões de casos prevalentes no mundo. Países como Estados

Unidos, Alemanha, França, entre outros ranqueiam a maior incidência de câncer entre os países desenvolvidos, enquanto que países de baixa qualidade de vida como alguns no leste asiático e africanos abrigam os mais altos índices de câncer dentro do grupo de países em desenvolvimento. Em uma escala crescente destacam-se o câncer de pulmão, o câncer de mama feminino, o câncer de cólon e reto seguido do câncer de estômago.

Figura 9. Mortalidade proporcional por câncer no Brasil entre 1980 e 2011



Fonte: Inca, 2012

No Brasil, a incidência de câncer tem chegado a níveis cada vez maiores em decorrência da modificação demográfica sofrida pela população, como por exemplo, aumento da expectativa de vida e maior crescimento do número de idosos, bem como diminuição da taxa de fecundidade. Com estas mudanças, está-se tornando cada vez mais frequente a presença de doenças crônico-degenerativas na população, dentre as quais destaca-se o câncer. (INCA, 2012)

Figura 10. Anos potenciais de vida perdidos por câncer. Considerando 1000 habitantes de todas as capitais entre 1980 e 2011. APVP – Anos potenciais de vida perdidos; TAPVP – Taxa de anos potenciais de vida perdidos.

Faixa etária	APVP	TAPVP
01-04 anos	441.408	5,08
05-09 anos	414.128	3,81
10-14 anos	354.046	3,17
15-19 anos	442.185	3,81
20-29 anos	1.063.260	4,71
30-39 anos	1.961.916	10,78
40-49 anos	3.698.486	27,67
50-59 anos	4.847.664	54,36
60-69 anos	3.694.432	65,95
70-79 anos	1.021.784	35,04
Total	17.939.309	15,75

Fonte: Inca, 2012

5.2 Morte Celular

Segundo Kroemer (2009) a morte celular é determinada quando uma célula perde sua atividade metabólica, tornando deficiente a manutenção e o transporte da membrana plasmática, acúmulo de íons Na^+ no interior do citoplasma e conseqüentemente, desequilíbrio osmótico, levando a uma completa disfunção do metabolismo celular.

O desenvolvimento e a manutenção dos seres vivos dependem da atividade celular e de como essas células realizam suas funções metabólicas entre o crescimento de uma célula viável e a morte de uma célula defeituosa para manter o equilíbrio homeostático do sistemas fisiológicos de um organismo (MEIER; FINCH e EVAN, 2001).

Os mecanismos de morte celular podem ser definidos de acordo com características bioquímicas e morfológicas e conhecidos principalmente por apoptose, autofagia e necrose (OKADA E MAK, 2004; CASTEDO, 2004).

De acordo com Evan e Littlewood (1998) a tumorigênese está intimamente relacionada as alterações nesse mecanismo de controle da morte celular.

5.3 Tipos de Morte Celular

5.3.1 Necrose

A necrose é considerada um processo de morte em resposta à injúria celular, no entanto, durante o processo necrótico, células vizinhas sofrem agressão pelo contato com o conteúdo intracitoplasmático da célula que sofreu necrose, desencadeando assim o processo inflamatório local. O extravasamento do material citoplasmático se dá, uma vez que a membrana plasmática perde sua integridade, fica sem capacidade de controle osmótico o que resulta em aumento do volume celular e ruptura, gerando extravasamento das enzimas hidrolíticas lisossomais. Outras características comum presente em células necróticas é a formação de agregados de cromatina (ZIEGLER e GROSCURTH, 2004).

5.3.2 Apoptose

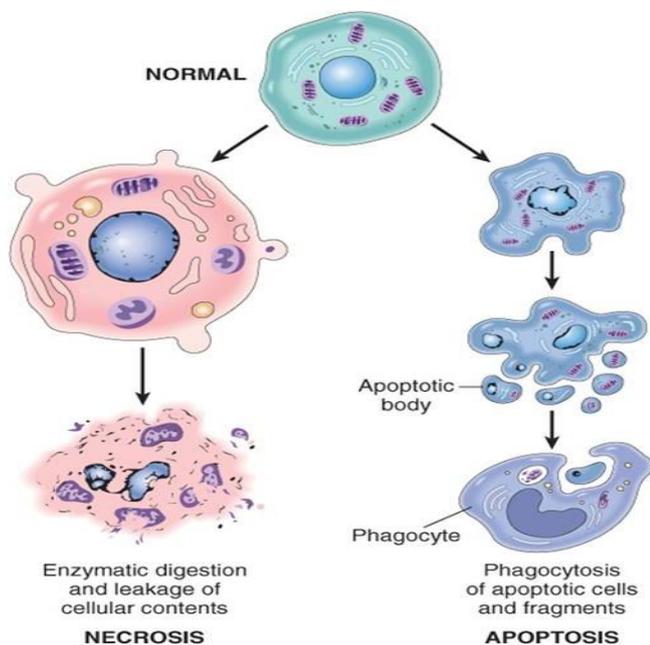
A apoptose apresenta alterações morfológicas bem coordenadas e definidas, não sendo considerada uma resposta acidental (LOCKSHIN e WILLIAMS, 1964). Essas alterações são iniciadas pela retração da célula, causando perda da aderência, seguida de condensação e marginação do material nuclear a carioteca. Na sequência são formadas os “blebs” (prolongamentos da membrana plasmática) e o núcleo inicia um processo de desintegração (EVAN, 2001).

Ao se romper, os blebs dão origem aos corpos apoptóticos que posteriormente são digeridos por células fagocíticas. Este processo de morte celular, quando não acontece de forma exagerada, não gera nenhum dano tecidual local nem promove nenhum tipo de resposta inflamatória, uma vez que todo material intracelular permanece envolto por membrana plasmática, visto que esta não perde sua integridade (ZIEGLER e GROSCURTH, 2004).

Por possuir essas características distintas e ao mesmo tempo benéficas, o processo de apoptose é utilizado como mecanismo de controle homeostático frente a diversas situações orgânicas, como na organogênese, atrofia orgânica, hematopoiese normal e eliminação de células por agentes genotóxicos (RANGANATH e NAGASHREE, 2001).

Estudos realizados por Nicholson (2000) indicam que o mecanismo apoptótico é tido como uma resposta do sistema inato para defender o organismo contra células que iniciam o processo neoplásico e que várias substâncias utilizados como quimioterápicos induzem esse tipo de morte celular.

Figura 11. Diferenças morfológicas celulares entre os processos de morte celular por necrose e apoptose.



Fonte: Robbins e Cotran, 2005

5.4 Terapias para o Câncer

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer – INCA (2012), hoje em dia as Cirurgias e procedimentos rádio e quimioterápicos exibem as melhores respostas para o tratamento do câncer. Todos essas terapias buscam a melhoria da qualidade vida, aumento de sobre-vida do paciente e se possível a cura. Para tumores localizados e em estágios

iniciais as cirurgias ou a radioterapia ou ainda a junção das duas técnicas são às formas de tratamento mais indicados e que alcançam maior sucesso para esses tipos de tumor.

As intervenções cirúrgicas podem ser realizadas em tumores em estágio inicial ou avançado. Na primeira, a tentativa é de promover ao paciente maiores chances curativas a partir da remoção completa do tumor. Enquanto que na segunda, o procedimento é realizado na tentativa de redução da massa tumoral, afim de evitar disseminação das células mutadas, e associada a outro tipo de tratamento. (INCA, 2012).

Segundo o INCA (2012) a radioterapia é a técnica mais adequada para tumores localizados e sólidos, uma vez que feixes radioativos são emitidos diretamente no tecido afetado, fazendo com que essa terapia seja mais apropriada para este tipos de canceres. Apesar de apresentar maior eficiência e rapidez na morte celular, a radiação ionizante utilizada neste tipo de tratamento pode oferecer riscos ao paciente que se submete a este procedimento, uma vez que células normais adjacentes a massa tumoral que sofreu a emissão radioativa, podem sofrer mutações e conseqüentemente expor o paciente a um novo câncer. (INCA, 2012).

A quimioterapia baseia-se no uso de drogas com alto poder alquilante e antimetabólitos e apesar da existência de uma variedade de substâncias químicas disponíveis para o tratamento do câncer, nem sempre se obtém sucesso na cura e os efeitos adversos, ainda, são devastadores. Com isso, torna-se incessante a busca de novos fármacos antitumorais mais efetivos e apresentem menos efeitos colaterais. (SALGALLER; LODGER, 1998).

Dentre os agentes quimioterápicos utilizados no tratamento dos diversos tipos de tumores, podemos destacar:

Agentes inibidores de mitose – evitam a formação dos microtúbulos, uma vez que inibem a síntese da tubulina (molécula proteica responsável pela estruturação do fuso acromático), conseqüentemente não há migração centriolar e a célula pára na fase da metáfase (JORDAM; WILSON, 2004)

Antibióticos antitumorais/Agentes antimetabólitos - Substâncias que interagem diretamente com a molécula de DNA inibindo sua síntese e a interação com enzimas reguladoras como a topoisomerase I, no entanto não possuem especificidade em nenhuma fase dentro do ciclo celular (EFFERTH, 2007; INCA, 2012).

Agentes alquilantes – compostos com poder de inclusão de um grupo alquil em substituição a um hidrogênio (INCA, 2012)

Referências

6 REFERÊNCIAS

ACUPUNTURA DE CHAKRA. Disponível em <<http://etnomedicina.blogspot.com.br/>>, acesso em 10 de Janeiro de 2014

ALBA-LOUREIRO, T.C.; MARTINS, E.F.; MIYASAKA, C.K.; LOPES, L.R.; LANDGRAF, R.G.; JANCAR, S.; CURI, R.; SANNOMIYA, P. Evidence that arachidonic acid derived from neutrophils and prostaglandin E2 are associated with the induction of acute lung inflammation by lipopolysaccharide of *Escherichia coli*. **Inflammation Research**, v. 53, p. 658-663, 2004.

ANTONINI, I.; CLAUDI, F.; CRISTALLI, G.; FRANCHETTI, P.; GRIFANTINI, M.; MARTELLI, S. **Journal Medicinal Chemistry**, 24, 1181, 1981.

APTSIAURI, N.; CABRERA, T.; MENDEZ, R.; GARCIA-LORA, A.; RUIZ-CABELLO, F.; GARRIDO, F. Role of altered expression of HLA class I molecules in cancer progression. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.601, p.123-131, 2007.

AREND, W.P. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. **Journal of Clinical Investigation**, 88, 1445-1451, 1991.

ASÍS, S. E.; BRUNO, A. M.; MOLINA, D. A.; CONTI, G. M.; GAOZZA, C. H. **Farmaco**, 51, 419, 1996.

BAXEVANIS, C.N.; PEREZ, S.A.; PAPAMICHAIL, M. Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy. **Cancer immunology, Immunotherapy**, v. 58, p. 317-324, 2009.

BERALDO, H.; SINISTERRA, R. D.; TEIXEIRA, L. R.; VIEIRA, R. P.; DORETTO, M. C.; **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 206, 241, 2002.

BERALDO, Heloisa; GAMBINO, Dinorah. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.4, n.1, p. 31-39, 2004.

BOVE, P.F.; VAN DER VLIET, A. Nitric oxide and reactive nitrogen species in airway epithelial signaling and inflammation. **Free Radic Biol Med**, v.41, n.4, p.515-527, 2006.

BRASILEIRO-FILHO, G. **Bogliolo Patologia**, Ed. 7, 2006.

BRENOL, J.C.T; XAVIER, R.M; MARASCA, J. Anti-inflamatórios não hormonais convencionais. **Rev Bras Med**, v. 57, 2000.

BUDHU, A.; WANG, X.W. The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. **Journal of Leukocyte Biology**, v.80, p.1-17, 2006.

CALVINO, B. Neural basis of pain. *Psychology e Neuropsychiatrie Vieillissement*, v. 4, n. 1, p. 7-20, 2006.

CARECETTO, H.; DI MAIO, R.; GONZÁLEZ, M.; RISSO, M.; SAGRERA, G.; SEOANE, G.; DENICOLA, A.; PELUFFO, G.; QUIJANO, C.; BASOMBRIIO, M. A.; PAULINO, M.; OLEA-AZAR, C.; **European Journal Medicinal Chemistry**, 35, 343, 2000.

CASAS, J. S.; GARCÍA-TASENDE, M. S.; SORDO. **Journal Coordination Chemistry Reviews**, 209, 197, 2000.

CASCAO, R.; ROSARIO, H.S.; FONSECA, J.E. Neutrophils: warriors and commanders in immune mediated inflammatory diseases. **Acta Reumatol Port**, v.34, n.2B, p.313-326, 2009.

CASTEDO, M.; PERFETTINI, J.L.; ROUMIER, T.; ANDREAU, K.; MEDEMA, R.; KROEMER, G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**. v. 23, p. 2825-837, 2004.

CHAHADE, W.H; GIORGI, R.D.N and SZAJUBOK, J.C.M. Antiinflamatórios não hormonais. **Einstein**, 6 (Supl 1):S166-S174, 2008.

CHAROKOPOS, N.; APOSTOLOPOULOS, N.; KALAPODI, M.; LEOTSINIDIS, M.; KARAMANOS, N.; MOUZAKI, A. Bronchial asthma, chronic obstructive pulmonary disease and NF-kappaB. **Current Medicinal Chemistry**, v.16, n.7, p.867-883, 2009.

COECKE, S., BLAAUBOER, B. J.; ELAUT, G.; FREEMAN, S.; FREIDIG, A.; GENSMANTEL, N.; HOET, P.; KAPOULAS, V. M.; LADSTETTER, B.; LANGLEY, G.; LEAHY, D.; MANNENS, G.; MENEGUZ, A.; MONSHOUWER, M.; NEMERY, B.; PELKONEN, O.; PFALLER, W.; PRIETO, P.; PROCTOR, N.; ROGIERS, V.; ROSTAMI-HODJEGAN, A.; SABBIONI, E.; STEILING, W.; VAN DE SANDT, J. J. Toxicokinetics and metabolism. **Alternatives to laboratory animals**. suppl 1, p. 147-175, 2005.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.; ROBBINS. Pathologic basis of disease. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999.

COLLINS, V.J. Mecanismos de Controle da dor. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1978.

COMMINS, S.P.; BORISH, L.; STEINKE, J.W. Immunologic Messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.125, n.2, p.:S53-72, 2010.

CORSINI, E.; DI PAOLA, R.; VIVIANI, B.; GENOVESE, T.; MAZZON, E.; LUCCHI, L.; MARINOVICH, M.; GALLI, C.L.; CUZZOCREA, S. Increased carrageenan-induced acute lung inflammation in old rats. **Immunology**, v.115, p.253-261, 2005.

CRUVINEL, Wilson de Melo; JÚNIOR, Danilo Mesquita; ARAÚJO, Júlio Antônio Pereira; CATELAN, Tânia Tiekao Takao Catelan; SOUZA, Alexandre Wagner Silva de;

SILVA, Neusa Pereira da; ANDRADE, Luís Eduardo Coelho. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.50, n.4, p. 434-447, 2010.

DE CASTRO FRANCA, S.; CORREA, M. M.; DOS SANTOS SCHIVO, I. R.; GARCIA LEME, J.; GIGLIO, J. R. A low molecular weight proinflammatory factor from rat spleen lymphocytes. Isolation and partial characterization. **Inflammation**, v. 30, n. 3-4, p. 87-96, 2007.

DIMMOCK, J. R.; SIDHU, K. K.; THAYER, R. S.; MACK, P.; DUFFY, M. J.; REID, R. S.; QUAIL, J. W.; PUGAZHENTHI, U.; ONG, A.; BIKKER, J. A.; WEAVER, D. F.; **Journal Medicinal Chemistry**,36, 2244, 1993.

DINARELLO, C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v.87, n. 6, p. 2095-2147, 1989.

DOBEK, A. S.; KLAYMAN, D. L.; DICKSON JR., E. T.; SCOVIL, J. P.; TRAMONT, E. C.; **Antimicrobial and Agents Chemotherapy**,1980.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chemico-biological Interactions**, 73, 1–27, 1990

DONNICI, C. L. ; NOGUEIRA, L. J. ; MONTANARI, C. A. ; CASS, Q. B. ; JARDIM, I. ; LEITÃO, A. **Ciência Hoje**, v. 42, p. 38, 2008.

DU, X.; GOU, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; CAFFREY, C. R.; HOLLER, T. P.; MCKERROW, J. H.; COHEN, F. E. **Journal Medicinal Chemistry**,45, 2695, 2002.

EFFERTH, T.; LI, P. C. H.; KONKIMALLA, V. S. B.; KAINA, B. New strategies for combating multidrug-resistant bacteria **Trends Mol. Med.** v. 13, p. 353, 2007.

EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, 411, 342-348, 2001.

FEUN, L.; MODIANO, M.; LEE, K.; MAO, J.; MARINI, A.; SAVARAJ, N.; PLEZIA, P.; ALMASSIAN, B.; COLACINO, E.; FISCHER, J.; MACDONALD, S.; **Cancer Chemother. Pharmacol.** 50, 223, 2002.

FILIPPIN, Lidiane Isabel; VERCELINO, Rafael; MARRONI, Norma Possa; XAVIER, Ricardo Machado. Influência de Processos Redox na Resposta Inflamatória da Artrite Reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n. 1, p. 17-24, Jan/Fev 2008.

FRODE, T.S.; SOUZA, G.E.; CALIXTO, J.B. The modulatory role played by TNF-alpha and IL-1 beta in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Cytokine**, 13, 162-168, 2001.

FUJISAWA, T.; VELICHKO, S.; THAI, P.; HUNG, L.Y.; HUANG, F.; WU, R. Regulation of airway MUC5AC expression by IL-1beta and IL-17A; the NF-kappaB paradigm. **Journal Immunology**, 183, 10, 6236-6243, 2009.

GORSKA, K.; MASKEY-WARZECHOWSKA, M.; KRENKE, R. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. **Current Opinion and Pulmonary Medicine**, v.16, n.2, p.89-96, 2010.

GUIDA, C.; MAIONE, P.; ROSSI, P.; BARESCINO, M.; SCETTINO, C.; BRAZAGUI, D.; ELMO, M.; GRIDELLI, C. Combined chemo-radioterapy for locally advanced non-small cell lung câncer: current status and future development. **Critical reviews in Oncology/Hematology**, v. 68, p. 222-232, 2008.

HANSSON, M.; OLSSON, I.; NAUSEEF, W.M. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, p. 214-224, 2006.

HEMMRICH, K.; KRÖNCKE, K.; SUSCHEK, C.V.; KOLB-BACHOFEN, V.. What sense lies in antisense inhibition of inducible nitric oxide synthase expression? **Nitric Oxide**, v. 12, p. 183-199, 2005.

HILÁRIO, M.O.E.; TERRERI, M.T.; LEN, C.A. Non steroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. **J Pediatr**, 82(5 Suppl):S206-12, 2006.

HIPPE, A.; HOMEY, B.; MUELLER-HOMEY, A. Chemokines. **Recent Results in Cancer Research**, v.180, p.35-50, 2010.

IASP. International Association for the Study of Pain, 1979. Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org/terms-p.html>>. Acesso em: 15 de Dezembro de 2013.

ILYIN, V. I.; HODGES, D. D.; WHITTEMORE, E. R.; CARTER, R. B.; CAI, S. X.; WOODWARD, R. M. **British Journal of Pharmacology**,144, 801, 2005.

INSTITUTO Nacional do Câncer (INCA). Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012>>. Acesso em: 11 Janeiro de 2014.

Jordan, M. A.; Wilson, L.; *Nat. Rev. Cancer*. **2004**, 4, 253. CROSSREF.

JULIOS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.

KALINOWSKI, D.S. et al. Design, synthesis, and characterization of novel iron chelators: structure–activity relationships of the 2-benzoylpyridine, 2007.

KARAH, N.; **European Journal Medicinal Chemistry**, 37, 909, 2002.

KASUGA, N. C.; SEKINO, K.; ISHIKAWA, M.; HONDA, A.; YOKOYAMA, M.; NAKANO, S.; SHIMADA, N.; KOUMO, C.; NOMIYA, K.; **Journal of Inorganic Biochemistry**, 96, 298, 2003.

KELLEHER, Z.T.; MATSUMOTO, A.; STAMLER, J.S.; MARSHALL, H.E.; KIM, J.Y., KIM, D.H., KIM, H.G., SONG, G., CHUNG, Y.C., ROH, S.H., JEONG, H.G. Inhibition of tumor necrosis factor- α -induced expression of adhesion molecules in human endothelial cells by the saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum*. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 210, 150-156, 2006.

KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase: friend or foe. **Journal Leukocyte Biology**, v.77, p.1-28, 2005.

KLIPPEL, J.H; WEYAND, C.M and WORTAMANN, R.L. Primer in the rheumatic diseases. **Ed Arthritis Foudation, Georgia**, p. 583-91, 2001.

KORHONEN, R.; LAHTI, A.; KANKAANRANTA, H.; MOILANEN, E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. **Current Drug Targets - Inflammation & Allergy**, v.4, n.4, p.471-479, 2005.

KRAYCHETE, D.C.; GUIMARÃES, A.C. Visceral hyperalgesia and chronic abdominal pain: diagnostic and therapeutic approach. *Revista Brasileira de de anesthesiologia*, v. 53, p. 833-853, 2003.

KROEMER, G.; et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death Differentiation**.16: 3–11, 2009.

KUMAR, M.; SHARMA, Uma D. Effect of pressure on nanomaterials. **Physica B: Condensed Matter**. 405, 13, 2820-2826, July 2010.

KUNKEL, S.L.; STRITER, R.M.; CHENSUE, S.W.; CAMPBELL, D.G; REMICK, D.G. The role of TNF in diverse pa-thologic processes. **Biotherapy**, 3, 135-141, 1991.

LEE, Y.; CHANG-HUN LEE, C.H.;UHTAEK, O.H. Painfull channels in Sensory Neurons. **Molecules and Cells**, v. 20, n. 3, p. 315-324, 2005

LOCKSHIN, R.A.; WILLIAMS, C.M. Programmed cell death II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. **Journal of Insect Physiology**, 10:643-49, 1964.

MA, THOMAS Y.; AL-SADI, RANA; DONGMEI YE; SAID, HAMID M. IL-1 β Induced Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability is mediated by MEKK-1 Activation of Canonical NF-kB Pathway. **The American Journal of Pathology**, v. 177, n. 5, p. 2310-2322, November 2010.

MARIOTTO, S.; SUZUKI, Y.; PERSICHINI, T.; COLASANTI, M.; SUZUKI, H.; MATTEI, C.; MOLGO, J.; JOSEPH, X.; ISRAEL, M.; BLOY, C. **Neuroscience Letters**, 271, 183, 1999.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v.454, n.7203, p.428-435, 2008.

MEIER, P. FINCH, A. EVAN, G. Apoptosis in development. **Nature**, 407, 796-801, 2000.

MICROBIOLOGIA e imunologia On-line – Citocinas e Imunoregulação, Capítulo treze. Disponível em: <<http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/immuno-port-chapter13.htm>>. Acesso em: 06/10/2013.

MILLER, A.; STANTON, C.; DEVERY, ROSALEEN. Modulation of arachidonic acid distribution by conjugated linoleic acid isomers and linoleic acid in MCF-7 and SW480 cancer cells. **LIPIDS**, v. 36, n. 10, p. 1161-1168, 2001.

MONROY, R.L.; SKELLY, R.R.; DAVIS, T.A.; MAC VITTIE, T.J. Therapeutic evaluation of interleukin-1 for stimulation of hematopoiesis in primates after autologous bone marrow transplantation. **Biotherapy**, 4, 97-108, 1992.

NASSER, S.; BILAL, S.; DOUGLAS, B.; PAULO, S.; FRANCISCO, H.; NAGIDA, S. Temas de revisión: manejo del dolor agudo en el postoperatorio. **Revista de Medicina Interna y medicina Crítica**, v. 1, n. 3, p. 118-125, 2004.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 173-182, 2006.

NICHOLSON, B. Differential diagnosis: nociceptive and neuropathic pain. *Am. J. Manag. Care*, v. 12, p. S256-S26, 2006.

