

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas/PPGCB

Fernanda Virginia Barreto Mota

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA
DOS DERIVADOS ISOXAZOLINA-ACILHIDRAZONAS AZA-BICÍCLICAS
R-99 E R-123

Recife

2018

Fernanda Virginia Barreto Mota

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA
DOS DERIVADOS ISOXAZOLINA-ACILHIDRAZONAS AZA-BICÍCLICAS
R-99 E R-123

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração: Biologia Química para a Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Orientadora: **Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva**
Co-orientadores: **Profa. Dra. Christina Alves Peixoto**
Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Mota, Fernanda Virgínia Barreto

Avaliação das atividades anti-inflamatórias e antinociceptiva dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas aza-bicíclicas **R-99** e **R-123** / Fernanda Virgínia Barreto Mota. – 2018.

168 f. : il.

Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva.

Coorientadores: Christina Alves Peixoto, Antônio Rodolfo de Faria.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Farmacologia 2. Doenças Crônicas I. Silva, Teresinha Gonçalves da (orient.) II. Peixoto, Christina Alves (coorient.) III. Faria, Antônio Rodolfo de (coorient) IV. Título.

615.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 269

FERNANDA VIRGINIA BARRETO MOTA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DOS
DERIVADOS ISOXAZOLINA-ACILHIDRAZONAS AZA-BICÍCLICAS R-99 E R-123**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, Área de concentração: Biologia Química para a
Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito
para a obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 01/03/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva / Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Christina Alves Peixoto / Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley / Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Patricia Machado Rodrigues e Silva Martins / Instituto Oswaldo Cruz –
FIOCRUZ/RJ

Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam / Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Maria Bernadete de Sousa Maia / Universidade Federal de Pernambuco

À minha vó Josefa Virginia, pelo apoio e compreensão,

Ao meu avô Josué Paes Barreto (in memoriam),

e à minha mãe Maria José (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

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

À minha orientadora, Profa Dra Teresinha Gonçalves da Silva, pela oportunidade que me foi dada, pela dedicação, orientação e amizade. Seus valiosos conhecimentos contribuem para minha formação e futuro. Por receber esses alunos doidos que caem de paraquedas no seu laboratório. Obrigada por acreditar em mim, pela paciência e me orientar por todos esses anos e por permitir colocar em prática a maioria das ideias loucas que eu tinha.

À minha mãe e avó, vida acadêmica dedicada a vocês que sempre acreditaram que o estudo deveria vir em primeiro lugar.

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

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

Às amigas Ana Karolina, Mary Aranda, Sandra Cabral e Viviane Michele por fazerem parte da minha história e pelo carinho e amizade. Vocês fazem parte do meu alicerce.

Aos meus chegados do “tô a fim de viajar”. Amigos que aguentaram muito dos meus estresses fim de tese: Marllon, Jéssica, Tatinha, Pedrinho, Michelly, Jullyane, Aline e Jaci. Em especial Jaci e Marllon/Jéssica que se dispuseram muitas vezes em escutar os meus dramas.

À minha querida e amada amiga / pósdoc / quase co-orientadora Isla Bastos por verdadeiramente ter me suportado. Sem você o termino dessa tese seria um inferno. Obrigada por passar noites acordada lendo tudo isso.

Aos meus amigos do Biofarmatox que estiveram junto comigo nos momentos de aflição e descontração: Alexandra Debora, Alícia, Anne Cecília, Bruna Raissa, Bruno Iraquitán,

Caio César, Carlson Júnior, Caroline Leal, Cynthia Laise, Elizabeth Borba, Etna Marques, George Torres, Henrique Bandeira, Isla Bastos, Jaciana Aguiar, Jessica Andrea, Jhonata Alexandre, Laís Farias, Larissa Cardoso, Lays Nerys, Leandro Coutinho, Maria do Desterro, Marllon Alex, Mychelly Rodrigues, Pedro Silvino, Pedrinho Paulo, Rayane Keyti, Sandra Cabral, Sandrine Arruda, Tatiane Bezerra, Temistocles Ítalo, Tonny Cley.

À Jeyce Andrade pela ajuda dada aos 48 do segundo tempo. Por ter me ajudado dando um norte num momento que empaquei numa parte da tese. A resposta estava bem na minha frente, mas eu não enxergava. Obrigada por ter perdido uma tarde comigo me ajudando na fisiologia pulmonar.

Em especial a Suzete Mendonça, pelo seu carinho, mesmo aparecendo só esporadicamente aqui o laboratório.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Antonio Rodolfo de Faria, do Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada a Fármacos - LASOF, Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Pernambuco, por fornecer as moléculas de estudo deste trabalho, pela compreensão e paciência de explicar e me fazer entender a parte química das moléculas usadas.

À minha co-orientadora, Dra. Christina Alves Peixoto, pela oportunidade que me foi dada e ajuda na realização de alguns experimentos.

Ao pessoal do Laboratório de Inflamação da Fiocruz/RJ, que me receberam de braços abertos. Em especial à Dra. Patrícia Martins que me orientou durante a minha estadia no Rio de Janeiro. Muito obrigada pela disponibilidade, paciência e motivação, principalmente por me fazer acreditar que mesmo com dificuldades eu posso/consigo desenvolver uma pesquisa de qualidade bastando ter criatividade, determinação e perseverança. Ao Dr. Marcos Martins, apesar de, a priori, aparentar ser intimidador, é um professor com um grande coração e sabedoria. A Dra. Tatiana Paula Ferreira (nossa querida Tati Paula) por me acompanhar nos experimentos e fazer as análises comigo. Pela sua felicidade e animação sempre que adentrava num ambiente, muito obrigada. As técnicas Ana Carol e Dayane que verdadeiramente me acompanharam durante toda a estadia, a quem aperriei muito, me ensinaram muito e foram muito generosas comigo. E muitíssimo obrigada também a Carol Azevedo, Fê e Amandinha por me acompanharem nos experimentos.

Ao professor Bruno Severo Gomes por ser o primeiro a acreditar em mim, onde eu mesma não via luz no fim do túnel.

Ao meu amigo Eryvelton Franco, por todas as caronas e conversas acadêmicas dentro do querido crossfox branco. As nossas conversas muitas vezes clarearam alguns pensamentos e/ou me deram muitas ideias. Muito obrigada por dividir essas viagens comigo.

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

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

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

À Adê, secretária do PPGCB, pela animação, disponibilidade e por ser sempre prestativa com suas “pupilas”.

À FACEPE que me permitiu fazer um intercâmbio com o Laboratório de Inflamação no Rio de Janeiro, isso foi muito importante ao desenvolvimento da minha pesquisa além do crescimento pessoal e profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo incentivo e apoio financeiro.

