

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

Sandra Cabral da Silva

CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA DA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA DE NOVOS DERIVADOS *N*-ACILHIDRAZÔNICOS

UFPE – Recife
2015

Sandra Cabral da Silva

CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA PRÉ-CLÍNICA DA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA DE NOVOS DERIVADOS *N*-ACILHIDRAZÔNICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Área de concentração: Desenvolvimento Pré-clínico de Produtos Bioativos.

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

Co-orientador: **Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura**

UFPE – Recife

2015

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Silva, Sandra Cabral da

Caracterização farmacológica pré-clínica da atividade anti-inflamatória de novos derivados N- Acilhidrazônicos/ Sandra Cabral da Silva– Recife: O Autor, 2015.

87 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva

Coorientador: Ricardo Olímpio de Moura

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2015.

Inclui bibliografia

1. Farmacologia 2. Inflamação 3. Aminoácidos I. Silva, Teresinha Gonçalves da (orientadora) II. Moura, Ricardo Olímpio (coorientador) III. Título

615.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-173



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

Recife, 27 de fevereiro de 2015

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 27 de fevereiro de 2015, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADORA INTERNA: Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

(Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura

(Departamento de Farmácia - Universidade Estadual da Paraíba)

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão

(Campus Vitória – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A minha mãe Josefa Cabral, por ter me dado a vida.

Por ter me dedicado sua vida...

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo fim de mais essa etapa, pelos sonhos que se concretizam. Porque Dele, por meio Dele e para Ele são todas as coisas.

À minha mãe, por seu amor, carinho e educação. Pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida e por me fazer acreditar que tudo é possível, basta perseguir os sonhos.

À minha orientadora, Dr^a Teresinha Gonçalves da Silva, pelo seu sempre excelente trabalho, conduzindo-me nos primeiros e essenciais passos da minha formação. Sua dedicação, orientação e amizade contribuem para meu aprendizado diário.

A meu pai, irmão e familiares, por acreditarem sempre em meu potencial.

As amigas Josicleide Silva, Adamares Santana e Fernanda Mota por fazerem parte da minha história. Pelo carinho e incentivo que me fizeram trilhar o caminho até aqui percorrido.

Ao Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura, do Departamento de Farmácia, da Universidade Estadual da Paraíba, por fornecer as moléculas de estudo deste trabalho.

A todos que fazem parte do Departamento de Antibióticos e do Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos, por toda prestatividade e contribuição para consolidação deste trabalho.

A aluna de iniciação científica, Jackellyne Carvalho. Sua atenção e dedicação ao trabalho foram essenciais à concretização do mesmo.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo incentivo e apoio financeiro.

Imensamente, muito obrigada!

“Sempre houve a crença de que Deus nos daria tudo o que a Ele pedíssemos.
Mas isso não é verdade. Ele nos dá apenas aquilo em que acreditamos. ”

Roberto Shinyashiki

RESUMO

SILVA, Sandra Cabral. **Caracterização farmacológica pré-clínica da atividade anti-inflamatória de novos derivados N-acilhidrazônicos**. 2015. 87f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

A inflamação é um processo complexo iniciado por vários fatores como patógenos, danos físicos, isquemia, injúrias tóxicas ou autoimunes, e tem como finalidade proteger o organismo. A inflamação é um evento que envolve o reconhecimento do agente ou estímulo lesivo provocando a infiltração de leucócitos para a região afetada com o intuito de remover o causador do dano e fazer com que o tecido retorne ao estado de homeostase. A busca por novos fármacos que possam ser utilizados como alternativa aos já existentes no mercado tem sido motivada pelos diversos efeitos colaterais causados pelo uso contínuo de medicamentos anti-inflamatórios. Neste contexto, e levando em consideração as diversas atividades biológicas descritas para derivados acilhidrazônicos, que se mostram como uma importante classe de compostos químicos sintéticos, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade anti-inflamatória de novos derivados N-acilhidrazônicos. Inicialmente, foi realizado uma triagem *in vitro* de sete derivados N-acilhidrazônicos. A partir destes resultados, quatro compostos (AMT, AMZ, AMZ-Bz e AMH) foram selecionados para triagem *in vivo* (teste do bolsão de ar), sendo selecionado o composto, AMH, para avaliação das demais atividades anti-inflamatórias. Para avaliação da atividade anti-inflamatória foram realizados os seguintes testes: pleurisia induzida por diferentes agentes flogísticos; permeabilidade vascular induzida por ácido acético; determinação dos níveis de citocinas, óxido nítrico (NO) e mieloperoxidase (MPO). A pleurisia foi induzida pela injeção de 0,1 mL por via intrapleural de um dos seguintes agentes flogísticos: carragenina (1% 0,1 mL/cav.), bradicinina (10 nmol/cav.), histamina (100 µg/cav.) ou zimosano (200 µg/cav.). No teste do bolsão de ar, o derivado AMH (na dose de 10 mg/kg) apresentou o melhor resultado com inibição da migração leucocitária de 75,8% em relação ao grupo controle. No teste da pleurisia o composto AMH inibiu significativamente a migração leucocitária induzida por carragenina (83,0%), histamina (49,2%) e zimosano (69,8%), em relação ao grupo controle. Na pleurisia induzida por bradicinina, a inibição da migração leucocitária foi de 20,6% em relação ao grupo controle. O AMH diminuiu a concentração de TNF- α e IL-1 β tanto no modelo de bolsão de ar quanto na pleurisia induzida por carragenina. Este composto apresentou ainda diminuição da permeabilidade vascular e inibição da concentração de NO e MPO na pleurisia induzida por carragenina. Desta forma, os resultados indicam que o derivado N-acilhidrazônico AMH apresenta atividade anti-inflamatória reduzindo a migração leucocitária, que está associada à diminuição de citocinas e óxido nítrico, histamina, bradicinina e sistema complemento.

Palavras-chave: Atividade anti-inflamatória, aminas vasoativas, pleurisia, derivados acilhidrazônicos.

ABSTRACT

SILVA, Sandra Cabral. **Preclinical pharmacological characterization of anti-inflammatory activity of novel *N*-acylhydrazones**. 2015. 87f. Dissertation (Master). – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Inflammation is a complex process initiated by various factors such as pathogens, injury, ischemia, toxic or autoimmune injuries, and aims to protect the body. Inflammation is an event that involves the recognition agent or the injurious stimuli causing infiltration of leukocytes to the affected area in order to remove the cause of the damage, and cause the fabric to return to a state of homeostasis. The search for new drugs that can be used as an alternative to already on the market has been motivated by the various side effects caused by the continued use of anti-inflammatory drugs. In this context and taking into account the different biological activities described for acylhydrazone derivatives, which show up as an important class of synthetic chemical compounds, this study aimed to evaluate the anti-inflammatory activity of new *N*-acylhydrazone derivatives. Initially, the screening was carried out in vitro seven *N*-acylhydrazone derivatives. From these results, four compounds (AMT, AMZ, AMZ-Bz and HAMs) were selected for in vivo screening (air pocket test), the compound being selected, AMH, for evaluation of other anti-inflammatory activities. To evaluate the anti-inflammatory activity the following tests were performed: pleurisy induced by different phlogistic agents; vascular permeability induced by acetic acid; determining the levels of cytokines, nitric oxide (NO) and myeloperoxidase (MPO). Pleurisy was induced by injecting 0.1 ml per intrapleural phlogistic one of the following agents: carrageenan (1% 0.1 ml / Cav.) Bradykinin (10 nmoles / Cav.), Histamine (100 µg/ cav.) or zymosan (200 mg µg/ cav.). In the test the air pocket, AMH derivative (at a dose of 10 mg / kg) showed the best result with inhibition of leukocyte migration from 75.8% in the control group. The test of pleurisy AMH compound significantly inhibited leukocyte migration induced by carrageenan (83.0%), histamine (49.2%) and zymosan (69.8%) in the control group. In pleurisy induced by bradykinin, inhibition of leukocyte migration was 20.6% in the control group. AMH decreased TNF- α concentration and IL-1 β both the air pocket model and the carrageenin-induced pleurisy. This compound also showed decreased vascular permeability and inhibition of MPO concentration of NO and in carrageenan-induced pleurisy. Thus, the results indicate that *N*-acylhydrazone AMH derivative exhibits anti-inflammatory activity reducing leukocyte migration, which is associated with decreased cytokine and nitric oxide, histamine, bradykinin and complement system.

Keywords: anti-inflammatory activity, vasoactive amines, pleurisy, acylhydrazone derivatives.

LISTA DE FIGURAS E ESQUEMA

Figura 1. Migração leucocitária. Para alcançar o foco inflamatório, as células da corrente sanguínea são ativadas e realizam o processo de rolamento, adesão e diapedese. Uma vez atingido o sítio da inflamação, os leucócitos fagocitam e destroem o agente causador da lesão. (Adaptado de NOURSHARGH; HORDIJK; SIXT, 2010).....	21
Figura 2. Esquema geral que representa as vias metabólicas que levam a produtos do ácido araquidônico envolvidos no processo inflamatório (CORUZZI; VENTURI; SPAGGIARI, 2007).....	24
Figura 3. Vias de ativação do sistema complemento (Adaptado de CRUVINEL et al., 2010).	29
Figura 4. Estrutura básica da função <i>N</i> -acilhidrazona.	34
Figura 5. Derivado acilhidrazônico com atividade antibacteriana (GOVINDASAMI, et al. 2011).....	34
Figura 6. Derivados acilhidrazônicos com atividade antifúngica (MALIK et al., 2012).....	35
Figura 7. Derivados acilhidrazônicos com atividade antitumoral (CUI, et al. 2010).	35
Figura 8. Derivado acilhidrazônico com atividade anti-HIV (SLUIS-CREMER et al. 2002).	35
Figura 9. Derivado acilhidrazônico (a) e acilhidrazônico acridínico com atividade antimalárica (b) (MELNYK, et al. 2006).	36

Figura 10. Derivado acilhidrazônico com atividade anti-inflamatória (SILVA, et al. 2014).

.....36

Figura 11. Efeitos do AMH (10 mg/kg) na concentração de TNF- α e IL-1 β no exsudato dos animais submetidos ao teste de bolsão de ar subcutâneo. ***p <0,05 em relação ao gupo controle após análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni..... 51

Figura 12. Efeito do composto acilhidrazona AMH no teste da permeabilidade vascular induzida por ácido acético. ***p <0,05 em relação ao gupo controle após análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni..... 52

Figura 13. Concentração de TNF- α e IL-1 β do composto AMH 10 mg/kg, no exsudato da cavidade pleural dos animais submetidos à pleurisia induzida por carragenina e tratados com composto AMH 10 mg/kg. ***p <0,05 em relação ao gupo controle após análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni.....54

Figura 14. Efeitos do AMH (10 mg/kg) na concentração de NO e MPO no exsudato dos animais submetidos ao teste de pleurisia induzida por carragenina. ***p <0,05 em relação ao gupo controle após análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni.56

Esquema 1. Rota Sintética dos Derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos.....42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Viabilidade celular dos derivados acilhidrazônicos no teste de citotoxicidade com macrófagos murinho J774.A1. Os compostos foram testados na concentração de 25 mg/mL. 48

Tabela 2. Total de leucócitos polimorfonucleares (média $\pm$ desvio padrão) e percentual de inibição da migração celular em animais dos grupos controle e tratados com os derivados acilhidrazônicos no teste de Bolsão de ar subcutâneo. 49

Tabela 3. Total de leucócitos polimorfonucleares (média $\pm$ desvio padrão) e percentual de inibição da migração celular em animais dos grupos controle e tratado com o derivado AMH no teste de pleurisia induzida por carragenina. 53

Tabela 4. Total de leucócitos polimorfonucleares (média $\pm$ desvio padrão) e percentual de inibição da inflamação nos animais dos grupos controle e tratado com o derivado AMH no teste de pleurisia induzida por zimosano, histamina e bradicinina.57

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-HPETE	5-hidroperoxieicosatetraenóico
5-LOX	5-lipoxigenase
AA	Ácido araquidônico
AcOH	Ácido acético
ADP	Difosfato de adenosina
AINES	Anti-inflamatórios Não Esteroidais
cav.	Cavidade
CCD	Cromatografia em camada delgada
CD4	Cluster de diferenciação 4
CD8	Cluster de diferenciação 8
CO ₂	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPM	Erro padrão médio
FcεRI	Receptor de Imunoglobulina E de alta afinidade
F.F	Faixa de fusão
FTCβ	Fator transformador de crescimento β
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos
HTAB	Hexadeciltrimetil Brometo de Amônia
IFN-	Interferon
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina

IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (União Internacional de Química Pura e Aplicada)
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
LTA4	Leucotrieno A4
LTB4	Leucotrieno B4
LTC4	Leucotrieno C4
LTD4	Leucotrieno D4
LTE4	Leucotrieno E4
MBL	Lectinas ligadoras de manose
MHC-	Complexo de histocompatibilidade
MIP-	Proteína inflamatória de macrófago
MPO	Mieloperoxidase
MTT	Brometo de [3- (4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio]
NK	Células Natural Killer
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PAF	Fator de agregação plaquetária
PBS	Solução tampão fosfato
PG	Prostaglandina
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2	Prostaglandina F2
PGH2	Prostaglandina H2

PGI2	Prostaciclina
PLA2	Fosfolipase A2
PMNLs	Leucócitos Polimorfonucleares
R.F	Fator de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
SP	Substância P
TNF-	Fator De Necrose Tumoral
TX	Tromboxano
TXA2	Tromboxano A2
TXB2	Tromboxano B2
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Fisiopatologia da Inflamação.....	20
2.2 Mediadores do Processo Inflamatório.....	22
2.2.1 Mieloperoxidase.....	22
2.2.2 Óxido Nítrico.....	22
2.2.3 A via do Ácido Araquidônico e os Eicosanóides.....	23
2.2.4 Aminas vasoativas, Peptídeos e Cininas.....	26
2.2.5 Resposta Imune e Inflamação.....	27
2.2.6 Sistema Complemento.....	28
2.2.7 Citocinas.....	30
2.3 Fármacos Anti-inflamatórios.....	31
2.4 Propriedades Biológicas das Acilhidrazônas.....	33
3. OBJETIVOS.....	39
3.1 Geral.....	39
3.2 Específicos.....	39
4. MATERIAL.....	41
4.1 Substâncias.....	41
4.2 Reagentes e Material de Consumo.....	41
4.3 Animais.....	41
5. MÉTODOS.....	42
5.1 Síntese dos Compostos.....	42
5.2 Determinação da Viabilidade Celular em Macrófagos Murino da linhagem J774.A1.....	43

5.3 Atividade Anti-inflamatória.....	44
5.3.1 Bolsão de Ar Subcutâneo.....	44
5.3.2 Permeabilidade Vascular Induzida por Ácido Acético.....	44
5.3.3. Pleurisia Induzida por diferentes agentes flogísticos.....	45
5.3.4 Determinação dos Níveis de Citocinas.....	45
5.3.5 Determinação dos Níveis de Óxido Nítrico.....	45
5.3.6 Derteminação dos Níveis de Mieloperoxidase.....	46
5.4 Análise dos Dados.....	46
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
6.1 Determinação da Viabilidade Celular.....	48
6.2 Bolsão de Ar Subcutâneo.....	49
6.2.1 Dosagem das Citocinas TNF- α e IL-1 β (Bolsão de Ar).....	50
6.3 Permeabilidade Vascular Induzida por Ácido Acético.....	52
6.4 Pleurisia Induzida por Carragenina.....	53
6.4.1 Dosagem das Citocinas TNF- α e IL-1 β (Pleurisia Induzida por Carragenina).....	54
6.4.2 Determinação dos Níveis de Óxido Nítrico e Mieloperoxidase (Pleurisia Induzida por Carragenina).....	55
6.5 Pleurisia Induzida por zimosano, histamina e bradicinina	57
7. CONCLUSÕES.....	60
8. REFERÊNCIAS.....	62
9. APÊNDICES.....	83
APÊNDICE A.....	84
APÊNDICE B.....	85
APÊNDICE C.....	86
APÊNDICE D.....	87

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é um processo fisiológico acionado sempre que um agente agressor físico, químico ou biológico, que ultrapassa a barreira de defesa do corpo humano. Este processo tem como objetivo principal recompor a homeostase do tecido lesado através da ativação de diversos mediadores específicos e não específicos da imunidade (PAUL, 2013). Quando esse balanço entre inflamação e restauração tecidual é quebrado, ocorre o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas e auto-imunes, tais como lúpus eritematoso sistêmico (KIS-TOTH; TSOKOS, 2010), artrite ou asma (SZÉLES, 2007).

Para o tratamento de condições inflamatórias geralmente são utilizados os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), que constituem um grupo heterogêneo de moléculas com propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas eficazes, porém é elevada a incidência dos efeitos colaterais devido ao seu uso contínuo (RANG; DALE, 2007).

Os AINES passaram a ser os fármacos mais largamente prescritos e usados em todo o mundo desde 1893, quando o químico alemão Felix Hoffman começou o processo comercial para produzir uma molécula com atividade analgésica, o ácido acetilsalicílico, patenteado como a aspirina. Contudo, apesar do amplo uso desses medicamentos, o seu mecanismo de ação somente foi esclarecido em 1971, quando John Vane, propôs que os anti-inflamatórios semelhantes ao ácido acetilsalicílico, suprimem o processo inflamatório pela inibição da ciclooxigenase (COX) (DUBOIS, 1998).

Além da aspirina, outros anti-inflamatórios não esteroidais se destacam, entre eles se encontram o ibuprofeno, o diclofenaco e o piroxicam, todos inibidores não seletivos da COX.

AINES não seletivos podem apresentar diversos efeitos colaterais, dentre os quais o mais importante é a tendência a produzir ulceração gástrica e duodenal. Este efeito colateral pode ser explicado pelo fato da inibição da COX-1 constitutivamente expressa no estômago resultar no bloqueio da biossíntese de importantes prostaglandinas (PGE_2 e PGI_2) envolvidas na citoproteção gástrica (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

Todavia, apesar do avanço nas terapias para o controle da inflamação, e da existência de medicamentos eficazes, atualmente não há medicamentos que sejam, ao mesmo tempo eficazes, potentes e apresentem mínimos efeitos colaterais.

Encontrar substâncias com maior eficácia e com baixa toxicidade tem levado os pesquisadores à uma busca frequente por novos fármacos. Entre os métodos de pesquisa, os processos de modificação molecular são os mais promissores (AMARAL; MONTANARI,

2002). Neste contexto, os derivados acilhidrazônicos se mostram como uma importante classe de compostos químicos sintéticos, uma vez que apresentam diversas atividades biológicas descritas na literatura, dentre as quais podemos citar as atividades leishmanicida (CHARRETE, 2011), analgésica e antiagregação plaquetária (BARREIRO et al., 2002) atividade antimitótica (SALUM, 2011), antiviral (TIAN et al., 2011), antibacteriana (GU et al, 2012), antifúngica (CACHIBA et al., 2012) e antimalárica (MELNYK et al, 2006).