NICHOLSON, D.W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**, v. 407, p. 810-16, 2000.

OKADA, H.; MAK, T.W. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer**. v. 4, p. 592-603, 2004.

OKAMOTO, T.; GOHIL, K.; FINKELSTEIN, E.I.; BOVE, P.; AKAIKE, T.; VAN DERVLIET, A. Multiple contributing roles for NOS2 in LPS-induced acute airway inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. v. 286, p. 198-209, 2004.

OLIVEIRA Jr, J.O; SERRANO, S.C; TEODORO, A.L and DANA BA. Os antiinflamatórios não hormonais. **Prática hospitalar**, v. 51, p. 173-8, 2007.

PALASKA, E.; SAHIN, G.; KELICEN, P; DURLE, N. T.; ALTINOK, G. Synthesis anti-inflammatory activity of 1-acylthiosemicarbazides, 1,3,4-thiadiazoles and 1,2,4-triazole-3-thiones. **IL Farmaco**, v. 57, p. 101-107, 2002.

PRIETO, P.; BAIRD, A. W.; BLAAUBOER. B. J.; CASTELL RIPOLL, J. V.; CORVI, R.; DEKANT, W.; DIETL, P.; GENNARI, A.; GRIBALDO, L.; GRIFFIN, J. L.; HARTUNG, T., HEINDEL, J. J.; HOET, P.; JENNINGS, P.; MAROCCHIO, L.; NORABERG, J.; PAZOS, P.; WESTMORELAND, C.; WOLF, A.; WRIGHT, J.; PFALLER, W. The assessment of repeated dose toxicity in vitro: a proposed approach.

The report and recommendations of ECVAM workshop 56. **Alternatives to laboratory animals**. v. 34, n. 3, p.315-41, 2006.

PURCHASE, I. F.; BOTHAM, P. A.; BRUNER, L. H.; FLINT, O. P.; FRAZIER, J. M.; STOKES, W. S. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. **Toxicological Sciences**. v.43, n.2, p.86-101, 1998.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. "Inflamacao e Antiinflamatorios". In: Farmacologia, 6 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. cap. 13-14, p. 211-245.

RANGANATH, R.M.; NAGASHREE, N.R. Role of programmed cell death in development. **Int Rev Cytol**. v. 202, p. 159-242, 2001.

RAO, P. N. P.; CHEN, Q. H.; KNAUS, E. E. Synthesis and Structure-Activity relationship Studies of 1,3-Diarylprop-2-yn-1-ones: Dual Inhibitors of Cyclooxygenases and Lipoxygenases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 1668-1683, 2006.

REINER, T.; POZAS, A.D.L.; GOMES, L.A.; PEREEZ-STABLE, C. Low dose combinations of 2-methoxyestradiol and docetaxel block prostate cancer cells in mitosis and increase apoptosis. **Cancer Letters**, 2008. Article in press.

RIOJA, I.; TERCENIO, M. C.; UBEDA, A.; MOLINA, P.; TÁRRAGA, A.; TEJERO, A.G.; ALCARAZ, M. J. Pyrroloquinazoline derivative with anti-inflammatory and analgesic activity by dual inhibition of cyclo-oxygenase-2 and 5-lipoxygenase. **European Journal of Pharmacology**, v. 434, p. 177-185, 2002.

ROTHERWELL, N.J. Functions and mechanisms of interleukin 1 in the brain. **Trends Pharmacological in Science**, 12, 430-436, 1991.

RYTER, S.W.; KIM, H.P.; HOETZEL, A.; PARK, J.W.; NAKAHIRA,K.; WANG, X.; CHOI, A.M. Mechanisms of cell death in oxidative stress. **Antioxid Redox Signal**,; v.9 n.1, p.49-89, 2007.

SALGALLER, M.L.; LODGER, P.A. Use of cellular and cytokine adjuvantes in the immunotherapy of câncer. **Journal of Surgical Oncology**. 68: 122-138. 1998.

SBED – Sociedade Brasileira para Estudo da Dor. 2005. Disponível em: www.dor.org.br/dor_impactos.asp. Acesso em: 20 Jan. 2014.

SCHMID-SCHONBEIN, G.W. Analysis of Inflammation. **Annual Review Biomedical Engineering**, v.8, p.93-151, 2006.

SILVA, A.C.M., ANDRADE, E.H.A., CARREIRA, L.M.M., GUIMARÃES, E.F., MAIA, J.G.S. Essential oil Composition of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. **Journal of Essential Oil Research**. 18, 269–271, 2006.

SINGH, S. K.; VOBBALAREDDY, S.; SHIVARAMAKRISHNA, S.; KRISHNAMRAJU, A.; RAJJAK, S. A.; CASTURI, S. R.; AKHILA, V.; RAO, Y. K. Methanesulfonamide group at position-4 of the C-5-phenyl ring of 1,5-diarylpyrazole affords a potent class of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 1683–1688, 2004.

SMEE, D.F., SIDWELL, R.W. A review of compounds exhibiting ant-orthopoxvirus activity in animal models. **Antiviral Research**, 57, 41–52, 2003.

SMIDERLE, F. R.; OLSEN, L. M.; CARBONERO, E. R.; MARCON, R.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; SANTOS, A. R. S.; TORRI, G.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A 3-O-methylated mannogalactan from *Pleurotus pulmonarius*: Structure and antinociceptive effect. **Phytochemistry**, v. 69 p. 2731–2736, 2008.

SOLOMON, D.H. NSAIDs: Mechanism of action. **UpToDate**, June 2007.

STEEDS, C. E. The anatomy and physiology of pain. **Surgery**, v. 27, n. 12, p. 507-511, Dez. 2009.

TAKEUCHI, K.; WATANABE, H.; TRAN, Q.; OZEKI, M.; SUMI, D.; HAYASHI, T.; IGUCHI, A.; IGNARRO, L.J.; OHASHI, K.; HAYASHI, H. Nitric oxide: inhibitory effects on endothelial cells calcium signaling, prostaglandin I₂ production and nitric oxide synthase expression. **Cardiovascular Research**, v. 62, p. 194-201, 2004.

TEITZ, Y.; RONEN, D.; VANSOVER, A.; STEMATSKY, T.; RIGGS, J. L.; **Antiviral Res.** 24, 305, 1994.

TEIXEIRA, M.J., SHIBATA, M.K., PIMENTA, C.A.M., CORREIA, C.F. **Dor no Brasil: estado atual e perspectivas.** São Paulo: Limay, 1995.

THOMSON, A. The Cytokine Handbook, 4th edn. **Academic Press**, 2003.

TRACEY, K.J.; CERAMI, F. A tumor necrosis factor: an update review of its biology. **Critical Care Medicine**, 21, 415-422, 1993

TSUCHIYA, K.; SAKAI, H.; SUZUKI, N.; IWASHIMA, F.; YOSHIMOTO, T.; SHICHIRI, M.; HIRATA, Y. Chronic blockade of nitric oxide synthesis reduces adiposity and improves insulin resistance in high-fat-induced obese mice. *Endocrinology*. 2007. (In press).

TURINI, M. E.; DUBOIS, R. N.; Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. **Annual Review of Medicine**, v. 53, p. 35–57, 2002.

USUNNOFF, K.G.; POPRATILOFF, A.; SCHMITT, O.; WREE, A. Functional neuronatomy of pain. **Advances in Anatomy, Embriology, and Cell Biology**, v. 184, p. 1-115, 2006.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**, v.39, n.1, p.44-84, 2007.

VANDERMEULEN, E. Pain perception, mechanisms of action of local anesthetics and possible causes. **Rev Belge Med Dent.** v. 55, p. 29-40, 2000.

VANE, S. J. Aspirin and other anti-inflammatory drugs. **Thorax**, London, v. 55, sup. 1, p. S3-S9, 2000.

VARELLA, Pedro P. V.; FORTES, Wilma C. Neves. Citocinas: revisão. **Revista brasileira de Alergia e Immunopatologia**, v. 24, n. 4, p. 146-154, 2001.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química nova**, v.28, p. 519-528, 2005.

WARREN, J. D.; WOODWARD, D. L.; HARGREAVES, R. T. **Journal Medicinal Chemistry**, 20, 1520, 1977.

WEST, D. X.; LIBERTA, A.; PADHYE, S. B.; CHIKATE, R. C.; SONAWANE, P. B.; KUMBHAR, A. S.; YERANDE, R. G.; **Coord. Chem. Rev.** 123, 49, 1993.

WU, G.J.; TSAI, G.J. Chitooligosaccharides in combination with interferon-gamma increase nitric oxide production via nuclear factor kappaB activation in murine RAW264.7 macrophages. **Food Chem Toxicol**, v.45, n.2, p.250-258, 2007.

YANG, C.M.; LUO, S.F.; HSIEH, H.L.; CHI, P.L.; LIN, C.C.; WU, C.C.; HSIAO, L.D. Interleukin-1beta induces ICAM-1 expression enhancing leukocyte adhesion in human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: involvement of ERK, JNK, AP-1, and NF-kappaB. **J Cell Physiol**, v.224 n.2, p.516-526, 2010.

YENG, L.T.; TEIXEIRA, M.J. Dor crônica. **Dor é coisa séria**, v. 1, n. 1, p. 3-7, 2005.

ZEILHOFER, H. U. Prostanoids in nociception and pain. **Biochemical of pharmacology**, v. 73, p. 165-174, 2007.

ZHU, L.J.; LANDOLT-MARTICORENA, C.; LI, T.; YANG, X.; YU, X.Q.; GLADMAN, D.D.; UROWITZ, M.B.; FORTIN, P.R.; WITHER, J.E. Altered Expression

of TNF- α Signaling Pathway Proteins in Systemic Lupus Erythematosus. **J Rheumatol**, v.37, n.8, p.1658-1666,2010.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci**. v.19, p.124-28, 2004.

Capítulo 2

Capítulo 2 - VH-25 um novo derivado tiossemicarbazônico induz a morte por apoptose em leucemia promielocítica aguda.

BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY

Jailson Oliveira da Silva, Jeyce Kelle Ferreira de Andrade, Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro, Valéria Rego Alves Pereira, Gardênia Carmem Gadelha Militão, André Luiz de Souza Barros, Dalci José Brondani, Terezinha Gonçalves da Silva, Silene Carneiro do Nascimento.

J.O. SILVA; J.K. ANDRADE; G.C.G. MILITÃO; A.L.S. BARROS; T.G. SILVA; S. C. NASCIMENTO.

Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Artur Sá, s/n, Cidade Universitária, Recife/PE, Brasil.

e-mail: Jailson_silva.22@hotmail.com

M.C.A.B. CASTRO; V.R.A. PEREIRA.

Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ, Av. Moraes Rego - Campus da UFPE, Recife - PE, Brasil.

D. J. BRONDANI

Departamento de Ciências farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Artur Sá, s/n, Cidade Universitária, Recife/PE, Brasil.

RESUMO

Objetivo: Uma classe de compostos que atuam como agentes alquilantes polifuncionais e que tem despertado grande interesse na química medicinal são os tiossemicarbazônicos, por apresentar uma atividade quelante. Este trabalho teve como objetivo verificar a atividade citotóxica de novos derivados tiossemicarbazônicos, e o mecanismo de morte celular de um derivado. **Material e métodos:** Foram realizados testes citotóxicos de novos derivados tiossemicarbazônicos em linhagens de células cancerígenas. O ensaio de citotoxicidade foi feito através do teste do MTT e os experimentos de mecanismo de ação incluíram o teste de exclusão do azul de tripan, análise morfológica por coloração May-Grunwald-Giemsa, Análise morfológica por citometria de fluxo e marcação com anexina V-FITC e Iodeto de propídeo analisados em citometria de fluxo. **Resultados:** Entre os derivados testados o VH-25 foi o que apresentou melhor atividade citotóxica em células HL-60, sendo este o composto selecionado e a linhagem HL-60 foi escolhida para os estudos de avaliação do mecanismo de ação. No teste do azul de tripan o M8A diminuiu a viabilidade celular. A análise morfológica indicou que o VH-25 induziu as células à apoptose, mostrando que o derivado está induzindo as células a sofrerem apoptose pela externalização da fosfatidilserina. **Conclusão:** Os resultados deste trabalho demonstraram que o derivado VH-25 é um agente anticâncer promissor.

Palavras chave: Citotoxicidade, tiossemicarbazônicos, apoptose.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente o câncer é dito como uma doença genética, pois durante seu desenvolvimento passa por diversas instabilidades genômicas que resultam na acumulação de mutações pontuais, deleções, rearranjos cromossômicos complexos e aneuploidias extensas (HARTWELL, KASTAN, 1994). Dentre os principais agentes antineoplásicos utilizados na quimioterapia estão os alquilantes polifuncionais, os antimetabólitos, os inibidores mitóticos, os antibióticos antitumorais entre outros (INCA, 2012).

Uma classe de compostos que atuam como agentes alquilantes polifuncionais e que tem despertado grande interesse na química medicinal são os tiossemicarbazônicos, por apresentar uma atividade quelante, para esta classe de moléculas são descritos uma grande variedade de efeitos biológicos tais como, atividade antitumoral (FEUN et al 2002), Anti-protozoária, (SHIPMAN-JUNIOR C et al, 1986), antiviral (TEITZ et al, 1994), antibacteriana (KASUGA et al., 2003) e citotóxica (KARAH et al., 2002) entre outras, a atividade anticâncer está sendo sem dúvida a mais bem estudada. Modificações estruturais podem manifestar atividades específicas, se tratando de compostos metálicos

essa atividade pode ser modulada através do desenho do ligante ou através da escolha do metal. (Beraldo, H. 2004).

O mecanismo de ação biológico de derivados tiossemicarbazônicos está relacionado a sua capacidade de formar complexos com cátions metálicos, atuando como agentes quelantes sequestrantes (BHARTI et al, 2003; HANG e BERTOZZI 2001). Sua via de indução da morte celular envolve a inibição da enzima ribonucleotídeo redutase, uma enzima importante na catálise dos dextrorribonucleotídeos utilizados na síntese do DNA, impedindo assim o processo de divisão celular. (GÓES e TENÓRIO, 2005). Esta enzima vem sendo relacionada como um alvo promissor na terapia do câncer e doenças protozoárias. Moléculas inibidoras desta enzima são extremamente efetivos no bloqueio a síntese do DNA. A gentamicina e a hidroxiuréia são os únicos inibidores desta enzima aprovados pela “Food and Drugs Administration (FDA)”. (GÓES e TENÓRIO,2005).

Entretanto alguns autores sugerem que o mecanismo de ação desta classe de moléculas é ainda complexa, embora possam se apresentar como ligantes versáteis tanto na forma neutra quanto na aniônica, podendo formar ligação coordenada com metais através do átomo de enxofre e do átomo de nitrogênio azometina (C=N) podendo apresentar múltiplos alvos. (GREENBAUM et al 2004). Entre os principais efeitos descritos relacionados atividade anticâncer de derivados tiossemicarbazônicos em ordem de descoberta são: inibição da ribonucleotídeo redutase, (BROCKMAN, et al. 1970). Produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), (SHAO, ZHOU, DI BILIO, 2006). Inibição da topoisomerase II (HALL, LOCKEY, KISTHER et al, 2000), Ruptura mitochondrial, (YUAN, LOVEJOY, RICHARDSON, 2004). Inibição da proteína resistente a multidrogas (MDR1), (LUDWING, SZAKÁCS, MARTIN,2006).

O processo de morte celular tem um papel fundamental no tratamento de várias doenças, pois através da modulação das vias de morte que vários fármacos promissores estão sendo desenvolvidos para doenças como o câncer, doença isquêmica e doença neurodegenerativas. Os mecanismos complexos que controlam a morte celular estão sendo mais bem compreendidos, o que torna cada vez mais evidente que diferentes vias de morte celular têm um papel crítico em múltiplas doenças, inclusive o câncer (KEEP et al, 2011).

As principais características de uma célula que sofreu processo de morte celular são: perda da integridade da membrana plasmática, fragmentação celular ou a célula foi englobada pelas células vizinhas. (KROEMER et al, 2009). A apoptose apresenta

algumas mudanças bioquímicas características como, a clivagem proteolítica por caspase (RICCI, ZONG, 2006), externalização da fosfatidilserina (PS) (FADOK et al, 1992), mudanças na permeabilidade da membrana mitocondrial com perda do potencial de membrana (KROEMER, REED, 2000; RICCI, ZONG, 2006), dentre outras.

Neste sentido os compostos tiosemicarbazônicos possuem um papel fundamental, na indução da morte celular, pois provocam quebra de moléculas importantes nas vias de sinalização da necrose e apoptose. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade anticâncer de um novo composto tiosemicarbazônico e os mecanismos de indução da morte celular.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Substâncias químicas

Os compostos Semicarbazônicos e Tiosemicarbazônicos foram sintetizados e adquiridos pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LabSINFA), Departamento de Farmácia/UFPE em parceria com o Laboratório de Bioensaios e Pesquisa de Fármacos (LBPF), Departamento de Antibióticos/UFPE.

2.2 Material Biológico

As linhagens celulares de câncer humano foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro e mantidas para cultivo no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Antibióticos da UFPE. As linhagens trabalhadas foram Carcinoma mucoepidermóide de pulmão (NCI-H292), Adenocarcinoma e carcinoma de mama (MCF-7), Células tumorais derivadas de carcinoma laríngeo humano (HEp-2) e Leucemia promielocítica (HL-60). O meio de cultivo foi DMEM (NCI-H292, HEp-2) e RPMI (MCF-7 e HL-60), suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos. As células foram mantidas e incubadas em estufa (HF 212 UV) a 37° C e atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. A absorbância foi medida a 560nm em leitor de microplacas (Modelo 3550 BIO-RAD, Inc.). Os experimentos foram analisados através de suas médias

e respectivos erros padrão, realizados em triplicata. Células não tratadas (controle) foram consideradas como absorvância de 100% de viabilidade celular (ANDRIGHETT-FROHNER et al., 2003). O gráfico da absorvância X log da concentração e determinadas suas CI_{50} e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%), a partir de regressão não linear, utilizando o programa prisma versão 5 (Graph Pad Prism software versão. 5.0.)

2.3 Teste do MTT

A citotoxicidade dos derivados tiosemicarbazônicos e semicarbazônico foi determinada através do ensaio colorimétrico do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo tetrazólico (MTT), segundo Mosmam (1983) utilizando quatro linhagens de células tumorais humanas: HL60, MCF-7, NCI e HEP. Foram montadas duas placas para leituras nos tempos 24 e 72 horas. As amostras VH02, VH08, VH21, VH25, VH28 e LS18A foram adicionadas em dose única na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$. Para efeito de comparação da atividade citotóxica foi utilizada a doxorrubicina (3,0 $\mu\text{g/mL}$) como droga de referência. As linhagens celulares foram semeadas em placas de 96 poços nas concentrações de 2×10^5 células/mL (NCI-H292, MCF-7 e HEP) e $0,3 \times 10^6$ células/mL (HL 60). Na sequência os compostos VH02, VH08, VH21, VH25, VH28 e LS18A totalmente dissolvidos em dimetilsufóxido (DMSO) sofreram uma diluição seriada nos meios DMEM e RPMI para obtenção das concentrações (0,048 - 25 $\mu\text{g/mL}^{-1}$), foram adicionados 100 μL /poço de cada concentração. As amostras foram colocadas em duplicata. Após 24 e 72 horas de incubação, o sobrenadante foi aspirado e adicionados 150 μL de solução do MTT (Sigma-Aldrich®) na concentração de 5 mg/mL^{-1} . As placas foram incubadas a 37° C por mais 3 horas, passado esse tempo foram adicionados 100 μL /poço de DMSO para precipitar o Formazam (ALLEY, et al., 1988; MOSMAM, 1983).

2.4 Viabilidade celular (teste de exclusão pelo azul de tripan)

Células HL60 foram incubadas em placa de 24 poços com o composto VH25 nas concentrações da CI_{50} de doxorrubicina (1,0 $\mu\text{g/mL}$) e duas vezes esse valor (2,0 $\mu\text{g/mL}$)

por período de doxorrubicina. Para efeito comparativo foi utilizada a doxorrubicina (3,0 µg/mL) como droga de referência, tanto o controle quanto o composto teste nas diferentes concentrações foram feitos em triplicata.

Após incubação com a doxorrubicina, foram removidas alíquotas 90µL da suspensão celular de cada poço e adicionado em eppendorf contendo 10 µL do azul de tripan. Células não-viáveis e viáveis foram analisadas por microscopia óptica e contadas em câmara de Neubauer. Os dados foram analisados através da média e do erro padrão de três experimentos independentes. Foram verificadas diferenças significativas entre os grupos através da comparação da análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls, para nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

2.5 Análise morfológica (May-grunwald-giemsa)

Células HL-60 foram incubadas com doxorrubicina em placas de 24 poços numa concentração de $0,3 \times 10^6$ (Células/mL) com o composto VH25 nas concentrações de 1,0 e 2,0 µg/mL. Para efeito comparativo foi utilizada a doxorrubicina (0,3 µg/mL) como droga de referência e DMSO (0,1%) como controle negativo, tanto os controles quanto o composto teste nas diferentes concentrações foram feitos em triplicata. Após o período de 24 h as células foram analisadas em microscópio de inversão (Modelo: WILD MPS 11 / Herbrugg Switzerland, LEITZ). Para confecção das lâminas foram retiradas alíquotas de 50 µL das diferentes amostras de suspensão celular e colocadas em centrífuga de lâmina (cytospin), numa rotação de 1200 rpm por 5 minutos. Após adesão das células na lâmina esta foi embebida em metanol por 10 segundos para fixação e posterior coloração em May-grunwald e Giemsa por 10 segundos respectivamente. O teste de coloração diferencial por May-grunwald-giemsa permite a visualização da integridade celular pela análise morfológica do citoplasma e núcleo, uma vez que, há interações eletrostáticas entre moléculas alvo e os corantes eosina (corante ácido) e o azul de metileno (corante básico). Por permitir uma boa visualização de alterações das características nuclear e citoplasmática, este teste é bastante aceito para estudos que comparam o mecanismo de ação da morte celular entre apoptose e necrose. As lâminas das linhagens tratadas, controle e padrão foram analisadas por microscopia óptica e as alterações morfológicas foram comparadas ao grupo não tratado (controle negativo) e realizadas fotomicrografias.

2.6 Análise morfológica (citometria de fluxo)

Para detectar de forma quantitativa alterações na morfologia celular foi feita uma análise morfológica em citometro de fluxo para visualização de alterações no tamanho celular e na granularidade/complexidade celular induzidas pelas drogas teste utilizando o citometro de fluxo BD Calibur (San Jose, EUA) através da aquisição de 20000 eventos. Dois experimentos independentes, em duplicata, foram realizados e os dados foram analisados pelo software CellQuest BD (San Jose, EUA).

2.7 Anexina V-FITC/ Iodeto de propídio

As células HL-60 ($0,3 \times 10^6$) foram marcadas com iodeto de propídio (PI) e anexina V usando o kit de detecção de apoptose anexina V-FITC (eBioscience, San Diego, EUA). O experimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante utilizando um citometro de fluxo BD Calibur (San Jose, EUA) através da aquisição de 20000 eventos. Dois experimentos independentes, em duplicata, foram realizados e os dados foram analisados pelo software CellQuest BD (San Jose, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio de citotoxicidade em células tumorais

O estudo do efeito citotóxico realizado através de teste do MTT, em linhagens de células tumorais humanas: NCI-H292, MCF-7, HEP e HL-60 demonstrou um perfil de atividade citotóxica em todos os compostos testados em pelo menos um tipo celular, com exceção do derivado VH21 que não apresentou atividade frente a nenhuma das linhagens testadas. O espectro de ação dos compostos VH02, VH08, VH28 e LS18A foram baixos, apresentando percentual de inibição que variou entre 0,5% e 25%. O composto VH25 apresentou baixa atividade de inibição para as linhagens celulares MCF-7 (44,27), NCI-H292 (35,17) e HEP (46,23), no entanto para a linhagem de HL60 os resultados foram bastante animadores, mostrando alto percentual de inibição do crescimento celular (79%).