Por fim, a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente a esse trabalho. Todos que passaram pela minha vida, principalmente nesse período, foram primordiais para o desenvolvimento e realização dessa pesquisa.

A todos meu imenso, muito obrigada!

Sou o coração do folclore nordestino
Eu sou Mateus e Bastião do Boi Bumbá
Sou um boneco do Mestre Vitalino
Dançando uma ciranda em Itamaracá
Eu sou um verso de Carlos Pena Filho
Num frevo de Capiba
Ao som da orquestra armorial
Sou Capibaribe
Num livro de João Cabral

Sou mamulengo de São Bento do Una
Vindo num baque solto de um Maracatu
Eu sou um auto de Ariano Suassuna
No meio da Feira de Caruaru
Sou Frei Caneca do Pastoril do Faceta
Levando a flor da lira
Pra Nova Jerusalém
Sou Luís Gonzaga
Eu sou do mangue também

Eu sou mameluco, sou de Casa Forte
Sou de Pernambuco, sou o Leão do Norte

Sou Macambira de Joaquim Cardoso
Banda de Pife no meio do Canavial
Na noite dos tambores silenciosos
Sou a calunga revelando o Carnaval
Sou a folia que desce lá de Olinda
O homem da meia-noite puxando esse cordão
Sou jangadeiro na festa de Jaboatão

Eu sou mameluco, sou de Casa Forte
Sou de Pernambuco, sou o Leão do Norte

Lenine / Paulo César Pinheiro

RESUMO

Compostos contendo anel isoxazolínico e função acilhidrazona têm sido descritos como agentes anti-inflamatórios e anti-nociceptivos. Pesquisas realizadas pelo nosso grupo mostraram que os derivados isoxazolina-acilhidrazonas aza-bicíclicas (**R-99** e **R-123**) apresentaram atividade em vários modelos de inflamação *in vivo*. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade anti-asmática e expectorante dos derivados **R-99** e **R-123** nos modelos de inflamação mediada por células da imunidade inata e alérgica, além de estudar o efeito anti-nociceptivo dos derivados nos modelos de nocicepção aguda e crônica, e prováveis mecanismos de ação. No teste da pleurisia induzida por diversos agentes flogísticos, os derivados **R-99** e **R-123** apresentaram atividade sobre o sistema complemento, histamina e bradicinina, ao verificar a inibição da migração leucocitária nos modelos induzidos por zimosano, histamina e bradicinina, respectivamente, enquanto que o **R-99** também agiu sobre a substância P (SP) ao provavelmente inibir receptores NK1 no modelo induzido por SP. Esses derivados também apresentaram atividade expectorante aumentando a eliminação do muco em 224,1% (**R-99**) e 326,0% (**R-123**). Na inflamação alérgica, os compostos **R-99** e o **R-123**, na dose de 5 mg/kg, reduziram a migração leucocitária na pleurisia induzida por ovalbumina (OVA) em 54,3 e 52,5%, respectivamente. Na asma alérgica induzida por OVA houve uma redução do influxo leucocitário de 58,2% para **R-99** e 59,2%, para **R-123**, na dose de 5 mg/kg, com inibição significativa na migração de células mononucleares. O **R-99** e **R-123** apresentaram efeito anti-nociceptivo em modelos de nocicepção induzida por formalina (43% e 28%, na 1ª fase e 38% e 55%, na 2ª fase), no modelo de capsaicina (61% e 55,2%, respectivamente); além de apresentar atividade no teste de alodinia mecânica induzida por adjuvante completo de Freund. Os compostos apresentam esse efeito agindo predominantemente por um mecanismo periférico com envolvimento dos sistemas opióide e α 2-adrenérgico, dos receptores TRVP1 e na via L-arginina-óxido nítrico. O **R-99** também apresentou envolvimento com o sistema colinérgico, especificamente nos receptores muscarínicos, e canais de potássio. Desta forma, os resultados indicam que os derivados **R-99** e **R-123** apresentam atividades expectorante, anti-asmática e anti-nociceptivas promissoras, contribuindo para a pesquisa e o desenvolvimento de fármacos eficazes para tratamento da asma brônquica e analgésicos.

Palavras-chave: Atividade Anti-inflamatória. Asma. Atividade Antinociceptiva. Isoxazolininas. Acilhidrazona.

ABSTRACT

Compounds containing isoxazolinic ring and acylhydrazone function have been reported as anti-inflammatory and analgesic agents. Studies conducted by our group found that isoxazoline-acylhydrazone derivatives are active against several inflammatory *in vivo* models. Therefore, this study aimed to evaluate the anti-asthmatic and expectorant activities of the **R-99** and **R-123** derivatives isoxazoline-acylhydrazone derivatives (**R-99** and **R-123**) against inflammatory essays mediated by cells of the innate immunity and allergic, besides the study of the anti-nociceptive effects from the derivatives in the essays of acute and chronic nociception, and investigation of the possible mechanisms of action. Regarding the pleurisy test induced by diverse phlogistic agents, the **R-99** and **R-123** derivatives had show activity against the complement system, histamine and bradykinin, once the leukocyte migration inhibition in the models induced by zymozan, histamine and bradykinin were verified, respectively. In addition, **R-99** also had effect on substance P (SP) through the presumably inhibition of the NK1 receptor, which was confirmed in the model induced by SP. These derivatives also have expectorant activity, which was observed by the increase of mucus secretion in 224,1% (**R-99**) and 326,0% (**R-123**). Respecting allergic inflammation, **R-99** and **R-123** derivatives, 5 mg / kg, both reduced leukocyte migration in the pleurisy induced by ovalbumin (OVA) in 54,3% and 52,5%, respectively. In addition, there was a reduction in the leukocyte influx of 47,5% (**R-99**) and 71,5% (**R-123**), and a significant inhibition of the mononuclear cells migration. The **R-99** and **R-123** derivatives had antinociceptive effect against models of nociception formalin-induced (43% and 28%, in the 1st phase, and 38% and 55%, in the 2nd phase), in the nociception capsaicin-induced essay (61% and 55,2%, respectively); and also, had activity in the mechanical allodynia test induced by Freund complete adjuvant. Moreover, the derivatives had these effects by acting predominantly by a peripheral mechanism involving the opioid and α 2-adrenergic systems, the TRVP1 receptors, and the L-arginine-nitric oxide pathway. Finally, **R-99** had interaction with the cholinergic system, specifically in the muscarinic receptors, and potassium channels. Therefore, our results indicate that **R-99** and **R-123** derivatives had expectorant, anti-asthmatic, and antinociceptive promissory activities that might contribute to the development of new and more efficient pharmaceuticals for bronchial asthma and analgesics.