Vários estudos comprovando a ação anti-inflamatória de derivados *N*-acilhidrazônicos foram descritos na literatura (BISPO JÚNIOR et al., 2011; DUARTE, 2006; BEZERRA NETTO, 2004). Neste contexto podemos ressaltar a importância da síntese de compostos tendo como base o núcleo acilhidrazônico como candidato a protótipo para desenvolvimento de fármacos para o tratamento dos sintomas da inflamação.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fisiopatologia da Inflamação

O termo inflamação deriva do latim “*inflammatio*” que significa “atear fogo”. Sua intensidade mostra-se diretamente proporcional ao trauma sofrido. Os sinais cardinais que caracterizam a inflamação, descritos por Cornelius Celsus, no ano V d.C., são: o rubor e o calor (são resultados de um aumento da circulação na área inflamada, esse aumento deve-se à hiperemia, onde há um maior fluxo de sangue arterial), o edema (decorre do aumento da permeabilidade vascular), e a dor (causada pela irritação química nas terminações nervosas e pela compressão mecânica). No século XIX Virchow acrescentou o quinto sinal da inflamação, a perda da função dos órgãos (consequência de uma série de fatores, especialmente do edema e da dor). Quando o processo reparatório se completa naturalmente, o processo inflamatório em si, e os sinais da inflamação tendem a desaparecer (LIMA et al, 2011).

A inflamação é uma resposta do hospedeiro à infecção, lesão tecidual e antígenos, designada primariamente à erradicação do agente invasor (ZHOU et al., 2007). A gênese e manutenção dos sinais da inflamação envolvem a liberação de inúmeros mediadores químicos como as cininas, neuropeptídeos e histamina no local da lesão tecidual, bem como componentes do complemento, citocinas e outros produtos dos leucócitos e das plaquetas. (RANG et al., 2007). Estes mediadores são responsáveis pelos eventos vasculares, permitindo a vasodilatação e o aumento da permeabilidade capilar, além da migração de leucócitos da circulação para o tecido inflamado e coordenação das variadas respostas de defesa local. Porém, é possível que a inflamação ultrapasse certos níveis, permitindo que quantidades suficientes desses mediadores endógenos penetrem na circulação sistêmica, se disseminando pelo sangue e provocando a resposta de fase aguda, definida como uma resposta multifatorial do organismo (ROTH et al., 2006).

Dentre as citocinas liberadas no momento do trauma, a interleucina 10 (IL-10) possui papel modulador do processo inflamatório; o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) induz a liberação de outras citocinas (VAZQUEZ-LOMBARDI, ROOME; CHRIST, 2013); e a interleucina 1-Beta (IL-1 β) promove a ativação da enzima cicloxigenase (COX) responsável pela produção de prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI₂s) e tromboxanos (TXs) (VERRI et al., 2006).

Dentre os leucócitos recrutados para o local da inflamação, podemos destacar os neutrófilos e as células mononucleares (linfócitos, monócitos e macrófagos) (SOEHNLEIN; LINDBOM 2010). Os neutrófilos são importantes células da resposta imune inata, sendo as primeiras células a migrarem para os locais de lesão, inflamação ou infecção e são responsáveis, junto com os macrófagos, pela fagocitose e destruição do agente causador da inflamação através da liberação de quimiocinas e citocinas (Figura 1) (MONTESEIRÍN 2009; KUMAR; SHARMA, 2010).

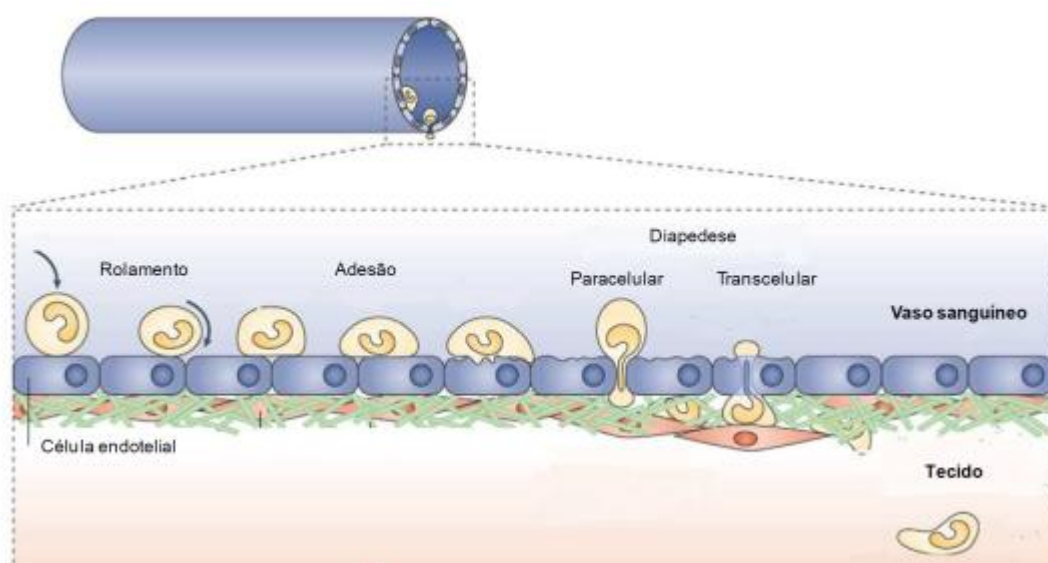


Figura 1. Migração leucocitária. Para alcançar o foco inflamatório, as células da corrente sanguínea são ativadas e realizam o processo de rolamento, adesão e diapedese. Uma vez atingido o sítio da inflamação, os leucócitos fagocitam e destroem o agente causador da lesão (Modificado de NOURSHARGH; HORDIJK; SIXT, 2010).

Os neutrófilos possuem três tipos de grânulos no seu citoplasma, e cada um contém proteínas específicas: grânulos primários (azurófilos), secundários (específicos) e grânulos terciários (gelatinase), além das vesículas secretórias. No interior dos grânulos primários, há enzimas proteolíticas e peptídeos antimicrobianos e dentre eles destacam-se a mieloperoxidase (MPO) (BORREGAARD, 2010; HOSTETTER, 2012). Outro tipo celular importante no processo inflamatório, essencial para a resposta imune inata e/ou adaptativa a patógenos são os monócitos/macrófagos. Estas células têm três funções principais: apresentação de antígenos, fagocitose e imunomodulação (AUFFRAY, SIEWEKE, GEISSMANN, 2009). Quando os monócitos/macrófagos são ativados têm a capacidade de

secretar TNF- α , interleucinas, interferon alfa ou beta (IFN- α/β), além de ativar a óxido nítrico sintase (NOS), liberando o óxido nítrico (NO) (DALE; BOXER; LILES, 2008)

2.2 Mediadores do Processo Inflamatório

2.2.1. Mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma peroxidase abundante nos grânulos presentes nos neutrófilos e nos monócitos. Todavia, os monócitos contêm apenas um terço da MPO encontrada nos neutrófilos (ARNHOLD, 2004). A MPO está apta a formar uma grande variedade de compostos. Após a conversão do oxigênio molecular em ânion superperóxido, promovido pela enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH), a enzima superóxido dismutase converte o ânion em peróxido de hidrogênio, o qual possui ação microbicida. A reação subsequente envolve a ligação da MPO com o peróxido de hidrogênio e sua conversão em íons hidroxila ou ácido hipocloroso, o qual também possui intensa atividade microbicida (ARNHOLD, 2004; JANTSCHKO, et al., 2004).

A MPO é considerada um marcador de leucócitos ativados (LAU; BALDUS, 2006) e, pode ser utilizada como marcador de neutrofilia em condições de inflamação e sepse (FAITH et al., 2008).

2.2.2 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) é um gás e um radical livre que regula funções celulares em condições fisiológicas e patológicas (MONCADA; HIGGS, 2006). O NO é formado a partir do aminoácido L-arginina, o qual está presente em altas concentrações no sangue, no fluído extracelular e também em diferentes tipos de células. A enzima óxido nítrico sintase (NOS) promove a catalise dessa reação. Todavia, o processo de liberação do NO é o resultado de uma série de eventos oxidativos e redutores, envolvendo um grande número de cofatores (BRUCKDORFER, 2005).

Atualmente são conhecidas três isoformas de NOS: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e NOS induzida (iNOS). As duas primeiras enzimas são constitutivas, produzem NO em baixas concentrações e sua ativação é dependente de cálcio (CIRINO; FIORUCCI; SESSA, 2003). Entretanto, a iNOS libera grandes quantidades de NO (cerca de 20 vezes mais do que a produção da NOS constitutiva), é ativada por estímulos externos

como, por exemplo, lipopolissacarídeos bacterianos e atinge um pico máximo de atividade em 24 horas após ativação (BRUCKDORFER, 2005). A expressão da iNOS pode ser benéfica: resultando em inibição do crescimento de patógenos microbianos, protegendo tecidos de danos em resposta inflamatória aguda sistêmica e inibindo microtrombose pela prevenção de adesão plaquetária; ou nociva: onde a síntese de NO dependente de iNOS no espaço subendotelial e o potencial para sua inibição por lipoproteínas podem ter impacto na patogênese dos vasos sanguíneos ateroscleróticos (MORRIS; BILLIAR, 1994).

Estímulos inflamatórios como lipopolissacarídeo e citocinas induzem a liberação do NO em vários tipos de células tais como células endoteliais, da musculatura lisa vascular e da musculatura lisa de vasos arterioscleróticos, além de macrófagos (XIE; KASHIWABARA; NATHAN, 1994; PUHAKKA et al., 2003).

2.2.3. A via do Ácido Araquidônico e os Eicosanóides

Os fenômenos da inflamação são mediados por substâncias químicas, cuja interação é complexa. Elas são oriundas do plasma, leucócitos, plaquetas, endotélio e tecido conjuntivo. Entretanto, neste cenário merece destaque, a ativação da cascata do ácido araquidônico (AA), que é um ácido graxo de 20 carbonos, contendo quatro duplas ligações, que apresenta papel regulador chave na fisiologia celular. O AA é liberado a partir de fosfolipídios de membrana através da enzima fosfolipase A2 (PLA2), que pode ser ativada por diversos estímulos químicos, inflamatórios, traumáticos e mitogênicos (BROOKS et al., 1999, HILÁRIO et al., 2006). O AA pode ser metabolizado pela via das cicloxigenases (COXs), dando origem a formação de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos; ou pela via das lipoxigenases (LOXs) levando a síntese dos leucotrienos (LTs) e lipoxinas (Figura 2) (RANG et al., 2007; YEDGAR et al., 2007).

A COX é a enzima chave na síntese de prostaglandinas (Figura 2) (BOTTING, 2006). O sítio cicloxigenase promove a oxidação do AA em prostaglandina G_2 , que por sua vez é reduzida ao intermediário instável PGH_2 pelo sítio peroxidase (BROOKS et al., 1999). As prostaglandinas G_2 e H_2 são compostos intermediários e quimicamente instáveis sendo convertidas pelas isomerases tissulares específicas em múltiplos prostanoides (PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 , TXA_2 e TXB_2). Entretanto, a maioria dos tecidos é capaz de converter PGH_2 em apenas alguns desses produtos finais, dependentemente do tipo de isomerase presente em cada tecido (HILÁRIO et al., 2006; FILHO; RAHAL, 2008).

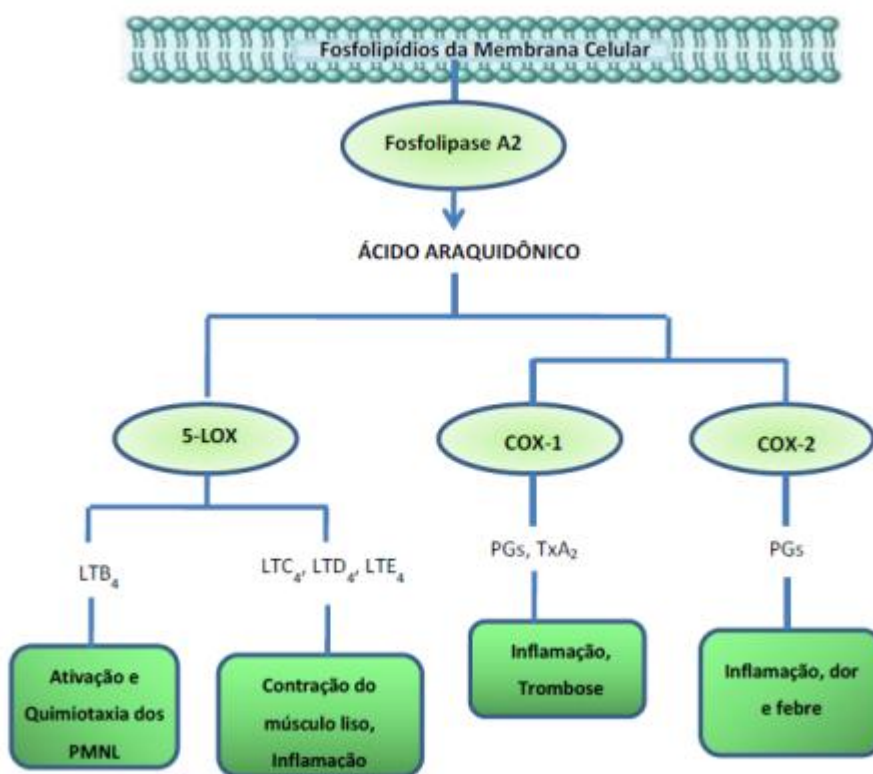


Figura 2. Esquema geral que representa as vias metabólicas que levam a produtos do ácido araquidônico envolvidos no processo inflamatório (CORUZZI; VENTURI; SPAGGIARI, 2007).

São encontradas duas isoformas circulantes de enzima cicloxigenase: COX-I e COX-II, que desempenham no organismo diferentes funções fisiológicas (LEES et al., 2004). A COX-I apresenta 17 aminoácidos em sua porção amino-terminal, enquanto a COX II apresenta 18 aminoácidos na porção carboxi-terminal. Embora sejam muito semelhantes na estrutura proteica, essas enzimas são codificadas por genes diferentes (HILÁRIO et al., 2006; MARNETT, 2009). O sítio de ligação da COX-I apresenta na posição 523 da cadeia protéica uma molécula de isoleucina, ao passo que a COX-II tem uma pequena molécula de valina. Essa mudança é que torna o sítio de ligação da COX-II mais largo e mais acessível (KVATERNICK et al., 2007).

A COX-I faz parte da constituição do trato gastrointestinal, sendo associada à produção de muco protetor e à inibição da secreção gástrica. Portanto, fármacos que inibem essa isoforma causam diversos distúrbios no trato digestivo e podem estar associadas ao risco de sangramento cutâneo e gastrointestinal como efeitos adversos. Nas plaquetas, a COX-I está associada à síntese do tromboxano A₂, substância que favorece a agregação e adesão plaquetária. Portanto, a inibição da COX-I está associada ao risco de sangramento cutâneo e

gastrointestinal (KUMMER; COELHO, 2002; LEES et al., 2004; BRICKS; SILVA, 2005; FRANCO et al., 2006; HAZEWINKELE et al., 2008).

A COX-II leva a formação de PGs que participam de eventos inflamatórios, algésicos e térmicos (KUMMER; COELHO, 2002; FRANCO et al., 2006; HAZEWINKELE et al., 2008). A expressão da COX-II é induzida por citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-2, TNF- α , e outros mediadores nos sítios de inflamação, como fatores de crescimento e endotoxinas. As citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e a IL-13, assim como os fármacos glicocorticóides inibem a expressão de COX-II. (VANE et al., 1998; MARNETT, 2009). Embora se saiba que a COX-II possui propriedades pró-inflamatórias, a resposta inflamatória total é produzida tanto pela COX-II como pela COX-I (LEES et al., 2004; HILÁRIO et al., 2006).

Na via da lipoxigenases (LOX), os produtos iniciais são gerados por três tipos de LOX, que estão presentes em apenas alguns tipos de células (COTRAN et al., 2006). As lipoxigenases são encontradas principalmente em células de origem mielóides, como por exemplo, leucócitos polimorfonucleares (PMNL), mastócitos, macrófagos e basófilos (GOMES et al., 2009). A 5-lipoxigenase é a principal enzima deste grupo, atuando sobre o ácido araquidônico e produzindo o ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE), um composto quimiotático para leucócitos, que é convertido em leucotrieno A₄ (LTA₄) (GOODMAN et al., 2009). O LTA₄ pode ser convertido em leucotrieno B₄ (LTB₄) ou em uma série de cisteinil-leucotrienos, LTC₄, LTD₄ e LTE₄. Os cisteinil-leucotrienos são produzidos principalmente por eosinófilos, mastócitos, basófilos e macrófagos, enquanto que o LTB₄ é produzido principalmente por neutrófilos e macrófagos (GILMAN et al., 2006; KATZUNG, 2006; RANG et al., 2007).

Inúmeras evidências experimentais sugerem que os leucotrienos e alguns dos seus metabólitos contribuem para a fisiopatologia da resposta inflamatória através de grande variedade de efeitos (HAEGGSTRÖM, 2000). O LTB₄ é um importante agente responsável pelo aumento da permeabilidade vascular, causa aderência, quimiotaxia e ativação de polimorfonucleares e monócitos, além de estimular a proliferação de macrófagos e linfócitos e a produção de citocinas por essas células (GOODMAN et al., 2009). Os cisteinil-leucotrienos provocam vasodilatação na maioria dos vasos do leito vascular, vasoconstrição coronária e contração do músculo brônquico, sendo muito importantes na asma (BERTOLINI et al., 2002). Os LTC₄ e LTD₄ causam edema decorrente do aumento da permeabilidade microvascular (ISHII et al., 1994).

2.2.4. Aminas vasoativas, Peptídeos e Cininas

A histamina e a serotonina se encontram disponíveis em reservas pré-formadas estando, portanto, entre os primeiros mediadores a serem liberados após o estímulo inflamatório (RANG et al., 2007). Estas substâncias são armazenadas em vesículas no interior de macrófagos, mastócitos e plaquetas, e são responsáveis por alterações vasculares como: vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e exsudação plasmática (PARADA et al, 2001).