Todos os resultados estão expressos na tabela 1. A doxorrubicina foi utilizada como substância padrão para efeito comparativo da atividade de inibição do crescimento celular.

Tabela 1 - Resultados do efeito inibidor do crescimento celular sobre as linhagens de HL-60, MCF-7, NCI-H292 e HEP. Todos os compostos foram testados na concentração de 25µg/mL. Os resultados estão expressos como percentual de inibição ± erro padrão.

AMOSTRA	Linhagem celular			
	HL60 % Inib ± EP	MCF-7 % Inib ± EP	NCI-H292 % Inib ± EP	HEP % Inib ± EP
VH02	0,00 ± 0,00	0,51 ± 2,68	0,00 ± 0,00	11,19 ± 0,40
VH08	0,00 ± 0,00	16,77 ± 3,32	0,00 ± 0,00	25,34 ± 5,66
VH21	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
VH25	78,60 ± 2,10	44,27 ± 3,75	35,17 ± 2,57	46,23 ± 5,80
VH28	0,00 ± 0,00	12,75 ± 1,34	22,18 ± 1,51	4,04 ± 1,89
LS18A	0,00 ± 0,00	5,34 ± 1,07	8,05 ± 0,68	0,00 ± 0,00
DOX	91,06 ± 3,04	62,23 ± 0,72	85,67 ± 2,00	80,07 ± 0,49

Diversos derivados tiossemicarbazônicos com atividade citotóxica são relatados na literatura, (REIS, et al, 2010; SILVA, et al 2010, FERRAZ et al, 2009; MENDES et al, 2009). No entanto alguns trabalhos mostram uma atividade citotóxica mais evidente em células leucêmicas (REIS, et al, 2010; FERRAZ et al, 2009). Este resultados corroboram com os resultados descritos acima onde o melhor resultado com a droga VH25 ocorreu em células HL-60.

Na determinação da CI_{50} foi utilizada a linhagem celular HL60, uma vez que esta apresentou o melhor percentual de inibição através do teste do MTT. Foram determinadas duas curvas padrão para o derivado VH25 nos tempos 24 e 72 horas (fig 1), apresentando boa atividade em ambos os períodos. A determinação da CI_{50} no tempo de 24 horas foi realizada, uma vez que os testes de mecanismos de ação necessitam desse resultados para serem concluídos. A doxorrubicina foi usada como substância padrão para os efeitos comparativos e apresentou citotoxicidade menor que 1µg/mL. Os resultados estão apresentados na tabela 2.

Figura 1 - Determinação da curva padrão para o produto VH25 nos tempos de 24 e 72 horas.

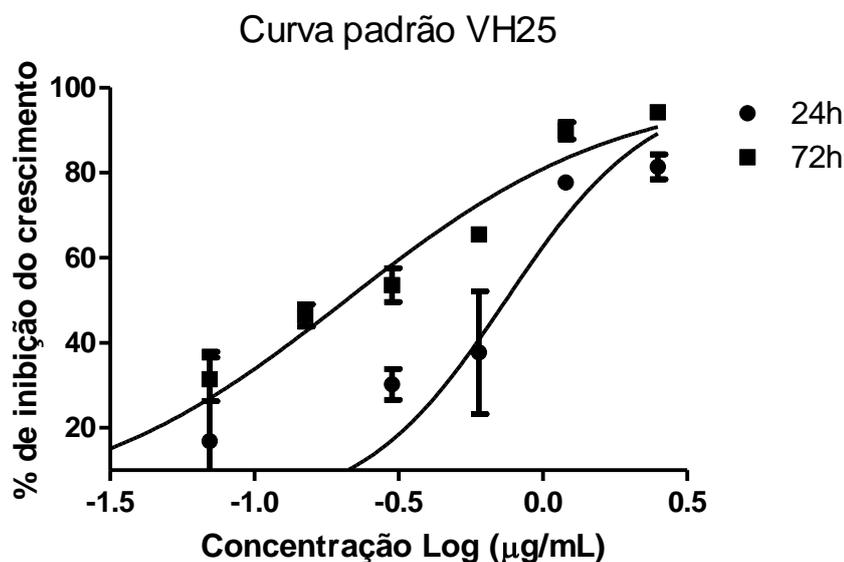


Tabela 2 - Determinação da CI_{50} (concentração em $\mu\text{g/mL}$ com capacidade de inibição de 50% do crescimento da população celular) do derivado VH25 frente a linhagem de células HL60, realizado pelo teste de MTT. Os resultados foram avaliados nos tempos de 72 e 24 horas. Intervalo de confiança de 95%.

Substância	Linhagem	IC_{50} $\mu\text{g/mL}$	Int. Conf. 95%	Tempo
VH25	HL 60	0,23	0,21-0,25	72 h
		1,07	0,5 - 2,4	24 h
DOX	HL60	0,02	0,01-0,02	72 h

Para estudos que visam os mecanismos de ação de novas drogas anticâncer, é necessário realização do teste de citotoxicidade *in vitro*. De acordo com estudos demonstrados por BERRIDGE (2005), o teste do MTT é um ensaio de boa escolha para realização dos experimentos de citotoxicidade celular. A atividade citotóxica é o primeiro ensaio para avaliar a atividade de candidatos a fármacos anticâncer (ISO 10993, 2005; ROGERO et al., 2003). O NCI (Instituto Internacional de Câncer) preconiza que, uma substância é considerada citotóxica quando sua CI_{50} está abaixo da concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$.

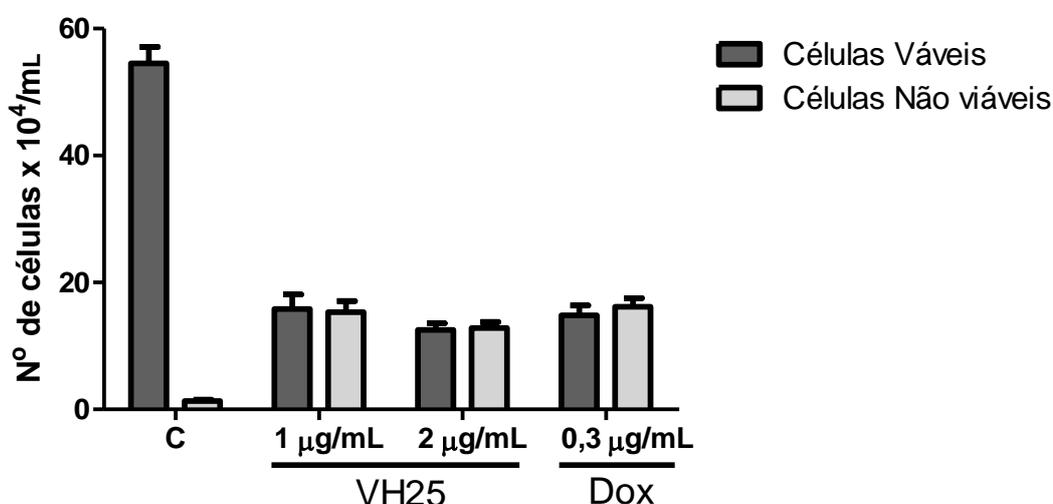
Estudos realizados com compostos Tiossemicarbazônicos são apontados no meio científico por terem sua atividade comprovada em diversas patologias, como: neoplasias

malígnas (FEUN et al 2002), atividade antiviral (TEITZ et al, 1994) e antibacteriana (KASUGA et al., 2003), entretanto ainda são escassos os estudos referentes às suas propriedades citotóxicas e anticâncer, tornando esta pesquisa uma importante contribuição para descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral e elucidação do mecanismo de ação na citotoxicidade celular.

3.2 Teste de viabilidade celular pelo teste de exclusão por azul de tripan

Para determinação da viabilidade celular foi realizado o ensaio de exclusão por azul de tripan no tempo de 24 h. O valor da CI_{50} ($1,07 \mu\text{g/mL}$) foi arredondado para facilitação dos cálculos e utilização no teste. Portanto, as concentrações foram $1x CI_{50}$ ($1,00 \mu\text{g/mL}$) e $2x CI_{50}$ ($2,00 \mu\text{g/mL}$). Houve redução do crescimento celular em 71% nas células incubadas na concentração de $1,00 \mu\text{g/mL}$, enquanto que para a concentração de $2,00 \mu\text{g/mL}$ houve uma inibição do crescimento em 77% em relação ao controle. A doxorrubicina utilizada como droga de referência mostrou sua atividade promovendo redução do crescimento das células em 73%. Os resultados do percentual de inibição estão expressos na figura 2.

Figura 2 - Efeito do composto VH25 em cultura de células HL60 para determinação da viabilidade celular através do método de exclusão por azul de tripan no tempo de 24 h. DMSO foi utilizado como controle negativo e a doxorrubicina como droga de referência padrão. Os resultados estão expressos como média \pm EP de três experimentos independentes. $P < 0,05$. Análise de variância (ANOVA), seguida de pós -teste de Newman-Keuls para comparação múltipla.



O teste de exclusão do corante azul de tripan estuda a permeabilidade da membrana plasmática (BARILE, 1994). Portanto, mesmo a membrana sendo lisada por um agente citotóxico, organelas citoplasmáticas ainda podem manter sua atividade fisiológica, bombeando o corante para fora da célula (VALADARES, et al, 2007). As células em apoptose mantêm suas membranas íntegras durante quase todo o processo até a sua morte, diferentemente das células necróticas que morfologicamente apresentam perda da integridade da membrana, a célula fica túrgida e o DNA é degradado aleatoriamente (CHAO, et al, 2010; HENRIQUEZ et al, 2008). Os resultados mostram que a droga VH25 diminui a viabilidade celular nas duas concentrações testadas.

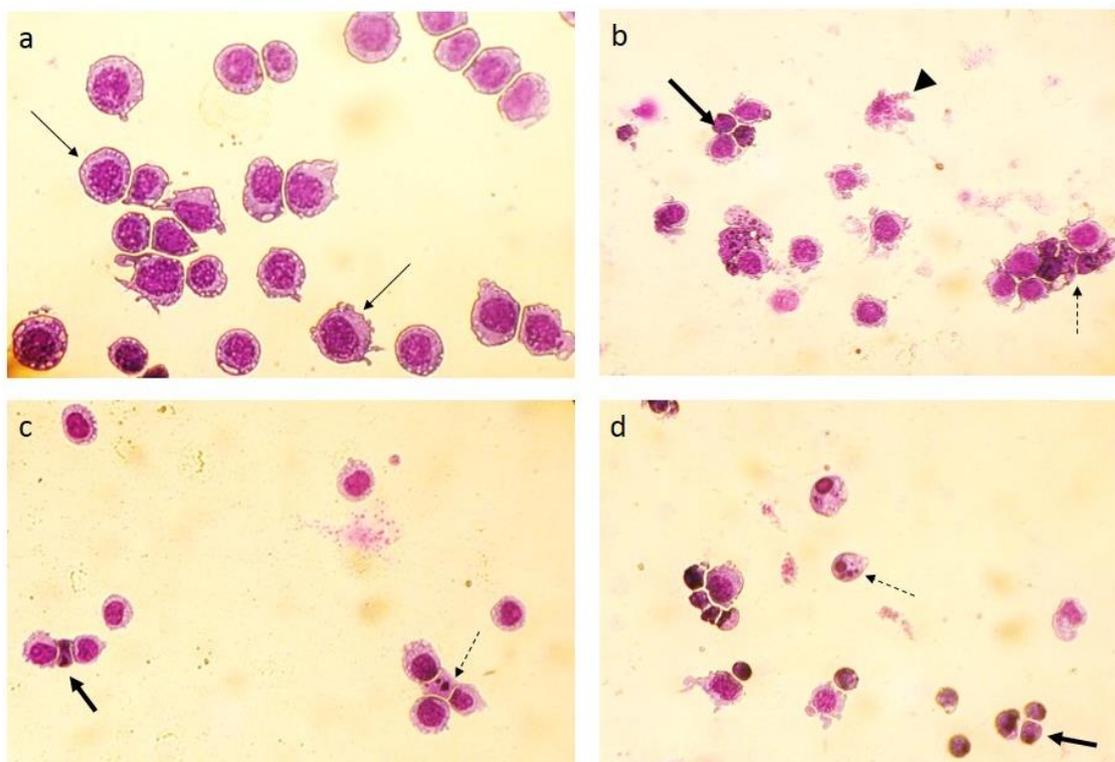
3.3 Análise morfológica – May-grunwald-giemsa

Após período de incubação celular por 24 h a análise morfológica das células de linhagem HL-60 realizada por microscopia óptica, em coloração diferencial May-grunwald-giemsa, foi possível verificar características da apoptose em estágios diferentes na população de células tratadas com o composto VH25.

Os resultados estão expressos na figura 3. As células do controle negativo (DMSO) apresentam características de uma célula neoplásica em suspensão, como por exemplo: núcleo aumentado, integridade da membrana nuclear e plasmática, cromatina descondensada e células não aderidas (figura 3a). No entanto, nas células incubadas com a doxorubicina utilizada como substância padrão (figura 3b), apresentam corpos apoptóticos, picnose, células necróticas e fragmentadas. Estas características são típicas de células em estágio de morte celular.

Os resultados apresentados para as células tratadas, tanto na concentrações da IC_{50} (1,00 μ L, figura 3c) quanto na concentração de 2x o valor da IC_{50} (2,00 μ L, figura 3d), nesta última parece ser mais expressivo a presença de células em picnose, mostram que este derivado tiosemicarbazônico promove a inibição do crescimento celular por estimular as células à morte, uma vez que são vistas células em picnose (diminuição do volume citoplasmático e nuclear), condensação da cromática e formação de corpos apoptóticos. O mecanismo de morte celular provavelmente é induzido pela ativação do processo de apoptose.

Figura 3 - Análise de células de linhagem HL60 por coloração diferencial May-grunwald-giemsa. Fotomicrografias do controle negativo (DMSO) apresentando células neoplásicas típicas: núcleo hiperplásico, célula não diferenciada, membranas nuclear e plasmática íntegras (3a, setas finas), tratamento com doxorubicina (3b), células tratadas com o composto VH25 - 1,00 µg/mL (3c) e VH25 - 2,00 µg/mL (3d). Células normais (setas finas), Picnose (setas grossas), Corpos apoptóticos (setas tracejadas), Necrose (pontas de setas).



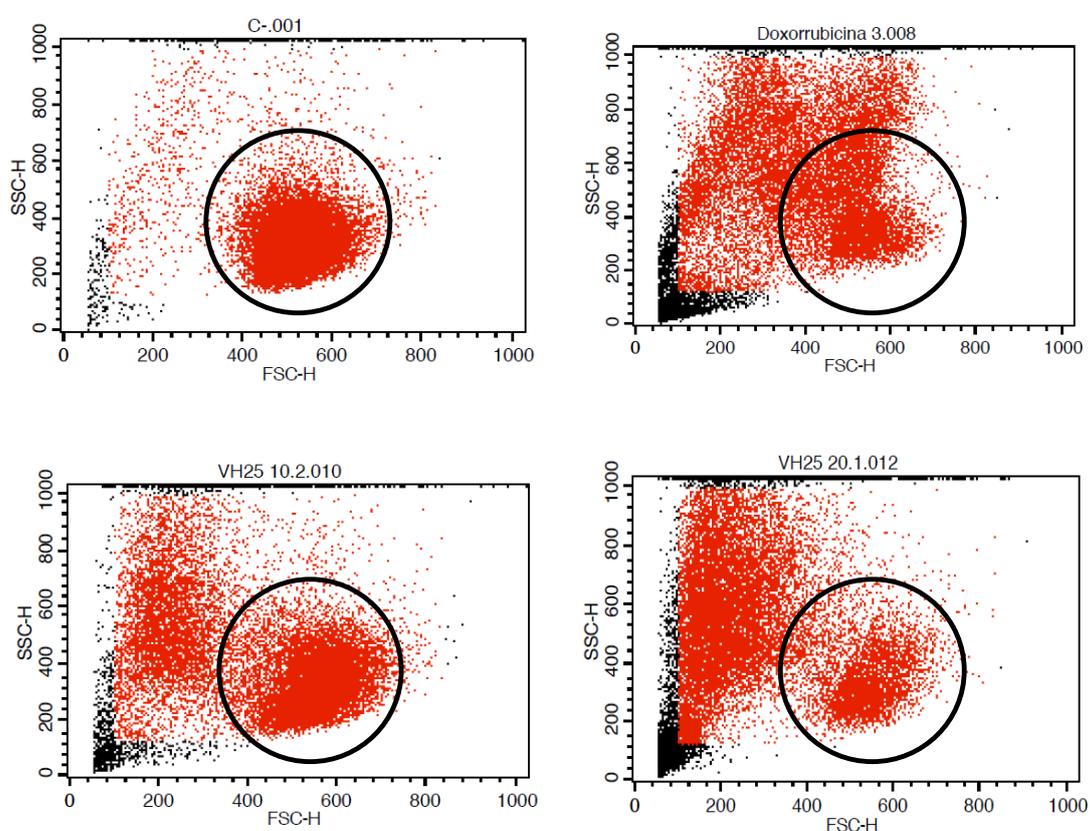
A análise morfológica diferencial permite a verificação das características de uma célula que mantém intacta sua integridade, quanto à definição nítida do delineamento nuclear pela carioteca e citoplasmático pela membrana plasmática, em relação às células que estão em diferentes estágios de morte celular.

3.4 Análise morfológica (Citometria de fluxo)

A análise de granularidade/complexidade e tamanho celular indicou que as alterações morfológicas apresentadas pelas duas drogas testes são compatíveis com os resultados da coloração diferencial May-grunwald-giemsa, pois a análise feita em

citometria de fluxo permite quantificar partículas em meio líquido que passam através de uma fonte de luz. O desvio da luz está diretamente relacionado com a estrutura e morfologia das células que é determinada para cada partícula que passe pela fonte de excitação. A redução do tamanho das células resulta na diminuição do desvio de luz para frente (FSC) e a condensação nuclear causa inicialmente um aumento transitório no desvio da luz para o lado (SSC) seguido de uma diminuição da SSC durante os estágios finais da apoptose. (Shapiro, 1995).

Figura 4. Análise do tamanho/granularidade celular em citometria de fluxo foram contabilizadas 20.000 células por amostras em triplicata de dois experimentos independentes. O círculo preto indica a população de células viáveis.

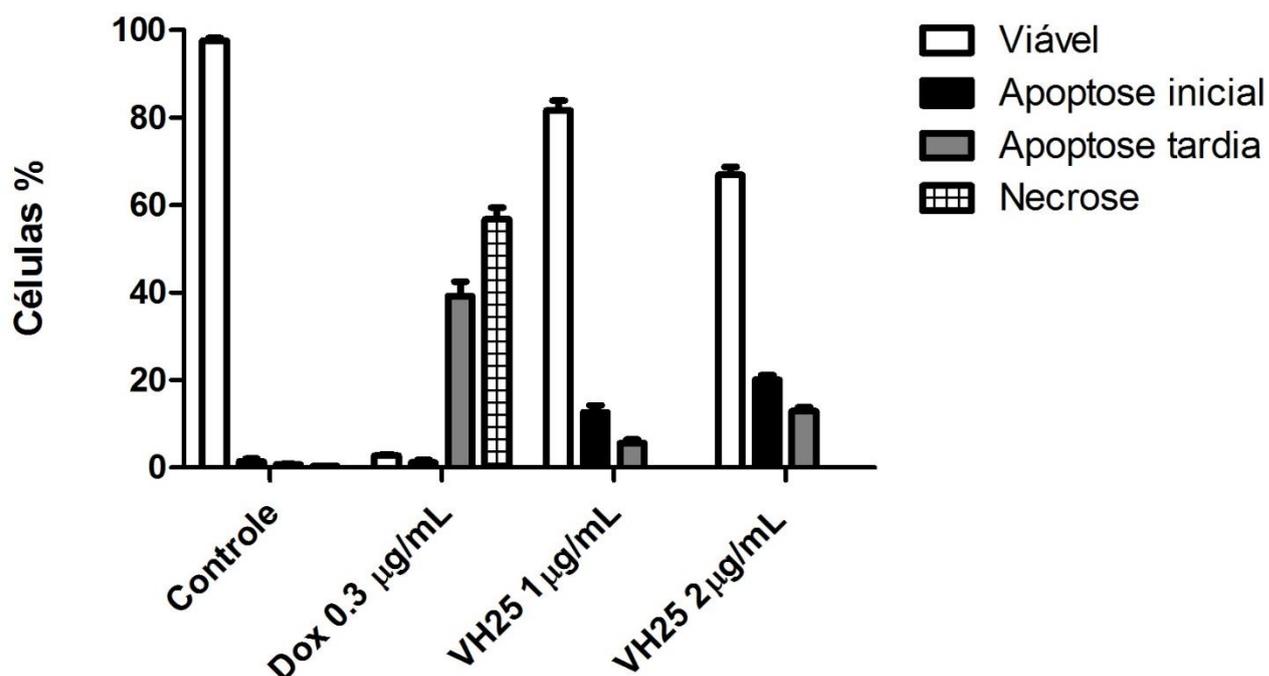


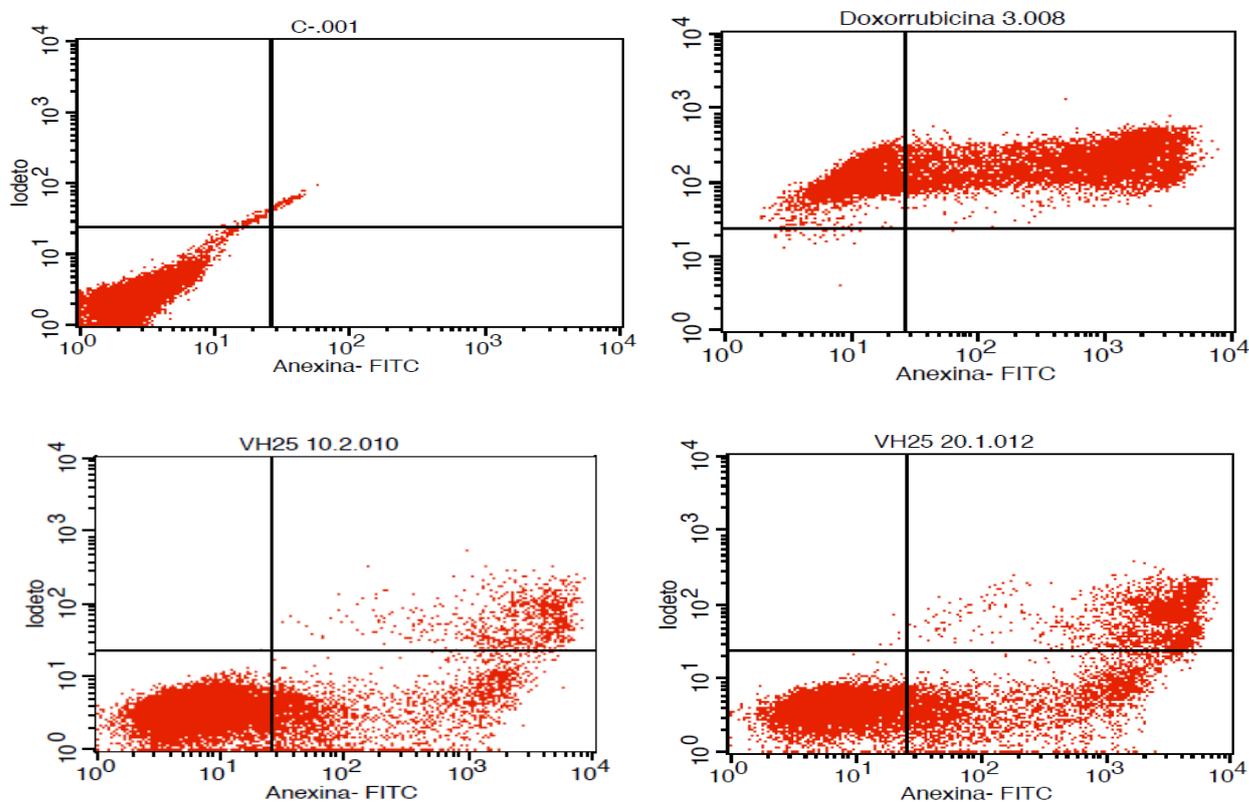
3.5 Anexina V-FITC / Iodeto de propídeo

Para confirmar processo de apoptose induzido pelo derivado VH25 nas células HL-60, conforme evidenciado em experimentos anteriores, foi realizado a marcação com

anexina e iodeto de propídeo e quantificados por citometria de fluxo. Foram contabilizadas cerca de 20.000 células por amostra. Os resultados mostram que a droga VH25 nas concentrações de 1,0 μ g/mL induziu apoptose em 13% apoptose inicial e 6% apoptose tardia com menos de 1% de células em necrose. Já na concentração de 2,0 μ g/mL houveram 20% de células em apoptose inicial e 13% em apoptose tardia com menos de 1% de células em necrose. O grupo controle apresentou cerca de 1% de células em apoptose somando apoptose inicial e tardia ($p < 0,05$). O controle positivo, doxorrubicina, apresentou cerca de 1% de células em apoptose inicial, 39% de células em apoptose tardia e 57% de células em necrose.