Keywords: Activity Anti-inflammatory. Activity Antinociceptive. Asthma. Isoxazolines. Acylhydrazone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas aza-bicíclicos <u>R-99</u> e <u>R-123</u>.	31
Figura 2 - Delineamento experimental do teste farmacológico de derivados isoxazolina-acilhidrazonas aza-bicíclicos <u>R-99</u> e <u>R-123</u> em modelo de pleurisia alérgica induzida por OVA.	33
Figura 3 - Delineamento experimental do teste farmacológico de derivados isoxazolina-acilhidrazonas <u>R-99</u> e <u>R-123</u> em modelo de asma brônquica experimental.	37
Figura 4 - Fluxograma do protocolo utilizado no estudo para a determinação do mecanismo de ação dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas aza-bicíclicos <u>R-99</u> e <u>R-123</u>.	41
Figura 5 - Exemplos de heterocíclicos pentagonais.	47
Figura 6 - Atividades biológicas dos compostos contendo o anel isoxazolina.	48
Figura 7 - Estrutura química do Broxaterol.	50
Figura 8 - Atividades biológicas dos compostos contendo a função N-acilhidrazona.	51
Figura 9 - Migração de neutrófilos. Para alcançar o foco inflamatório, os neutrófilos da corrente sanguínea são ativados e realizam o processo de rolamento, adesão e diapedese.....	54
Figura 10 - Mediadores químicos da inflamação.	55
Figura 11 - Esquema de ativação de linfócitos Th2 por alérgeno e desencadeamento da asma brônquica (GOLAN, 2014). Proteína básica principal (MBP), proteína	

catiônica eosinofílica (ECP), imunoglobulina E (IgE) e imunoglobulina G (IgG).	61
Figura 12 - Mecanismo básico da dor. Processamento sensorial no corno dorsal da medula espinal.	73
Figura 13 - Diferentes tipos de neurônios sensoriais primários, responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC.	75
Figura 14 - Via de condução de estímulos dolorosos.	76
Figura 15 - A via da dor e intervenções que podem modular a atividade em cada ponto.	79
Figura 16 - Neurotransmissores e neuromoduladores espinhais.	80
Figura 17 - Locais de ação dos opióides na medula espinal.	81
Figura 18 - Os opióides ativam pré e pós-sinapticamente os RaPGs-7 (receptor acoplado da proteína G 7) transmembrana ao longo das vias transmissoras da dor.	81
Figura 19 - Efeito dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas aza-bicíclicos (<u>R-99</u> e <u>R-123</u>) na pleurisia induzida por carragenina.	89
Figura 20 - Efeitos dos derivados <u>R-99</u> e <u>R-123</u> sobre as mudanças histopatológicas do tecido pulmonar dos animais na pleurisia induzida por carragenina em camundongos.	91
Figura 21 - Efeito no tratamento com os derivados <u>R-99</u> e <u>R-123</u> na migração de leucócitos totais para a cavidade pleural dos animais no teste de pleurisia induzida por diversos agentes flogísticos.	93

Figura 22 - Efeito do tratamento com os derivados <u>R-99</u> e <u>R-123</u> na migração de leucócitos totais para a cavidade pleural dos animais no teste de pleurisia induzida por ovalbumina.	96
Figura 23 - Efeito do tratamento com os compostos <u>R-99</u> e <u>R-123</u> sobre a viabilidade celular (%) medido pelo teste de MTT em diferentes tempos nas células da linhagem P815 tratadas com diferentes concentrações de <u>R-99</u> (A) e <u>R-123</u> (B).	98
Figura 24 - Efeito do tratamento com os compostos <u>R-99</u> e <u>R-123</u> sobre desgranulação anafilática de mastócitos. Células da linhagem RBL-2H3 foram sensibilizadas com IgE anti-DNP-BSA e tratadas com diferentes concentrações de <u>R-99</u> e <u>R-123</u> durante 1 h.	99
Figura 25 - Efeito do tratamento com os derivados isoxazolina-acilhidrazonas azabíclicos <u>R-99</u> e <u>R-123</u> sobre inflamação alérgica das vias aéreas induzida por ovalbumina (OVA). Leucócitos totais, células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos foram diferenciados em amostras de lavado broncoalveolar.	101
Figura 26 - Efeito do tratamento com derivados isoxazolina-acilhidrazonas <u>R-99</u> e <u>R-123</u> sobre a função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas em camundongos ativamente sensibilizados, nos dias 0 e 14, e desafiados com ovoalbumina no 21° ao 24° dia após a sensibilização.	102
Figura 27 - Efeito do tratamento com derivados isoxazolina-acilhidrazonas <u>R-99</u> e <u>R-123</u> sobre a geração de citocinas e quimiocinas nos pulmões de camundongos ativamente sensibilizados nos dias 0 e 14 e desafiados com OVA no 21° ao 24° dia após a sensibilização.	104
Figura 28 - Efeitos dos derivados isoxazolina-acilhidrazona sobre as mudanças histopatológicas do tecido pulmonar de animais alérgicos e marcação de eosinófilos teciduais.	106

Figura 29 - Efeitos dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas <u>R-99</u> e <u>R-123</u> sobre a análise de fibras colágenas nas vias aéreas de animais sensibilizados e broncoprovocados	108
Figura 30 - Número de contorções abdominais (média ± erro médio padrão) nos grupos tratados com os derivados <u>R-99</u> e <u>R-123</u> no teste de contorções abdominais induzido por ácido acético	112
Figura 31 - Efeito dos derivados <u>R-99</u> e <u>R-123</u> (15 mg/kg, v.o.) e morfina (5 mg/kg, s.c.) no teste de nocicepção induzido por formalina em camundongos	113
Figura 32 - Efeito dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas aza-bicíclicos <u>R-99</u> e <u>R-123</u> (15 mg/kg, v.o.) e vermelho de rutênio (3 mg/kg, i.p.) no teste de nocicepção induzida por capsaicina em camundongos	115
Figura 33 - Efeito dos derivados <u>R-99</u> e <u>R-123</u> (15 mg/kg, v.o.) e dexametasona (0,5 mg/kg, v.o.), sobre a hiperalgesia mecânica plantar induzida por CFA em camundongos	117
Figura 34 - Influência do pré-tratamento de camundongos com naloxona (5 mg/kg i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado pelos derivados isoxazolina-acilhidrazona aza-bicíclicos <u>R-99</u> (15 mg/kg, v.o.) e <u>R-123</u> (15 mg/kg, v.o.) no modelo de nocicepção induzido por ácido acético	119
Figura 35 - Influência do pré-tratamento de camundongos com prazosina (0,15 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado pelos derivados isoxazolina-acilhidrazona aza-bicíclicos <u>R-99</u> (15 mg/kg, v.o.) e <u>R-123</u> (15 mg/kg, v.o.) na nocicepção induzido por ácido acético	121
Figura 36 - Influência do pré-tratamento de camundongos com ioimbina (0,5 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado pelos derivados isoxazolina-acilhidrazona aza-bicíclicos <u>R-99</u> (15 mg/kg, v.o.) e <u>R-123</u> (15 mg/kg, v.o.) no modelo de nocicepção induzido por ácido acético	122