A histamina é considerada o principal mediador na fase imediatamente após a lesão, aumentando a permeabilidade vascular, induzindo a contração do endotélio venular e as lacunas interendoteliais, atuando sobre a microcirculação (COTRAN et al., 2006). A histamina exerce essa ação biológica pela ativação de receptores H₁ expressos, que causa separação das células endoteliais e permitem a transudação de líquidos e moléculas do tamanho de pequenas proteínas no tecido perivascular (MCDONALD et al., 1999). A ativação desses receptores permite o aumento do cálcio intracelular capazes de ativar nociceptores e promover a síntese de prostaglandinas (CLOUGH, 1999). A histamina também é um importante mediador das respostas alérgica imediata e inflamatória. Sua fonte mais abundante são os mastócitos, porém também são encontradas em outras células como basófilos, plaquetas e nos neurônios (HOUGH, 2000; HAAS, 2008). A extensão da liberação de outros mediadores como prostaglandinas e NO é determinada pela liberação primária de histamina (MCDONALD et al., 1999).

A serotonina é o segundo mediador vasoativo pré-formado, possuindo ações semelhantes às da histamina. Está presente nas plaquetas e nas células enterocromafins e nos mastócitos em roedores. Sua liberação é estimulada quando as plaquetas se agregam após contato com colágeno, trombina, adenosina difosfato (ADP) e complexo antígeno-anticorpo. A liberação de histamina também é estimulada durante reações mediadas por IgE decorrentes dos mastócitos, resultando em aumento da permeabilidade durante reações imunológicas (COTRAN et al., 2006; RANG et al., 2007).

Dentre os peptídeos envolvidos no processo inflamatório podemos citar a substância P. A substância P é um peptídeo integrante da família das taquicinas, que tem efeitos pró-inflamatórios e é responsável pela inflamação neurogênica. Junto com as neurocininas atuam nos receptores NK-1, aumentando o fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular, e em receptores NK-2, induzindo broncoconstrição (GOUDET et al., 2008; ZHANG et al., 2009). A substância P promove vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, atração de

células do sistema imune para o local da lesão e degranulação dos mastócitos com liberação de diversos neuromediadores (OTTEN, 1980)

As cininas, representadas pela bradicinina, Lys-bradicinina e Met-Lys-bradicinina, geram peptídeos vasoativos liberados a partir de substratos proteicos. No sistema enzimático das cininas, a calicreína sintetiza a bradicinina por clivagem proteolítica do seu precursor, o cininogenio (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2006). A bradicinina é um peptídeo vasoativo derivado do cininogênio (precursor inativo) que afeta a musculatura, promovendo vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (SIQUEIRA-JUNIOR, DANTAS, 2000). Os receptores B₂ da bradicinina são constitutivos e medeiam o aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, broncoconstrição e estimulação de receptores algésicos. Os receptores B₁, pouco expressos na maioria dos tecidos em condições normais, são rapidamente induzidos em condições patológicas por vários estímulos pro-inflamatórios, como as citocinas interferon gama (IFN- γ), IL-1 e TNF- α . (CALIXTO et al., 2004)

2.2.5. Resposta Imune e Inflamação

O sistema imune é responsável pelos processos de reparo tecidual como também pela defesa do organismo e tem sido conceitualmente dividido em imunidade inata e imunidade adaptativa. Estes dois tipos de imunidade atuam de maneira independente. Na imunidade inata as células atuantes são as fagocitárias mononucleares e os granulócitos, enquanto que na imunidade adquirida as células em atuação são os linfócitos (JANEWAY et al, 2010).

As principais células efetoras da imunidade inata são: macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *Natural Killer* (NK). São considerados os principais mecanismos da imunidade inata a liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento, bem como síntese de proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas. Em contraposição à resposta inata, a resposta imune adaptativa depende da ativação de células especializadas, os linfócitos, e das moléculas solúveis por eles produzidas. As principais características da resposta adquirida são: especificidade e diversidade de reconhecimento, memória, especialização de resposta, autolimitação e tolerância a componentes do próprio organismo (MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997).

Na imunidade inata, os macrófagos secretam diversos mediadores, tais como NO, citocinas (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , etc), quimiocinas (IL-8, MIP-1 α , MCP-1), entre outros. (KONSMAN et al, 2002). A indução para a ativação dos macrófagos pode ocorrer tanto pelo

estímulo lesivo ou pela ação de outras citocinas, principalmente IFN- γ , que são liberadas por linfócitos (JANEWAY et al, 2010; PARSLOW, 2004).

Os neutrófilos são células cruciais no processo inflamatório devido a sua rápida ativação e resposta ao estímulo quimiotático. Estas células exercem importante papel nas fases precoces das reações inflamatórias e são sensíveis a agentes quimiotáticos como produtos de clivagem de frações do complemento (C3a e C5a) e substâncias liberadas por mastócitos e basófilos. Em condições normais, os neutrófilos são eliminados da circulação e dos tecidos inflamados por apoptose (BRINKMANN, et al., 2004).

Os mastócitos originados de células hematopoéticas situadas na medula óssea e em geral, não são encontrados na circulação. Estas células apresentam na superfície receptores de alta afinidade, Fc ϵ RI, ligados a moléculas de IgE, e são ativados pelo reconhecimento de antígenos multivalentes pelas IgEs. Seu envolvimento em processos inflamatórios está associado as reações alérgicas em que os mastócitos, juntamente com os basófilos, em contato com o alérgeno, desencadeiam reação de hipersensibilidade do tipo I via ativação de Fc ϵ RI. Após o estímulo, sobrevém a degranulação e liberação de mediadores preformados, seguida da liberação de mediadores formados após a ativação. Dentre os mediadores preformados estão aminas vasoativas, heparina, proteases, TNF- α , IL-4 e GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*). Os mediadores neoformados incluem derivados do ácido araquidônico, o fator de agregação plaquetária (PAF) e uma série de citocinas (ABBAS, 2003).

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

2.2.6. Sistema Complemento

O sistema complemento é o principal mediador humoral do processo inflamatório junto aos anticorpos. É constituído por um conjunto de proteínas, tanto solúveis no plasma como expressas na membrana celular. Cada componente ativado no sistema complemento

adquire atividade proteolítica, ativando os elementos seguintes em cascata. Ao longo do processo, ocorre a produção de diversos mediadores que alteram a permeabilidade vascular e contribuem para o desenvolvimento da resposta inflamatória (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001).

Há três vias de ativação do sistema complemento: clássica, alternativa e via das lectinas ligadoras de manose (MBL). A ativação dessas vias contribui para a integração dos mecanismos efetores da imunidade inata e adaptativa (Figura 3). Na resposta imune inata, patógenos que invadem o organismo se deparam com substâncias solúveis da resposta imune inata, como as proteínas do sistema complemento, proteína C reativa e outras. Na imunidade adaptativa, o sistema complemento é ativado pela ligação de anticorpos preformados ao patógeno ou antígeno (imunocomplexo) (BARRINGTON, et al., 2001).

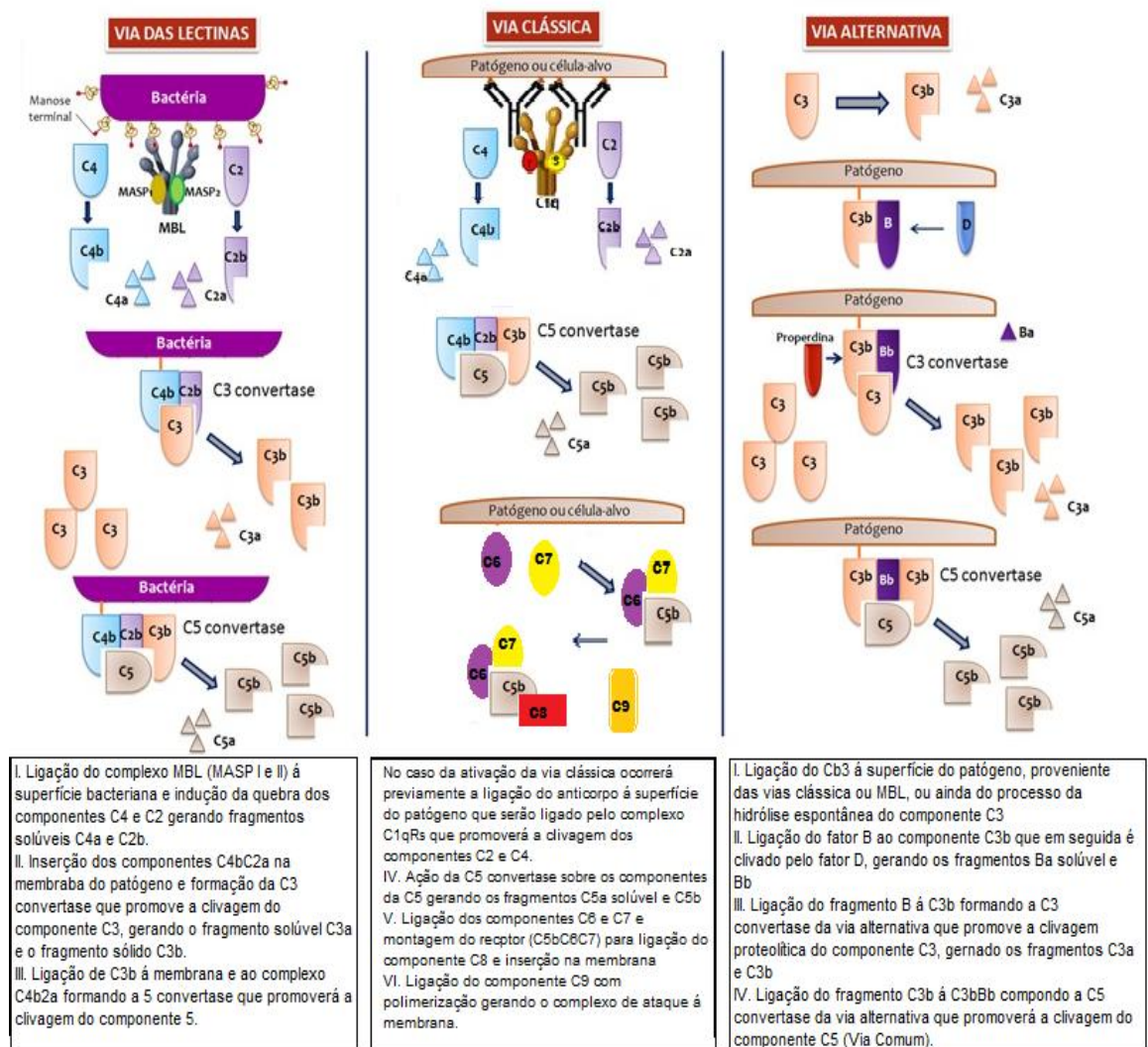


Figura 3. Vias de ativação do sistema complemento (Adaptado de CRUVINEL et al., 2010)

A regulação da ativação do sistema complemento é promovida por proteínas solúveis circulantes e/ou acopladas à membrana celular. Esse mecanismo espécie-específico assegura que a ativação do sistema complemento em baixos níveis não comprometa as células do próprio organismo e impede que, nos momentos de intensa ativação, ocorra deposição dos complexos gerados sobre tecidos autólogos (CRUVINEL et al., 2010)

2.2.7. Citocinas

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico através da ativação de proteinoquinases ativadas por mitógenos (LIN; CALVANO; LOWRY, 2000). Diferentes tipos de células secretam a mesma citocina, e uma única citocina pode agir em diversos tipos de células, induzir sua própria produção ou a produção de outras citocinas devido as suas ações pleiotrópicas (TORRE-AMIONE, 2005).

Como não é possível classificar as citocinas quanto a célula de origem ou quanto a função biológica, elas foram agrupadas em interleucinas (numerada sequencialmente de IL-1 a IL-35), fatores de necrose tumoral (TNF), quimiocinas, interferons (IFN) e fatores de crescimento mesenquimal (CURFS; MEIS; HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997). Algumas citocinas podem ter ações pró ou anti-inflamatórias, de acordo com o microambiente no qual estão localizadas. Dentre as consideradas pró-inflamatórias, temos as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 e TNF- α . As anti-inflamatorias são IL-4, IL-10, IL-13 e TGF β (fator transformador de crescimento β) (PARSLOW et al, 2004; TORRE-AMIONE, 2005).

As interleucinas anti-inflamatórias inibem a liberação de citocinas pró-inflamatórias e reduzem a expressão da COX-II (VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998), enquanto que as interleucinas pró-inflamatórias migram e atuam na área lesionada, sinalizando a inflamação (CUNHA et al, 2000).

A IL-10 é produzida principalmente por células CD8⁺ ativadas. Células Th0, Th1, Th2 ativadas, linfócitos B, mastócitos e monócitos ativados por LPS também podem produzir IL-10, porém são fontes menos importantes. A IL-10 inibe a síntese de outras citocinas, como o IFN- γ , IL-2, IL-12, TNF- β . Seus efeitos supressivos sobre as células Th1 diminuem a função citolítica e secretora de citocinas por Th1 e facilita o desenvolvimento de respostas Th2. IL-10 atua como um co-estimulador para a proliferação de mastócitos e seus progenitores. É ainda co-estimulador no crescimento dos timócitos imaturos, agindo como

fator de diferenciação para as células T citotóxicas, sendo esta ação de menos intensidade (VARELLA; FORTE, 2001)

A função principal da IL-1 é servir como mediadora da resposta inflamatória do hospedeiro a infecções e outros estímulos, promovendo a proliferação e a diferenciação das células do sistema imune inato e adaptativo (ABBAS et al, 2008; OLIVEIRA et al, 2008).

Monócitos e macrófagos são a principal fonte de IL-1, produzindo principalmente IL-1 β , enquanto os queratinócitos produzem IL-1 α . Outros tipos celulares podem produzir IL-1, como células endoteliais, fibroblastos, miócitos, células de Langerhans e linfócitos B e T. As formas α e β da IL-1 têm atividades semelhantes, suas atividades biológicas primordiais incluem a estimulação de células CD4⁺ que secretem IL-2 e produzam receptores para esta citocina; proliferação e ativação de linfócitos B, neutrófilos, monócitos/macrófagos e aumentam as atividades quimiotáticas e fagocitárias (VARELLA; FORTE, 2001). A IL-1 β produz inflamação sistêmica através da ativação da COX-II, com a formação de PGE₂; também produz substância P, óxido nítrico (ativando a enzima óxido nítrico sintetase) e moléculas de adesão endotelial (WOLF, et al., 2008).

TNF- α é sintetizado e liberado no local da lesão a partir de diversas células, como: macrófagos, linfócitos Th1, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, células NK e células do sistema nervoso (MEYERS et al, 2005). O TNF- α é um potente indutor de metabolismo muscular e caquexia, por estimular a lipólise e inibir a lipoproteína lipase (CURFS; MEIS; HOOBKAMP-KORSTANJE, 1997). As demais ações do TNF são: alterações endoteliais, atividade quimiotática e estímulo ao metabolismo oxidativo de fagócitos. Tem também atividade de pirógeno endógeno, aumenta a reabsorção óssea, a atividade de adipócitos e a expressão de MHC-I e II. Estimula a produção de IL-6 fazendo com que os hepatócitos produzam proteínas da fase aguda da inflamação (VARELLA; FORTE, 2001).

2.3. Fármacos Anti-inflamatórios

Os principais fármacos utilizados nos processos inflamatórios são os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) que possuem propriedade anti-inflamatória, analgésica, antitérmica e antitrombótica (SÜLEYMAN; DEMIRCAN; KARAGÖZ, 2007). O principal mecanismo de ação dos AINEs ocorre através da inibição da COX fazendo com que haja uma redução da conversão do ácido araquidônico e desta forma, impedem a síntese de eicosanoides e prostanoide (MONTEIRO et al., 2008).

O efeito dos AINEs é inespecífico, sintomático e não interfere na história natural do processo inflamatório (VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998; MONTEIRO et al., 2008). Há, no entanto, o inconveniente de que o uso destes medicamentos, principalmente se utilizado de forma crônica, venha a provocar alguns efeitos indesejáveis (RAJAKARIAR et al., 2006). O efeito dos AINEs na produção de prostaglandinas é também a principal causa da sua toxicidade, promovendo a alteração da função renal, risco de doenças cardiovasculares e problemas gastrointestinais (LAINE et al., 2006; MCGETTIGAN; HENRY, 2011).

Os AINEs pertencem a duas grandes classes: Inibidores Não Seletivos da COX e inibidores Seletivos da COX-II (Coxibes).

Os AINEs com ação predominante sobre a COX-I são: ácido acetilsalicílico (AAS), indometacina, ibuprofeno, fenoprofeno, cetoprofeno e piroxican. Esses medicamentos são comercializados há muitos anos e são os mais utilizados em adultos e crianças (RODERJAN, 2004).

Os coxibes representados pelo celecoxibe, valdecoxibe, rofecoxibe, lumiracoxibe e etoricoxibe são inibidores potentes da COX-2. Estes fármacos surgiram com a finalidade de reduzir os efeitos gastrintestinais dos inibidores tradicionais. Todavia, essa seletividade acarreta um desequilíbrio entre os fatores anti- e pró-trombóticos, com predomínio de tromboxano (TXA₂) em detrimento de prostaciclina (PGI₂), o que desencadeia uma série de complicações cardiovasculares. Atualmente, no Brasil, apenas o celecoxibe e o etoricoxibe são comercializados, ambos com retenção de receita médica e com clara indicação dos riscos de complicações cardiovasculares (MENDES et al., 2012).

Além dos AINEs, os anti-inflamatórios esteroidais também denominados glicocorticóides, são fármacos utilizados como agentes anti-inflamatórios, atuando em vários tipos celulares e tecidos (FLAMMER; ROGATSKY, 2011). Seu mecanismo de ação envolve interações com receptores intracelulares pertencentes à superfamília dos receptores que controlam a transcrição gênica. Ao serem ativados, esses receptores podem levar à indução (desencadeamento de transcrição) ou à repressão (inibição de transcrição) de genes particulares (CHROUSOS; MARGIORIS, 2001).

Os fármacos anti-inflamatórios esteroidais bloqueiam a liberação de prostaglandinas pela inibição da atividade de fosfolipase A₂, que interfere na cascata do ácido araquidônico. Assim, indivíduos que utilizam este tipo de anti-inflamatório por períodos prolongados ficam predispostos a infecções por seus efeitos imunossupressores (MILLER, STANTON; DERERY, 2001).

A obtenção de inibidores duais para a COX/LOX pode contornar ou minimizar efeitos colaterais indesejáveis dos AINEs (MAHY et al, 1993). A justificativa para o desenvolvimento de inibidores duais da COX e 5-LOX foi baseado tanto a atividade pró-inflamatória dos leucotrienos, como nos efeitos prejudiciais que os inibidores da COX causam na mucosa gástrica (ATAY; TARNAWSKI; DUBOIS, 2000; CELOTTI; LAUFER, 2001). Inibidores duais 5-LOX/COX devem, teoricamente, apresentar aumento dos efeitos anti-inflamatórios e melhor tolerabilidade gástrica (FIORUCCI et al, 2001).