Figura 5. Avaliação da via de indução da morte celular, utilizando marcação com Anexina V/ Iodeto de propídeo. DMSO foi utilizado como controle negativo e a doxorrubicina como droga de referência padrão. Os resultados estão expressos como média \pm EP de dois experimentos independentes. $P < 0,05$. Análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste de Dunnett para comparação múltipla.





Estes resultados são muito promissores visto que a VH25 induziu a morte celular de forma quase que exclusiva pela via de apoptose de forma dose dependente. Quando comparado com a doxorubicina é possível perceber que esta droga age mais pela via da necrose (57%), enquanto que a droga teste nas duas concentrações testadas apresentou menos de 1% de células em necrose, resultado esse semelhante com o controle negativo (fig. 4). Isto é importante visto que uma droga com atividade anticâncer promissora precisa apresentar sua via de indução de morte por apoptose, uma vez que esta é melhor forma de eliminar células cancerígenas tendo em vista que não extravasa o conteúdo extracelular criando um foco inflamatório no local, como ocorre na necrose.

Uma característica bioquímica importante na detecção da apoptose é a externalização da fosfatidilserina presente na região interna da bicamada lipídica (BRATTON et al, 1997). A anexina V é uma proteína recombinante utilizada na identificação deste evento, pois ela interage de forma específica com os resíduos da fosfatidilserina (ARUR et al, 2003). O iodeto de propídeo (IP) por sua vez, só consegue

intercalar o DNA e marcar o núcleo de vermelho se a membrana celular estiver danificada, processo este que só ocorre em células necróticas ou em apoptose tardia (KUMAR, et al, 2004). A utilização do teste da AnexinaV/Iodeto de propídeo foi realizado com o intuito de se caracterizar bioquimicamente a indução da apoptose.

Os resultados apresentados demonstraram que o derivado VH25 promove morte celular quase que exclusiva por apoptose de forma dose dependente. O composto induziu necrose em menos de 1% das células, resultado esse semelhante com o controle negativo. Uma droga com atividade anticâncer promissora deve apresentar, principalmente, uma via de indução de morte celular com poucos danos adversos. A apoptose representa a melhor forma de eliminar células cancerígenas uma vez que não extravasa o conteúdo extracelular criando um foco inflamatório no local, como ocorre na necrose.

Compostos tiossemicarbazônicos estão amplamente relacionados a indução de apoptose. Reis et al (2010) sugere que o efeito pró-apoptótico promovido por um composto tiossemicarbazônico em HL-60 está associado a diminuição da expressão de Bcl2 e Bcl-X_L e BcrAbl. Ibrahim et al (2014), observou degradação do DNA nuclear em quatro linhagens de células tumorais (MDA-MB-231, MCF-7, HT-29 e HCT-116) induzida por um derivado tiossemicarbazônico, esse resultado sugere que a apoptose é o principal mecanismo de morte celular promovido por esses compostos. Outros estudos demonstraram efeito pró-apoptótico induzido por cobre (II) e gálio (III) complexados a tiossemicarbazonas (DA SILVA, et al, 2013; LESSA, et al, 2013). Estes trabalhos corroboram com os nossos resultados onde, o derivado VH-25 induz a morte celular por apoptose em células HL-60.

4 CONCLUSÕES

Através do ensaio de citotoxicidade pode-se concluir que o derivado VH25 apresentou atividade citotóxica frente a linhagem HL-60 o que permitiu o seguimento dos testes de mecanismo de ação. Os testes de mecanismo de ação mostraram que o composto VH25 induz apoptose em células HL-60, comprovado pelo teste de análise morfológica e confirmado através da externalização da fosfatidilserina. Estes resultados são inéditos para este novo derivado tiossemicarbazônico. No entanto mais estudos precisam ser

realizados para identificar qual via de apoptose está envolvida neste processo, assim como ensaios que mostrem se a apoptose está sendo dependente da via das caspases ou não.

5 AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado através de financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES.

6 REFERÊNCIAS

ABEER A IBRAHIM, HAMID KHALEDI, POUYA HASSANDARVISH, HAPIPAH MOHD ALI, HAMED KARIMIAN. Indole-7-carbaldehyde thiosemicarbazone as a flexidentate ligand toward Zn(II), Cd(II), Pd(II) and Pt(II) ions: cytotoxic and apoptosis-inducing properties of the Pt(II) complex. **Dalton Trans.** 43. 3850-3860. 2014.

ALLEY, M.C.; SCUDIERO, D.A.; MONKS, A.; HURSEY, M.L.; CZERWINSKI, M.J.; FINE, D.L.; ABBOTT, B.J.; MAYO, J.G.; SHOEMAKER, R.H.; BOYD, M.R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Res.** 1;48(3):589–601, Feb 1988.

ARUR, S.; UCHE, U.E.; REZAUL, K.; FONG, M.; SCRANTON, V.; COWAN, A.E. et al. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. **Dev Cell.** 4, 587-598, 2003.

BARILE, F.A. In vitro cytotoxicology. **CRC Press**, 96P, 1994.

BERALDO, Heloisa; GAMBINO, Dinorah. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.4, n.1, p. 31-39, 2004.

BERRIDGE, M.V.; HERTS, P.M.; TAN, A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnology Annual Review**. 11, 127-152, 2005.

BHARTI, N., SHAIENDRA, SHARMA, S., NAQVI, F., AZAM, A. New palladium(II) complexes of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones. Synthesis, spectral studies and in vitro anti-amoebic activity. **Bioorganical Medicinal Chemistry**, 3, 2923–2929, 2003.

BRATTON, D.L.; FADOK, V.A.; RICHTER, D.A.; KAILEY, J.M.; GUTHRIE, L.A.; HENSON, P.M. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calciummediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. **J. Biol. Chem**, 272, 26159-26165, 1997.

BROCKMAN, R. W.; SIDWELL, R. W.; ARNETT, G.; SHADDIX, S. M.; **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 133, 609, 1970.

CHAO, Y.; SHEPARD, C.; WELLS, A. Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. **Molecular Cancer**.9(1):179, 2010.

DA SILVA JG, RECIO DESPAIGNE AA, LOURO SR, BANDEIRA CC, SOUZA-FAGUNDES EM, BERALDO H. Cytotoxic activity, albumin and DNA binding of new copper(II) complexes with chalcone-derived thiosemicarbazones. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 65: 415-26. 2013.

DANIAL, N.N.; KORSMEYER, S.J. Cell death: critical control points. **Cell**. v. 116, p. 205-219, 2004.

FADOK, V.A.; VOELKER, D.R.; CAMPBELL, P.; COHEN, J.J.; BRATTON, D.L.; HENSON, P.M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **J. Immunol**. 148, 2207-2216, 1992.

FERRAZ, K.S.O; LUCAS, F; CARRILHO, D; PINTO, M.C.X; LEITE, M.F; FAGUNDES, E.M.S. et al. 2-Benzoylpyridine-n (4)- toyl thiosemicarbazones and their palladium (II) complexes: cytotoxicity against leukemia cells. *Biorganic and medicinal chemistry*. 17. 7138-7144. 2009.

FEUN, L.; MODIANO, M.; LEE, K.; MAO, J.; MARINI, A.; SAVARAJ, N.; PLEZIA, P.; ALMASSIAN, B.; COLACINO, E.; FISCHER, J.; MACDONALD, S.; **Cancer Chemother. Pharmacol.** 50, 223, 2002.

GREENBAUM, D.C. et al. Synthesis and structure–activity relationships of parasiticidal thiosemicarbazone cysteine protease inhibitors against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Medicinal Chemistry** 47, 3212–3219, 2004.

HALL, I. H.; LACKEY, C. B.; KISTLER, T. D.; IVES, J. S.; BERALDO, H.; ACKERMAN, L.; WEST, D. X.; **Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.**, 333, 217, 2000.

HANG, H. C.; BERTOZZI, C. R. **Acc. Chem. Res.**, 34, 727, 2001.

HARTWELL, L. H, KASTAN, M. B. Cell cycle control and cancer. **Science**. 266. 1821-1828. 1994.

HENRIQUEZ, M.; ARMISÉN, R.; STUTZIN, A. Quest, A.F. Cell death by necrosis, a regulated way to go. **Curr Mol Med**. 8, 187-206, 2008.

INSTITUTO Nacional Do Câncer (INCA). 2012. Quimioterapia. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=101 Acesso em: 14 de fevereiro de 2014.

KARAH, N.; **European Journal Medicinal Chemistry**, 37, 909, 2002.

KASUGA, N. C.; SEKINO, K.; ISHIKAWA, M.; HONDA, A.; YOKOYAMA, M.; NAKANO, S.; SHIMADA, N.; KOUMO, C.; NOMIYA, K.; **Journal of Inorganic Biochemistry**, 96, 298, 2003.

KEPP, O., GALLUZZI, L., LIPINSKI, M., YUAN, J. & KROEMER, G. Cell death assays for drug discovery, **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, p. 221-237, 2011.

KROEMER, G.; et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death Differentiation**.16: 3–11, 2009.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Pathology Basis of Disease**, 7th edn., WB Saunders, Chuna, 1552p, 2004.

LESSA JA, SOARES MA, DOS SANTOS RG, MENDES IC, SALUM LB, DAGHESTANI HN, ANDRICOPULO AD, DAY BW, VOGT A, BERALDO H. Gallium(III) complexes with 2-acetylpyridine-derived thiosemicarbazones: antimicrobial and cytotoxic effects and investigation on the interactions with tubulin. **Biometals. European Journal of Medicinal Chemistry** .26 :151-65. 2013.

LUDWIG, J.A.; SZAKÁCS, G.; MARTIN, S.E. et al. Selective toxicity of NSC73306 in MDR1 positive cells as a new strategy to circumvent multidrug resistance in cancer. **Cancer Res.**, 66: 4808-15, 2006.

MENDES, I.C; SOARES, M.A; SANTOS, R.G; PINHEIRO,C; BERALDO, H. Gallium (III) complexes of 2-pyridine formamide thiosemicarbazones: cytotoxic activity against malignant glioblastoma. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 44. 1870-1877. 2009.

MESQUITA, M.; DE PAULA, J.; PESSOA, C.; MOREAS, M.; COSTA-LOFUTO, L.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, 123, 439 445, 2009.

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

NICHOLSON, D.W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**, v. 407, p. 810-16, 2000.

REIS, D.C; PINTO, M.C.X; FAGUNDES, E.M.S; WARDELL, S.M.S.V; WARDELL, J. L; BERALDO, H. Antimony (III) complexes with 2-benzoylpyridine- derived thiosemicarbazones. Cytotoxicity against human leukemia cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 45. 3904-3910. 2010.

RICCI, M.S.; ZONG, W.X. Chemotherapeutic for targeting cell death pathways. **The Oncologist**. 11, 342-357, 2006.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDAB, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, v. 6 nº 3: 317-320, 2003.

SHAO, J.; ZHOU, B.; DI BILIO, A.J. et al. A Ferrous-Triapine complex mediates formation of reactive oxygen species that inactivate human ribonucleotide reductase. **Mol Cancer Ther**, 5: 586-92, 2006

SHAPIRO, H.M. Overture. In: Shapiro HM. Practical Flow Cytometry. 3. ed. New York: Wiley-Liss, 1995.

SHIPMAN-JUNIOR, C.; SMITH, S.H.; DRACH, J.C.; KLAYMAN, D.L. Thiosemicarbazones of 2-acetylpyridine, 2-acetylquinoline, 1-acetylisoquinoline, and related compounds as inhibitors of herpes simplex virus *in vitro* and in a cutaneous herpes guinea pig model. **Antiviral Res**, 6: 197–222, 1986.

SILVA, A.P; MARTINI, M.V; OLIVEIRA, C.M.A; CUNHA, S; CARVALHO, J.E; RUIZ, A.L.T.G; SILVA, C.C. Antitumor activity of (-)- α bisabolol based

thiosemicarbazones against human tumor cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**. 45. 2987-2993. 2010.

TEITZ, Y.; RONEN, D.; VANSOVER, A.; STEMATSKY, T.; RIGGS, J. L.; **Antiviral Res.** 24, 305, 1994.

TENÓRIO, R. P.; GÓES, A. J. S.; LIMA, J. G.; FARIA, A. R.; ALVES, A. J.; AQUINO, T. M. **Quím. Nova**, 28, 1030, 2005. [CrossRef]

VALADARES, M.C.; CASTRO, N.C.; CUNHA, L.C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, 43, 631-638, 2007.

YUAN, J.; LOVEJOY, D.B.; RICHARDSON, D.R. Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity. *in vitro and in vivo assessment*. **Blood**, 104: 1450-8, 2004.

Capítulo 3

**Capítulo 3 - Atividade Anti-inflamatória de VH02 e VH08 novos derivados
Tiossemicarbazônicos**

Inflammation Research

Jailson Oliveira da Silva, Larissa Cardoso Correia de Araújo, Terezinha Gonçalves da
Silva, Dalci José Brondani, Silene Carneiro do Nascimento.

J. O. SILVA; L. C. C. ARAÚJO; T. G. SILVA; S. C. NASCIMENTO;
Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Artur
Sá, s/n, Cidade Universitária, Recife/PE, Brasil.
e-mail: Jailson_silva.22@hotmail.com

D. J. BRONDANI

Departamento de Ciências farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Rua
Prof. Artur Sá, s/n, Cidade Universitária, Recife/PE, Brasil.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito anti-inflamatório e antinociceptivo e os possíveis mecanismos de ação de novos derivados carbazônicos. **Material e métodos:** Os modelos de permeabilidade vascular, bolsa de ar e edema de orelha, foram utilizados para comprovação da atividade anti-inflamatória. Carragenina e óleo de cróton foram usados como agentes inflamatórios. **Resultados:** os compostos VH08 (3 mg/Kg) e VH02 (100 mg/Kg) inibiram em 80 % e 86% a migração de polimorfonucleares, 64% (VH02) os níveis de óxido nítrico, MPO 34% e 28% ($p < 0,05$) e 25% e 8% a permeabilidade vascular. Houve aumento da IL-10 em 308% para os animais tratados com VH02 quando comparados ao controle. **Conclusões:** houve atividade anti-inflamatória significativa. Acredita-se que o efeito anti-inflamatório possivelmente está relacionado a atividade imunomoduladora, uma vez que houve redução da migração celular, dos níveis de NO e MPO e aumento de IL-10, no entanto são necessários mais estudos para melhores esclarecimentos.

Palavras chave: bolsa de ar. óxido nítrico. Anti-inflamatório. tiossemicarbazônas. semicarbazônas. interleucina.

1 INTRODUÇÃO

Estudos na área da farmacologia vem ganhando espaço e contribuído para o progresso da ciência e descoberta de novas drogas com atividades anti-inflamatória e analgésica mais modernas. Esses avanços têm sido possíveis graças aos recentes conhecimentos dos mecanismos moleculares da fisiopatologia das doenças, principalmente na atividade de enzimas, canais iônicos, receptores e modulação da liberação de mediadores químicos. Derivados carbazônicos tem sido relatados em diversos estudos por sua atividade, anti-inflamatória, antitumoral e antifúngica (DOBEK et al., 1980; KALINOWSKI et al., 2007; SMEE e SIDWELL, 2003) antimalárica (WEST et al., 1993) e antichagásica (CARECETTO, 2000). Segundo Do campo (1990), compostos Semicarbazônicos e Tiossemicarbazônicos possuem propriedades medicinais com capacidade na inibição do crescimento de alguns organismos patogênicos. De modo geral a atividade desses compostos pode estar relacionado a inibição enzimática, interação com a molécula de DNA e ou inibição de síntese de DNA (BERALDO, 2004). Apesar da grande versatilidade farmacológica apresentada por esta classe de compostos, diferenças estruturais podem ocasionar manifestação específica na atividade. Por isso a tentativa de descoberta dos mecanismos de ação de novos derivados semicarbazônicos e tiossemicarbazônicos na atividade inflamatória para síntese de fármacos mais seguros.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Drogas

Os derivados tiosemicarbazônicos VH02 - (2E)-2-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno) e VH08 - (2E)-2-(4-fluorobenzilideno)hidrazinacarbatioamida, foram sintetizados e adquiridos pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LabSINFA), Departamento de Farmácia/UFPE/Recife-Brasil. Dexametasona foi comprada de Aché, São Paulo, Brasil. EDTA foi adquirido a partir de Labtest, São Paulo, Brasil. Kits ELISA para TNF- α , IL-1 β e IL-10 foram comprados de eBioscience, São Paulo, Brasil. Ácido acético glacial foi comprado de VETEC, São Paulo, Brasil. Tween 20, carragena, azul de Evans e indometacina foram adquiridos da Sigma, EUA. O veículo utilizado para diluição dos derivados carbazônicos foi solução aquosa a 2-5% de tween 20.

2.2 Animais

Foram utilizados camundongos adultos albinos swiss de variedade *Mus musculus*, machos, pesando entre 25 e 30g provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE/Recife-Brasil. Os animais foram divididos em grupos de seis animais/gaiola e mantidos sob controle de temperatura (22 ± 2 °C) e ciclo de claro/escuro de 12/12h. Água e comida foram disponibilizados sem restrições. Antes do início dos experimentos, os animais foram aclimatados ao ambiente por ao menos 30 min. Para realização das atividades anti-inflamatórias e antinociceptivas os animais foram mantidos em jejum por 4 horas antes de cada ensaio. Os experimentos foram conduzidos sob processo 035663/2013-90 aprovado pelo comitê de ética e experimentação animal da UFPE e seguindo os princípios éticos do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e as normas do Instituto Nacional de Saúde e Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório.

2.3 Teste de bolsa de ar subcutânea induzida por carragenina

A formação de uma bolsa de ar na região cervical dorsal dos camundongos se deu através de injeção subcutânea de 2,5 mL de ar estéril no 1º e 4º dia. No 7º dia, os animais receberam veículo (água/tween 20 a 2%), indometacina (10 mg/kg), VH02 (6,25, 25 e 100 mg/Kg) e VH08 (0,12, 0,6 e 3 mg/Kg) por via oral (V.O.). As doses foram escolhidas de acordo com o teste de toxicidade e resultados de teste piloto realizado em nosso laboratório. Decorridos 60 minutos da administração das drogas, injeção de 1 mL de carragenina (1%) dentro da bolsa de ar foi utilizada para induzir a inflamação. Após 6 horas, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, e as bolsas de ar lavadas com 3 mL de tampão PBS/EDTA. A contagem de polimorfonucleares (PMNs) foi realizada utilizando contador hematológico ABX Micros 60. A média do número de células brancas contidas no exsudato inflamatório dos animais dos grupos tratados foi comparada com a média do número de leucócitos dos animais do grupo controle definida como 100%. Os exsudatos foram centrifugados e alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para determinação dos níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10 e quantificação dos níveis da enzima mieloperoxidase (MPO) e do óxido nítrico (NO).

2.3 Edema de orelha induzido por óleo de cróton

Os camundongos receberam veículo (água/tween 20 a 2%), dexametazona (10 mg/kg), VH02 (100 mg/Kg) ou VH08 (3 mg/Kg) por V.O. 60 minutos antes da indução da inflamação. Para promoção do edema foram aplicados, na superfície externa/interna da orelha direita, 20 μ L de solução de óleo de Cróton (5%) dissolvido em acetona como agente flogístico. A orelha esquerda recebeu 20 μ L de solução água/acetona (3/7) e foi utilizada como controle. Decorridas 6 horas, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e com utilização de um Punch, discos de 6 mm de diâmetro foram retirados de ambas as orelhas e imersos em tampão fosfato/HTAB para posterior dosagem dos níveis de MPO e NO. As médias das diferenças de pesos entre as orelhas direitas e esquerdas demonstraram a formação e intensidade do edema.

2.3 Permeabilidade vascular induzida por ácido acético

Veículo (água/tween 20 a 2%), indometacina (10 mg/kg), VH02 (100 mg/Kg) ou VH08 (3 mg/Kg) foram administradas por V.O. 60 minutos antes da aplicação do ácido acético. 30 min após inoculação das drogas os animais foram anestesiados por solução associada de quetamina (1mL/Kg) e xilazina (0,7mL/Kg), 10 min após 0,2 mL de solução corante de azul de Evans (1%) foi injetado no plexo retro-orbital dos animais. Decorridos 20 min da administração do azul de Evans, 0,5 mL de solução de ácido acético (1,0%) foi injetado via intraperitoneal (I.P.) como agente flogístico. Passados 20 min os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e 2 mL de solução salina (0,9%) foram utilizados para coleta do exsudato peritoneal, o qual foi centrifugado por 10 min em 2000 rpm. A absorbância do sobrenadante foi determinada por leitor de microplaca (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA) a 630 nm. A permeabilidade vascular foi representada em DO/mL de corante contido na cavidade peritoneal.

2.3 Quantificação dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-10

Para realização da dosagem das citocinas pró-inflamatórias TNF α , IL-1 β e IL-10, os exsudatos inflamatórios, recolhidos através da técnica do bolsa de ar subcutânea, foram armazenados em freezer -40 °C. A quantificação dessas citocinas foi determinada pela técnica de ELISA sanduíche, utilizando Kits específicos para camundongos. O protocolo utilizado foi o mesmo recomendado no manual de instruções do fabricante (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA).

2.3 Determinação dos níveis de MPO

Os níveis da enzima MPO foram determinadas a partir do exsudato da bolsa de ar e homogenato do fragmento de tecido retirado no ensaio de edema de orelha, segundo metodologia descrita por Rao et al. (1993). Usando reagentes convencionais, a concentração de cada enzima foi estimada por meio de medida colorimétrica a 450 nm através de leitor de microplacas ELISA (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA) e os resultados expressos pela média da absorbância/grupo.

2.3 Quantificação dos níveis de NO

A concentração de óxido nítrico (NO) foi determinada através de seus produtos de degradação, nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-) usando o método de GRIESS (GIUSTARINI et al., 2008). Alíquotas de 50 μL , do exsudato inflamatório coletado nos teste da bolsa de ar e do homogenato de fragmento da orelha retirado no teste de edema de orelha induzido por óleo de cróton, foram colocados em placa de fundo chato de 96 poços. Sob baixa luminosidade, 50 μL de reagente de GRIESS foi adicionado em cada poço contendo amostra e a placa foi incubada por dez minutos em temperatura ambiente e posteriormente lida em contador de microplaca ELISA (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA) a 540 nm. A curva-padrão com concentrações previamente conhecidas de NO_2 também tiveram as suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores de nitrito/nitrato em μM , com auxílio da equação da reta.

3 RESULTADOS

3.1 Teste de bolsa de ar subcutânea induzida por carragenina

A partir do ensaio foi percebido que ambos os compostos testados, VH08 (0,12; 0,6 e 3 mg/Kg) e VH02 (6,25 e 100 mg/Kg) revelaram causar influência na inibição da migração de Leucócitos PMNs quando comparados aos animais do grupo controle (fig. 1). No entanto, as doses de 3 mg/Kg e 100 mg/Kg provocaram uma inibição da migração celular (80% e 86%) respectivamente, sendo os mais efetivos quando verificada a taxa de migração celular, mostrando-se semelhantes a atividade inibitória promovida pela indometacina utilizada como droga de referência para atividade anti-inflamatória (77%), não havendo portanto diferença estatística significativa. Os resultados estão expressos na tabela 1.