Figura 37 - Influência do pré-tratamento de camundongos com atropina (5 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado pelos derivados isoxazolina-acilhidrazona aza-bicíclicos R-99 (15 mg/kg, v.o.) e R-123 (15 mg/kg, v.o.) no modelo de nocicepção induzido por ácido acético123

Figura 38 - Influência do pré-tratamento de camundongos com L-arginina (100 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado pelos derivados isoxazolina-acilhidrazona aza-bicíclicos R-99 (15 mg/kg, v.o.) e R-123 (15 mg/kg, v.o.) no teste de nocicepção induzido por ácido acético125

Figura 39 - Influência do pré-tratamento de camundongos com glibenclamida (10 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado pelos derivados isoxazolina-acilhidrazona aza-bicíclicos R-99 (15 mg/kg, v.o.) e R-123 (15 mg/kg, v.o.) no modelo de nocicepção induzido por ácido acético127

Figura 40 - Efeitos dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas aza-bicíclicos R-99 e R-123 (15 mg/kg, v.o.) e diazepam (10 mg/kg, v.o.) no desempenho dos camundongos no Teste da Barra Giratória (*rota rod*)128

Figura 41 - Efeitos dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas aza-bicíclicos R-99 e R-123 (15 mg/kg, v.o.) e diazepam (10 mg/kg, v.o.) no número de cruzamentos (A), número de levantamentos (B), número de auto-limpeza (C) e número de bolos fecais (D) conforme avaliado pelo teste de campo aberto129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividade expectorante dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas <u>R-99</u> e <u>R-123</u>	110
---	------------

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-HT	- 5-hidroxitriptamina, Serotonina
5-LOX	- 5-lipoxigenase
AC	- Adenilato ciclase
ACh	- Acetilcolina
ADA	- Adenosina-deaminase
AHR	- Hiperresponsividade das vias aéreas
AINES	- Anti-inflamatórios não esteroidais
ALT	- Alanina transaminase
AMPA	- Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
AMPc	- Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
AP-1	- Proteína Ativadora-1
APC	- Célula apresentadora de antígeno
AST	- Aspartato transaminase
ATP	- Trifosfato de adenosina
BAL	- Lavado broncoalveolar
BK	- Bradicinina
BNP-BSA	- Albumina de Soro Bovino (BSA), 2,4- Dinitrofenilado
CA	- Cainato
Cav	- Cavidade
CFA	- Adjuvante Completo de Freund
COX	- Cicloxigenase

CSI	- Corticosteroides inalados
CSF	- Fatores estimuladores de colônia
CysLT	- Cysteinil leucotrienos
DMSO-d6	- Dimetil sulfóxido deuterado
DPOC	- Doença pulmonar obstrutiva crônica
ECA	- Enzima conversora de angiotensina
ECP	- Proteína de eosinófilos catiônica
EDN	- Neurotoxina derivada de eosinófilos
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	- Óxido nítrico sintase endotelial
EPO	- Peroxidase eosinofílica
FcεRI	- Receptores específicos de alta afinidade para IgE
GABA	- Ácido Gama-Aminobutírico
GC	- Guanilato ciclase
Gi	- Proteína G inibitória
GMPc	- Monofosfato cíclico de guanosina
GPCR	- Receptores acoplados à proteína G
Gq	- Proteína G estimulatória
HDAC2	- Histona deacetilase 2
HE	- Hematoxilina-eosina
HTAB	- Hexadeciltrimetil brometo de amônia
IASP	- Associação Internacional do Estudo da Dor
ICAM	- Molécula de adesão intercelular

ICLAS	- Conselho Internacional de Laboratório de Animais Experimentais
IFN	- Interferon
IgE	- Imunoglobulina E
IL	- Interleucina
iNOS	- Óxido nítrico sintase indutivo
i.p.	- Intraperitoneal
LASOF	- Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada a Fármacos
LGICs	- Canais de íons controlados por ligante
LT	- Leucotrieno
mAb	- Anticorpo monoclonal
MBP	- Proteína eosinofílica básica principal
MCP-1	- Proteína quimiotática de monócito 1
MHC-II	- Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
MIP-1 α	- Proteína <i>inflamatória</i> de macrófago 1 alfa
MMP-9	- Metaloproteinase de matriz 9
MPO	- Mieloperoxidase
nAChRs	- Receptores nicotínicos neuronais de acetilcolina
NAEPP	- Programa Nacional para a Educação e Prevenção da Asma dos Estados Unidos
NF κ B	- Fator nuclear- κ B
NGF	- Fator de Crescimento Neural
NMDA	- N-metil-D-aspartato
NO	- Óxido nítrico

NOS	= Óxido nítrico sintase
OPD	- <i>o</i> -fenildiamina dihidroclorato
OVA	- Ovalbumina
PAF	- Fator de ativação plaquetária
PAS	- Ácido periódico de Schiff
PBS	- Solução tampão fosfato
PDE4	- Fosfodiesterase 4
PDGF	- Fator de crescimento derivado da plaqueta
PG	- Prostaglandina
PGE2	- Prostaglandina E2
PGI2	- Prostaciclina
PKG	- Proteína quinase G
PLC	- Fosfolipase C
PMNL	- Leucócitos polimorfonucleares
Rf.	- Razão de frente
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
RTK	- Receptores da tirosina quinase
SBCAL	- Sociedade Brasileira de Ciência em Animal de Laboratório
s.c.	- Subcutânea
SNC	- Sistema nervoso central
SP	- Substância P
Th	- Linfócitos T auxiliares
TNF	- Fator de necrose tumoral

TGFβ	- Fator de crescimento transformante beta
TIMP1	- Inibidor tecidual de metaloproteinase 1
TrkA	- Receptores tirosina quinase A
TRPA	- <i>Receptor de potencial</i> transitório da <i>anquirina</i>
TRPV	- <i>Receptor de potencial</i> transitório vaniloide
VCAM	- Molécula de adesão celular vascular
VEF1	- Volume expiratório forçado no primeiro segundo
VEGF	- <i>Fator de crescimento</i> de endotélio vascular
v.o.	- Via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	27
1.1 PROBLEMATIZAÇÃO	29
1.2 OBJETIVOS	29
1.2.1 Geral	29
1.2.2 Específicos	29
1.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
1.3.1 Camundongos	30
1.3.2 Substâncias	31
1.3.3 Reagentes	31
1.3.4 Pleurisia induzida por diversos agentes flogísticos	32
1.3.5 Pleurisia induzida por ovalbumina (OVA)	33
1.3.6 Determinação dos níveis de óxido nítrico e citocinas	34
1.3.7 Ensaio da atividade da mieloperoxidase (MPO)	34
1.3.8 Análise histopatológica	34
1.3.9 Determinação da viabilidade celular em mastócitos da linhagem P815.....	35
1.3.10 Avaliação de células alvo “<i>in vitro</i>” - mastócitos	35
1.3.11 Modelo de asma experimental induzida por ovalbumina	36
1.3.11.1 Avaliação de hiper-reatividade das vias aéreas e função pulmonar	37
1.3.11.2 Lavado broncoalveolar	38
1.3.11.3 Obtenção de tecido pulmonar	38