Os leucotrienos têm um papel essencial no desenvolvimento e na manutenção do processo inflamatório e ficou mais explícito que tanto os leucotrienos, como as prostaglandinas têm efeitos complementares, enquanto que a produção de lipoxinas se opõem as ações inflamatórias dos leucotrienos (MARTEL-PELLETIER et al, 2003). As lipoxinas são consideradas produtos de contra-regulação do ácido araquidônico, responsáveis pela ação anti-inflamatória e gastroprotora (CORUZZI; VENTURI; SPAGGIARI, 2007).

Em vista desses conceitos, sugere-se o bloqueio tanto da produção de prostaglandina quanto de leucotrieno por apresentarem efeitos sinérgicos alcançando dessa forma a atividade anti-inflamatória ideal. Além disso, a inibição do processo inflamatório pela via dual 5-LOX/COX pode produzir um espectro mais amplo de efeitos anti-inflamatórios (MARTEL-PELLETIER et al, 2003).

Substâncias que contêm em suas estruturas uma porção hidrazona apresentam-se como inibidores duais da 5-LOX/COX (REIS et al., 2011). O nosso trabalho tem como objetivo comprovar a atividade anti-inflamatória de derivados acilhidrazônicos e investigar o possível mecanismo de ação do composto mais ativo.

2.4. Propriedades Biológicas das Acilhidrazônas

Há muito tempo que compostos derivados da hidrazona vem sendo utilizados para diversos fins, que vão desde a agricultura, passando pelo ramo industrial e, principalmente, no setor farmacêutico. Emil Fischer (1883), descobriu as hidrazônas quando estava sintetizando um derivado indólico a partir da reação entre fenil hidrazina com propanona (CAIXEIRO, 2007). Desde então, esses compostos passaram a ser sintetizados em larga escala por apresentarem ação contra diferentes tipos de patologias (ZAMPIROLI, 2009).

Os derivados acilhidrazônicos se mostram como uma importante classe de compostos químicos sintéticos por suas diversas propriedades farmacológicas. A Figura 4 mostra a

estrutura de uma hidrazona, precursora de diversos compostos amplamente sintetizados e de interesse farmacêutico.

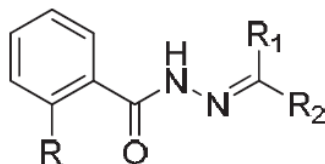


Figura 4. Estrutura básica da função *N*-acilhidrazona.

A atividade antibacteriana de derivados acilhidrazônicos já foi relatada frente a diferentes espécies e cepas de bactérias. Govindasami et al. (2011) avaliou a atividade antimicrobiana de derivados acilhidrazônicos frente a uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus*, onde estes compostos apresentaram inibição de até 12 mm/halo. Reis (2007) também constatou significativa atividade antibacteriana de derivados da acilhidrazona frente a diferentes cepas de *Mycobacterium tuberculosis* e *Staphylococcus aureus* (figura 5).

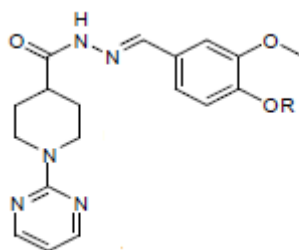


Figura 5. Derivado acilhidrazônico com atividade antibacteriana (GOVINDASAMI, et al. 2011)

A atividade antifúngica também já foi constatada para derivados acilhidrazônicos frente a diferentes espécies do gênero *Candida* sp. (MALIK et al., 2012; CACHIBA et al., 2012). A seguir, alguns compostos que apresentaram tais atividades nestes respectivos trabalhos (figura 6).

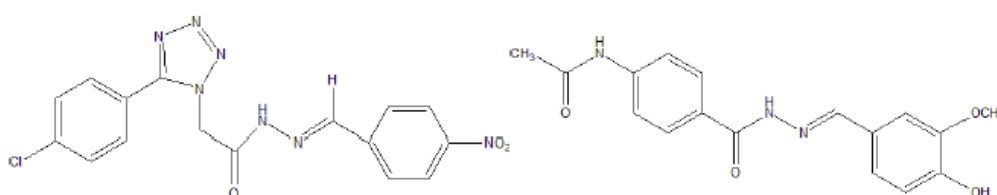


Figura 6. Derivados acilhidrazônicos com atividade antifúngica (MALIK et al., 2012).

Cui et al. (2010) avaliaram a atividade de compostos acilhidrazônicos frente a células tumorais e constataram a capacidade dos compostos (Figura 7) de induzir a célula à morte. Salum (2011) descreveu as atividades antiproliferativa, antitubulina, antimitótica e inibitória da migração celular para derivados da acilhidrazona.

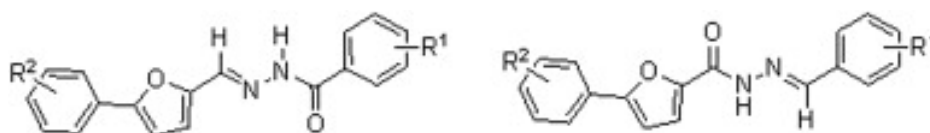


Figura 7. Derivados acilhidrazônicos com atividade antitumoral (CUI, et al. 2010).

Tian et al. (2009) e Jin et al., (2010) sintetizaram novas séries de compostos acilhidrazônicos, as quais foram avaliados frente ao vírus HIV, comprovando a atividade antiviral destas substâncias. O composto representado na Figura 8 foi um dos que apresentaram atividade anti-HIV de forma mais efetiva. A atividade desestabilizadora da transcriptase reversa de derivados acilhidrazônicos foi observada por Sluis-Cremer et al. (2002).

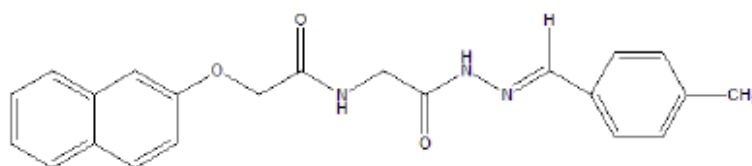


Figura 8. Derivado acilhidrazônico com atividade anti-HIV (SLUIS-CREMER et al. 2002).

Derivados acilhidrazônicos também já foram relatados como potenciais agentes antimaláricos frente a cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes a cloroquinas (MELNYK et al., 2006). Na Figura 9 estão demonstrados exemplos de compostos com tal atividade já comprovada.

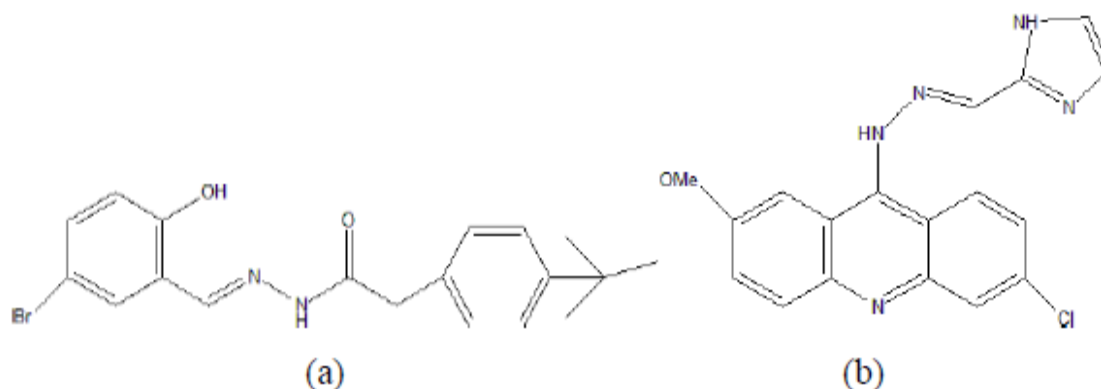


Figura 9. Derivado acilhidrazônico (a) e acilhidrazônico acridínico com atividade antimalárica (b) (MELNYK, et al. 2006).

Diversos trabalhos têm relatado a atividade anti-inflamatória de derivados acilhidrazônicos. Os mecanismos de ação destes compostos podem envolver a inibição de enzimas como as cicloxigenases (COX) e a 5-Lipoxigenase (5-LOX) (HIGGS; VANE, 1983). Já foram relatados diversos derivados da *N*-acilhidrazona com ação anti-inflamatória (DUARTE, 2006; UNSAL-TAN, et al., 2010; BISPO JÚNIOR et al., 2011; SILVA et al., 2014). Um exemplo de derivado com atividade anti-inflamatória pode ser observado na Figura 10.

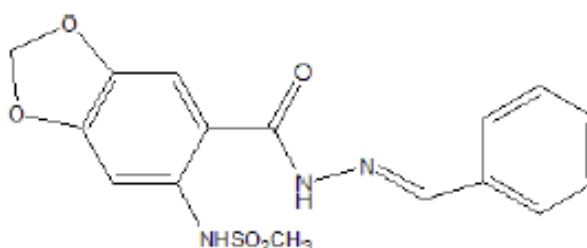


Figura 10. Derivado acilhidrazônico com atividade anti-inflamatória (SILVA, et al. 2014).

Além das atividades farmacológicas supracitadas, podemos citar ainda de atividade tripanocida (CARVALHO et al., 2014), leishmanicida (HERNANDEZ et al., 2013),

antimicobacterianos (LANNES, 2010), antinociceptiva (FIGUEIREDO, et al. 2000; SAUZEM, 2004), antiagregante plaquetário (RODRIGUES et al., 2007), antitrombótica (BARREIRO, et al. 2002; LIMA, et al. 2008), entre outras.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar o potencial anti-inflamatório de derivados *N*-acilhidrazônicos como novos protótipos para o desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios.

3.2. Específicos

- ☐ Avaliar o potencial citotóxico de derivados *N*-acilhidrazônicos;
- ☐ Realizar a triagem de derivados *N*-acilhidrazônicos utilizando como modelo de inflamação aguda bolsa de ar;
- ☐ Avaliar a atividade anti-inflamatória do derivado acilhidrazona AMH, utilizando modelos experimentais de inflamação aguda por pleurisia induzida por carragenina, histamina, bradicinina e zimosano e permeabilidade vascular induzida por ácido acético;
- ☐ Determinar as concentrações de TNF- α , IL-1 β e NO no exsudato inflamatório de animais tratados com os compostos em estudo nos modelos experimentais de bolsa de ar e pleurisia induzida por carragenina;
- ☐ Determinar a concentração de MPO em amostras do tecido pulmonar do modelo de pleurisia induzida por carragenina.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAL

4.1. Substâncias

Os derivados *N*-acilhidrazônicos foram fornecidos pelo Prof. Dr. Ricardo Olimpio Moura, do Departamento em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

4.2. Reagentes

Kits de citocinas: Mouse TNF- α Elisa, Mouse IL-1 β Elisa (eBioscience); Reagentes: ácido acético glacial C₂H₄O₂ (VETEC), heparina sódica 5.000 μ l/mL (Cristalia), Azul de Evans (Sigma, St. Louis, Missouri, USA). HEMSTAB EDTA 15 gl/dl (Labtest), cloridrato de ketamina (Vetbrands), cloridrato de xilazina (Vetbrands).

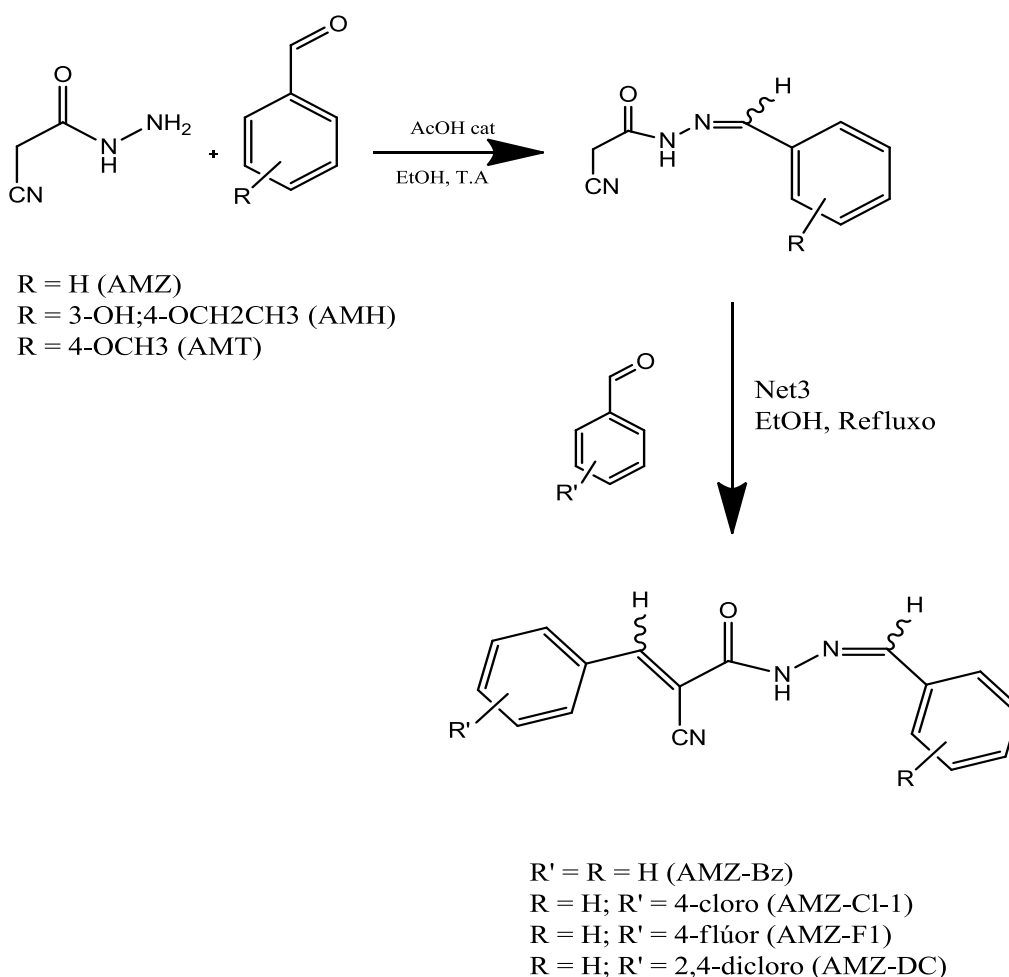
4.3. Animais

Foram utilizados, 162 camundongos adultos (com cerca de 60 dias de nascidos) machos, albinos Swiss (*Mus musculus*), pesando entre 25 e 30 g, provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Foram usados em média 06 animais por grupo. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polietileno com grades de aço inoxidável e maravalha como cobertura, tendo acesso livre à água e ração balanceada, mantidos em ambiente com temperatura de 22°C $\pm$ 2 e luminosidade controlada, proporcionando um ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os animais foram submetidos a jejum, com a retirada da ração cerca de 4 horas antes do início do experimento. Durante o experimento os animais tiveram livre acesso à ingestão de água. Os animais foram mantidos de acordo com as normas Internacionais do Conselho de Laboratório de Animais Experimentais (ICLAS). Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animal de Laboratório (SBCAL) e com as normas estabelecidas pelo *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE), sob protocolo de número 23076.030374/2014-85. Este projeto encontra-se em concordância com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605- art. 32 e decreto 3.179- art. 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

5. MÉTODOS

5.1. Síntese dos Compostos

Para a obtenção dos derivados acilhidrazônicos intermediários, foram realizadas reações de condensação da 2-cianoacetohidrazida com os diferentes aldeídos substituídos, em equivalência molar de 1:1. O solvente utilizado na reação foi o etanol, além disso, utilizou-se o ácido acético como catalizador (Esquema 1). As reações foram submetidas à agitação e tiveram seus desenvolvimentos acompanhados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). A precipitação do produto ocorreu rapidamente no meio reacional. Ao serem finalizadas as reações, observou-se a formação de um produto único e os produtos de partidas eram completamente consumidos. As reações foram levadas à geladeira para baixar a energia do sistema e estimular a precipitação de uma maior quantidade de produto. Posteriormente, os produtos foram filtrados em papel de filtro e levados à estufa para secar em temperatura variando entre 40-50 °C. Por fim, foi pesado em balança de precisão, para que fossem calculados os rendimentos (SANTOS, 2012).



Esquema 1. Rota Sintética dos Derivados *N*-acilhidrazônicos substituídos

5.2. Determinação da viabilidade celular em macrófagos murino da linhagem J774.A1

A avaliação da viabilidade celular dos derivados *N*-acilhidrazônicos foi medida utilizando um ensaio de redução de MTT, que é baseada na conversão de 3- (4,5-dimetil-2-tiazole) -2,5 brometo de difenil-2H-tetrazólio (MTT) a um produto de formazan pela ação da enzima succinil desidrogenase, que está presente na mitocôndria de células viáveis (MOSMANN, 1983; ALLEY et al., 1988). As células foram plaqueadas em meio DMEM em microplacas de 96 poços e incubadas durante 24 h a 37 ° C. Após este período, 25 µl dos compostos: AMZ-DC-1, AMH, AMZ-Cl1, AMZ-Bz, AMZ, AMZ-F1 e AMT (25 µg / ml) foram adicionados a cada poço e incubou-se durante 72 h. Em seguida, o corante MTT (25 µl; 0,5 mg / mL) foi adicionado aos poços, e o ensaio foi incubado durante mais 3 h. Após este período, o meio foi removido e dimetilsulfóxido (DMSO, 100 µl) foi adicionado às cavidades para solubilizar os sais de formazan. A densidade óptica dos poços foi medida a 540 nm, e foi comparada com as dos poços de controle (células incubadas apenas com meio). Dois experimentos independentes foram realizados em duplicata. As amostras foram classificadas pela diminuição da percentagem de viabilidade celular e classificadas da seguinte forma: inativo (1-20%), fracamente ativa (20-50%), moderadamente ativa (50-70%) ou muito ativos (70-100%).

5.3. Atividade Anti-inflamatória

5.3.1. Bolsão de Ar Subcutâneo

A indução de uma bolsa de ar no dorso dos camundongos foi feita através da injeção de ar estéril. Este experimento foi realizado como triagem a fim de selecionar o(s) composto(s) com melhor atividade anti-inflamatória. Para o procedimento experimental, no primeiro dia, injetou-se 2,5 mL de ar estéril no dorso do animal, repetindo-se o procedimento após 72 horas. No sétimo dia os animais receberam, por via oral, os derivados acilhidrazônicos AMH, AMZ-Bz, AMZ e AMT na dose de 100 mg/kg, indometacina (10 mg/kg) e um grupo controle recebeu o veículo (salina + DMSO 5%). Para indução da inflamação foi injetado 1,0 mL de uma solução de carragenina a 1% dentro da bolsa de ar uma hora após a administração dos compostos. Decorridas 6 horas após a aplicação do agente flogístico, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e as bolsas lavadas com 3,0 mL de solução salina contendo EDTA como líquido de arraste. A contagem de leucócitos totais

foi realizada em analisador hematológico ABX micros 60 (GUERRA et al, 2011). Os exsudatos do composto que apresentou melhores resultados foi centrifugado e o sobrenadante guardado a -20°C para análise de citocinas.