Figura 1 – Avaliação da migração celular de PMNs em exsudato extraído de bolsa de ar subcutânea em camundongos. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão do número de PMNs. $P < 0,05$ a significância foi determinada com ANOVA One-way e pós-teste de Newman-Keuls. * valores significativos em relação ao controle. # não significativos em relação à Indometacina.

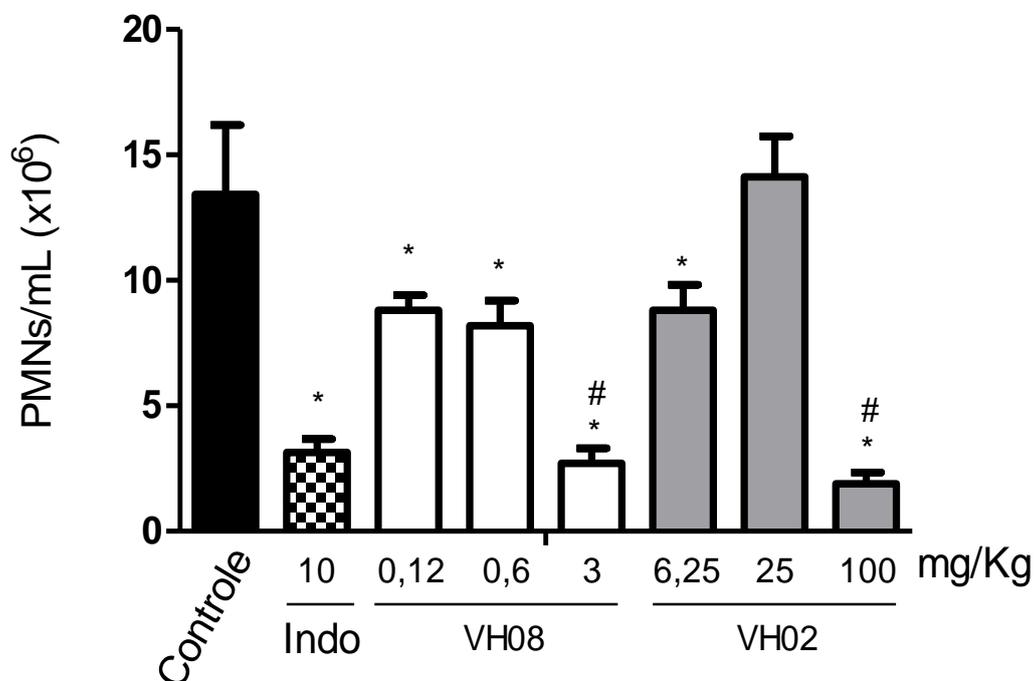


Tabela 1 - Atividade dos derivados tiosemicarbazônicos VH08 e VH02 na migração celular de leucócitos PMNs no exsudato inflamatório obtido no teste de bolsa de ar. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão do número de PMNs. $P < 0,05$ a significância foi determinada com ANOVA One-way e pós-teste de Newman-Keuls. * significativos em relação ao controle, # não significativos em relação à Indometacina.

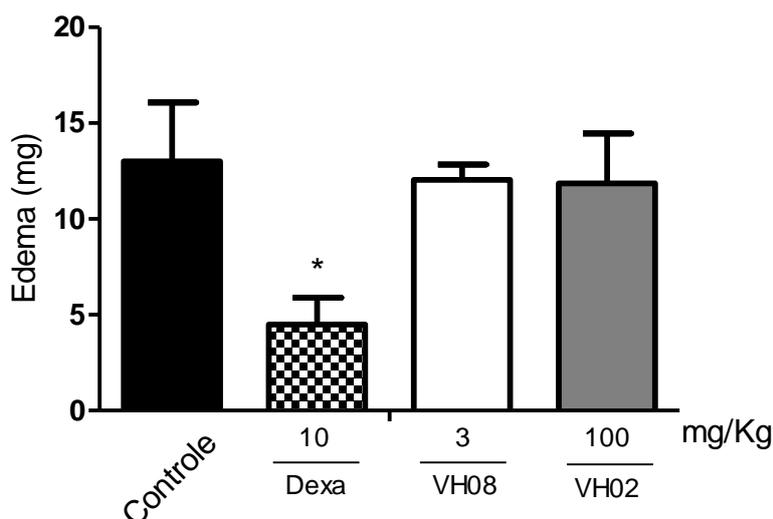
Grupo	Dose (mg/Kg)	Nº de PMNs/mL x 10 ⁶	% inibição
Controle	-	13,43 \pm 2,7	-
Padrão	10	3,14 \pm 0,5*	77
	0,12	8,8 \pm 0,6*	34
VH08	0,6	8,2 \pm 1,0*	39
	3	2,7 \pm 0,6*	80
	6,25	8,8 \pm 1,0*	34
VH02	25	14,13 \pm 1,6	-
	100	1,9 \pm 0,4*	86

3.2 Edema de orelha induzido por óleo de cróton

Este modelo consiste na formação de edema na região auricular do animal a partir de exposição do tecido ao agente flogístico (óleo de cróton) através de aplicação tópica. A inflamação é caracterizada pelo aumento de permeabilidade vascular e migração leucocitária com consequente formação do edema.

Os resultados demonstram que os compostos tiosemicarbazônicos VH08 (3 mg/Kg) e VH02 (100 mg/Kg) não promoveram diminuição do edema de orelha provocado pelo óleo de cróton quando comparados ao animais do grupo controle (fig. 2).

Figura 2 – Avaliação da diminuição de edema produzido por óleo de cróton em orelha de camundongos. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão do peso (g) do fragmento de orelha. $P < 0,05$ a significância foi determinada com ANOVA One-way e pós-teste de Newman-Keuls. * valores significativos em relação ao controle.



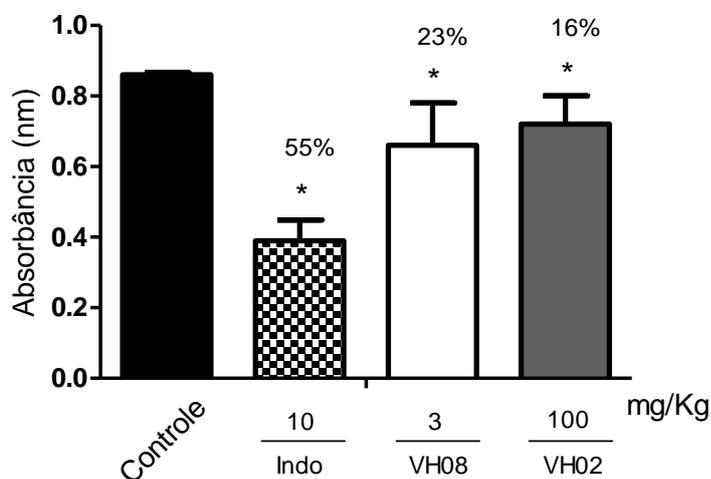
3.3 Permeabilidade vascular induzida por ácido acético

Os resultados apresentados demonstram que os compostos VH08 (3 mg/Kg) e VH02 (100 mg/Kg) promoveram diminuição significativa de 23% e 16% (tab. 2) na permeabilidade vascular do azul de Evans induzida por ácido acético, quando comparados com o grupo controle, os valores são demonstrados na figura 3.

Tabela 2 - Atividade dos derivados tiosemicarbazônicos VH08 e VH02 na permeabilidade vascular. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da absorbância de corante azul de Evans. $P < 0,05$ a significância foi determinada com ANOVA One-way e pós-teste de Newman-Keuls. * significativos em relação ao controle.

Grupo	Dose (mg/Kg)	Absorbância (nm) \pm D.P.	% INIB
Controle	-	0,86 \pm 0,006	-
Padrão	10	0,39 \pm 0,059	55
VH08	3	0,66 \pm 0,12	23
VH02	100	0,72 \pm 0,08	16

Figura 3 - Atividade dos derivados tiosemicarbazônicos VH08 e VH02 na permeabilidade vascular. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da absorbância de corante azul de Evans. $P < 0,05$ a significância foi determinada com ANOVA One-way e pós-teste de Newman-Keuls. * significativos em relação ao controle. $P < 0,05$ a significância foi determinada com ANOVA One-way e pós-teste de Newman-Keuls. * valores significativos em relação ao controle.

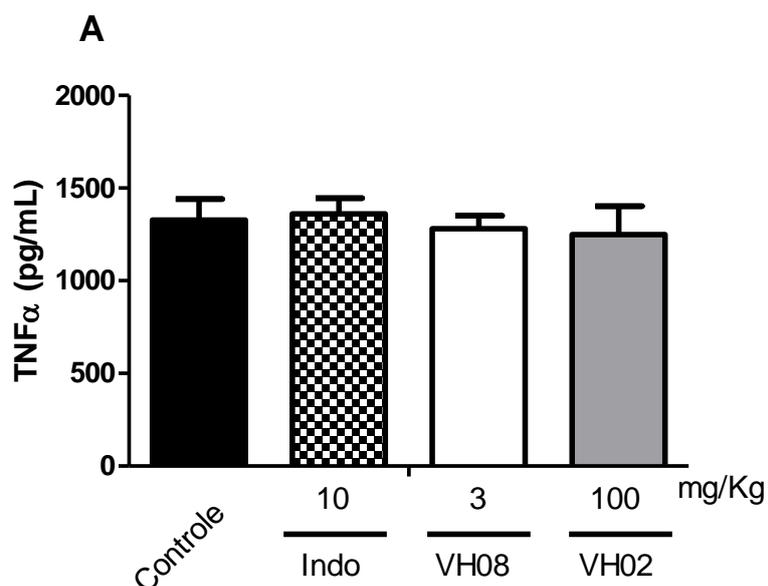


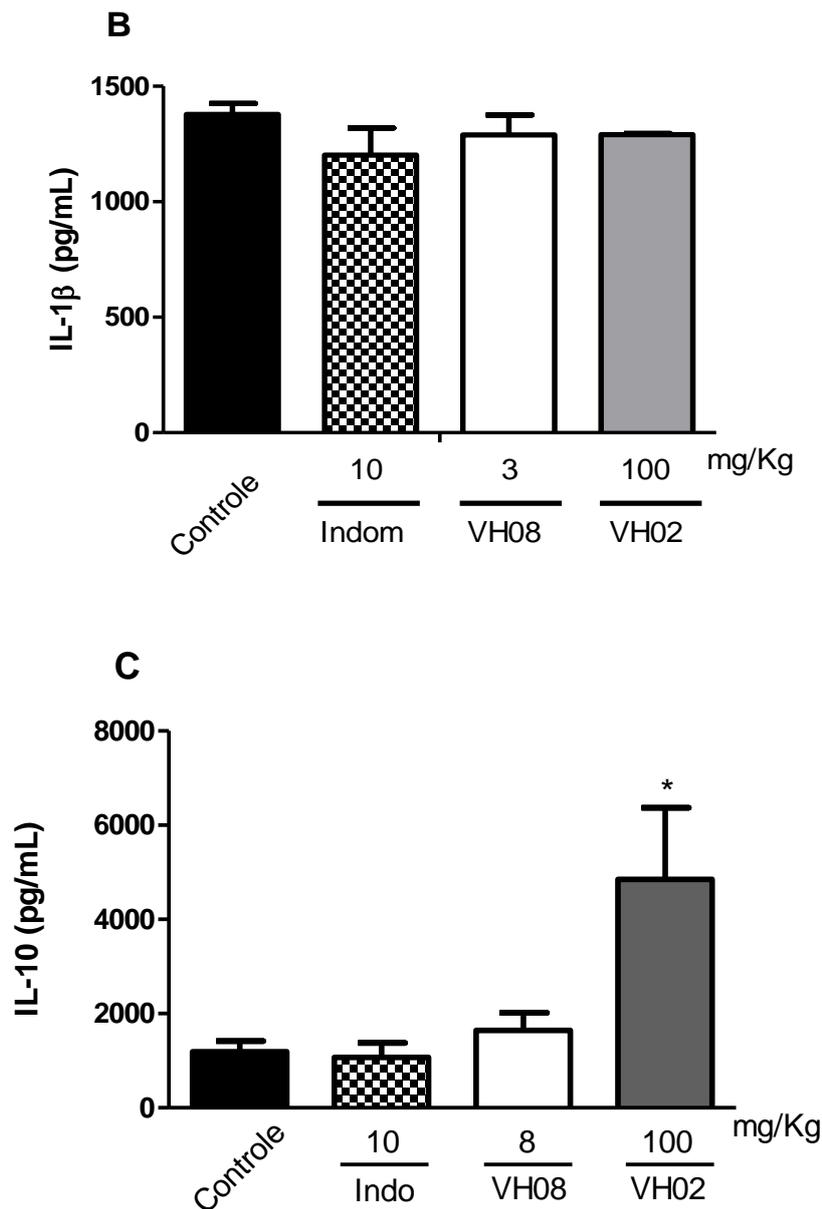
3.4 Quantificação dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-10

A quantificação dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-10 foi realizada utilizando as amostras dos exsudatos inflamatórios obtidos a partir do teste de bolsa de ar subcutânea após 6 horas de inoculação do agente flogístico.

Os resultados demonstram que os compostos tiossemicarbazônicos VH08 (3 mg/Kg) e VH02 (100 mg/Kg) não promoveram alteração nos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (fig. 4A) e IL-1 β (fig. 4B), no entanto, o nível da citocina anti-inflamatória IL-10 (fig. 4C) foi aumentado em 38% e 307% quando comparados aos animais do grupo controle, sendo o aumento significativo estatisticamente apenas para o derivado VH02.

Figura 4 – Quantificação dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-10 no exsudato inflamatório de bolsa de ar induzido por carragenina. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da quantidade de citocinas (pg/mL). $P < 0,05$ a significância foi determinada com ANOVA One-way e pós-teste de Newman-Keuls. * valores significativos em relação ao controle.



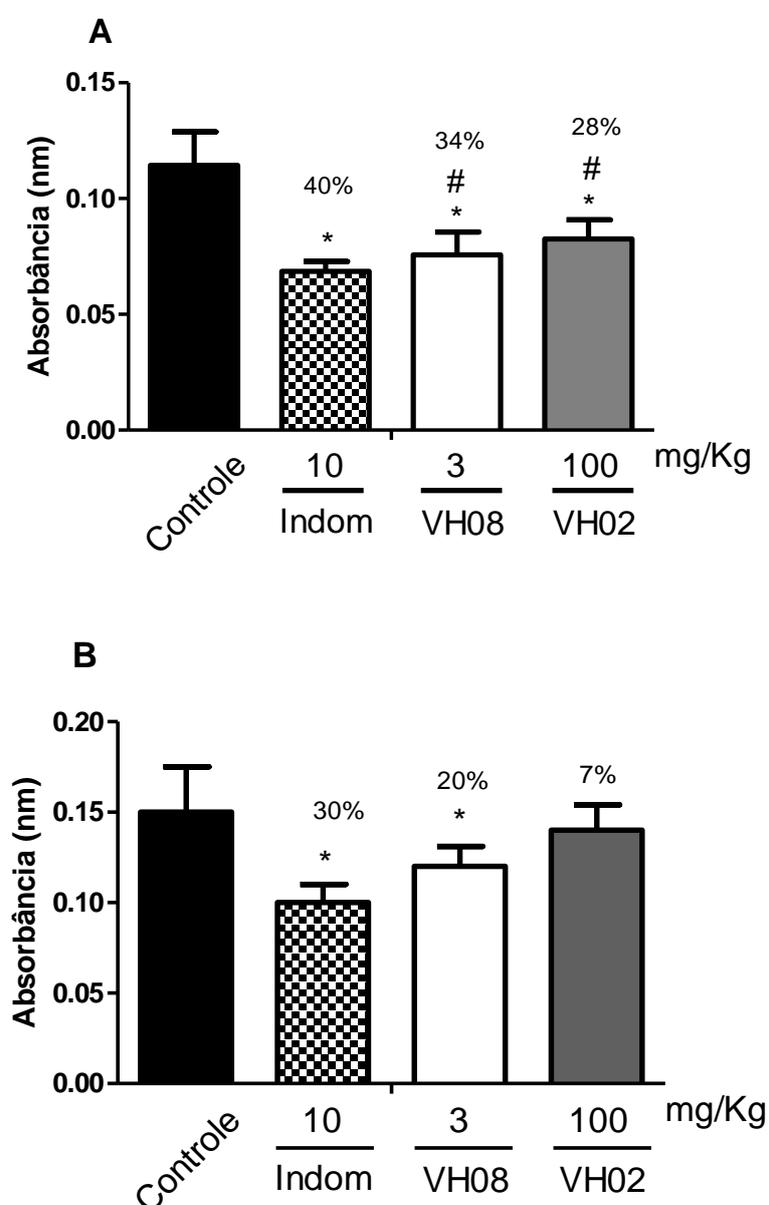


3.5 Determinação dos níveis de MPO

A determinação da presença da enzima MPO foi realizada através do exsudato inflamatório extraído da bolsa de ar subcutânea e do sobrenadante do macerado do fragmento de tecido retirado a partir do teste de edema de orelha induzido por óleo de cróton.

Os resultados indicam que houve uma diminuição de 34% e 28% (fig. 5A) e 20% e 7% (fig. 5B) nos níveis da enzima MPO presentes no exsudato da bolsa de ar subcutânea e no fragmento de tecido da orelha dos animais tratados com os compostos tiosemicarbazônicos VH08 (3 mg/Kg) e VH02 (100 mg/Kg) respectivamente, quando comparados aos animais do grupo controle.

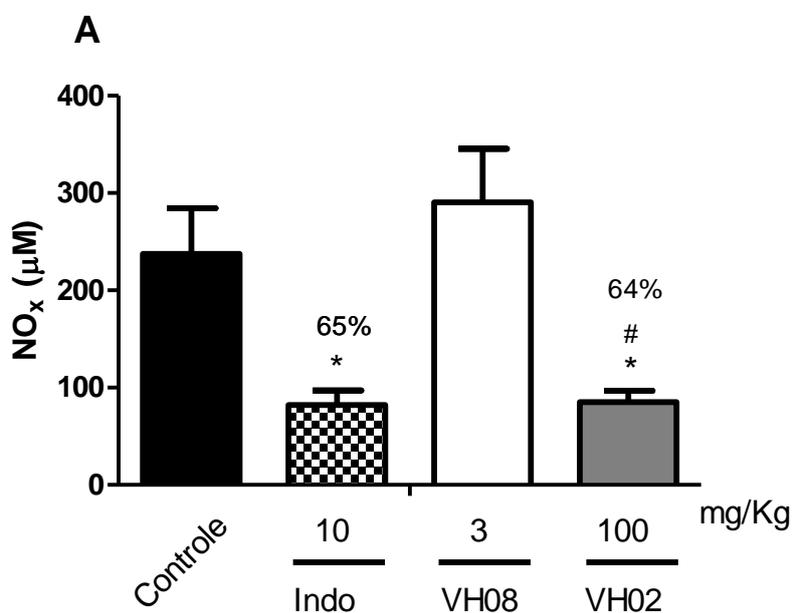
Figura 5 – Determinação da presença de MPO no exsudato inflamatório da bolsa de ar induzido por carragenina e no fragmento de orelha obtido no teste de edema gerado por óleo de cróton. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da absorbância (nm). $P < 0,05$ a significância foi determinada com ANOVA One-way e pós-teste de Newman-Keuls. * valores significativos em relação ao controle. # valores não significativos em relação ao padrão.

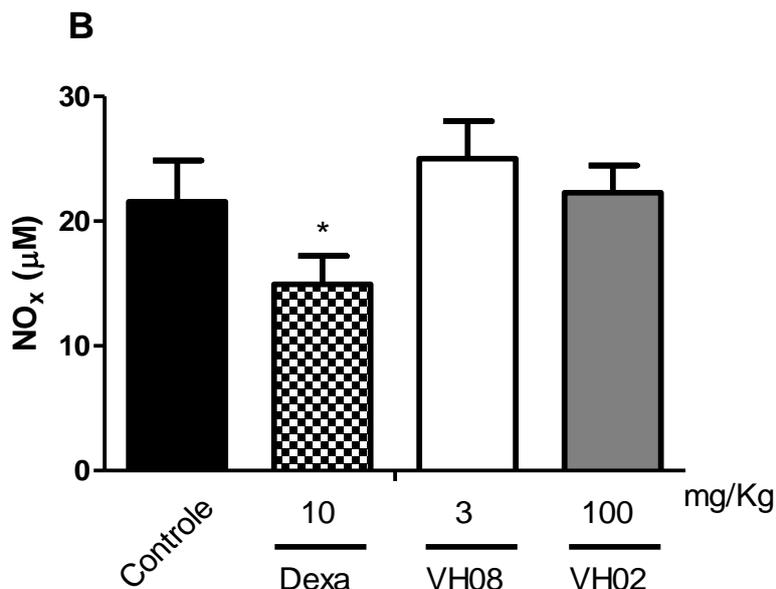


3.6 Quantificação dos níveis de NO

O tratamento dos animais com o derivado tiossemicarbazônico VH02 (100 mg/Kg) no teste de bolsa de ar induzida por carragenina, reduziu em 64% (fig. 6A) os níveis de óxido nítrico, no entanto o mesmo composto demonstrou não inibir a produção de NO no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton (fig. 6B), quando comparados aos animais do grupo controle. A indometacina foi utilizada como droga padrão para os efeitos de comparação no teste de bolsa de ar, enquanto que a dexametazona foi a referência no teste de edema de orelha. O composto VH08 não apresentou nenhum efeito inibidor da produção do óxido nítrico no foco inflamatório em ambos os testes. Os resultados estão expressos em μM e foram quantificados a partir dos subprodutos nitritos/nitratos (NO_x).

Figura 6 – Quantificação de NO no exsudato inflamatório de bolsa de ar induzido por carragenina e no fragmento de orelha obtido no teste de edema gerado por óleo de cróton. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão de NO_x em μM . $P < 0,05$ a significância foi determinada com ANOVA One-way e pós-teste de Newman-Keuls. * valores significativos em relação ao controle. # valores não significativos em relação ao padrão.





4 DISCUSSÃO

Nosso trabalho utilizou três diferentes modelos para demonstrar a atividade anti-inflamatória dos novos derivados tiossemicarbazônicos: o modelo de bolsa de ar subcutânea, o edema de orelha induzido por óleo de cróton e ensaio de permeabilidade vascular induzida por ácido acético.

A carragenina é um polissacarídeo coloidal extraído de algas vermelhas da classe rodofita (VAN DE VELDE *et al.*, 2002), caracteriza-se como um importante agente flogístico utilizado na promoção de inflamações nos experimentos de dor e inflamação. A ação da Carragenina inclui: vasodilatação, exsudação de plasma e liberação de mediadores químicos que contribuem para aumento de migração celular até o foco da inflamação (CRUNKHORN E MEACOCK, 1971; HENRIQUES *et al.*, 1987). O exsudato rico em proteínas, contém grande número de neutrófilos e metabólitos do ácido araquidônico o que implica na afirmação que são envolvidas as vias da COX e LOX (ZHANG *et al.*, 2001).

O modelo de bolsa de ar consiste na formação de uma cavidade subcutânea artificial, formada no dorso do animal a partir de injeção de ar estéril e posteriormente preenchida por solução de um agente irritante (carragenina), com objetivo de avaliar o nível de

migração celular de PMNs e outras células do sistema imunitário, como mastócitos e macrófagos no sítio inflamatório, esse modelo simula a cavidade sinovial na artrite reumatoide (Edwards et al., 1981). Os resultados apresentados no nosso estudo a partir desse ensaio demonstram que tanto o derivado VH08, quanto o VH02 apresentaram atividade anti-inflamatória, uma vez que houve redução do número de PMNs no exsudato inflamatório

O modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton é utilizado nas pesquisas para identificar a atividade anti-inflamatória de AINES de uso tópico, no entanto também tem validade para estudos realizados por anti-inflamatórios esteroidais. Este modelo inflamatório se caracteriza por vasodilatação e migração leucocitária decorrente da liberação de prostaglandinas, histamina e serotonina com ativação de fosfolipase A₂ (TRONGSAKUL et al., 2003).