1.3.11.4 Determinação dos níveis de citocinas	38
1.3.11.5 Análise histopatológica	38
1.3.12 Atividade expectorante	39
1.3.13 Nociceção induzida por ácido acético	39
1.3.14 Nociceção induzida por formalina	40
1.3.15 Nociceção induzida por capsaicina	40
1.3.16 Alodinia mecânica induzida pelo adjuvante completo de Freund (CFA)	40
1.3.17 Análise dos possíveis sistemas envolvidos no mecanismo de ação antinociceptivo	41
1.3.17.1 Participação do sistema opioide	42
1.3.17.2 Participação do sistema α -adrenérgico	42
1.3.17.3 Participação do Sistema Colinérgico	43
1.3.17.4 Participação do Óxido Nítrico	43
1.3.17.5 Participação dos canais de K ⁺ dependentes de ATP	43
1.3.18 Avaliação da coordenação motora (teste do rota-rod)	44
1.3.19 Modelo do campo aberto (<i>open field</i>)	44
1.3.20 Análise estatística	45
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	46
2.1 DERIVADOS ISOXAZOLINA-ACILHIDRAZONAS	46
2.1.1 Propriedades Biológicas das Isoxazolininas.....	46
2.1.2 Propriedades Biológicas das Acilhidrazonas	50
2.2 INFLAMAÇÃO	51
2.2.1 Fisiopatologia da Inflamação	51

2.2.2. Mediadores químicos da inflamação	55
2.2.3 Resposta Imune e Inflamação	56
2.3 ASMA	58
2.3.1 Fisiopatologia da asma	58
2.3.2 Terapia antiasmática	63
2.3.2.1 Agonistas β 2 adrenérgicos	64
2.3.2.2 Anticolinérgicos	64
2.3.2.3 Metilxantinas	65
2.3.2.4 Corticosteróides	65
2.3.2.5 Antileucotrienos	66
2.3.2.6 Anticorpos anti-IgE	66
2.3.2.7 Inibição de mediadores inflamatórios na asma	67
2.3.2.7.1 Anticorpos anti-IL-5	67
2.3.2.7.2 Anticorpos anti-IL-4 e anti-IL-13	68
2.3.3 Modelos murinos de inflamação	69
2.3.4 Modelo experimental de asma brônquica	70
2.4 DOR	70
2.4.1 Fisiopatologia da Dor	70
2.4.2 Mediadores químicos envolvidos no processo nociceptivo	77
2.4.3 Mediadores e modulação na medula espinhal	78
2.4.3.1 Sistema Opióide e Antinociceção	80
2.4.3.2 Canais de K^+ _{ATP} e Antinociceção	82
2.4.3.3 Sistema Muscarínico e Antinociceção	83

2.4.3.4 Sistema Adrenérgico e Antinocicepção	83
2.4.4 Tratamento Farmacológico da Dor: Fármacos Analgésicos	84
2.4.5 Modelo experimental para análise dos possíveis sistemas envolvidos no mecanismo de ação antinociceptiva	85
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87
3.1 PLEURISIA INDUZIDA POR CARRAGENINA	87
3.1.1 Análise histopatológica do pulmão	90
3.2 PLEURISIA INDUZIDA POR DIVERSOS AGENTES FLOGÍSTICOS	92
3.3 PLEURISIA ALÉRGICA INDUZIDA POR OVALBUMINA	96
3.4 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR EM MASTÓCITOS DA LINHAGEM P815	97
3.5 AVALIAÇÃO DE CÉLULAS ALVO “ <i>IN VITRO</i> ” – MASTÓCITOS	99
3.6 MODELO DE ASMA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR OVALBUMINA	100
3.6.1 Avaliação de hiper-reatividade das vias aéreas e função pulmonar	101
3.6.2 Determinação dos níveis de citocinas	104
3.6.3 Análise histopatológica do pulmão	105
3.7 ATIVIDADE EXPECTORANTE	109
3.8 NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO	111
3.9 NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA FORMALINA	113
3.10 NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR CAPSAICINA	115
3.11 ALODÍNIA MECÂNICA INDUZIDA PELO ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND (CFA)	117
3.12 ANÁLISE DOS POSSÍVEIS SISTEMAS ENVOLVIDOS NO MECANISMO DE AÇÃO ANTINOCICEPTIVA	119

3.12.1 Participação do sistema opioide	119
3.12.2 Participação do sistema α-adrenérgico	120
3.12.3 Participação do sistema colinérgico	123
3.12.4 Participação do óxido nítrico	125
3.12.5 Participação dos canais de K⁺ dependentes de ATP	126
3.13 TESTES DO <i>ROTA ROD</i> E CAMPO ABERTO	128
4 CONCLUSÕES.....	131
REFERÊNCIAS.....	133
ANEXO A - PARECER DE COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL 1	165
ANEXO B - PARECER DE COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL 2	166
ANEXO C - PARECER DE COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL 3	167

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é uma reação complexa envolvendo componentes celulares e moleculares. É uma resposta inespecífica a uma agressão específica que envolve o reconhecimento do estímulo lesivo, para sua posterior destruição e tentativa de reconstruir o tecido danificado (NATHAN, 2002; ZHOU et al., 2007). Quando esse balanço entre inflamação e restauração tecidual é quebrado, ocorrerá o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas e autoimunes, tais como doenças inflamatórias intestinais, artrite ou asma (SZÉLES, 2007).

A asma é uma doença inflamatória crônica, associada a uma hiperatividade das vias aéreas em resposta a determinados fatores desencadeantes como: infecções virais, exercício físico ou exposição a diferentes alérgenos, com a obstrução do fluxo aéreo e com sintomas respiratórios como chiados, tosse e sensação de opressão do tórax (GINA, 2016). É uma doença multifatorial associada à predisposição genética e aos fatores de risco ambientais (poluição atmosférica, fumo, ácaro, pólen e poeira), sendo caracterizada por uma resposta imediata e ampla a uma reexposição a alérgenos. O tratamento da asma engloba duas categorias de medicamentos: fármacos utilizados para o alívio rápido dos sintomas (broncodilatadores) e fármacos com ação preventiva a longo prazo (principalmente anti-inflamatórios). Atualmente a terapêutica antiasmática, em particular a associação de fármacos por via inalatória, é bastante eficaz, segura e acessível. Todavia, a utilização prolongada de corticosteroides por via inalatória levanta algumas questões devido aos seus efeitos adversos (BARNES, 2010).