5.3.2. Permeabilidade Vascular Induzida por Ácido Acético

Os efeitos da substância teste no aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético foi determinado de acordo com o método descrito por Whittle, 1964. A amostra em estudo, foi administrada por via oral na dose de 10 mg/kg. Para os animais do grupo controle foi administrado o veículo (salina + DMSO 5%). Uma hora após, cada animal foi anestesiado com uma solução de ketamina e xilazina, numa concentração de 2:1, por via intraperitoneal. Imediatamente após, foi injetado no plexo retro-orbital 0,2 mL/camundongo do corante Azul de Evans a 1%. Em seguida, foi administrado 0,5 mL da solução de ácido acético (1%) na cavidade peritoneal. Após um intervalo de 30 minutos, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂, a cavidade peritoneal foi lavada com 2,0 mL de solução de NaCl 0,9% e o exsudato foi coletado e centrifugado a 2000 rpm durante 10 min. A absorbância do sobrenadante foi lida em filtro de 610 nm com um leitor de microplacas (termo plate).

5.3.3. Pleurisia Induzida por Diferentes Agentes Flogísticos

Os animais foram pré-tratados por via oral com o derivado AMH (10 mg/kg), dexametasona (0,5 mg/kg) ou veículo (salina + DMSO 5%) usado para o grupo controle e falso operado (*Sham*). Após uma hora, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com uma solução de cloridrato de ketamina e cloridrato de xilazina, numa proporção de 2:1. Foi feita uma incisão transversal na pele e nos músculos abdominais e 0,1 mL de solução do agente flogístico foi injetada na pleura do animal. A pleurisia foi induzida pela injeção intrapleural de carragenina (1%) (FRODE; MEDEIROS, 2001), histamina (100 µg/cav), bradicinina (10 nmol/cav) (GOULART, et al., 2007) ou zimosano (200 µg/cav) (FERREIRA, et al., 2012). Na pleurisia induzida por bradicinina os animais foram tratados previamente com captopril (5 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da aplicação de bradicinina para evitar a ação das enzimas quinases sobre a bradicinina. Após 4 horas os animais foram sacrificados, o tórax aberto e a cavidade pleural foi lavada com 1,0 mL de uma solução tampão fosfato estéril

contendo heparina (20 UI/mL). A contagem total de leucócitos foi feita em analisador hematológico.

5.3.4. Determinação dos Níveis de Citocinas

Os exsudatos recolhidos durante os testes do bolsão de ar e pleurisia induzida por carragenina foram armazenados em um freezer -20°C, para a determinação dos níveis citocinas. A quantificação de IL-1 β e TNF- α desses exsudatos foram determinadas pela técnica de ELISA sanduíche, utilizando kits específicos para camundongos, de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA).

5.3.5. Determinação dos Níveis de Óxido Nítrico

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

5.3.6. Determinação dos Níveis de Mieloperoxidase (MPO)

MPO é uma enzima encontrada primariamente nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos, e é comumente usada como um marcador do conteúdo tecidual de polimorfonucleares que migram para o local da inflamação. A atividade da enzima MPO foi avaliada utilizando metodologia descrita por Bradley et al. (1982), com algumas adaptações. As amostras do pulmão dos animais com pleurisia induzida por carragenina foram colhidas na 4^a h, após a indução da inflamação e foram imediatamente armazenadas em 500 μ L de tampão HTAB (5 g de hexadeciltrimetil brometo de amônia – Sigma – diluído em 1 litro de tampão fosfato de potássio) a -20° C, para posterior determinação dos níveis teciduais de MPO. Para determinação da concentração dessa enzima as amostras foram homogeneizadas com tampão HTAB e centrifugadas (10 minutos, 14000 rpm e 4° C). O sobrenadante foi coletado e 7,0 μ L

foi distribuído em duplicatas em microplaca de 96 poços, adicionando-se logo em seguida o o-dianisidina (16,7 mg de o-dianisidina – Sigma; 90 mL de água deionizada; 10 mL de tampão fosfato de potássio; 50 µL de peróxido de hidrogênio 1%). A concentração de MPO foi estimada por meio de medida colorimétrica (absorbância a 450 nm) em leitor de microplacas. Os resultados foram expressos em mU/mL (BRADLEY et al, 1982, RAO et al, 1993).

5.4. Análise dos Dados

Os experimentos de bolsa de ar induzido por carragenina e pleurisia induzida por carragenina, histamina e zimosano foram estatisticamente avaliados, por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de Newman-Keuls com intervalo de confiança de 99%, utilizando-se o software *Graph Pad prism. 5.0*. Valores de “p” menores que 0,001 ($p < 0,001$) foram considerados como indicativos de significância.

A determinação da concentração de citocinas, NO e MPO foram estatisticamente avaliadas, por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de 95%, utilizando-se o software *Graph Pad prism. 5.0*. Valores de “p” menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Determinação da Viabilidade Celular

Os resultados da avaliação da citotoxicidade dos derivados *N*-acilhidrazônicos na linhagem celular de macrófagos encontram-se na Tabela 1. O fármaco de referência utilizado foi a doxorrubicina. Foram avaliados sete compostos, dentre eles foram selecionados quatro compostos (AMH, AMZ-Bz, AMZ e AMT) para avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo* por terem apresentado os menores percentuais de citotoxicidade.

Tabela 1. Viabilidade celular dos derivados acilhidrazônicos no teste de citotoxicidade com macrófagos murino J774.A1. Os compostos foram testados na concentração de 25 mg/mL.

Produto	Dose (mg/mL)	Viabilidade (%) em J774.A1
Doxorrubicina	25	6,2±1,5
AMZ-DC-1	25	7,1±1,1
AMT-F1	25	21,4±2,9
AMZ-Cl1	25	51,8±3,2
AMH	25	82,3±2,2
AMZ-Bz	25	88,1±3,0
AMZ	25	99,0±3,8
AMT	25	96,1±8,7

O ensaio de citotoxicidade teve como princípio a verificação da viabilidade celular do macrófago murino da linhagem J774.A1. Devido a proporcionalidade da quantidade de cristais de formazan gerados e a funcionalidade mitocondrial das células é possível verificar o número de células viáveis (MOSMANN, 1983; PRINSLOO; PIETERS; BEZUIDENHOUT, 2013). É um ensaio colorimétrico, que apresenta como vantagem principal a rapidez com que as amostras podem ser processadas. Ele detecta as células vivas, metabolicamente ativas, e o sinal é dependente do grau de ativação dessas células (MOSMANN, 1983). Os testes de citotoxicidade *in vitro* devem quantificar a viabilidade celular e o crescimento e serem correlacionados com experimentos em animais e estudos clínicos (SCHMALZ, 1994). MELO (2014) investigou a citotoxicidade das séries de derivados híbridos acilidrazônicos em culturas de macrófagos e constatou que os compostos em geral são considerados pouco citotóxicos. LACERDA et al. (2014) também observaram alta viabilidade celular para os derivados *N*-glicinil-hidrazonas.

6.2. Bolsão de Ar Subcutâneo.

O resultado da atividade anti-inflamatória para este teste encontra-se na Tabela 2. Os compostos AMZ-Bz e AMH apresentaram atividade anti-inflamatória promissora, apresentando resultados estatisticamente iguais nas doses de 10 e 100 mg/kg, bem como apresentaram inibição estatisticamente semelhante à indometacina. Entretanto, o AMH foi o escolhido para estudos dos possíveis mecanismos de ação por ter o melhor rendimento na síntese. Para a realização de testes posteriores a dose de 10 mg/kg foi escolhida por ter apresentado a eficácia estatisticamente semelhante à dose de 100 mg, e como dose menor, espera-se que cause menos efeitos colaterais.

Tabela 2. Total de leucócitos polimorfonucleares (média $\pm$ desvio padrão) e percentual de inibição da migração celular em animais dos grupos controle e tratados com os derivados acilhidrazônicos no teste de Bolsão de ar subcutâneo.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Nº de Leucócitos/mL ($\times 10^6$)	Inibição %
Controle Salina	-	17,0 $\pm$ 1,21	-
Controle Negativo	-	0,1 $\pm$ 0	-
AMT-Bz	100	12,4 $\pm$ 1,83*	26,6
AMT	100	13,5 $\pm$ 1,74*	20,1
AMZ	100	12,4 $\pm$ 1,77*	26,6
AMZ-Bz	1	12,0 $\pm$ 1,83*	29,2
	10	6,64 $\pm$ 0,43*	60,9
	100	6,96 $\pm$ 0,08*	59,1
AMH	1	9,26 $\pm$ 0,91*	45,5
	10	6,75 $\pm$ 0,57*	61,8
	100	6,82 $\pm$ 0,75*	59,8
Indometacina	5	4,84 $\pm$ 0,45*	61,5

*p < 0,001. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle.

O modelo de bolsão de ar induzido por carragenina não é um modelo experimental para artrite, mas a administração de carragenina por via subcutânea, na bolsa de ar, promove uma resposta inflamatória caracterizada por um aumento significativo nas concentrações de mediadores inflamatórios no exsudado e proliferação celular semelhante a observado no fluido sinovial (DALMARCO et al., 2012) Para indução da inflamação neste modelo foi

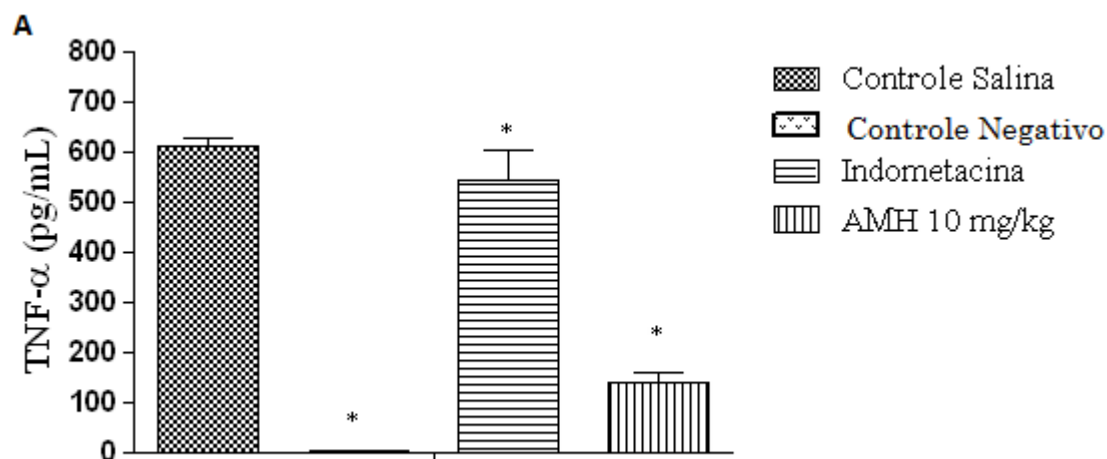
utilizada a carragenina, um polissacarídeo sulfatado, extraído de algas que atua como agente flogístico amplamente utilizada em diversos estudos experimentais por induzir a migração de neutrófilos e por ter uma intensa ação quimiotática, desencadeando uma inflamação aguda associada à hiperalgia envolvendo liberação sequencial de vários mediadores inflamatórios, como por exemplo, a histamina, serotonina, cininas, prostaglandinas e tromboxanos (SCOGNAMILLO-SZABÓ, BECHARA; CUNHA, 2005; ROCHA et al, 2007).

Para comprovar o efeito anti-inflamatório dos derivados acilhidrazonicos AMH, AMZ-Bz, AMZ e AMT, selecionados por seu baixo potencial citotóxico, o modelo de bolsão de ar foi utilizado como triagem, cuja finalidade foi definir o derivado que apresentasse maior inibição na migração leucocitária e a melhor dose que tivesse efeito inibitório sobre a migração leucocitária e exsudação. MOTA (2013) descreveu que no teste do bolsão de ar derivados isoxazolina-acilhidrazona apresentou resultados significativos.

6.2.1. Dosagem das citocinas TNF- α e IL-1 β (Bolsão de ar)

A dosagem de citocinas TNF- α e IL-1 β do exsudato inflamatório do teste do bolsão de ar foi realizada através da técnica do ELISA sanduiche.

O composto AMH diminuiu significativamente a produção de TNF- α na dose de 10 mg/kg (140,6 pg/mL) quando comparados ao controle (603,3 pg/mL). O padrão, indometacina, apresentou uma concentração de TNF- α de 544,1 pg/mL (Figura 11a). O composto AMH também apresentou uma diminuição significativa na produção de IL-1 β (Figura 11b) na dose de 10 mg/kg quando comparada ao controle salina.



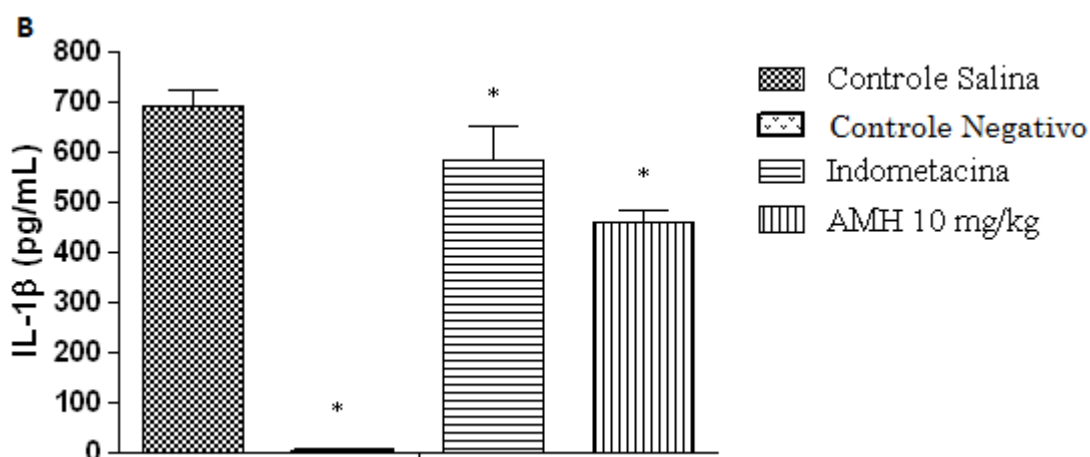


Figura 11. Efeitos do AMH (10 mg/kg) na concentração de TNF- α e IL-1 β no exsudato dos animais submetidos ao teste de bolsão de ar subcutâneo. *p <0,005 em relação ao grupo controle após análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni.

No teste do bolsão de ar o composto AMH diminuiu a concentração de TNF- α e IL1- β . O TNF- α é uma citocina chave para a resposta imune inata, e um potente ativador de neutrófilos, mediando a aderência, quimiotaxia e degranulação. Esse fator induz a produção de autacóides em células endoteliais, incluindo prostanoídes, PAF e NO (MANTOVANI et al, 2001).

A IL1- β promove a expressão de moléculas de adesão, migração de leucócitos e aumento da permeabilidade vascular, indicando que IL1- β é um importante mediador pró-inflamatório (HALLEGUA; WEISMAN, 2002). Portanto, é possível atribuir o efeito anti-inflamatório à diminuição destas duas importantes citocinas pró-inflamatórias.

6.3. Permeabilidade Vascular Induzida por Ácido Acético

Com o intuito de avaliar o efeito do composto AMH na liberação de aminas vasoativas na resposta anti-inflamatória foi realizado o teste de permeabilidade vascular induzida por ácido acético (Figura 13).

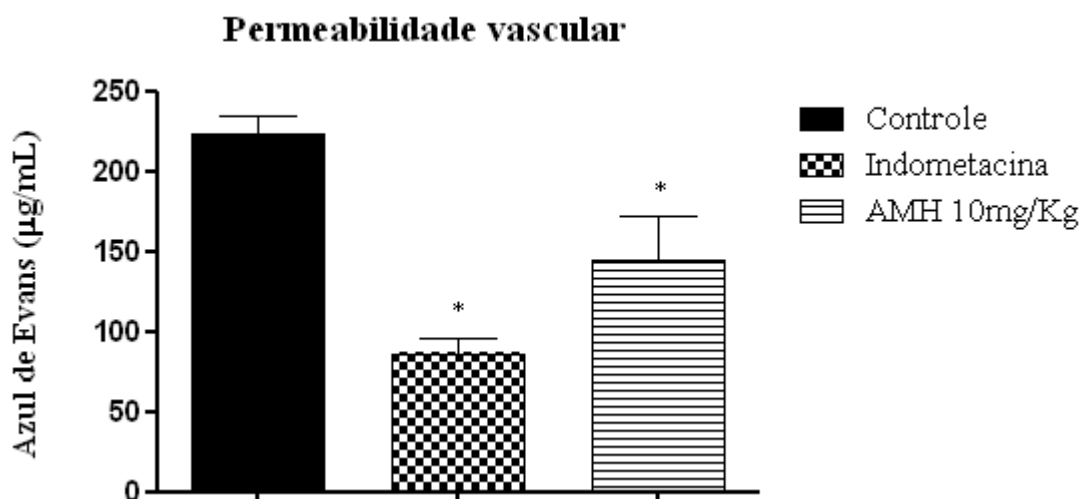


Figura 12. Efeito do composto acilhidrazona AMH no teste da permeabilidade vascular induzida por ácido acético. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle após análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni.

O aumento da permeabilidade vascular leva ao extravasamento de fluido rico em proteína (exsudato) para o tecido extravascular, esta é uma característica fundamental da inflamação aguda. A perda de proteína do plasma reduz a pressão osmótica intravascular e aumenta a pressão osmótica no fluido intersticial (COTRAN; KUMAR; ROBINS, 2005). O composto AMH inibiu a permeabilidade vascular em relação ao grupo controle. Este efeito provavelmente envolve a diminuição na liberação de aminas vasoativas (histamina, bradicinina, serotonina). A indometacina foi utilizada como fármaco padrão.

6.4. Pleurisia Induzida por Carragenina.

Os resultados da atividade anti-inflamatória na pleurisia induzida por carragenina encontram-se na Tabela 3. O composto AMH apresentou atividade anti-inflamatória indicada por uma diminuição significativa na migração celular quando comparado ao grupo controle. O AMH na dose de 10 mg/kg apresentou inibição de 83,0%, sobre a migração leucocitária para a cavidade torácica.