No processo inflamatório os Leucócitos PMNs são as primeiras células ativadas e se apresentam de forma expressiva no foco inflamatório, caracterizando a primeira fase da inflamação (SPEYER et al., 2004). A partir da ativação dessa população celular inicia-se a produção e liberação de radicais livres, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs) os quais são bem representados pelo peróxido de hidrogênio, ânion superóxido, radicais hidroxila (OH⁻) e ácido hipocloroso (HOCl) (ZARBOCK e LEY, 2009; THOMAS et al., 2008) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), dos quais destacam-se o peroxinitrito e o NO (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). A produção de radicais livres está ligada a diversos processos fisiológicos exercendo importantes funções ao organismo, como por exemplo na sinalização celular, síntese de proteínas e atividade bactericida (SHANLEY et al., 2002), no entanto, se essas espécies moleculares se encontram de forma exacerbada, podem manifestar reações indesejáveis como dano em proteínas e no próprio tecido (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

A eliminação do agente inflamatório ocorre por meio da atividade hidrolítica de algumas enzimas, que ficam armazenadas no interior de grânulos dos PMNs (CASCAO et al., 2009). Merece destaque a MPO, uma enzima contida nos grânulos azurófilos dessas células de defesa (HANSSON et al., 2006; KUMAR e SHARMA, 2010).

Dessa forma, a MPO é uma enzima intensamente expressa durante a ativação neutrofílica e atua como promotora de danos tissulares por meio da produção de íons OH⁻ ou HOCl, este poderoso oxidante reage com duplas ligações de lipídios ocasionando peroxidação lipídica, o que leva ao aumento da permeabilidade de membranas celulares

(HANSSON et al., 2006; KLEBANOFF, 2005). Estudos realizados por Abu-Soud (2000) demonstraram que a MPO ainda pode catalisar o consumo de NO derivado do endotélio, inibindo portanto os efeitos anti-inflamatórios e vaso dilatadores desse composto.

Dessa maneira a determinação da presença de MPO no foco inflamatório, constitui uma das melhores formas de avaliar a atividade anti-inflamatória de novos fármacos, uma vez que a presença dessa enzima caracteriza um dos principais fatores na gênese de inflamações crônicas.

A partir do exsudato recolhido na bolsa de ar, foram determinadas a presença da MPO e os níveis de NO para melhor compreensão da atividade anti-inflamatória proposta pelos compostos tiossemicarbazônicos. Nota-se, portanto que os níveis de MPO foram reduzidos a partir do tratamento com ambos os compostos estudados, mas apenas os animais tratados com o composto VH02 tiveram diminuição dos níveis de NO quando comparados aos animais do grupo controle.

Ensaio semelhante realizado por Sayar e Melli (2005) corroboram com os resultados apresentados neste trabalho, mostrando que a indometacina é capaz de diminuir a presença de leucócitos PMNs. Ainda, a indometacina, droga de referência utilizada neste ensaio, é um AINE que inibe a atividade da enzima ciclooxigenase e diminui a síntese de prostaglandinas e tromboxanos a partir da degradação do ácido araquidônico (JURNA; BRUNE, 1990).

Segundo Lin e Thomas (2010) os agentes antioxidantes estão envolvidos no processos inflamatórios severos e crônicos. A quantificação dos níveis de NO através de seus subprodutos nitrito e nitrato são importantes reforços para confirmação da atividade anti-inflamatória promovida pelos compostos tiossemicarbazônicos VH02 e VH08.

Ainda, o NO é considerado como um importante vasodilatador uma vez que atua como agente relaxante da musculatura vascular, estando relacionado ao aumento da permeabilidade vascular (VON KNETHEN et al., 2007) e na migração de leucócitos por exercer função quimiotática (PAREDI e BARNES, 2009; MEDZHITOV, 2008; NATHAN, 2006).

De acordo com Luiking et al (2010) A síntese e aumento da concentração de NO só é permitida devido a ativação da enzima Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS) que é expressa quando o processo inflamatório se estabelece. É necessário lembrar que a ativação da iNOS acontece após a estimulação de macrófagos e células do endotélio principalmente pela interleucina IL-1 β e o fator de necrose tumoral TNF- α , importantes

citocinas pro-inflamatórias que atuam na fase aguda da inflamação (VAJDOVICH, 2008).

A partir dos exsudatos recolhidos no ensaio de bolsa de ar foram avaliados também os níveis de citocinas TNF α e IL-1 β (pró-inflamatórias) e IL-10 (anti-inflamatória). Os resultados apresentados a partir da quantificação dessas citocinas, mostram que não houve diminuição na quantidade TNF- α e IL-1 β para nenhum dos compostos testados e que apenas o composto VH02 promoveu aumento significativo da IL-10 quando comparado ao grupo controle. Trabalho realizado por Vigial e colaboradores (2008), demonstra que a indometacina não altera os níveis de TNF- α , corroborando com os nossos resultados. A síntese e secreção dessas citocinas é estimulada por vários fatores, como: complexos imunes, toxinas, lesões e processos inflamatórios. As principais ações do TNF- α e IL-1 β incluem ativação das células endoteliais e leucócitos, indução de reações sistêmicas de fase aguda, síntese e liberação de outras citocinas, fatores de crescimento, eicosanóides e óxido nítrico. Moléculas de adesão endotelial são sintetizadas na superfície vascular, facilitando a aderência de leucócitos circulantes (DINARELLO, 2009; SIMS E SMITH, 2010).

As respostas decorrentes da ação do TNF- α e IL-1 β envolve, tipicamente, vias de sinalização intracelular e ativação de fatores de transcrição celular como o NF- κ B que, uma vez ativado, modula a transcrição gênica de várias proteínas pró-inflamatórias, inclusive a transcrição dos genes que codificam estas citocinas (KUMAR e SHARMA, 2010)

O aumento da permeabilidade vascular é mediado por várias substâncias geradas durante o processo inflamatório. O mecanismo mais comum pelo qual esses mediadores promovem o aumento dessa permeabilidade é através da contração das células endoteliais que revestem as vênulas pós-capilares. Quando as células endoteliais se contraem as junções intercelulares se desfazem, permitindo o extravasamento plasmático. Outros mecanismos envolvidos no aumento da permeabilidade vascular inclui a retração das células endoteliais com envolvimento do citoesqueleto, lesões das células endoteliais mediadas por leucócitos, lesão endotelial direta, extravasamento através de novos capilares (capilares em regeneração) cujas junções intercelulares não estejam fechadas e por transcitose (LICHTMAN e WILLIAMS, 2006; MEHTA e MALIK, 2006).

Os resultados obtidos no ensaio de bolsa de ar caracteriza que a atividade anti-inflamatória se dá pela diminuição da migração celular de PMNs e MPO para o composto

VH08 e que, a diminuição do NO e o aumento da IL-10, além dos fatores anteriormente citados está relacionado a ação do produto VH02, sugerindo ação imunomoduladora e inibição no mecanismo de ativação da iNOS, o que explica a diminuição nos níveis de NO, que por sua vez está relacionado a diminuição da permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético.

Ainda podemos sugerir que ação anti-inflamatória dos derivados em estudo está relacionada ao bloqueio das lipoxigenases e inibição da síntese de Leucotrienos (C4, D4, E4) o que implica na diminuição da permeabilidade vascular demonstrado pelos nossos resultados, ainda pode estar relacionado com inibição de leucotrieno B4, ao ácido hidroxieicosatetraenóico (HETE) e as lipoxinas A4 e B4 (LXA4 e LXB4) o que explica a diminuição do número de PMNs no exsudato inflamatório, uma vez que a presença desses metabólitos do ácido aracônico aumentam o processo de quimiotaxia de leucócitos.

No entanto, são necessários novos testes para descoberta do real mecanismo de ação dos compostos estudados, uma vez que os dados apresentados mostram-se insuficientes para tal esclarecimento.

5 CONCLUSÃO

Através de modelos de bolsa de ar subcutânea, edema de orelha e permeabilidade vascular induzido por ácido acético para determinação da atividade anti-inflamatória, pode-se concluir que os compostos VH08 e VH02 apresentam atividade anti-inflamatória inibindo a migração de PMNs e a permeabilidade vascular. Sendo mais eficazes nas doses de 3 mg/Kg e 100 mg/Kg. Ainda, esses os derivados VH08 e VH02 não apresentam influência nos níveis de TNF- α e IL-1 β , contudo os níveis de IL-10 sofrem aumento em presença do composto VH02. Houve diminuição no níveis de enzima MPO, para ambos os compostos, no entanto só houve diminuição do nível de NO apenas para o derivado VH02.

6 AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado através de financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES.

7 REFERÊNCIAS

ABU-SOUD, H. M.; HAZEN, S. L. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 5425-5430, 2000.

BERALDO, Heloisa; GAMBINO, Dinorah. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.4, n.1, p. 31-39, 2004.

CARECETTO, H.; DI MAIO, R.; GONZÁLEZ, M.; RISSO, M.; SAGRERA, G.; SEOANE, G.; DENICOLA, A.; PELUFFO, G.; QUIJANO, C.; BASOMBRIO, M. A.; PAULINO, M.; OLEA-AZAR, C.; **European Journal Medicinal Chemistry**, 35, 343, 2000.

CASCAO, R.; ROSARIO, H.S.; FONSECA, J.E. Neutrophils: warriors and commanders in immune mediated inflammatory diseases. **Acta Reumatol Port**, v.34, n.2B, p.313-326, 2009.

CRUNKHORN, P.; MEACOCK, C. R. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. **British Journal of Pharmacology**, v. 42, p. 392 –402, 1971.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 519-50, 2009.

DOBEK, A. S.; KLAYMAN, D. L.; DICKSON JR., E. T.; SCOVIL, J. P.; TRAMONT, E. C.; **Antimicrobial and Agents Chemotherapy**, 1980.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chemico-biological Interactions**, 73, 1–27, 1990.

EDWARDS, J. C. et al. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. **The Journal of Pathology**, v. 134, n. 2, p. 147-56, 1981.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Free radicals in biology and medicine. 3.ed. New York: Oxford University Press Inc, 1999.

HANSSON, M.; OLSSON, I.; NAUSEEF, W.M. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, p. 214-224, 2006.

HENRIQUES, M. G. M. O. et al. Mouse paw oedema. A new model for inflammation? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 20, p. 243 – 249, 1987.

JURNA, I.; BRUNE, K. Central effect of the non-steroid anti-inflammatory agents, indometacin, ibuprofen, and diclofenac, determined in C fibre-evoked activity in single neurones of the rat thalamus. **Pain**, v. 41, p. 71-78, 1990

KALINOWSKI, D.S. et al. Design, synthesis, and characterization of novel iron chelators: structure–activity relationships of the 2-benzoylpyridine, 2007.

KLEBANOFF S.J. Phagocyte antimicrobial systems: Myeloperoxidase. **Proceedings of the Association of American Physicians** v.111, n.5, p.383-389. 1999.

KOSTER R, ANDERSON M, DE BEER EJ. Acetic acid for analgesic screening. **Federetion Proceedings**, 18,412, 1959.

KUMAR, M.; SHARMA, Uma D. Effect of pressure on nanomaterials. **Physica B: Condensed Matter**. 405, 13, 2820-2826, July 2010.

LICHTMAN, M. A.; WILLIAMS, W. J. **hematology**. In: (Ed.). New York, Williams Hematology, 2006.

LUIKING, Y.C.; ENGELEN, M.P.; DEUTZ, N.E. Regulation of nitric oxide production in health and disease. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.13, n.1, p.97-104, 2010.

MEDZHITOV, Ruslan; STETON, Daniel B.; KO, Joan S.; HEIDMANN, Thierry. Trex1 Prevents Cell-Intrinsic Initiation of Autoimmunity. **Cell**, v.134, n. 4, p. 587-598, August 2008.

MEHTA, D.; MALIK, A.B. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. **Physiol Rev.**, v. 86, n. 1, p. 279-367, Jan 2006.

MONTAÑO LOZA A., RODRÍGUEZ LOMELÍ X., GARCÍA CORREA J. E., DÁVALOS COBIÁN C., CERVANTES GUEVARA G., MEDRANO MUÑOZ F. Efecto de la administración de indometacina rectal sobre los niveles séricos de amilasa posteriores a colangiopancreatografía retrógrada endoscópica y su impacto en la aparición de episodios de pancreatitis secundaria. **Rev. esp. enferm. dig.** [revista en la Internet]. 2007 Jun.; 99(6): 330-336. Disponible em: <http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S113001082007000600005&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4321/S1130-01082007000600005>>, acesso em: 28 de janeiro de 2014.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 173-182, 2006.

PAREDI, P.; BARNES, P.J. The airway vasculature: recent advances and clinical implications. **Thorax**, v.64, n.5, p.444-450, 2009.

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. **Inflammation**, v.17, n.1, p.723-741, 1993.

SAYAR, K.; MELLI, M. Effect of combination of misoprostol and indomethacin on eicosanoid production in carrageenan-induced air pouch inflammation in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 369, p. 365-371, 1999

SCHIANTARELLI, P.; CADEL, S.; ACERBI, D.; PAVESI, L. Anti-inflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. **Arzneim.-Forsch./Drug Res.** v. 32, p. 230-235, 1982.

SHANLEY, T.P.; ZHAO, B.; MACARIOLA, D.R.; DENENBERG, A.; SALZMAN, A.L.; WARD, P.A. Role of nitric oxide in acute lung inflammation: lessons learned from the inducible nitric oxide synthase knockout mouse. **Crit Care Med**, v. 30, n. 9, p. 1960-8, Sep 2002.

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 2, p. 89-102, 2010.

SITÔNIO, M.M.; CARVALHO JUNIOR, C.H.R.; CAMPOS, I.A.; SILVA, J.BN.F.; LIMA, M.C.A.; GÓES, A.J.S.; MAIA, M.B.S., NETO, P.J.R.; SILVA, T.G. Anti-inflammatory and anti-arthritic activities of 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione (β -lapachone). **Inflamm. Res.** v. 62, p. 107-113, 2012.

SMEE, D.F., SIDWELL, R.W. A review of compounds exhibiting ant-orthopoxvirus activity in animal models. **Antiviral Research**, 57, 41-52, 2003.

SPEYER, C.L.; GAO, H.; RANCILIO, N.J.; NEFF, T.A.; HUFFNAGLE, G.B.; SARMA, J.V.; WARD, P.A. Novel Chemokine Responsiveness and Mobilization of Neutrophils during Sepsis. **Am. J. Pathol.** v. 165, p. 2187-2196, 2004.

THOMAS, S.R.; WITTING, P.K.; DRUMMOND G.R. Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. **Antioxid Redox Signal**, v.10, n.10, p.1713-1765, 2008.

TRONGSAKUL, S.; PANTHONG, A.; KANJANAPOTHI, D.; TAESOTIKUL, T. The analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activity of *Diospyros variegata* Kruz. **Journal of ethnopharmacology**, v. 85, p. 221-225, 2003.

VAJDOVICH, P. Free radicals and antioxidants in inflammatory processes and ischemia-reperfusion injury. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v.38, n.1, p.31-123, 2008.

VAN DE VELDE, F., KNUTSEN, S. H., USOV, A. L., ROLLEMA, H. S., & CEREZO, A. S. ¹H and ¹³C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: Application in research and industry. **Trends in Food Science & Technology**, 13, 73–92, 2002a.

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

VON KNETHEN, A.; SOLLER, M.; BRUNE, B. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) and sepsis *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, v.55, n.1, p.19-25, 2007.

ZARBOCK, A.; LEY, K. Neutrophil adhesion and activation under flow. **Microcirculation**, v.16, n.1, p.31-42, 2009.

ZHANG, Y.; YANG, Z.; GAO, X. & WU, G. The role of 5-hydroxytryptamine 1A and 5-hydroxytryptamine 1B receptors in modulating spinal nociceptive transmission in normal and carrageenan-injected rats. **Pain**, 92(1-2), p. 201-211, 2001.

Capítulo 4 - Atividade Antinociceptiva de um Novo Derivado Semicarbazônico e um Tiosemicarbazônico

Interfaces Científicas

Jailson Oliveira da Silva, Terezinha Gonçalves da Silva, Dalci José Brondani, Silene Carneiro do Nascimento.

J. O. SILVA; T. G. SILVA; S. C. NASCIMENTO;

Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Artur Sá, s/n, Cidade Universitária, Recife/PE, Brasil.

e-mail: Jailson_silva.22@hotmail.com

D. J. BRONDANI

Departamento de Ciências farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Artur Sá, s/n, Cidade Universitária, Recife/PE, Brasil.

Resumo

Objetivo: Derivados carbazônicos tem sido estudados por sua atividade, anti-inflamatória, antitumoral e antinociceptiva. O objetivo deste trabalho foi de avaliar o efeito antinociceptivo e o possível mecanismo de ação dos novos derivados estudados. **Material e métodos:** A atividade antinociceptiva foi comprovada pelo teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético e o teste de formalina, solução de ácido acético a 1% e solução de formaldeído a 2,5% foram utilizados como agentes nociceptivos. Glibenclamida 2 mg/Kg foi utilizado como bloqueador dos canais de K_{ATP} para verificação dos composto por essa via. **Resultados:** Os derivados VH21 (25mg/Kg) e LS18A (25 mg/Kg) reduziram o número de contorções abdominais em 79% e 65% e o tempo de lambida da pata em 65% e 48% na segunda fase da nocicepção quando comparados ao animais do grupo tratado apenas com veículo ($p<0,05$). **Conclusões:** houve atividade antinociceptiva significativa para os dois derivados testados e sabe-se que os canais de K_{ATP} não estão envolvidos no mecanismo de ação do VH21 e a atividade nociceptiva está relacionada a atividade anti-inflamatória.

Palavras chave: dor. nocicepção. tiosemicarbazônas. semicarbazônas.

1 INTRODUÇÃO

Estudos na área da farmacologia vem ganhando espaço e contribuído para o progresso da ciência na descoberta de novas drogas com atividades e analgésica e antipirética mais modernas. Esses avanços têm sido possíveis graças aos recentes conhecimentos dos mecanismos moleculares da fisiopatologia das doenças, principalmente na atividade de enzimas, canais iônicos, receptores e modulação da liberação de mediadores químicos. Derivados carbazônicos tem sido relatados em diversos estudos por sua atividade, anti-inflamatória, antitumoral e antifúngica (DOBEK et al., 1980; KALINOWSKI et al., 2007; SMEE e SIDWELL, 2003) antimalárica (WEST et al., 1993) e antichagásica (CARECETTO, 2000). Segundo Do campo (1990), compostos Semicarbazônicos e Tiosemicarbazônicos possuem propriedades medicinais com capacidade na inibição do crescimento de alguns organismos patogênicos. De modo geral a atividade desses compostos pode estar relacionado a inibição enzimática, interação com a molécula de DNA e ou inibição de síntese de DNA (BERALDO, 2004). Apesar da grande versatilidade farmacológica apresentada por esta classe de compostos, diferenças estruturais podem ocasionar manifestação específica na atividade. Por este motivo o nosso trabalho tem por objetivo tentar descobrir os mecanismos de ação de novos derivados semicarbazônicos e tiosemicarbazônicos na atividade analgésica para promover mais segurança na linha de produção de novos fármacos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Drogas

O derivado semicarbazônico (LS18A) (2Z)-2-(piridina-3-ilmetilideno)hidrazinacarbatioamida e o derivado VH21 – (2E)-2-(piridina-4-ilmetilideno)hidrazinacarboxiamida, foram sintetizados e adquiridos pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LabSINFA), Departamento de Farmácia/UFPE/Recife-Brasil. O AAS foi comprada de Bayer, o Ácido acético glacial e formaldeído foram comprados de VETEC, São Paulo, Brasil. Tween 20, e indometacina foram adquiridos da Sigma, EUA. O veículo utilizado para diluição dos derivados carbazônicos foi solução aquosa a 2-5% de tween 20.

2.2 Animais

Foram utilizados camundongos adultos albinos swiss de variedade *Mus musculus*, machos, pesando entre 25 e 30g provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da UFPE/Recife-Brasil. Os animais foram divididos em grupos de seis animais/gaiola e mantidos sob controle de temperatura (22 ± 2 °C) e ciclo de claro/escuro de 12/12h. Água e comida foram disponibilizados sem restrições. Antes do início dos experimentos, os animais foram aclimatados ao ambiente por ao menos 30 min. Para realização das atividades antinociceptivas os animais foram mantidos em jejum por 4 horas antes de cada ensaio. Os experimentos foram conduzidos sob processo 035663/2013-90 aprovado pelo comitê de ética e experimentação animal da UFPE e seguindo os princípios éticos do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e as normas do Instituto Nacional de Saúde e Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório.

2.3 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

A ação antinociceptiva foi verificada através do teste de contorção abdominal induzida pelo ácido acético segundo Koster et al. (1959). Veículo (água/tween 20 a 2%), Ácido Acetilsalicílico - AAS (200 mg/Kg), VH21 (6,25, 25 e 100mg/Kg), ou LS18A (6,25, 25 e 100 mg/Kg) foram administrados por V.O. 60 min antes da injeção do agente irritante (ácido acético 1%). Após 60 minutos da administração das substâncias testes 10 mL/Kg de ácido acético (1%) foi injetado via I.P. em região abdominal de cada animal. Passados 10 min foi iniciada contagem do 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 a média de grupo controle, segundo a equação. $\%INIB = ((mc - mt) / mc) * 100$.

Nota. mc = média de contorções do grupo controle; mt = média de contorções do grupo tratado.

2.4 Participação dos canais de Potássio (K_{ATP})

Veículo (água/tween 20 a 2%), Ácido Acetilsalicílico - AAS (200 mg/Kg) foram administrados V.O. 60 min antes da injeção do ácido acético (1%). 60 minutos após administração das substâncias testes, 10 mL/Kg de ácido acético (1%) foi injetado via I.P. em região abdominal de cada animal.

A participação dos canais de potássio no modelo de nocicepção induzida por ácido acético foi avaliada pela administração de glibenclâmida (2 mg/Kg) injetada 30 minutos antes do tratamento com o derivado VH21.

2.5 Teste de formalina

Veículo (água/tween 20 a 2%), VH21 (25 mg/Kg) ou LS18A (25 mg/Kg) foram administrados V.O. 60 min e Morfina (4 mg/Kg) via I.P. 30 min antes da injeção de 20 μ L/pata de formalina (2,5%). O tempo de lambida das patas foi registrada em duas diferentes fases: 1^a - dor neurogênica (0-5 min) e a 2^a dor inflamatória (15-30 min) após injeção da formalina.