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

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

Grandes vantagens são verificadas durante o planejamento e desenvolvimento de fármacos pré-existentes. Elas decorrem, entre outros fatores, do prévio conhecimento de suas ações terapêuticas e reações adversas, e respectivos mecanismos de ação, bem como mecanismos farmacocinéticos. Anéis heterocíclicos estão presentes em diferentes tipos de compostos orgânicos, os quais podem apresentar diferentes bioatividades. Dentre os sistemas heterocíclicos, compostos contendo o anel 2-isoxazolina apresentaram diversas atividades biológicas como antibacteriana (PATEL; KUMARI; PATEL, 2014), antifúngica (BASAPPA et al., 2003), antioxidante (KALIRAJAN et al., 2012), antitrombótica (QUAN et al., 2003), anti-inflamatória (PARK et al., 2006; ALAM et al., 2011), anticâncer (KHAZIR et al., 2013), anti-hiperglicêmico (GOYARD et al., 2016), analgésica (DALLANOCE et al., 2011; REIS et al., 2011), antiasmática (DALLANOCE et al., 2006; GHIDINI et al., 2014), entre outros. As isoxazolininas fazem parte de uma interessante classe de compostos heteropentacíclicos. A síntese de novas moléculas contendo esse heterocíclico constitui uma importante área de investigação devido ao seu potencial aplicativo em diversas áreas do conhecimento científico (TAVARES, 2010).

Os compostos estudados por nosso grupo possuem o núcleo isoxazolinico, além da função acilhidrazona. Essa função pertence a uma classe de moléculas que vem sendo estudadas com afinco devido as suas diversas propriedades farmacológicas. Na literatura encontram-se relatos de propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antitrombóticas de derivados acilhidrazônicos (BARREIRO et al., 2002). Os mecanismos de ação desses compostos podem envolver a inibição de enzimas pró-inflamatórias como as ciclooxigenases (COX) e 5-lipoxigenase (5-LOX) (HIGGS; VANE, 1983). Alguns trabalhos também demonstraram atividades antitumoral e antiviral (ROSTOM; SHALABY; EL-DEMELLAWY, 2003).

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

O tratamento farmacológico da asma tem apresentado poucas novidades nas últimas três décadas. Os medicamentos atualmente disponíveis são divididos em duas categorias: 1) fármacos para melhora dos sintomas agudos (agonista β_2 -adrenérgicos, brometo de ipratrópio e aminofilina); 2) fármacos para manutenção, usados para prevenir os sintomas (corticosteroides inalatórios e sistêmicos, cromonas, antagonistas de leucotrienos, agonista β_2 -adrenérgicos de longa duração e teofilina de liberação lenta), sendo a forma inalatória dos corticosteroides (CE) considerada a maneira mais efetiva de tratamento preventivo da asma. Já o cromoglicato dissódico e nedocromil, por possuírem preços elevados e serem administradas por via inalatória quatro vezes ao dia, têm levado à baixa adesão ao tratamento da asma com estes medicamentos (BORGES, 2001). Os agentes modificadores da ação de leucotrienos (montelucaste e o zafirlucaste) constituem uma classe de medicamentos para o tratamento da asma, promovendo uma combinação de ações preventivas da inflamação brônquica e broncodilatadoras de alívio (BORGES, 2001), porém podem apresentar potenciais eventos neuropsiquiátricos com o seu uso (ERDEM et al., 2015). Portanto, há a necessidade do aperfeiçoamento desses medicamentos e procura de fármacos que sejam de baixo custo, fácil administração e que possuam o mínimo de efeitos colaterais.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Geral

Estudar o efeito anti-inflamatório e antinociceptivo dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas **R-99** e **R-123** nos modelos de inflamação e nos modelos de nocicepção aguda e crônica, e prováveis mecanismos de ação.

1.2.2 Específicos

- ❑ Avaliar a citotoxicidade dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas **R-99** e **R-123** em linhagens de mastócitos P815;
- ❑ Avaliar a ação dos derivados **R-99** e **R-123** sobre a desgranulação anafilática de mastócitos em células da linhagem RBL-2H3;

- ❑ Avaliar a atividade anti-inflamatória dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas **R-99** e **R-123**, utilizando o modelo de pleurisia induzida por diversos agentes flogísticos (zimosano, histamina, bradicinina, substância P e ovalbumina);
- ❑ Avaliar o potencial efeito anti-inflamatório de derivados isoxazolina-acilhidrazonas sobre o recrutamento de leucócitos e citocinas no lavado broncoalveolar no modelo de asma experimental induzido por ovoalbumina, e subsequente hiperresponsividade das vias aéreas;
- ❑ Avaliar a atividade antinociceptiva dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas **R-99** e **R-123** nos modelos experimentais de nocicepção induzida por formalina, capsaicina e hipernocicepção mecânica induzida por carragenina;
- ❑ Avaliar o efeito preventivo ou curativo dos derivados isoxazolina-acilhidrazona **R-99** e **R-123** frente ao modelo de hipernocicepção mecânica persistente induzida pelo Adjuvante Completo de Freund (CFA);
- ❑ Avaliar o efeito antinociceptivo através da interação com os sistemas opioide, adrenérgico, colinérgico, óxido nítrico e com canais de K^+ _{ATP};
- ❑ Avaliar o efeito dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas sobre o desempenho motor de animais utilizando os testes de *rota rod* e de campo aberto - Open Field.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Camundongos

Foram utilizados camundongos machos adultos albinos swiss (*Mus musculus*), com 60 dias de nascidos, pesando entre 20 e 25g, provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e camundongos fêmeas Balb/c, com 8 a 10 semanas de nascidos, pesando 25 g, provenientes do Biotério do *Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami* (LIKA). Os animais foram acondicionados em gaiolas de polietileno com grades de aço inoxidável e maravalha como cobertura, tendo acesso livre à água e ração, mantidos num ambiente com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e luminosidade controlada, com ciclos de claro-escuro de 12/12 horas. Todos os animais foram submetidos a jejum, com retirada da ração cerca de 4 horas antes do início do experimento, mas tiveram livre acesso à ingestão de água.