Tabela 3. Total de leucócitos polimorfonucleares (média $\pm$ desvio padrão) e percentual de inibição da inflamação em animais dos grupos controle e tratado com o derivado AMH no teste de pleurisia induzida por carragenina.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Nº de Leucócitos/mL ($\times 10^6$)	Inibição %
Controle	-	11,54 $\pm$ 1,69	-
AMH	10	1,96 $\pm$ 0,41*	83,0
Dexametasona	0,5	2,66 $\pm$ 0,45*	76,9

*p < 0,001. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle.

A indução de pleurisia em murinos vem sendo utilizada para o estudo de substâncias com potencial de redução dos parâmetros inflamatórios como formação de exsudato, extravasamento de proteínas e migração de leucócitos para tecidos inflamados (ACKERMAN et al., 1980). O modelo é caracterizado pelo rápido influxo de polimorfonucleares, seguido pela infiltração de mononucleares, para a cavidade pleural dos animais (MURAI et al., 2003). Esse processo é regulado tanto por células mononucleares residentes (CAILHIER et al., 2006) como também pelo mesotélio (ANTONY, 2003), o qual é constituído por células epiteliais e forma a pleura, membrana que envolve o pulmão.

Tanto as células mononucleares como o mesotélio funcionam como gatilhos da resposta inflamatória, uma vez que após alguma lesão liberam mediadores lipídicos, aminas e citocinas que irão ativar outras células, além de promover a expressão de moléculas de adesão tanto nas células do endotélio vascular como nos leucócitos (ANTONY, 2003; CAILHIER et al., 2006).

Na pleurisia induzida por carragenina, ocorre a liberação de mediadores lipídicos como prostaglandinas (YUHKI et al., 2004), leucotrienos (RAYCHAUDHURI et al., 1997), além de citocinas. Os resultados mostraram que o derivado AMH inibia a migração leucocitária na cavidade torácica de 83,0% quando comparado ao grupo controle.

6.4.1. Dosagem das citocinas TNF- α e IL-1 β (Pleurisia induzida por carragenina)

O composto AMH diminuiu significativamente a produção de TNF- α no exsudato pleural na dose de 10 mg/kg quando comparados ao controle. A dexametasona, apresentou uma concentração de TNF- α de 9,5 pg/mL (Figura 13a). Com relação à produção de IL-1 β , o

AMH também diminuiu a produção desta citocina quando comparado ao controle (Figura 13b)

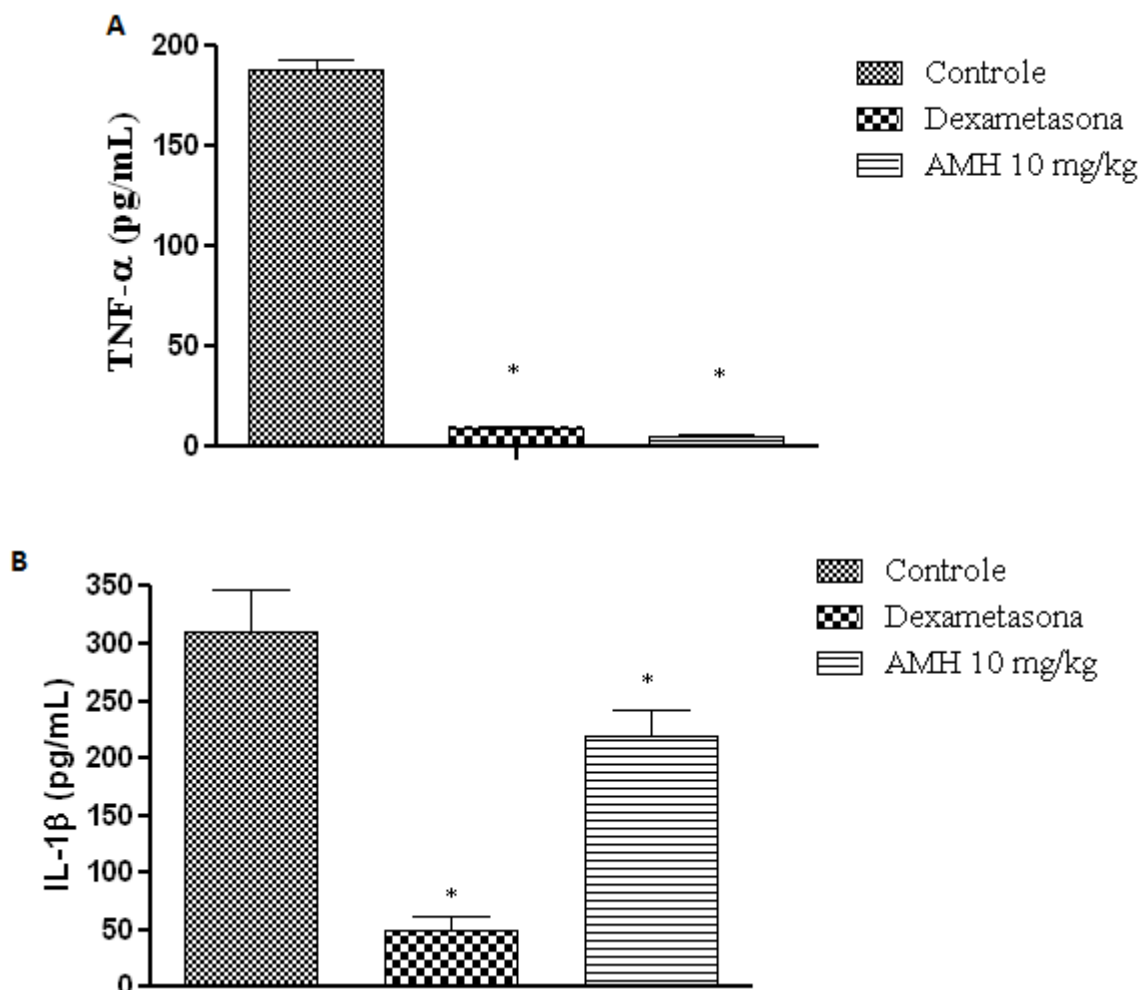


Figura 13. Concentração de TNF- α e IL-1 β no exsudato da cavidade pleural dos animais submetidos à pleurisia induzida por carragenina e tratados com o composto AMH 10 mg/kg. *p < 0,05 em relação ao grupo controle após análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni.

Neste estudo o AMH reduziu os níveis de TNF- α e IL-1 β no lavado pleural de camundongos com pleurisia. Estes resultados corroboram com estudos realizados por MOTTA (2011) que revelaram que derivados acilhidrazônicos inibiram a produção de TNF- α e IL-1 β em estudos com moléculas desta classe. Resultados semelhantes foram obtidos por MELO (2014) que também demonstraram que derivados acilhidrazônicos híbridos inibiram a liberação de TNF- α *in vitro*.

No modelo da pleurisia induzida pela carragenina já foi relatado que tanto a IL-1 β como o TNF- α promoveram aumento de leucócitos e de neutrófilos no lavado pleural de

camundongos (FRÖDE, SOUZA, CALIXTO, 2001). Com base nos resultados obtidos podemos sugerir uma relação entre a diminuição da migração celular e redução na liberação destas citocinas pró-inflamatórias.

6.4.2. Determinação dos Níveis de Óxido Nítrico e Mieloperoxidase (Pleurisia induzida por carragenina)

No grupo tratado com AMH na dose de 10 mg/kg houve redução significativa dos níveis de NO quando comparado com o grupo controle (Figura 14a). No grupo tratado com AMH na dose de 10 mg/kg houve redução dos níveis de MPO quando comparado com o grupo controle (Figura 14b).

Em estados fisiológicos, o NO atua funcionalmente como agente protetor, mas em condições de alta produção, pode contribuir para lesão tecidual. O NO tem sido implicado em algumas doenças como: artrite reumatoide, esclerose múltipla e sepsis, pelo qual o aumento da produção de NO promove lesão tecidual e contribui para a progressão dessas doenças (SMITH; LASSMANN, 2002; REDDY et al., 2005).

Portanto, estudos *in vitro* e *in vivo* de fármacos demonstrando a inibição de NO são importantes para a descoberta de novos medicamentos que atenuem a resposta inflamatória (DALMARCO et al., 2002). O derivado AMH também inibiu a concentração de óxido nítrico. Uma hipótese para que este fato tenha ocorrido é que o derivado AMH ao inibir a concentração de TNF- α , conseqüentemente reduza a produção de NO.

Outro fator importante a relatar foi que o derivado AMH não só reduziu a migração de leucócitos, mas também a atividade da mieloperoxidase, uma enzima considerada marcador de neutrófilos ativados. No modelo experimental da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos, Frode et al. (2001) observaram que o aumento da atividade da mieloperoxidase estava associado com o aumento do número de leucócitos e de neutrófilos para a cavidade pleural de camundongos inflamados.

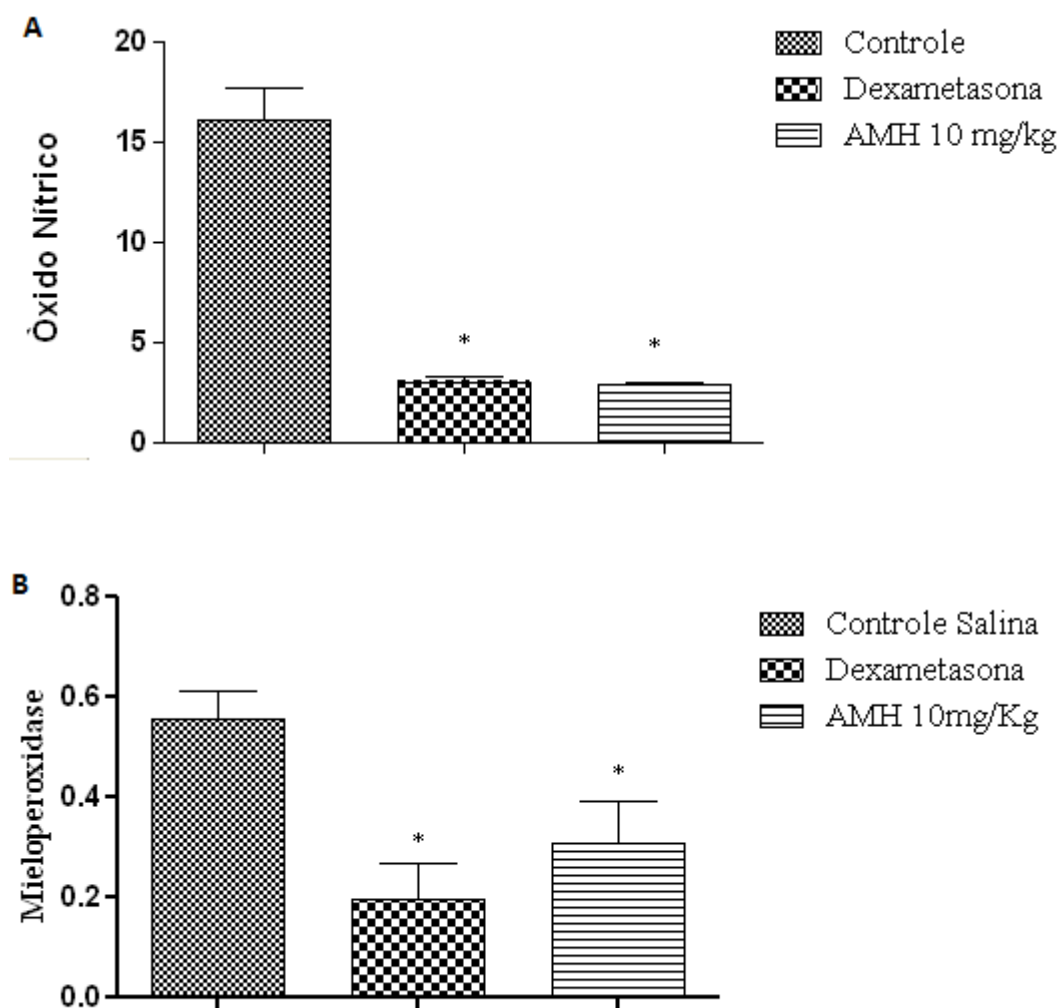


Figura 14. Efeitos do AMH (10 mg/kg) na concentração de NO e MPO no exsudato dos animais submetidos ao teste de teste de pleurisia induzida por carragenina. *** $p < 0,05$ em relação ao grupo controle após análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni.

6.5. Pleurisia Induzida por Zimosano, Histamina e Bradicinina

A dose de 10 mg/kg do composto AMH utilizada foi eficaz em diminuir a migração celular para a cavidade pleural dos camundongos nos testes de pleurisia induzida por zimosano, histamina ou bradicinina (Tabelas 4).

Tabela 4. Total de leucócitos polimorfonucleares (média $\pm$ desvio padrão) e percentual de inibição da inflamação nos animais dos grupos controle e tratado com o derivado AMH no teste de pleurisia induzida por zimosano, histamina e bradicinina.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Nº de Leucócitos/mL ($\times 10^6$)/ % de Inibição		
		Zimosano	Histamina	Bradicinina
Controle	-	10,28 $\pm$ 1,60	3,94 $\pm$ 0,62	4,46 $\pm$ 0,85
AMH	10	3,10 $\pm$ 0,66*/69,8	2,00 $\pm$ 0,17*/49,2	3,54 $\pm$ 0,47/20,6
Dexametasona	0,5	4,34 $\pm$ 1,20*/57,8	-	1,96 $\pm$ 0,48*/56,0
Terfenadina		-	2,14 $\pm$ 0,57*/45,7	-

*p <0,001. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle.

Várias substâncias são conhecidas por induzir a pleurisia em camundongos promovendo a liberação de diferentes mediadores inflamatórios. A pleurisia está associada a uma acentuada reação inflamatória nas vias respiratórias, semelhante ao que ocorre na asma humana (GOULART et al., 2007). O influxo de leucócitos do sangue ao local da inflamação desempenha um importante papel na modulação da resposta inflamatória (SALEH et al, 1996).

Além da carragenina, também foi utilizado para indução da pelurisia o zimosano, uma substância formada principalmente por carboidratos originados da parede celular de leveduras. Além de estimular a liberação de citocinas (UTSUNOMIYA et al., 1998) e mediadores lipídicos (KIKUCHI et al., 1995), a injeção de zimosano promove principalmente a ativação dos componentes do sistema complemento (IMAI et al., 1991), estimulando a produção de mediadores que irão contribuir para o desenvolvimento da resposta inflamatória por meio de vias distintas as da carragenina. Outro mediador envolvido na pleurisia em camundongos é a histamina. A conclusão é baseada nos resultados em que a terfenadina, antagonista do receptor H_1 da histamina, causou diminuição significativa tanto da migração celular como da exsudação do processo inflamatório (FRODE, 2000). A histamina atua no recrutamento de neutrófilos em vários modelos de inflamação. Estudos feitos por Yamashiro e colaboradores (2001) demonstraram que a histamina foi capaz de induzir a quimiotaxia de leucócitos nas veias da retina de ratos quando administrada por via intraorbital. Já se comprovou que esse mediador liberado dos mastócitos exerce papel importante no aumento da permeabilidade vascular, no sítio do processo inflamatório (EVILEVITCH et al., 1999; MCDONALD et al., 1999). Todavia os resultados obtidos com o antagonista do receptor H_1 da histamina permitem também sugerir que tal mediador está envolvido no processo de migração celular.

Assim como ocorreu nos modelos experimentais utilizando a carragenina, o tratamento com AMH também inibiu a migração leucocitária induzida por zimosano em 69,8% e por histamina em 49,2% quando comparado ao grupo controle. Dessa forma, os resultados apresentados neste estudo, sugerem uma possível ação dessa substância sobre a histamina e intermediários produzidos após a ativação do complemento, visto que já foi estabelecido que a resposta inflamatória induzida pelo zimosano está em grande parte relacionada à ativação desse sistema (PILLEMER et al., 1953; IMAI et al., 1991).

Contudo, o AMH não foi capaz de inibir a migração de leucócitos para a cavidade pleural, na pleurisia induzida por bradicinina em camundongos. A bradicinina, nas vias aéreas da maioria das espécies animais, promove broncoconstrição, estimulação das fibras nervosas sensoriais, aumento de secreção e muco, e também extravasamento plasmático (LEMBECK et al., 1991; SAKAMOTO et al., 1992;1993). Vale ressaltar ainda que apesar dos efeitos inflamatórios induzidos pela bradicinina serem de menor magnitude quando comparados com aqueles produzidos por agentes inespecíficos tipo carragenina e zimozano, os nossos resultados fornecem evidências adicionais que as cininas são capazes de iniciar e de manter o processo inflamatório. O efeito inibitório sobre a migração celular induzida por bradicinina parece estar relacionado com a via de administração da substância testada. Foi o que demonstrou o trabalho de Frode (1996) onde houve inibição significativa da migração celular quando administrado pelas vias intraperitoneal e intrapleural, entretanto, não foi efetivo em inibir os mesmo parâmetros quando administrado via oral.

Em conjunto, os dados obtidos nos experimentos mostram que o composto AMH testado apresenta propriedades anti-inflamatórias promissoras. A atividade anti-inflamatória no bolsão de ar está relacionada com a diminuição de citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez diminuíram a permeabilidade vascular (redução do edema), a migração leucocitária e a produção de NO. Na pleurisia o AMH atenuou a inflamação induzida por carragenina, zimosano e histamina, sugerindo a participação de citocinas, mediadores lipídicos e sistema complemento.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

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

- Os derivados *N*-acilhidrazonicos testados apresentaram baixa citotoxicidade, exceto os compostos AMZ-DC-1, AMT-F1 e AMZ-Cl1;

- O derivado acilhidrazonico AMH apresentou baixa citotoxicidade, melhor rendimento e também melhor atividade anti-inflamatória no teste de triagem *in vivo*;
- O AMH inibiu a permeabilidade vascular induzida por ácido acético;
- O derivado AMH diminuiu a migração celular na pleurisia induzida por carragenina, zimosano ou histamina, contudo, não houve diminuição da migração leucocitária na pleurisia induzida por bradicinina;
- O AMH inibiu significativamente a produção de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, óxido nítrico e mieloperoxidase;

|

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Cellular and Molecular. **Immunology**. 6ed. Saunders 2003.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ACKERMAN, N. et al. Three day pleural inflammation: a new model to detect drug effects on macrophage accumulation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 215, n. 3, p. 588-95. 1980.

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

ANTONY, V. B. Immunological mechanisms in pleural disease. **European Respiratory Journal**. v. 21, n. 3, p. 539-44. 2003.

ARNHOLD J. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**. v. 69, n.1, p. 4-9. 2004.

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

AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M.H.; GEISSMANN, F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. **Annual Review of Immunology**. v. 27, p. 669 – 692. 2009.