3 RESULTADOS

3.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

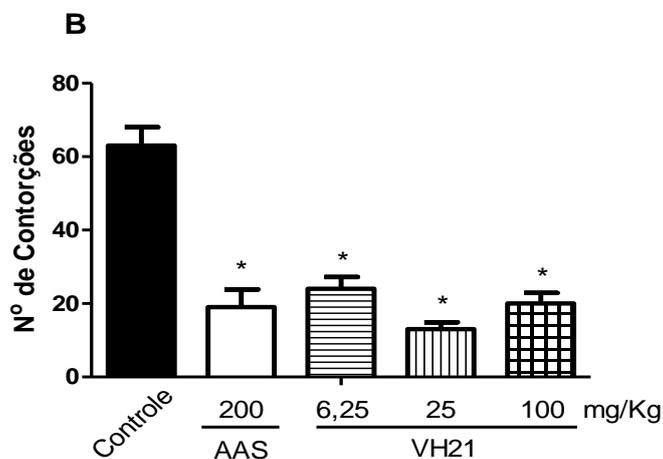
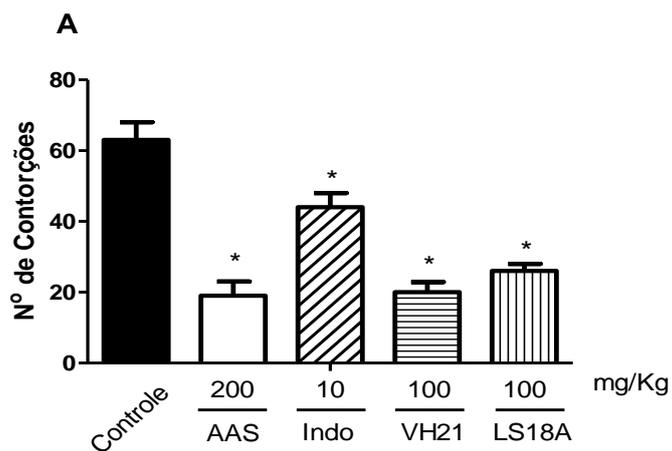
O efeito antinociceptivo avaliado a partir de estímulos químicos induzidos pelo ácido acético apresentou resultados animadores na diminuição das contorções abdominais. O uso dos compostos VH21 e LS18A nas doses 100 mg/Kg (fig. 1A) apresentou atividade antinociceptiva quando comparados aos animais do grupo controle. Foi realizada uma curva de relação dose resposta para as doses de 6,25; 25 e 100 mg/Kg, tanto para o composto VH21 (fig 1B) quanto para o LS18A (fig 1C). O comportamento de ambos os derivados foi dose resposta não-dependente. No entanto o derivado VH21 na dose de 25 mg/Kg inibiu o número de contorções em 79% se mostrando a mais efetiva, enquanto que o derivado LS18A nas doses de 25 mg/Kg e 100 mg/Kg apresentou inibição de 65% e 58% respectivamente, não apresentando entre elas diferença estatística significativa (tab. 1). Ainda, quando comparado à Indometacina utilizado como padrão a atividade dos compostos VH21 e LS18A se mostrou estatisticamente significativa (fig 1A). E o derivado VH21 (25 mg/Kg) apresentou-se estatisticamente significativo quando comparado aos animais tratados com AAS, também utilizado como padrão (fig 2).

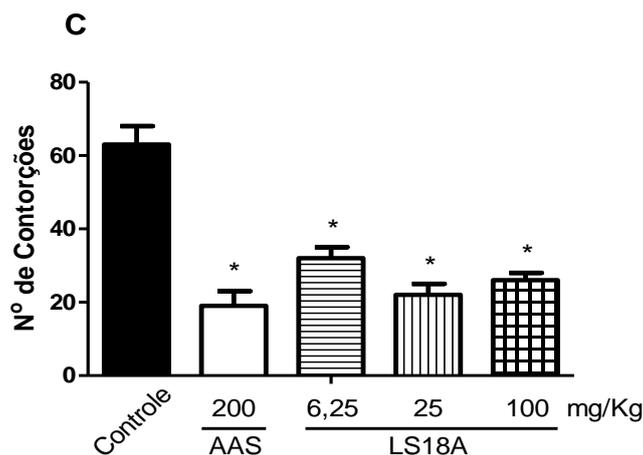
Tabela 1 - Determinação do percentual de inibição das contorções abdominais. O N° de contorções = média das contorções de cada grupo. Os resultados são expressos em média \pm Desvio Padrão do número de contorções abdominais/grupo teste. $P < 0,05$ análise de variância ANOVA e pós -teste de Newman-Keuls. * valores significativos em relação ao grupo controle.

Grupo	Dose (mg/Kg)	N° de contorções \pm DP	% INIB
Controle	-	63 \pm 4,87	-
AAS	200	19 \pm 4,83	69*
Indometacina	10	44 \pm 4,03	30*
	6,25	24 \pm 3,21	62*
VH21	25	13 \pm 1,92	79*
	100	20 \pm 2,88	68*

	6,25	32 ± 3,96	50*
LS18A	25	22 ± 3,00	65*
	100	26 ± 2,17	58*

Figura 1 – Diminuição das contorções abdominais a partir do tratamento com os compostos VH21 e LS18A. em A- AAS, Indometacina, VH21 e LS18A (100 mg/Kg), B- curva dose resposta VH21 e C- curva dose resposta LS18A. Os resultados são expressos em média ± Desvio Padrão do número de contorções abdominais/grupo teste. P<0,05 análise de variância ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls. * valores significativos em relação ao grupo controle.





3.2 Participação dos canais de Potássio (K_{ATP})

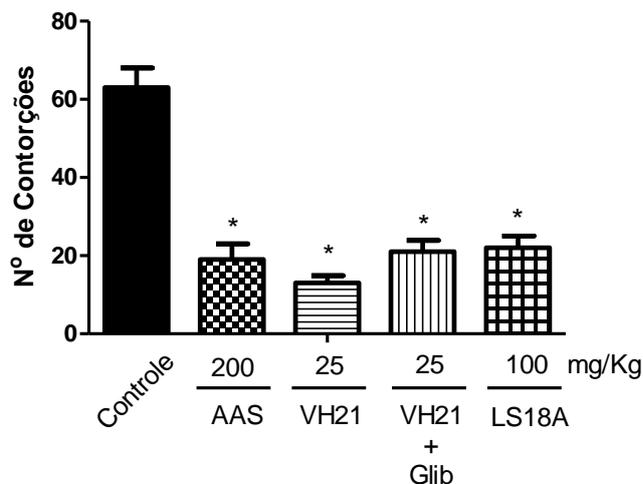
A participação dos canais de K_{ATP} na atividade nociceptiva foi avaliada através do modelo de contorções abdominais induzidos por ácido acético (1%). Neste teste foi utilizada glibenclamida como agente bloqueador desses canais. A partir dos resultados obtidos, verificou-se que a atividade antinociceptiva promovida pelo composto VH21 (25 mg/Kg) nos animais que receberam a glibenclamida 30 minutos antes do estímulo doloroso, não sofreu alteração quando contadas o número de contorções abdominais e comparadas ao animais do grupo controle. Os resultados estão expressos na tabela 2

Tabela 2 - Determinação do percentual de inibição das contorções abdominais e participação dos canais de potássio na nocicepção. O N° de contorções = média das contorções de cada grupo. Os resultados são expressos em média \pm Desvio Padrão do número de contorções abdominais/grupo teste. $P < 0,05$ análise de variância ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls. * valores significativos em relação ao grupo controle.

Grupo	Dose (mg/Kg)	Nº de contorções \pm DP	% INIB
Controle	-	63 \pm 4,87	-
AAS	200	19 \pm 4,83	69*
VH21	25	13 \pm 1,92	79*
VH21 + Glib	25	21 \pm 2,92	67*
LS18A	25	22 \pm 3,00	65*

Figura 2 – Determinação da resposta nociceptiva frente aos compostos VH21 e LS18A e verificação da participação dos canais de potássio no modelo de contorções abdominais. Os resultados são expressos em

média \pm Desvio Padrão do número de contorções abdominais/grupo teste. $P < 0,05$ análise de variância ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls. * valores significativos em relação ao grupo controle.



3.3 Teste de formalina

Os resultados demonstram que, na primeira fase tanto o composto VH21, quanto o LS18A não apresentaram diminuição do tempo de lambida da pata (fig. 3) sensibilizada com a formalina, ou seja, ambas não apresentam atividade em receptores periféricos. No entanto, na segunda fase do teste houve percentual de inibição no tempo de lambida da pata em 48% e 65% (tab. 4) para os derivados VH21 (25 mg/Kg) e LS18A (25 mg/Kg) respectivamente quando comparados ao tempo de lambida apresentado pelos animais do grupo controle. Esses resultados sugerem que a atividade antinociceptiva está relacionada aos mediadores e mecanismos inflamatórios.

Figura 3 – Determinação da atividade antinociceptiva dos compostos VH21 e LS18A (25 MG/Kg) frente ao teste de formalina. Os resultados são expressos em média \pm Desvio Padrão do tempo de lambida na pata sensibilizada. $P < 0,05$ análise de variância ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls. * valores significativos em relação ao grupo controle.

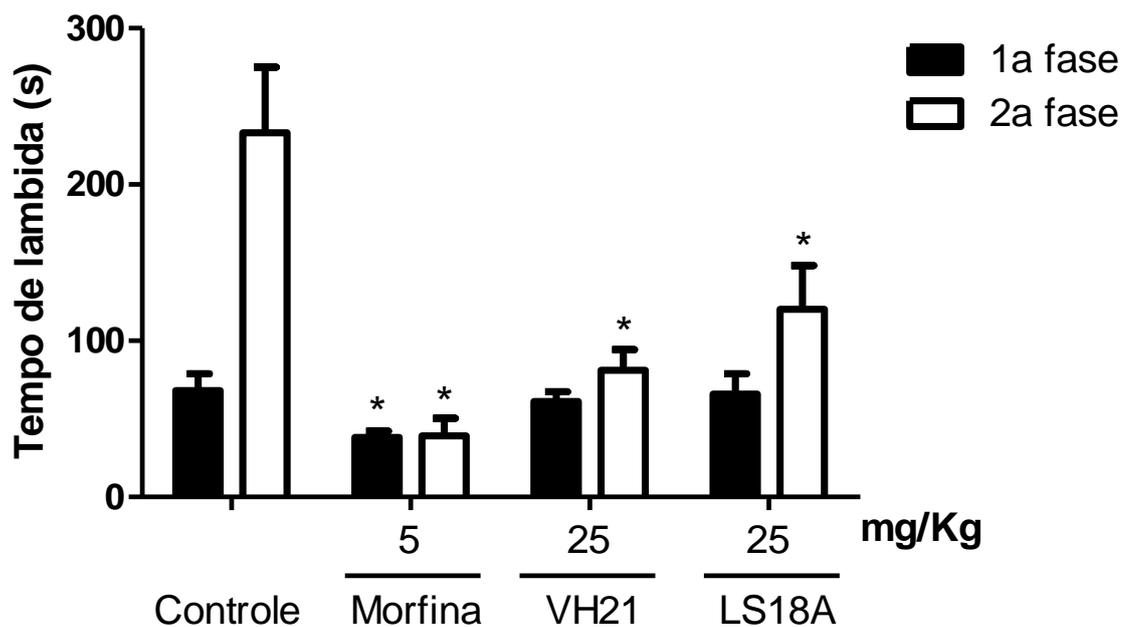


Tabela 3 – Demonstração do percentual de inibição da nocicepção no teste de formalina. Os resultados são expressos em média \pm Desvio Padrão do tempo de lambida na pata sensibilizada. $P < 0,05$ análise de variância ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls. * valores significativos em relação ao grupo controle.

Grupo	Dose (mg/Kg)	Tempo de lambida					
		Fase 1 (0-5 min)			Fase 2 (15-30 min)		
		Tempo (s)	D.P.	% INIB	Tempo (s)	D.P.	% INIB
Controle	-	68	10,8	-	233	42,2	-
Morfina	5	38	4,18	44*	39	11,4	83*
VH21	25	66	12,9	3	120	28,2	48*
LS18A	25	61	6,36	10	81	13,5	65*

4 DISCUSSÃO

4.1 Atividade antinociceptiva

O presente trabalho demonstrou que os compostos estudados mostraram atividade antinociceptiva nos dois modelos utilizados, teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético e teste de formalina.

Segundo Lapa e colaboradores (2003), em camundongos, os estímulos nociceptivos provocados por injeção intraperitoneal de ácido acético são visualizados através das contorções abdominais e estiramento das patas traseiras do animal, com isso o modelo de contorções abdominais avalia a resposta motora decorrente do estímulo nociceptivo. O ensaio de contorções é utilizado como teste de triagem, uma vez que a nocicepção é causada por um somatório de eventos neurotransmissores e neuromoduladores em nível do sistema nervoso periférico ou central e pode sofrer influência analgésica em ambos os sistemas.

O envolvimento dos canais iônicos, como os canais de K_{ATP} , são utilizados na tentativa de avaliação da participação da antinocicepção supraespinhal induzida por morfina e glibenclamida (OCANA et al., 1990). Estes canais podem ser encontrados nos tecidos periféricos e na medula espinhal (CALO'G et al., 2000).

Os nossos resultados se mostraram promissores quanto a atividade antinociceptiva, uma vez que os derivados VH21 e LS18A se mostraram eficazes na diminuição das contorções abdominais exercidas sobre a influência do ácido acético nos animais tratados com essas substâncias. Um estudo realizado por Ali e colaboradores (2012) corroboram com nossos achados, uma vez que a atividade da acetofenona semicarbazona e benzofenona semicarbazona apresentaram resultados semelhantes no teste de contorções abdominais para esta classe de compostos.

Neste trabalho, foi investigada a participação dos canais de K_{ATP} na atividade antinociceptiva do derivado tiossemicarbazônico VH21 no modelo de contorções abdominais induzidos pelo ácido acético. Os resultados mostram que o pré-tratamento com glibenclamida não alterou a resposta antinociceptiva produzida pelo composto testado, sugerindo que sua ação não está relacionada a esse tipo de receptor.

O teste de formalina é considerado o modelo mais válido para validação da dor aguda e tônica, quando correlacionado aos testes de dor térmica ou mecânica (TRONGSAKUL et al., 2003). Este ensaio é geralmente utilizado para avaliação de compostos com possível potencial de efeito analgésico. Para provocar estímulos nocivos em camundongos, uma

injeção de solução diluída de formalina é aplicada na região subplantar da pata traseira do animal. A resposta nociceptiva registrada é quantificada pelo tempo que o animal passa lambendo a pata injetada. A menção de atividade nociceptiva se dá em dois tempos distintos de lambida, um período de zero a cinco minutos (fase precoce) – efeito direto nos nociceptores (PUIG e SORKIN, 1996), substâncias com efeito nesta fase estão associadas com atividade central, tal como acontece com medicamentos opióides (SHIBATA, et al., 1998) e antidepressivos (SAWYNOK et al., 1999). No período entre quinze e trinta minutos após a injeção da formalina (fase tardia) – efeito é causado por liberação de mediadores químicos inflamatórios, ativação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (CHAPLAN et al., 1997) e produção de NO na medula espinhal (OKUDA et al., 2001), consequentemente, drogas com efeito nesta fase são fortes candidatos a medicamentos anti-inflamatórios.

Nossos resultados demonstram que no teste de formalina, tanto o composto VH21, como o LS18A apresentaram redução significativa no tempo de lambida da pata apenas na segunda fase da nocicepção quando comparados aos animais do grupo controle, sugerindo assim que estes derivados apresentam mecanismo de ação relacionada as vias anti-inflamatórias. Resultados semelhantes publicados por Rocha e colaboradores (2006) a partir do uso de benzaldeído semicarbazona (BS) na nocicepção induzida por formalina, reforçam os nossos achados, visto que o BS reduz significativamente o tempo de lambida na segunda fase do teste.

Blackburn-Munro e colaboradores (2002) salientam a estreita relação da ação de medicamentos utilizados no tratamento de convulsões, como carbamazepina e fenitoína, com a atividade mais eficaz na segunda fase da resposta nociceptiva induzida por formalina. Sendo assim os resultados apresentados são inconclusivos para propor o mecanismo de ação dos compostos testados, portanto, tornam-se necessários mais estudos para descoberta do verdadeiro mecanismo de ação desses novos derivados carbazônicos.

5 CONCLUSÃO

Através de modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético e o teste de formalina pode-se concluir que ambos os compostos testados VH21 e LS18A apresentam atividade antinociceptiva uma vez que o número de contorções abdominais

foram reduzidas. Ainda pode-se concluir que os canais de K_{ATP} não estão envolvidos no mecanismo de ação do composto VH21 e que atividade de ambos os derivados carbazônico possuem atividade antinociceptiva relacionada a inibição de mediadores inflamatórios. No entanto são necessários novos estudos para desvendar o correto mecanismo de ação dessas novas drogas.

6 AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado através de financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES.

7 REFERÊNCIAS

ALI, S. M. M.; JESMIN, M.; AZAD, M. A. K.; ISLAM, M. K.; ZAHAN, R. Anti-inflammatory and analgesic activities of acetophenone semicarbazone and benzophenone semicarbazone. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. p. 1036-1039, 2012.

BERALDO, Heloisa; GAMBINO, Dinorah. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.4, n.1, p. 31-39, 2004.

BLACKBURN-MUNRO, G., IBSEN, N., ERICHSEN, H.K. A comparison of the anti-nociceptive effects of voltage-activated Na^+ channel blockers in the formalin test. **European Journal of Pharmacology**, 445, 231–238, 2002.

CALO' G.; GUERRINI, R. RIZZI, A. SALVADORI, S.; REGOLI, D. Pharmacology of nociceptin and its receptor: a novel therapeutic target. **Br J Pharmacol**, v. 129, p. 1261-83, 2000.

CARECETTO, H.; DI MAIO, R.; GONZÁLEZ, M.; RISSO, M.; SAGRERA, G.; SEOANE, G.; DENICOLA, A.; PELUFFO, G.; QUIJANO, C.; BASOMBRIIO, M. A.;

PAULINO, M.; OLEA-AZAR, C.; **European Journal Medicinal Chemistry**,35, 343, 2000.

CHAPLAN, S.R., MALMBERG, A.B., YAKSH, T.L. Efficacy of spinal NMDA receptor antagonism in formalin hyperalgesia and nerve injury evoked allodynia in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 280, p. 829–838, 1997.

DOBEK, A. S.; KLAYMAN, D. L.; DICKSON JR., E. T.; SCOVIL, J. P.; TRAMONT, E. C.; **Antimicrobial and Agents Chemotherapy**,1980.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chemico-biological Interactions**, 73, 1–27, 1990.

KALINOWSKI, D.S. et al. Design, synthesis, and characterization of novel iron chelators: structure–activity relationships of the 2-benzoylpyridine, 2007.

LAPA, A. J. et al. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. Porto Alegre: Gráfica Metrópole. **Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais**, 119 p, 2003.

OCANA, N.; DEL POZO, E.; BARRIOS, M.; ROBLES, L.I.; BAYENS, J.M. Na ATP-dependent potassium channel blocher antagonizes morphine analgesia. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 189, p. 377-378, 1990.

OKUDA, K., SAKURADA, C., TAKAHASHI, M., YAMADA, T., SAKURADA, T. Characterization of nociceptive responses and spinal release of nitric oxide metabolites and glutamate evoked by different concentrations of formalin in rats. **Pain**, v.92, p. 107–115, 2001.

PUIG, S., SORKIN, L.S. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppress phase-2 activity. **Pain**, v. 64, p. 345–355, 1996.

ROCHA, L. T., COSTA, K. A., OLIVEIRA, A. C. P., NASCIMENTO Jr. E. B., BERTOLLO, C. M., ARAÚJO, F., TEIXEIRA, L. R., ANDRADE, S. P., BERALDO, H., COELHO, M. M. Antinociceptive, antiedematogenic and antiangiogenic effects of benzaldehyde semicarbazone. **Life Sciences**, v. 79, p. 499–505, 2006.

SAWYNOK, J., ESSER, M.J., REID, A.R. Peripheral antinociceptive actions of desipramine and fluoxetine in an inflammatory and neuropathic pain test in the rat. **Pain** v. 82, p. 149–158, 1999.

SHIBATA, M., OHKUBO, T., TAKAHASHI, H., INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347–352, 1998.

SMEE, D.F., SIDWELL, R.W. A review of compounds exhibiting ant-orthopoxvirus activity in animal models. **Antiviral Research**, 57, 41–52, 2003.

TRONGSAKUL, S.; PANTHONG, A.; KANJANAPOTHI, D.; TAESOTIKUL, T. The analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activity of *Diospyros variegata* Kruz. **Journal of ethnopharmacology**, v. 85, p. 221-225, 2003.

WEST, D. X.; LIBERTA, A.; PADHYE, S. B.; CHIKATE, R. C.; SONAWANE, P. B.; KUMBHAR, A. S.; YERANDE, R. G.; **Coord. Chem. Rev.** 123, 49, 1993.

Conclusão

CONCLUSÕES

A partir dos modelos empregados para comprovação da atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e citotóxica, pode-se concluir que:

- O composto VH25 é citotóxico em linhagem de HL60;
- O derivado VH25 promove alterações morfológicas em células cancerosas e apresenta mecanismo de ação da morte celular por apoptose;
- O composto VH08 apresenta alta toxicidade; os compostos VH21 e LS18A toxicidade moderada e os compostos VH02 e VH08 toxicidade baixa ou não apresentam;
- Os derivados VH21 e VH28 apresentam atividade anti-inflamatória com baixa eficácia;
- Os compostos VH08 e VH02 apresentam atividade anti-inflamatória inibindo a migração de PMNs e a permeabilidade vascular, sendo mais eficazes nas doses de 3 mg/Kg e 100 mg/Kg.
- Os derivados VH08 e VH02 não alteram os níveis de TNF- α e IL-1 β
- O nível de IL-10 tem aumento considerável em presença do composto VH02;
- A quantidade de MPO, em presença dos compostos VH08 e VH02, sofre diminuição no local da inflamação;
- O produto VH02 promove diminuição dos níveis de NO no foco inflamatório;
- Os compostos VH21 e LS18A apresentam atividade antinociceptiva, diminuindo o número de contorções abdominais e lambidas na 2ª fase do ensaio de formalina
- Os canais de K_{ATP} não estão envolvidos no mecanismo de ação do composto VH21 para o efeito nociceptivo;

METODOLOGIA

1 Material

O derivado semi-carbazônico (LS18A) (2Z)-2-(piridina-3-ilmetilideno) hidrazinacarbatioamida e os derivados tio-semi-carbazônicos VH02 - (2E)-2-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno), VH08 - (2E)-2-(4-fluorobenzilideno) hidrazinacarbatioamida, VH21 - (2E)-2-(piridina-4-ilmetilideno) hidrazinacarboxiamida, VH25 - (2E)-2-[(hidroxinaftaleno-1-il) metilideno] hidrazinacarboxiamida e VH28 (2Z)-2-(piridina-3-ilmetilideno) hidrazinacarbatioamida.

Todos os compostos semicarbazônico e tiosemicarbazônicos foram sintetizados e adquiridos pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LabSINFA), Departamento de Farmácia/UFPE em parceria com o Laboratório de Bioensaios e Pesquisa de Fármacos (LBPF), Departamento de Antibióticos/UFPE para realização deste trabalho.

2 Comitê de Ética

Todos os experimentos realizados neste trabalho estão de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi submetido para apreciação do comitê de ética em experimentação animal do centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. O mesmo foi identificado e aprovado pelo número do processo 035663/2013-90.

3 Teste de Toxicidade Aguda

A toxicidade aguda foi avaliada segundo método da Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) para o teste de produtos químicos, n° 423 (OECD, 2001), em que os animais do sexo feminino e em número de três por grupo receberam via oral (VO) dose única dos derivados tiosemicarbazônicos VH02 (300 e 2000 mg/Kg), VH08 (5, 50 e 300 mg/Kg), VH21 (300 e 2000 mg/Kg), VH25 (300 mg/Kg) e VH28 (300

e 2000 mg/Kg) e semicarbazônico LS18A (300 e 2000 mg/Kg). Após administração das substâncias testes os animais foram observados continuamente pelos primeiros 30 minutos e em intervalos regulares para avaliação de efeitos adversos e determinação da hora da morte. Àqueles que permaneceram vivos, foram observados uma vez ao dia por período de 14 dias.

4 Pleurisia Induzida por Carragenina

Os animais em número de seis por grupo, foram escolhidos aleatoriamente e pré-tratados com tiossemicarbazônicos VH02, VH21, VH25, VH28 (100 mg/Kg), a via de administração foi oral, uma hora antes da administração da carragenina (1% 0,5 mL/animal) via intraperitoneal (IP). A indometacina (10 mg/Kg) foi utilizada como substância de referência e solução salina (0,9%) como controle negativo. Para indução da inflamação os animais receberam uma injeção intrapleural de carragenina (0.1 mL de carragenina/1%), os animais foram anestesiados com solução associada de Cloridrato de Ketamina e Cloridrato de Xilazina, numa proporção de 1:1. (FRÖDE; MEDEIROS, 2001).

Decorridas 4 horas os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, o tórax aberto e a cavidade pleural lavada com 1,0 mL de solução tampão PBS/EDTA. Coletado, o exsudato inflamatório foi analisado em contador hematológico ABX (MICROS 60 OT, HORIBA-FRANÇA) para determinação do número de células leucócitos PMNs.