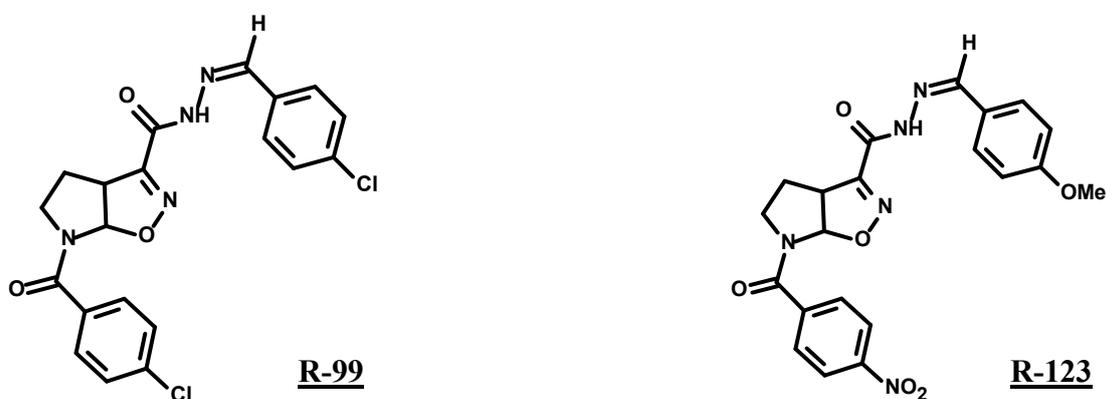
Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animal de Laboratório (SBCAL) e com as

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 UFPE (CEUA-UFPE), sob protocolos de número 23076.013748/2015-89, 23076.017767/2016-65 e também foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Osvaldo Cruz (CEUA-Fiocruz), sob protocolo de número LW-57/14.

1.3.2 Substâncias

Os derivados isoxazolina-acilhidrazonas aza-bicíclicos (4-chlorobenzylidene)-acid-hydrazide 6-(4-chlorobenzoyl)-4,5,6,6a-tetrahydro-3aH-pyrrolo[3,2-d]isoxazole-3-carboxylic (**R-99**) e (4-methoxybenzylidene)-acid-hydrazide-6-(4-nitro-benzoyl)-4,5,6,6a-tetrahydro-3aH-pyrrolo[3,2-d]isoxazole-3-carboxylic (**R-123**) (Figura 1) foram sintetizados e fornecidos pelo Laboratório de Síntese Orgânica Aplicada a Fármacos da UFPE, Brasil. As doses usadas nesse estudo foram escolhidas de acordo com resultados de um *screening* realizado em estudos anteriores (MOTA, 2013). As substâncias **R-99** e **R-123**, foram solubilizadas em salina contendo 5% de dimetilsulfóxido (DMSO).

Figura 1 - Estruturas químicas dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas aza-bicíclicos **R-99** e **R-123**



Fonte: ALMEIDA (2008).

1.3.3 Reagentes

Ovalbumina, zimosano, carragenina, histamina, reagente de Griess, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), dimetilsulfóxido (DMSO), brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB), terfenadina, substância P, e dexametasona foram comprados na Sigma

Chemical Co. Bradicinina foi comprada na Alfa Aesar (Tewksbury, Estados Unidos). Cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina foram comprados na Ceva Saúde Animal Ltda (São Paulo, Brasil), ciproeptadina foi comprada na Farmácia Roval (Pernambuco, Brasil), SR 140333 foi comprada na Tocris Bioscience (Bristol, United Kingdom), captopril foi comprado na Medley Farmacêutica Ltda (São Paulo, Brasil), hematoxilina-eosina (HE). Mouse TNF- α , Mouse IL-1 β ELISA kits foram comprado na eBioscience (San Diego, California, EUA). Morfina (União Química Farmacêutica Nacional - Minas Gerais, Brasil), naloxona (Cristália - São Paulo, Brasil), cetamina e xilazina (Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda - São Paulo, Brasil), formalina (Merck Inc. - Brasil), ácido acético glacial (VETEC - São Paulo, Brasil), cloridrato de pilocarpina (Hertape Calier Saúde Animal S.A.), fenilefrina (European Pharmacopoeia Reference Standard) e carragenina, dexametasona, indometacina, vermelho de rutênio, capsaicina, clonidina, ioimbina, L-nitro arginine methyl ester (L-NAME), L-argenina, prazosina, atropina, glibenclamida, dimetilsufóxido (DMSO), vermelho de fenol (Sigma Aldrich - St. Louis, MO, USA). Todas as drogas foram dissolvidas em salina 0,9%, exceto **R-99** e **R-123**, que foram dissolvidas em salina contendo 5% de DMSO. Todos os medicamentos foram diluídos imediatamente antes do seu uso.

1.3.4 Pleurisia induzida por diversos agentes flogísticos

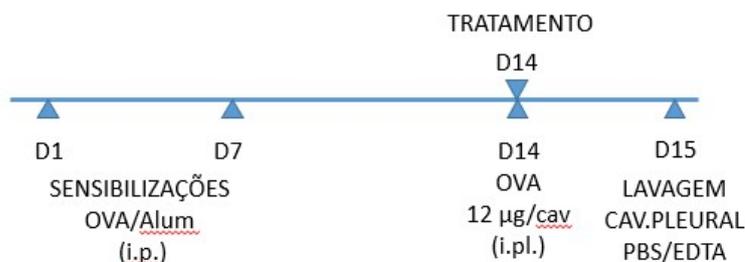
Os animais foram pré-tratados com os derivados **R-99** e **R-123** (15 mg/kg; melhor dose obtida nos testes preliminares; v.o), dexametasona (0,5 mg/kg; v.o), ciproeptadina (10 mg/kg; v.o), veículo (salina 0,9% + DMSO 5%; vo), salina (0,9%, v.o.), ou terfenadina (25 mg/kg; i.p). Após uma hora (v.o.) ou 30 minutos (i.p.), os animais foram anestesiados com uma solução de cloridrato de cetamina a 10% (0,1 ml/100g peso corpóreo) e cloridrato de xilazina a 2% (0,07 ml/100g peso corpóreo) por via intraperitoneal. O espaço intercostal entre a quarta e quinta costela foi exposto cirurgicamente e a pleurisia foi induzida pela injeção intrapleural (i.pl.), 0,1 mL, de carragenina 1% (FRODE; MEDEIROS, 2001), histamina (100 μ g/cav), bradicinina (10 nmol/cav), substância P (SP) (20 nmol/cav) (GOULART et al., 2007) ou zimosano (200 μ g/cav) (FERREIRA et al., 2012). Na pleurisia induzida por bradicinina, foi administrado captopril (5 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes do desafio para evitar a degradação da bradicinina. Após 4 horas, os animais foram eutanasiados, o tórax aberto e a cavidade pleural foi lavada com 1,0 mL de tampão fosfato estéril contendo EDTA (10 μ M). Para

avaliar se o subtipo de receptor de taquicicina NK1 está envolvido na pleurisia induzida por SP, foi usado o antagonista SR140333 na dose de 20 nmol/cav na cavidade pleural 5 min antes da injeção SP (20 nmol). A contagem total de leucócitos foi feita em contador hematológico ABX Micros 60 – Horiba.