BARREIRO, E. J. A Química Medicinal e o Paradigma do Composto-protótipo. **Revista Virtual de Química**. v. 1, n. 1, p. 26- 34. 2009.

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

BARRINGTON, R.; ZHANG, M.; FISCHER, M.; CARROLL, M. C. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. **Immunological Reviews**. v.180, p. 5-15. 2001.

BERTOLINI, A.; OTTANI A.; SANDRINI, M. Selective COX-2 inhibitors and dual acting anti-inflammatory drugs: critical remarks. **Current Medicinal Chemistry**. v.9, n.10, p.1033-1043. 2002.

BEZERRA NETTO, H.J.C. Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos derivados 6-nitro-benzodioxola-*n*-acilidrazônicos, desenhados como candidatos a protótipos de fármacos analgésicos e antiinflamatórios, sintetizados a partir do safrol. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2004.

BISPO JÚNIOR, W.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; ALVES, M. A. et al. Analgesic and Anti-Inflammatory activities of Salicylaldehyde 2-Chlorobenzoyl Hydrazone (H2LASSBio-466), Salicylaldehyde 4-Chlorobenzoyl Hydrazone (H2LASSBio-1064) and Their Zinc (II) Complexes. **Molecules**. v.16, p. 6902-6915. 2011.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**. v. 60, n. 3, p. 618-622. 1982.

BRICKS, L. F.; SILVA, C. A. A. Toxicidade dos anti-inflamatórios não-hormonais. **Pediatrics**. v.27, n.3, p.181-193. 2005.

BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS, D. S.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**. v. 303, p. 1477-1478. 2004.

BROOKS, P. M.; EMERY, E.; EVANS, F. Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase I and cyclooxygenase II. **Rheumatology**. v.38, p. 779-788. 1999.

BRUCKDORFER R. The basics about nitric oxide. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 26, n. 1-2, p. 3-31. 2005.

BORREGAARD, N.; Neutrophils, from Marrow to Microbes. **Immunity**. v. 33, n. 5, p. 657–670. 2010.

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

CACHIBA, T. H.; CARVALHO, B. D.; CARVALHO, D. T. et al. Síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana e antifúngica de derivados N-acilidrazônicos. **Química Nova**. v.35, n.8, p. 1566-1569. 2012.

CAIXEIRO, J. M. R. Dialquilfosforidilidrazonas e N,N'-Bis(Diisobutilfosforiltioamida)diaminas: Síntese, caracterização, modelagem molecular e estudo da atividade biológica. Tese (Doutorado em Química orgânica) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, R.; FERNANDES, E. S.; FERREIRA, J.; CABRINI, D. A.; CAMPOS, M. M. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **British Journal of Pharmacology**. v.143, n. 7, p. 803-818. 2004.

CARVALHO, S.A.; KAISER, M.; BRUN, R.; SILVA, E.F.; FRAGA, C.A. Antiprotozoal activity of (e)-cinnamic N-acylhydrazone derivatives. **Molecules**. v. 19, n. 12, p. 20374-20381. 2014.

CAILHIER, J. F.; SAWATZKY, D. A.; KIPARI, T.; HOULBERG, K.; WALBAUM, D.; WATSON, S.; LANG, R. A.; CLAY, S.; KLUTH, D.; SAVILL, J.; HUGHES, J. Resident pleural macrophages are key orchestrators of neutrophil recruitment in pleural inflammation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 173, n. 5, p. 540-7. 2006.

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

CHARRET, K.S. Efeitos dos compostos acilhidrazonas pirazólicas sobre as formas evolutivas de *Leishmania amazonensis* e na infecção experimental em camundongos isogênicos CBA. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2011.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 28, n.1, p.11-23. 2007.

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

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

CIRINO, G.; FIORUCCI, S.; SESSA, W. C. Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 24, n. 2, p. 91-5. 2003.

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

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual Química**. v. 1, n. 3, p. 241-256. 2009.

CRUVINEL, W. M.; JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. 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. 434-61. 2010.

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

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.

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

CURFS, J. H.; MEIS, J. F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 10, p. 742-780. 1997.

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

DALE, D.C.; BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**. v. 112, n. 4, p. 935 – 945. 2008.

DALMARCO E.M, FRODE T.S, MEDEIROS Y.S. Effects of methotrexate upon inflammatory parameters induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators Inflammation**. v. 11, n. 5, p. 299-306. 2002.

DALMARCO, E. M.; ASTOLFI, G.; DE LIZ, R.; DE CÓRDOVA, C. M.; FRÖDE, T. S. Modulatory effect of mycophenolate mofetil on carrageenan-induced inflammation in the mouse air pouch model. **International Immunopharmacology**. v. 13 v. 4, p. 476-82. 2012.

DUBOIS, R.N.; ABRAMSON, S.B.; CROFFORD, L.; GUPTA, R.A.; SIMON, L.S.; VAN DE PUTTE, L.B.; LIPSKY, P.E. Cyclooxygenase in biology and disease. **The FASEB Journal**. v. 12, n. 12, p. 1063-73. 1998.

DUARTE, C. M. Novos derivados acilidrazônicos planejados como candidatos a fármacos analgésicos e antiinflamatórios. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

EVILEVITCH, V; WU, TT; LINDGREN, L; GREIFF, L; NORRGREN, K; WOLLMERM P. Time course of the inflammatory response to histamine and allergen skin prick test in guinea-pigs. **Acta Physiol. Scand.**, v.165, p. 409-513,1999.

FAITH, M.; SUKUMARAN, A.; PULIMOOD, A. B.; JACOB, M. How reliable an indicator of inflammation is myeloperoxidase activity? **Clinica Chimica Acta**. v. 396, n. 1-2, p. 23 – 25. 2008.

FERREIRA, R. G.; MATSUI, T. C.; GODIN, A. M.; GOMIDES, L. F.; PEREIRA-SILVA, P. E.; DUARTE, I. D.; MENEZES, G. B.; COELHO, M. M.; KLEIN, A. Neutrophil recruitment is inhibited by nicotinamide in experimental pleurisy in mice. **European Journal of Pharmacology**. v. 685, n. 1-3, p. 198-204, 2012.

FRESHNEY, I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6 ed. New Jersey: John Wiley and Sons, 2010. 723 p.

FIGUEIREDO, J. M.; CÂMARA, C.A.; AMARANTE, E.G.; MIRANDA, A.L.; SANTOS, F.M.; RODRIGUES, C.R.; FRAGA, C.A.; BARREIRO, E.J. Design and synthesis of novel potent antinociceptive agents: methyl-imidazolyl N-acylhydrazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 8, p. 2243-2248. 2000.

FILHO, M.M.M.; RAHAL, S.C. O uso de antiinflamatórios inibidores COX II seletivos na osteoartrite canina. **Veterinária e Zootecnia**. v.15, n.3. p.407-415. 2008.

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

FLAMMER, J.R.; ROGATSKY, I. Minireview: Glucocorticoids in autoimmunity: unexpected targets and mechanisms. **Molecular Endocrinology**. v. 25, n. 7, p. 1075 – 1086. 2011.

FRANCO, G.C.N.; MORETTI, D.; CAVALCANTE, P.F.C.; LOPES, L.C. Uma análise crítica sobre viabilidade do uso dos inibidores seletivos de COX II em odontologia. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**. v.18, n.1, p.75-81. 2006.

FRODE, T.S. Análise dos efeitos de medicamentos antiasmáticos, da bradicinina e da substância p no modelo experimental da pleurisia em camundongos. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1996.

FRODE, T.S. Mediadores e mecanismos envolvidos na pleurisia induzida pela carragenina em camundongos. Tese (Doutorado em Farmacologia) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

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**. v. 13, n. 3, p. 162-8. 2001.

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

GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11a ed. Rio de Janeiro: Grow-Hill, 2006.

GOODMAN, L.; TORRES, B.; PUNKE, J.; REYNOLDS, L.; SPEAS, A.; ELLIS, A.; BUDSBERG, S. Effects of firocoxib and tepoxalin on healing in a canine gastric mucosal injury model. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.23, p.56-62. 2009.

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

GOUDET, C.; CHAPUY, E.; ALLOUI, A.; ACHER, F.; PIN, J. P.; ESCHALIER, A. Group III metabotropic glutamate receptors inhibit hyperalgesia in animal models of inflammation and neuropathic pain. **Pain**. v.137, p.112-24. 2008.

GOULART, S.; MORITZ, M. I.; LANG, K. L.; LIZ, R.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. Anti-inflammatory evaluation of *Solidago chilensis* Meyen in a murine model of pleurisy. **Journal Ethnopharmacology**. v. 113, n. 2, p. 346-353. 2007.

GOVINDASAMI, T.; PANDEY, A.; PALANIVELU, N.; PANDEY, A. Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Biologically Important Vanillin Related Hydrazone Derivatives. **International Journal of Organic Chemistry**. v. 1, p. 71-77. 2011.

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

GU. W.; WU, R.; QI, S.; GU, C.; SI, F.; . Synthesis and antibacterial evaluation of **Molecules**. New N-acylhydrazone derivatives from dehydroabietic acid. v. 17, n. 4, p. 4634-4650. 2012.

GIUSTARINI, D.; ROSSI, R.; MILZANI, A.; DALLE-DONNE, I. Nitrite and nitrate measurement by Griess reagent in human plasma: evaluation of interferences and standardization. **Methods in Enzymology**. v. 440, p. 361-380. 2008.

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

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

HALLEGUA, D. S.; WEISMAN, M. H. Potential therapeutic uses of interleukin 1 receptor antagonists in human diseases. **Annales Rheumatology**. v. 61, p. 960-967. 2002.

HAZEWINKEL, H.A.W.; VAN DEN BROM, W.E.; THEYSE, L.F.H.; POLLMEIER, M.; HANSON, P.D. Comparison of the effects of firocoxib, carprofen and vedaprofen in a sodium urte crystal induced synovitis model of arthritis in dogs. **Research in Veterinary Science**. v.84, p.74-79. 2008.

HERNÁNDEZ, P.; ROJAS, R.; GILMAN, R. H.; SAUVAIN, M.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H. Hybrid furoxanyl Nacylhydrazone derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 7, n. 59C, p. 64-74. 2013.

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

HILÁRIO, M.O.E.; TERRERI, M.T.; LEN, C.A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Journal of Pediatrics**, v.82, n.5, 2006.

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

HOSTETTER, S. J. Neutrophil Function in Small Animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 42, n. 1, p. 157–171. 2012.

IMAI, Y.; HAYASHI, M.; OH-ISHI, S. Key role of complement activation and platelet-activating factor in exudate formation in zymosan-induced rat pleurisy. **The Japanese Journal of Pharmacology**. v. 57, n. 2, p. 225-32. 1991.

ISHII, K.; MOTOYOSHI, S.; KAWATA, J.; NAKAGAWA, H.; TAKEYAMA, K. A useful method for differential evaluation of anti-inflammatory effects due to cyclooxygenase and 5-lipoxygenase inhibitors in mice. **The Japanese Journal of Pharmacology**. v.65, p.297-303. 1994.

ITURRY-YAMAMOTO, G. R.; PORTINHO, C.P. sistema complemento: ativação, regulação e deficiências congênitas e adquiridas. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 47, n. 1, p. 41-51. 2001.

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

JANTSCHKO W, FURTMULLER PG, ZEDERBAUER M, JAKOPITSCH C, OBINGER C. Kinetics of oxygen binding to ferrous myeloperoxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 426, n.1, p. 91-97. 2004.

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

LACERDA RB, SALES NM, DA SILVA LL, TESCH R, MIRANDA AL, BARREIRO EJ, FERNANDES PD, FRAGA CA. Novel potent imidazo[1,2-a]pyridine-N-Glycinyldihydrazone inhibitors of TNF- α production: in vitro and in vivo studies. **PLoS One**. v. 9, n. 3, p. 1-10. 2014.

LEMBECK, F; GRIESBACHER, T; ECKHARDT, M; HENKE, S; BREIPOHL, G; KNOLLE, J. New, long-lasting, potent bradykinin antagonists. **Br. J. Pharmacol.**, v.102, p.297-304,1991.

LANNES, A. C. Cepas bacterianas: susceptibilidade a derivados da classe acilhidrazona em amostras do Hospital Universitário Antônio Pedro. Dissertação (Mestrado em Patologia). Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2010.

LAINE, L.; SMITH, R.; MIN, K.; CHEN, C.; DUBOIS, R. W. Systematic review: the lower gastrointestinal adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. v. 24, n. 5, p. 751-67. 2006.

LAU, D.; BALDUS, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 111, n. 1, p. 16–26. 2006.

LEES, P.; LANDONI, M.F.; GIRAUEDEL, J.; TOUTAIN, P.L. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. **Journal Veterinary of Pharmacology and Therapeutics**. v.27, p.479-490. 2004.

LIMA, L. M.; FRATTANI, F. S.; DOS SANTOS, J. L.; CASTRO, H. C.; FRAGA, C. A.; ZINGALI, R. B.; BARREIRO, E. J. Synthesis and anti-platelet activity of novel arylsulfonate-acylhydrazone derivatives, designed as antithrombotic candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 43, p. 348-356. 2008.

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

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

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

KIKUCHI, M.; TSUZURAHARA, K.; NAITO, K. Involvement of leukotriene B₄ in zymosan-induced rat pleurisy: inhibition of leukocyte infiltration by the 5-lipoxygenase inhibitor T-0757. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 18, n. 9, p. 1302-4. 1995.

KIS-TOTH, K.; TSOKOS, G.C. Dendritic cell function in lupus: Independent contributors or victims of aberrant immune regulation. **Autoimmunity**. v.43, n.2, p.121-30. 2010.

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

KUMAR, V.; SHARMA, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. **International Immunopharmacology**. v. 10, n. 11, p. 1325-1334. 2010.

KUMMER, C.L.; COELHO, T.C.R.B. Anti-inflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase II (COX II): aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v.5, n.4, p. 498-512. 2002.

KVATERNICK, V.; POLLMEIER, M.; FISCHER, J.; HANSON, P.D. Pharmacokinetics and metabolism of orally administered firocoxib, a novel second generation coxib, in horses. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics**. v.30, p.208-217. 2007.

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

MALIK, M. A.; AL-THABAITI, S. A.; MALIK, M. A. Syntesis, Structure Optimization and Antifungal Screening of Novel Tetrazole Ring Bearing Acyl-Hidrazones. **International Joournal of Molecular Sciences**. v.13, p. 10880-10898. 2012.

MARNETT, L.J. The COXIB experience: A look in the rear-view mirror. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v.49, p.265-290. 2009.

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

MARTIN-FONTECHA, A.; THOMSEN, L. T.; BRETT, S.; GERARD, C.; LIPP, M.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Induced recruitment of NK cells to lymphnodes provides IFN- γ for TH1 priming. **Nature Immunology**. v. 5, n. 12, p. 1260-1265. 2004.

MANTOVANI, A.; LOCATI, M.; VECCHI, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P. Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. **Trends in Immunology**. v. 26, n. 6, p. 328-336. 2001.

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

MEDZHITOV R, PRESTON-HURLBURT P, JANEWAY CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**. v. 388, p. 394-397. 1997.

MELO, T. R. F. Síntese e avaliação farmacológica de novos compostos híbridos úteis para o tratamento das complicações da anemia falciforme. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Universidade Estadual Paulista, Araraquara-São Paulo, 2014.

MENDES, R. T.; STANCZYK, C. P.; SORDI, R.; OTUKI, M. F.; SANTOS, F. A.; FERNANDES, D. Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios. **Revista Brasileira Reumatologia**. v. 52, n. 5, p. 767-782. 2012.

MCGETTIGAN, P.; HENRY, D. Cardiovascular risk with non-steroidal anti-inflammatory drugs: systematic review of population-based controlled observational studies. **PLoS Medicine**. v. 8, n9, p. 1-18. 2011.

MELNYK, P.; LEROUX, V.; SERGHERAERT, C.; GRELLIER, P. Design, synthesis and in vitro antimalarial activity of an acylhydrazone library. **Bioorg Med Chem Lett**. v.16, p.31-35. 2006.

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

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.

MONCADA S, HIGGS EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**. v. 147, n. 1, p. 193-201. 2006.

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

MONTESEIRÍN, J. Neutrophils and Asthma. **Journal Investigational Allergology and Clinical Immunology**. v. 19, n. 5, p. 340-354. 2009.

MORRIS, S.M., BILLIAR, T.R. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. **American Journal of Physiology**. v. 266, p. 829-839. 1994.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**. v.65 ,n. 55-63, p.55-63. 1983.

MOTA, FVB. Estudo das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de novos derivados isoxazolina-acilhidrazonas. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

MURAI, N. et al. Concurrent evolution and resolution in an acute inflammatory model of rat carrageenin-induced pleurisy. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 73, n. 4, p. 456-63. 2003.

NOURSHARGH, S.; HORDIJK, P. L.; SIXT, M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 11, p. 366–378. 2010.

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

OTTEN, U.; GOEDERT, M.; MAYER, N.; LEMBECK, F. Requirement of nerve growth factor for development of substance P-containing sensory neurones. **Nature**. v.287, p.158-159. 1980.

PAUL, W.E. **Fundamental Immunology**. Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

PARADA, S.A.; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**. v.4, p.937-944. 2001.

PARRILHA, G.L. Complexos metálicos de hidrazonas, tiossemicarbazonas e lapachol: atividades farmacológicas e relações de estrutura-atividade. Tese (Doutorado em Ciências - Química) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

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

PILLEMER, L.; BLUM, L.; LEPOW, I.H.; ROSS, O.A.; TODD, E.W. & WARDLAW, A.C. The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. **Science**. v. 120, n. 3112, p. 279-85. 1954.

PRINSLOO, S.; PIETERS, R.; BEZUIDENHOUT, C. C. A cell viability assay to determine the cytotoxic effects of water contaminated by microbes. **South African Journal of Science**. v. 109, p.1-4. 2013.

PUHAKKA, A.; KINNULA, V.; NAPANKANGAS, U.; SAILY, M.; KOISTINEN, P.; PAAKKO, P.; et al. High expression of nitric oxide synthases is a favorable prognostic sign in non-small cell lung carcinoma. **APMIS**. v. 111, n.12, p. 1137-46. 2003.

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

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE. P.K. **Farmacologia**. 6ª Ed. Editora Elsevier, 2007.

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

RAYCHAUDHURI, A. et al. Inhibition of LTB4 biosynthesis in situ by CGS 23885, a potent 5-lipoxygenase inhibitor, correlates with its pleural fluid concentrations in an experimentally induced rat pleurisy model. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. v. 355, n. 4, p. 470-4. 1997.