5 Peritonite Induzida por Carragenina

Animais em número de seis por grupo foram tratados por VO com doses dos derivados tiossemicarbazônicos VH02, VH08, VH21, VH28 (100 mg/Kg) e semicarbazônico LS18A (100 mg/Kg) por via oral uma hora antes da administração da carragenina (1% 0,5 mL/animal), esta última foi inoculada por via intraperitoneal (IP).

Após quatro horas de repouso, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ (gás carbônico), o peritônio foi lavado com 2,0 mL de solução tampão PBS/EDTA e o

exsudato inflamatório foi coletado e analisado em contador hematológico ABX (MICROS 60 OT, HORIBA-FRANÇA) para determinação do número de células PMNs. Em seguida foram centrifugadas durante 10 minutos em 3000 rpm, separadas em eppendorf e congeladas.

Indometacina (10 mg/Kg) e Solução salina (0,9%) foram utilizadas como droga padrão e controle negativo para comparação dos resultados.

RESULTADOS

1 Teste de Toxicidade Aguda

Durante a avaliação do “screening” hipocrático, os grupos que receberam o tratamento apresentaram diversos sintomas (tabela 1) a partir da administração oral das substâncias testes (observação ininterrupta dentro da primeira hora pós gavagem), entretanto, alguns animais apresentaram sintomas estendidos por período superior a 1h e os animais do grupo VH08 vieram a óbito dentro das primeiras 24 horas.

A partir do ensaio da toxicidade, foi possível identificar a classificação de periculosidade de cada substância testada. Os resultados estão expostos na tabela 2 em que é possível verificar que os derivados VH02 e VH28 apresentam toxicidade superior à 2000 mg/Kg de peso corporal, fazendo parte dos compostos de classe 5 ou não classificados (NC), VH021 e LS18A a toxicidade está entre 300 e 2000 mg/Kg do peso corporal substancia de classe 4 e VH08 apresenta toxicidade entre 5 e 50 mg/Kg sendo inserido em compostos de classe 2 (OECD, 2001).

Tabela 1. Sintomas observados durante o teste de toxicidade aguda. A descrição dos sintomas está apresentado por escala de intensidade. 1=sintoma fraco; 2=sintoma forte.

Sintomas	Grupos				
	VH02	VH08	VH21	VH28	LS18A
Agitação	2	-	-	-	-
Frêmito vocal	2	-	1	-	-
Movimentos estereotipados	1	1	1	-	-
Resposta ao toque	-	1	2	-	-
Contorção abdominal	1	1	2	-	1
Sonolência	-	2	1	-	-
Defecção	-	1	1	-	-
Piloereção	-	1	1	-	-
Micção	-	1	-	-	-
Tremores	2	-	-	-	1
Taquicardia	-	-	-	-	-
Cianose	-	2	-	-	-
Bradycardia	-	2	-	-	-
Desorientação/Desequilíbrio	-	2	-	-	-

Fonte: SILVA, 2014

Tabela 2 - Classificação da toxicidade para cada composto testado, a dose letal foi avaliada em miligramas da substância por quilograma de peso corporal. *NC = não classificável.

Composto	Dose letal (mg/Kg)	Classe
VH02	> 2000	5 ou NC*
VH08	> 5 – 50	2
VH21	> 300 – 2000	4
VH25	-	-
VH28	> 2000	5 ou NC*
LS-18A	> 300 – 2000	4

Fonte: SILVA, 2014

O teste de toxicidade é realizado com objetivo de determinar o potencial de novas substâncias e produtos químicos em causar danos à saúde humana. Os testes que avaliam a toxicidade sistêmica são feitos na intenção de classifica-los de acordo com seu potencial

tóxico ou letal permitindo assim uma apropriada rotulagem destes compostos a partir das características toxicológicas apresentadas em modelos animais. Não apenas para letalidade, mas estudos do potencial tóxico podem avaliar Outros parâmetros, como: potencial tóxico em órgãos específicos, relação dose-resposta, indicativos sobre o mecanismo de ação da substância testada e estabelecimento das doses para estudos adicionais, entre outros (PURCHASE, et al., 1998; BLAAUBOER, 2003; PRIETO, et al., 2006; COECKE, et al., 2006).

Segundo a OECD 423 (2001) quando uma droga é aplicada em dose única não permite a identificação exata da dose letal (DL50) da substância em estudo, mas fornece dados suficientes para manter uma margem de segurança, uma vez que se tem a informação do valor aproximado da letalidade. De acordo com o mesmo documento de orientação, a OECD permite com esse teste a classificação de periculosidade da droga/produto químico. Foi, portanto, com este objetivo que o teste de toxicidade foi realizado, na tentativa de verificar a dose letal para fins de cálculo de dose para os experimentos animais posteriores.

Não foi testada dose superior a 2000 mg/Kg para nenhuma das substância do estudo, uma vez que valores para dose letal (DL50) acima de 2.000 mg/Kg de peso corporal do animal são consideradas praticamente não tóxicas, portanto doses superiores a este valor (5.000 mg/Kg) não são indicadas para realização do teste de toxicidade, a não ser em casos especiais para detecção da real toxicidade e proteção à vida (OECD, 2001).

Os resultados sobre a toxicidade apresentados neste trabalho são apenas preliminares e constituem informação primordial de grande importância para realização de estudos posteriores que são de real interesse e necessidade para descobrir a dose letal. Um estudo toxicológico para algumas das substâncias acima descritas já está sendo pensado para realização o mais breve possível.

2 Pleurisia Induzida por Carragenina

O modelo da pleurisia induzido pela carragenina é caracterizado por apresentar em 4 horas após a indução da inflamação na cavidade pleural, um aumento da exsudação e infiltração imediata neutrófilos. Além do recrutamento de PMNs, ainda pode haver, no

local, liberação de vários mediadores inflamatórios, como: histamina, bradicinina, espécies reativas de oxigênio e ânion superóxido (CORSINI et al., 2005).

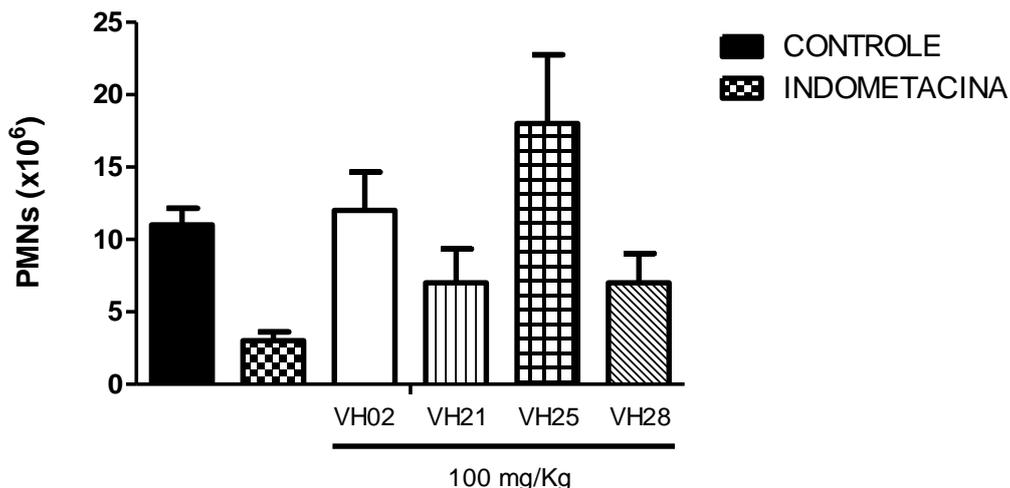
A partir dos resultados apresentados na tabela 2, pode-se verificar que os compostos VH28 e VH21 apresentaram baixo efeito inibidor na migração de leucócitos PMNs (28,62 e 35,06) respectivamente em relação ao controle. Os derivados VH25 e VH02, não apresentaram efeito inibidor e sim parecem ter agido como agentes pró-inflamatórios uma vez que aumentaram a migração leucocitária, mostrados como % de inibição negativa.

Tabela 2 - Efeito dos compostos VH28, VH21, VH25 e VH02 na migração celular de leucócitos polimorfonucleares no exsudato inflamatório obtido no teste de pleurisia induzida por carragenina em camundongos *Mus musculus*. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão do número de PMNs. $P < 0,05$ a significância foi determinada com ANOVA One-way e pós-teste de Newman-Keuls. * significativos em relação ao controle.

Grupo	Dose (mg/Kg)	Média \pm Desvio padrão	% Inibição
VH28	100	7,98 \pm 2,02	29
VH21	100	7,26 \pm 2,34	35
VH02	100	12,02 \pm 2,65	-
VH25	100	18,98 \pm 4,75*	-
Indometacina	10	3,02 \pm 0,6*	73
Controle	-	11,18 \pm 1,15	-

Fonte: SILVA, 2014

Figura 1. Ação dos compostos tiossemicarbazônicos no modelo de pleurisia induzida por carragenina. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão do número de PMNs. $P < 0,05$ a significância foi determinada com ANOVA One-way e pós-teste de Newman-Keuls. * valores significativos em relação ao controle.



3 Peritonite Induzida por Carragenina

Os resultados obtidos para o ensaio de peritonite induzida pela carragenina estão apresentados na tabela 2. O composto VH08 apresentou atividade em todas as doses testadas, estas informações são expressas a partir da inibição da migração celular avaliada pelo número de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) presentes no exsudato inflamatório da região peritoneal (tabela 3). Para as doses de 30 e 100 mg/Kg a redução foi de 43,98% e 53,31 respectivamente, não havendo diferença estatística entre elas. No entanto, na dose de 300 mg/Kg o percentual de inibição da migração celular se mostrou mais eficaz apresentando uma taxa de 75,90%, comportamento semelhante aos animais tratados com indometacina (substância padrão) que mostrou uma resposta da inibição no valor de 78,31% em relação aos animais do grupo controle. Os compostos VH28 e VH02, não se mostraram eficazes para inibir a migração celular dos PMNs.

Ensaio de peritonite são realizados para avaliar a migração de leucócitos polimorfonucleares por meio da contagem de células no exsudato inflamatório após a indução da inflamação pelo agente flogístico carragenina. Os resultados apresentados sugerem que a atividade anti-inflamatória está relacionada a inibição da migração leucocitária.

Tabela 3 - Efeito dos compostos VH28, VH08 e VH02 na migração celular de leucócitos polimorfonucleares no exsudato inflamatório obtido no teste de peritonite induzida por carragenina em camundongos *Mus musculus*. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão do número de PMNs. $P < 0,05$ a significância foi determinada com ANOVA One-way e pós-teste de Bonferroni's. * significativos em relação ao controle.

Grupo	Dose (mg/Kg)	Nº de PMNs/mL x 10⁶	% inibição
VH28	100	12,6 \pm 3,6	5
VH08	30	7,4 \pm 1,47*	44
	100	6,2 \pm 0,82*	53
	300	3,2 \pm 0,9*	76
VH02	30	12,4 \pm 1,51	7
	100	9,1 \pm 1,24*	31
	300	11,2 \pm 1,81	16
Padrão	10	2,8 \pm 0,96*	78
Controle	-	13,3 \pm 1,82	-

Fonte: SILVA, 2104

ANEXO 2 - Tabela 423 OECD utilizada como modelo para os testes de toxicidade aguda

Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Ciências Biológicas
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
 fax: (55 81) 2126 8350
 www.ccb.ufpe.br



Recife, 28 de novembro de 2013.

Ofício nº 656/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
 Para: **Prof. Silene Carneiro do Nascimento**
 Universidade Federal de Pernambuco
 Departamento de Antibióticos
 Processo nº 23076.035663/2013-90

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Avaliação das Atividades Citotóxica, Antiinflamatória e Antinociceptiva de Derivados Tio-Semi-Carbazônicos e Semi-Carbazônicos em Modelos Animais**".

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Antibióticos; Animal: Rato heterogênico; Linhagem: Albino Suíço; Idade: 60 dias; Peso: 25g; Sexo: machos e fêmeas; Nº Total de Animais: 144.

Marcia Vasconcelos
 Profª Marcia Vasconcelos
 Vice-Presidente do CEUA/CCB-UFPE
 SIAPE 2199635

CCB: Integrar para desenvolver



BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY

Entirely in English

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Impact Factor	p.1
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.3



ISSN: 0753-3322

DESCRIPTION

An international multidisciplinary journal with two objectives:

- to create an interface between clinical and laboratory responses to drugs and to investigate critical approaches to different pathologies with regard to biological and clinical data,
- to provide a niche for authors whose work is not directly defined by the review criteria of existing journals.

Biomedicine and pharmacotherapy is one of the few journals at the forefront of fundamental and technical science, biological and medical disciplines, therapeutics and pathological description. General fields of interest include molecular and cell biology, genetic disease, immunology and immunoregulation and chemotherapy. Special emphasis is placed on studies of specific topics such as differentiation, pharmacology and toxicology, preclinical and clinical pharmacology, the effects of drugs on cell structural and functional elements, the mechanism of gene regulation in normal and pathological cells, the role of viruses and parasites and the therapy of the diseases they induce. Brief reports of meetings, symposia and conferences will also be considered for publication as well as announcements of scientific meetings or academic courses.

AUDIENCE

Hospital practitioners, biologists, pharmacotherapists

IMPACT FACTOR

2012: 2.068 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2013

Anexo 5 - Normas da Revista Inflammation Research

13/2/2014

Inflammation Research


www.springer.com

 Ciências Biomédicas - Immunology | Inflammation Research



Inflammation Research

Official Journal of: The International Association of Inflammation Societies + The European Histamine Research Society

Managing Editor: John A. Di Battista

ISSN: 1023-3830 (print version)

ISSN: 1420-908X (electronic version)

Journal no. 11

Instructions for Authors

Instructions for Authors

EDITORIAL PROCEDURE

We use electronic forms of all articles during submission and typesetting.

Manuscripts received are acknowledged immediately.

Manuscripts will be assessed by two or more reviewers. Referees' comments will remain anonymous unless referees explicitly request to be named.

Once a paper has been evaluated, the authors will be notified of the editorial decision (in general within 1 month after receipt).

Corrections to proofs should be made within 72 hours. If not, the paper will be published uncorrected. Manuscripts will be published online within 3 months after acceptance.

TYPES OF PAPERS

General Remarks

All pages should be numbered consecutively, including references, tables and figure legends. All text, including figure legends, tables and references, should be typed double spaced.

Inadequate presentation may give grounds for immediate rejection.

Papers should be easy to read. Highly sophisticated, specialist terms should either be defined or avoided. Intelligibility is a major aim of Inflammation Research.

Therefore, authors are encouraged to use short sentences, the active case, avoiding colloquialisms and to repeat keywords throughout the text. Authors are requested to have their manuscripts checked by a native English speaker for correct grammar and English usage before submission.

Papers should follow the standard scientific format: Abstract, Key Words, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, References.

Original Research Papers

Anexo 6 - Normas da Revista Interfaces Científicas

Diretrizes para Autores

As **normas de submissão** são requisitos básicos para aceitação de trabalhos a serem publicados em qualquer uma das revistas desta plataforma. Os autores devem observar requisitos de estrutura, formatação, citações e referências.

Os originais devem estar em português, inglês ou espanhol, devem ser inéditos e destinar-se exclusivamente ao Portal de Periódicos da Sociedade de Educação Tiradentes, não sendo permitida sua apresentação simultânea a outro periódico, tanto no que se refere ao texto, como figuras ou tabelas, quer na íntegra ou parcialmente, excetuando-se resumos ou relatórios preliminares publicados em Anais de Reuniões Científicas.

Submissão de artigos *online*

Os artigos devem ser submetidos, exclusivamente de forma eletrônica através do Portal de Periódicos da Sociedade de Educação Tiradentes. Disponível em:

<http://periodicos.set.edu.br/index.php>

Artigos enviados por e-mail não serão considerados

Todos os direitos editoriais são reservados para as publicações do Portal de Periódicos SET, nenhuma parte das publicações pode ser reproduzida, estocada por qualquer sistema ou transmitida por quaisquer meios ou formas existentes ou que venham a ser criados, sem prévia permissão por escrito da Comissão Editorial, ou sem constar o crédito de referência, de acordo com as leis de direitos autorais vigentes no Brasil.

Nas pesquisas envolvendo seres humanos, os autores deverão enviar uma cópia de aprovação emitida pelo Comitê de Ética, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), segundo as normas da Resolução do Conselho Nacional de Saúde - CNS 196/96 ou órgão equivalente no país de origem da pesquisa.

Categorias de manuscritos aceitos:

Artigo original: trabalho de pesquisa com resultados inéditos e que agreguem valor à publicação. Limitado com no mínimo oito páginas e no máximo 15 páginas. Sua estrutura deve conter:

- **Introdução:** deve ser breve, definir o problema estudado, destacando a sua importância e as lacunas do conhecimento. NBR 6022:2003
- **Método:** os métodos empregados, a população estudada, a fonte de dados e os critérios de seleção devem ser descritos de forma objetiva e completa. Inserir o número do protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e informar que a pesquisa foi conduzida de acordo com os padrões éticos exigidos.
- **Resultados:** devem ser apresentados de forma clara e objetiva, descrevendo somente os dados encontrados sem interpretações ou comentários, podendo para maior facilidade de compreensão serem acompanhados por tabelas, quadros e figuras. O texto deve complementar e não repetir o que está descrito nas ilustrações.
- **Discussão:** deve restringir-se aos dados obtidos e aos resultados alcançados, enfatizando os novos e importantes aspectos observados no estudo e discutindo as concordâncias e divergências com outras pesquisas já publicadas.
- **Conclusão:** deve corresponder aos objetivos ou hipóteses do estudo, fundamentada nos resultados e discussão, coerente com o título, proposição e método.
- **Estudo teórico:** análise de estudos teóricos, levando ao questionamento de modelos existentes e à elaboração de hipóteses para futuras pesquisas. Limitado a 15 páginas. Cerca de no máximo 36.000 caracteres com espaço.

Forma e preparação de manuscritos

Os textos enviados em Língua Portuguesa devem estar escritos conforme o Novo Acordo Ortográfico que passou a vigorar em janeiro de 2009. Tamanho A4, com espaço entrelinhas de 1,5cm, fonte **arial**, tamanho 12, e as margens: superior e esquerda 3cm, margens inferior e direita 2cm. O arquivo da submissão deve estar no formato Microsoft Word.

Página de identificação: deve conter o **título do artigo** (máximo de 16 palavras) em português, inglês e espanhol, sem abreviaturas e siglas; **nome(s) do(s) autor(es)**, indicando no rodapé da página a função que exerce(m), a instituição a qual pertence(m), títulos e formação profissional, endereço (cidade, estado e país) para troca de correspondência, incluindo e-mail, de preferência institucional, e telefone. Se o artigo for baseado em tese ou dissertação, indicar o título, o nome da instituição e o ano de defesa.

- **Citações** NBR 10520:2002 - Sistema autor-data – Neste sistema, a indicação da fonte é feita: a) pelo sobrenome de cada autor ou pelo nome de cada entidade responsável até o primeiro sinal de pontuação, seguido(s) da data de publicação do documento e da(s)

página(s) da citação, no caso de citação direta, separados por vírgula e entre parênteses;

- **Notas de rodapé** – deverão ser evitadas e usadas quando extremamente necessárias. Deverão ser indicados por ordem numérica;
- **Depoimentos** - frases ou parágrafos ditos pelos sujeitos da pesquisa deverão seguir a mesma regra de citações, quanto a aspas e recuo (4 cm além das margens), utilizando o sistema autor data;
- **Ilustrações** - as tabelas, quadros e figuras devem ter um título breve, serem numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na ordem em que forem inseridas no texto, sendo limitadas a cinco no conjunto. Exceto tabelas e quadros, todas as ilustrações devem ser designadas como **figuras**. As tabelas devem incluir apenas os dados imprescindíveis, evitando-se tabelas muito longas, não utilizar traços internos horizontais ou verticais, estas devem seguir os procedimentos do IBGE. As notas explicativas devem ser colocadas no rodapé das tabelas e não no cabeçalho ou título. Quando a tabela ou figura forem extraídas de outro trabalho, a fonte original deve ser mencionada. Devem estar em resolução de 300 dpi, colorida, em formato digital (jpg) e deverão ser postadas no portal da revista como documento complementar. Ver: **estrutura e normas**;
- **Tabelas** - em resolução superior a 300 dpi, colorida, em formato digital (jpg) e deverão ser postadas no portal da revista como documento complementar. Ver: **estrutura e normas**;
- **Figuras** (fotos, desenhos, gráficos etc) - serão publicadas sem identificação dos sujeitos, a menos que acompanhadas de permissão por escrito de divulgação para fins científicos. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem estar em resolução de 300 dpi, colorida, em formato digital (jpg) e deverão ser postadas no portal da revista como documento complementar. Ver: **estrutura e normas**;
- **Apêndices e anexos** - devem ser evitados.
- **Agradecimentos** - contribuições de pessoas que prestaram colaboração intelectual ao trabalho como assessoria científica, revisão crítica da pesquisa, coleta de dados entre outras, mas que não preencham os requisitos para participar de autoria, devem constar dos "Agradecimentos", no final do trabalho, desde que haja permissão expressa dos nomeados. Também poderão ser mencionadas, as instituições que deram apoio, assistência técnica e outros auxílios.
- **Errata**: após a publicação do artigo, se os autores identificarem a necessidade de errada, deverão enviá-la ao Editor da revista, por email.

Resumo: deve ser apresentado em português (resumo), inglês (*abstract*) e espanhol (*resumen*), com até 250 palavras, explicitando o objetivo da pesquisa, método, resultados e conclusões, com base na Norma NBR 6028.

Palavras-chave: devem ser indicados de três a seis palavras-chave que permitam identificar o assunto do trabalho, acompanhando o idioma dos resumos: português (Descritores), inglês (Descriptors), espanhol (Descriptores) e Francês (Mots- Clés), extraídos dos vocabulários adotados. No caso dos Descritores em Ciências da Saúde, utilizar o DeCS (Descritores em Ciências da Saúde), elaborado pela BIREME e/ou (MeSH) Medical Subject Headings, elaborado pela NLM (National Library of Medicine).

Referências: As referências dos documentos impressos e eletrônicos devem ser normalizadas de acordo com as Normas da ABNT 6023/2002 e para área de saúde. Recomenda-se que o número de referências não ultrapasse a 20. Sugere-se incluir aquelas estritamente pertinentes à problemática abordada e evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores.

NORMAS ABNT

ABNT. **NBR 6022:** informação e documentação – artigo em publicação periódica científica impressa – apresentação. Rio de Janeiro, 2003.

ABNT. **NBR 6023:** informação e documentação (referências – Elaboração)

ABNT. **NBR 6028:** resumos. Rio de Janeiro, 1990.

ABNT. **NBR 14724:** informação e documentação – trabalhos acadêmicos – apresentação. Rio de Janeiro, 2002.(informações pré-textuais, informações textuais e informações pós-textuais)

ABNT. **NBR 10520:** informações e documentação – citações em documentos – apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao editor".
2. O arquivo da submissão está em formato Microsoft Word.
3. URLs para as referências foram informadas quando possível.
4. Os textos enviados em Língua Portuguesa devem estar escritos conforme o Novo Acordo Ortográfico que passou a vigorar em janeiro de 2009. Tamanho A4, com espaço entrelinhas de 1,5cm, fonte arial, tamanho 12, e as margens: superior e esquerda 3cm, margens inferior e direita 2cm.
5. O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em [Diretrizes para Autores](#), na página Sobre a Revista.
6. Em caso de submissão a uma seção com avaliação pelos pares (ex.: artigos), as instruções disponíveis em [Assegurando a avaliação pelos pares cega](#) foram seguidas.

Declaração de Direito Autoral

Oferece acesso livre e imediato ao seu conteúdo, seguindo o princípio de que disponibilizar gratuitamente o conhecimento científico contribui para a democratização do saber. Assume-se que, ao submeter os originais os autores cedem os direitos de publicação para a revista. O autor(a) reconhece esta como detentor(a) do direito autoral e ele autoriza seu livre uso pelos leitores, podendo ser, além de lido, baixado, copiado, distribuído e impresso, desde quando citada a fonte.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

ISSN: 2316-3798