REDDY, L.V.; SUMAN, A.; BEEVI, S. S. *et al.* Design and synthesis of 1-Aroyl-2-ylidene Hidrazines under conventional and microwave irradiation conditions and their citotoxic activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.21, n.1, p.98-104. 2010.

REIS, R. C. N. Síntese de surfactantes Derivados da D-ribolactona. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2007.

Reis, S. L. G. B.; Almeida, V. M.; Almeida, G. C.; Boaviagem, K. M.; Mendes, C. C. B.; Faria, A. R.; Góes, A. J. S.; Magalhães, L. R.; Silva, T. G. Síntese e avaliação preliminar da atividade antinociceptiva de novas isoxazolil-aril-hidrazonas. **Química Nova**. v.34, n.1, p. 76-81. 2011.

ROBBERTS II, L. J.; MORROW, J. D. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatement of gout. *In*: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN,

A. G. (Ed.) **Goodman e Gilman's The Pharmacocological Basis of Therapeutics**. 10 ed. New York: McGraw-Hill, 2011. Cap. 27, p. 687-731.

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

RODRIGUES, A. P. C.; COSTA, L. M. M.; DE MIRANDA, A. L. P. *et al.* Síntese e avaliação das propriedades antiagregante plaquetárias de novos compostos acil-hidrazônicos bioativos. *In: Anais do XI Encontro da SBQ-Rio de Janeiro*, Rio de Janeiro, 2007.

ROTH, J.; RUMMEL, C.; BARTH, S.W.; GERSTBERGER, R.; HÜBSCHLE, T. Molecular aspects of fever and hyperthermia. **Immunology And Allergy Clinics of North America**. v.29, p.229-245. 2006.

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

SAKAMOTO, T; ELWOOD, W; BARNES, PJ; CHUNG, KF. Effect of HOE 140, a new bradykinin antagonist, on bradykinin and platelet-activating factor-induced bronchoconstrictions and airway microvascular leakage in guinea pig. **Eur. J. Pharmacol.**, v.213, p.376-373, 1992.

SAKAMOTO, T; TSUKAGOSHI, H; BARNES, PJ; CHUNG, KF. Role played by NK2 receptor and cyclooxygenase activation in bradykinin B2 receptor mediated-airway effects in guinea pigs. **Agents Actions**, v.39: p.111-117,1993.

SALUM, L. B. Planejamento de ligantes da tubulina com propriedades antitumorais. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade de São Paulo, São Carlos. 2011.

SANTOS, J.C.S. Síntese, elucidação estrutural e avaliação biológica preliminar de derivados N-acilidrazônicos. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, 2012.

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

SAUZEM, P. D. Derivados pirazolidínicos inéditos causam antinocicepção em camundongos no teste da formalina. Dissertação (Mestrado) – Pós graduação em Bioquímica toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

SCHMALZ, G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. **Journal of Dentistry**. v.2, n. 22, p. 6-11. 1994.

SLUIR-CREMER, N.; ARION, D.; PARNIAK, M. A. Destabilization of the HIV-1 Reverse Transcriptase Dimer upon interaction with *N*-Acyl Hydrazone Inhibitors. **Molecular Pharmacology**. v.62, n.2, p. 398-405. 2002.

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

SMITH KJ, LASSMANN H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. **Lancet Neurol**. v. 1, n. 4, p. 232-41. 2002.

SILVA, Y.K.; REYES, C.T.; RIVERA, G.; ALVES, M.A.; BARREIRO, E.J.; MOREIRA, M.S.; LIMA, L.M. 3-Aminothiophene-2-acylhydrazones: non-toxic, analgesic and anti-inflammatory lead-candidates. **Molecules**. v. 19, n. 6, p. 8456-71. 2014.

SUIQUEIRA-JUNIOR, J.F. Inflamação aguda: resposta vascular e celular. In: SUIQUEIRA-JUNIOR, J.F.; DANTAS, C.J.S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. Rio de Janeiro: MEDSI, p. 73-82, 2000.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**. v. 10, p. 427-439. 2010.

SÜLEYMAN, H.; DEMIRCAN, B.; KARAGÖZ, Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. **Pharmacological Reports**. v. 59, n. 3, p. 247 – 258. 2007.

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

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

TIAN, B.; HE, M.; TAN, Z. et al. Synthesis and antiviral evaluation of New N-Acylhydrazones Containing Glycine Residue. **Chemical biology & drug design**. v.77, p.189-198. 2011.

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

UNSAL-TAN, O.; OZDEN, K.; RAUK, A.; BALKAN, A. Synthesis and cyclooxygenase inhibitory activities of some N-acylhydrazone derivatives of isoxazolo[4,5-d]pyridazin-4(5H)-ones. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 45, p. 2345–2352. 2010.

UTSUNOMIYA, I.; ITO, M.; OH-ISHI, S. Generation of inflammatory cytokines in zymosan-induced pleurisy in rats: TNF induces IL-6 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) in vivo. **Cytokine**. v. 10, n. 12, p. 956-63. 1998.

VARELLA, P. P. V.; FORTE, W. C. N. Citocinas: revisão. **Revista brasileira de alergologia e imunopatologia**. v. 24, n. 4, p. 146-154. 2001.

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

VAZQUEZ-LOMBARDI, R.; ROOME, B.; CHRIST, D. Molecular Engineering of Therapeutic Cytokines. **Antibodies**. v. 2, p. 426-451. 2013.

VERRI JR, W.A.J.; CUNHA, T.M.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**. v.112, p.116-138. 2006.

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

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

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

WOLF, G.; LIVSHITS, D.; BEILIN, B.; YIRMIY, A.; SHAVIT, Y. Interleukin-1 signaling is required for induction and maintenance of postoperative incisional pain: genetic and pharmacological studies in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**. v. 22, p. 1072-1077. 2008.

XIE, Q. W.; KASHIWABARA, Y.; NATHAN, C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. **Journal of Biological Chemistry**. v. 269, n. 7, p. 4705-8. 1994.

YEDGAR, S.; KRIMSKY, M.; COHEN, Y.; FLOWER, R. Treatment of inflammatory diseases by aselective eicosanoid inhibiton: a double-edged sword? **Pharmacological Sciences**. v.28, n.9, p.459-464. 2007.

YUHKI, K. et al. Prostaglandin receptors EP2, EP3, and IP mediate exudate formation in carrageenin-induced mouse pleurisy. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 311, n. 3, p. 1218-24. 2004.

YAMASHIRO K, KIRYU J, TSUJIKAWA A, NONAKA A, HONJO M, TANIHARA H et al. Suppressive effects of histamine H1 receptor antagonist diphenhydramine on the leukocyte infiltration during endotoxin-induced uveitis. **Experimental Eye Research**. v. 73, n. 1, p. 69-80. 2001.

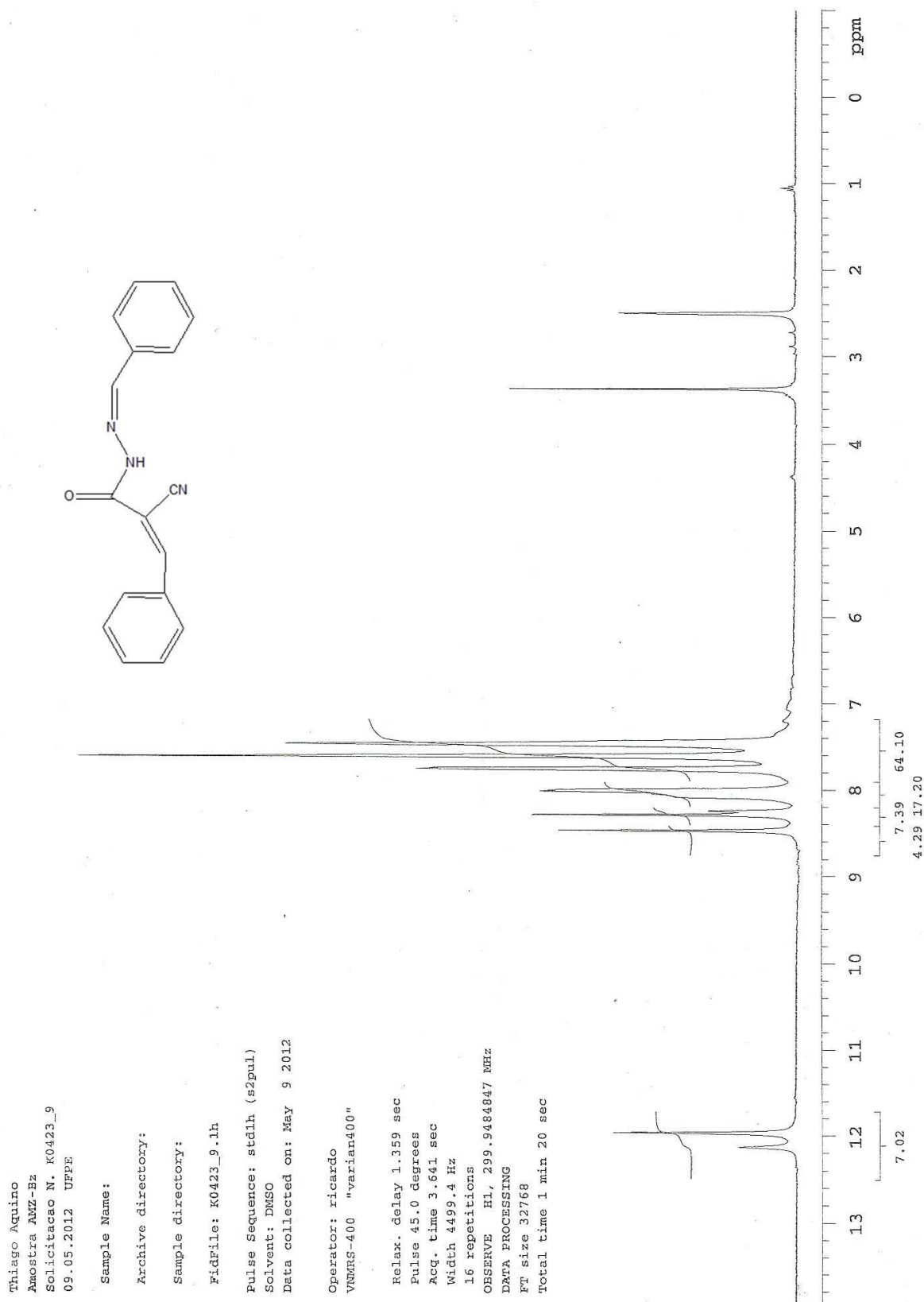
ZHANG, H. M.; CHEN, S. R.; PAN, H. L. Effects of activation of group III metabotropic glutamate receptors on spinal synaptic transmission in a rat model of neuropathic pain. **Neuroscience**. v.158, p.875-884. 2009.

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

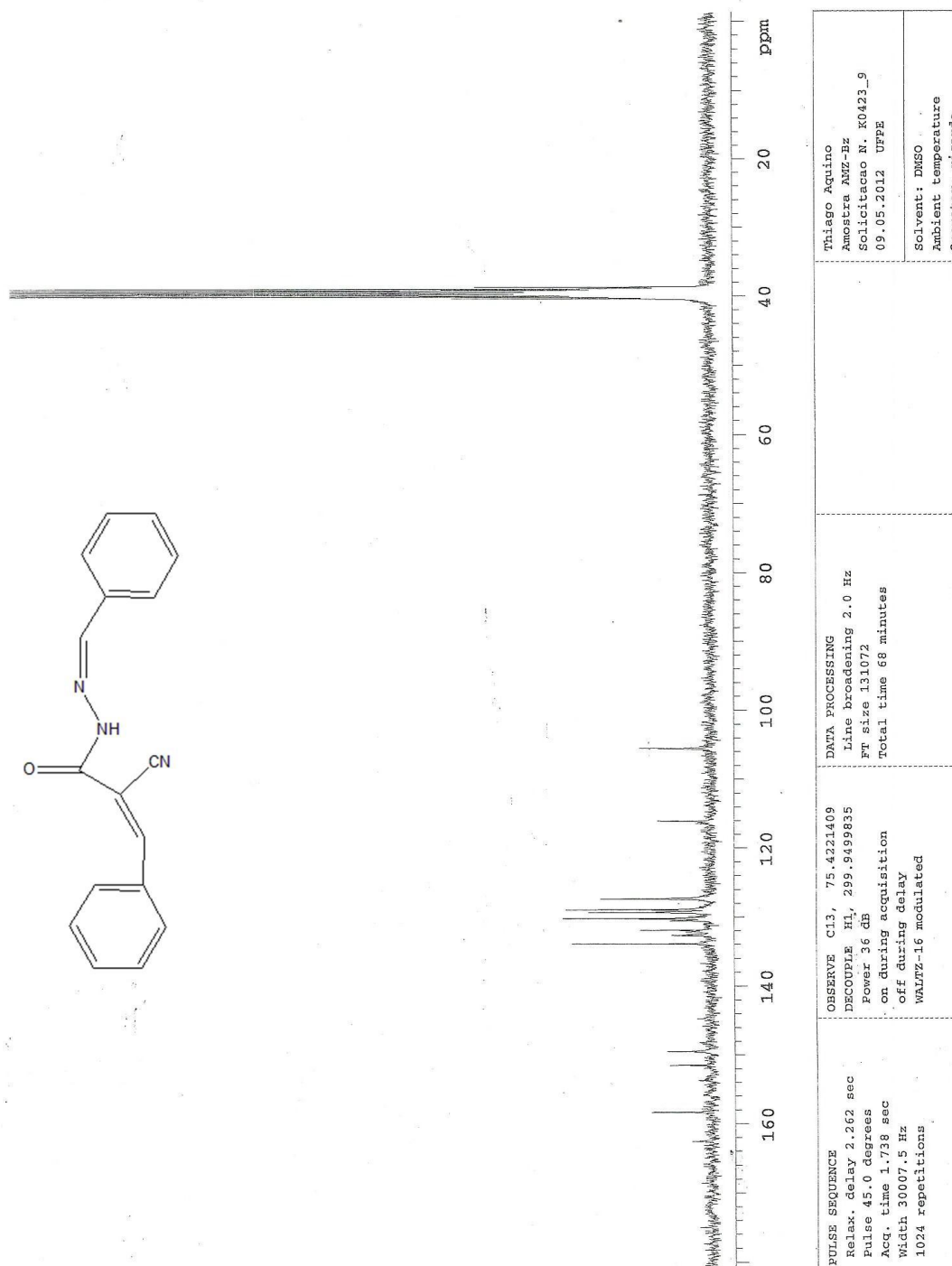
APÊNDICES

10. APÊNDICES

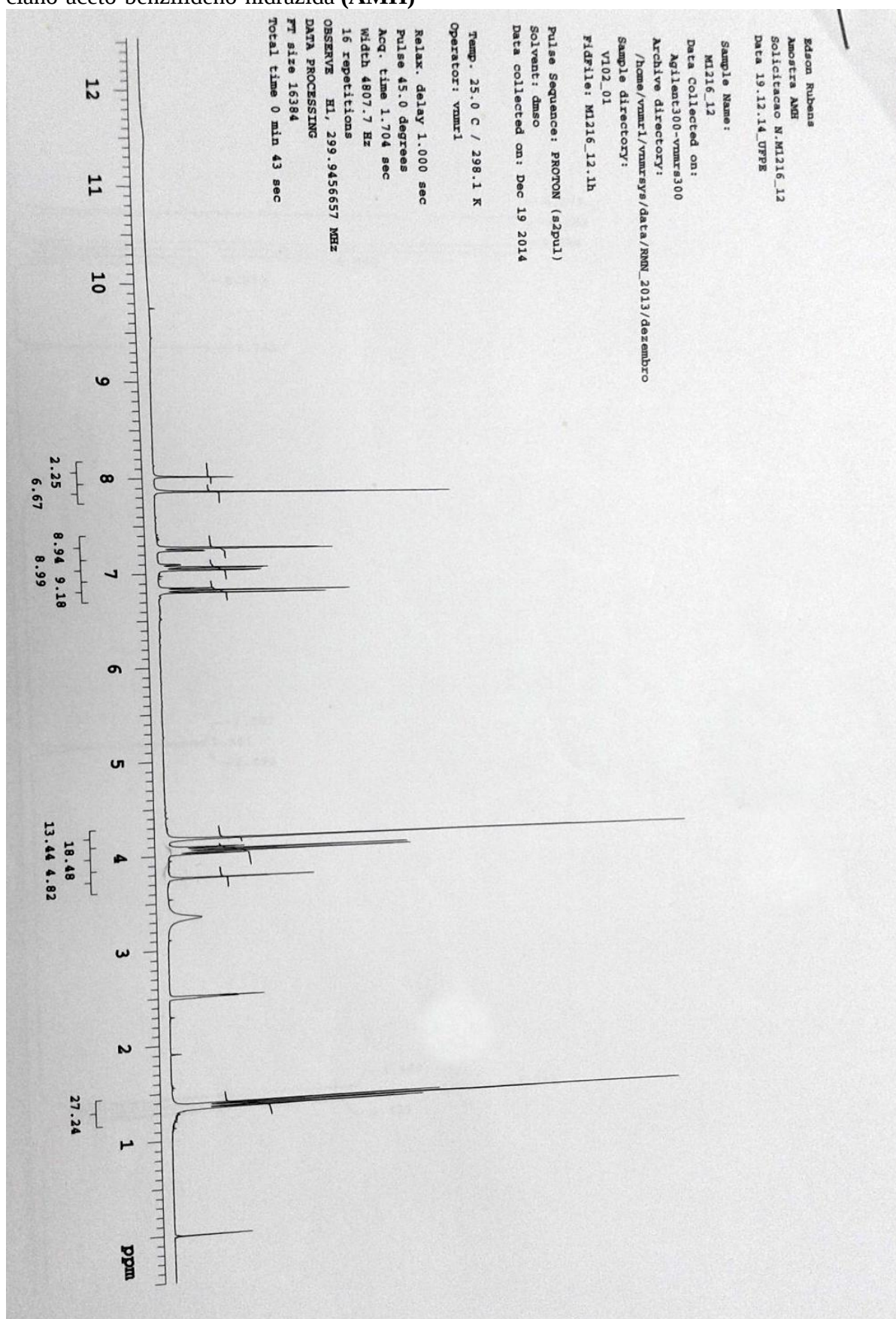
APÊNDICE A – Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio do 3-fenil-2-ciano-aceto-benzilideno-hidrazida (AMZ-Bz)



APÊNDICE B – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono do 3-fenil-2-cianoacetobenzilideno-hidrazida (AMZ-Bz)



APÊNDICE C - Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio do 3-fenil-2-ciano-aceto-benzilideno-hidrazida (AMH)



APÊNDICE D - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono do 3-fenil-2-cianoacetobenzilideno-hidrazida (AMZ)