1.3.5 Pleurisia induzida por ovalbumina (OVA)

A pleurisia induzida por ovoalbumina (OVA), por ser uma inflamação alérgica, foi realizada com algumas modificações (BEZERRA-SANTOS et al., 2006). Os animais foram sensibilizados com uma solução de OVA (50 µg) e Al(OH)₃ (5 mg) dissolvidos em salina e administrados no 1º e 7º dia por i.p. O desafio alérgico foi realizado sete dias após a última sensibilização. Os animais foram pré-tratados por v.o. com os derivados isoxazolina-acilhidrazonas aza-bicíclicos **R-99** e **R-123** (5, 15 e 45 mg/kg), dexametasona (0,5 mg/kg), veículo (salina 0,9% + DMSO 5%) ou salina (0,9%, v.o.). Após uma hora, os animais foram anestesiados com uma solução de cloridrato de cetamina a 10% (0,1 mL/100g peso corpóreo) e cloridrato de xilazina a 2% (0,07 mL/100g peso corpóreo) por via intraperitoneal. O espaço intercostal entre a quarta e quinta costela foi exposto cirurgicamente e a pleurisia foi induzida pela injeção intrapleural (i.pl.) de 0,1 mL de OVA (12 µg/cav). Após 24 horas os animais foram eutanasiados, o tórax aberto e a cavidade pleural foi lavada com 1,0 mL de tampão fosfato estéril contendo EDTA (10 µM). A contagem total de leucócitos foi feita em contador hematológico ABX Micros 60 – Horiba. Para melhor compreensão, o delineamento experimental do modelo de pleurisia alérgica induzida por OVA está representado na Figura 2.

Figura 2 - Delineamento experimental do teste farmacológico de derivados isoxazolina-acilhidrazonas aza-bicíclicos **R-99 e **R-123** em modelo de pleurisia alérgica induzida por OVA**



Fonte: Elaborado pela autora (2018).

(D) dia.

1.3.6. Determinação dos níveis de óxido nítrico e citocinas

Para avaliar a produção de óxido nítrico (NO), as concentrações de nitrito (metabolito estável do NO) foram medidas no sobrenadante do exsudato da pleurisia induzida por carragenina. Uma alíquota de 50 µL de amostra foi transferida para uma microplaca de 96 poços e incubada com 50 µL de reagente de Griess modificado (sulfanilamida 1%, N-(1-naftil) etilenodiamina dicloridrato 0,1%, H₃PO₄ 5%) por 10 min em temperatura ambiente protegido da luz. A absorbância foi medida em 540 nm em leitor de microplacas e a concentração de nitrato foi calculada usando uma curva padrão de nitrito de sódio. Os resultados foram expressos em µM (GIUSTARINI et al., 2008).

A quantificação de TNF-α e IL-1β foram determinadas pela técnica de ELISA sanduíche utilizando Kits específicos para camundongos, de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA). Os resultados foram expressos em pg/mL.

1.3.7 Ensaio da atividade da mieloperoxidase (MPO)

Para a avaliação da atividade da enzima MPO foi utilizada a metodologia de Bradley e colaboradores (1982). Tecidos pulmonares do teste da pleurisia induzida por carragenina foram coletados e pesados. Cada fragmento do órgão foi homogeneizado numa solução contendo tampão fosfato de sódio 10 mM (pH 7,0) e 0,5% (w v) de *brometo de hexadeciltrimetilamônio* (HTAB). O homogenato foi centrifugado durante 5 min a 7.000 rpm, e uma alíquota do sobrenadante foi deixado para reagir com uma solução de peróxido de hidrogênio e o-dianisidine em tampão fosfato de sódio. A atividade da MPO foi medida pela taxa de variação da absorbância a 450 nm após 5 minutos de incubação.

1.3.8 Análise histopatológica

Após a realização da lavagem da cavidade torácica, os pulmões foram perfundidos com salina contendo 20 mM de EDTA e removidos. O lobo esquerdo foi infundido com formalina tamponada a 10 % e conservado na mesma solução até o processamento histológico. As lâminas foram preparadas a partir de blocos de parafina de tecido pulmonar e corados com hematoxilina-eosina (HE) para análise histopatológica em microscópio óptico.

Para as quantificações das áreas inflamadas, foram atribuídos graus de 0 a 3 [0 – ausente (até 4 células por campo); 1 – discreto (de 5 a 15 células por campo); 2 – moderado (de 6 a 25 células por campo) e 3 – abundante (acima de 26 células por campo)], de acordo com as escalas propostas por Motohiro et al. (1986) e Lossos et al. (2000).

1.3.9 Determinação da viabilidade celular em mastócitos da linhagem P815

A viabilidade celular dos derivados **R-99** e **R-123** 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 sais 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, 100 μ L dos compostos: **R-99** e **R-123** (1,56 - 200 μ M) foram adicionados a cada poço e incubadas durante 24, 48 e 72 h a 37 ° C.

Após cada período de incubação, o corante MTT (25 μ L; 0,5 mg/mL) foi adicionado aos poços, e o ensaio foi incubado durante mais 3 h. Em seguida, o meio foi removido e 100 μ L de DMSO foi adicionado aos poços para solubilizar os sais de formazan. A densidade óptica dos poços foi medida a 540 nm, e foi comparada com as do grupo 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%).

1.3.10. Avaliação de células alvo “*in vitro*” - mastócitos

Para quantificação da desgranulação anafilática, foram utilizadas células da linhagem RBL-2H3. As células foram cultivadas em meio DEMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, Sigma Chemical Co.) suplementado com 15% de soro fetal bovino (Cultilab), penicilina (1x10⁶ U/mL) e estreptomicina (0,2 g/mL) e mantidas em atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37°C.

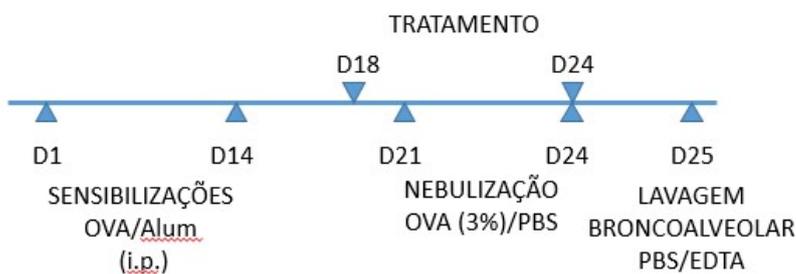
A avaliação da desgranulação de mastócitos foi realizada através da quantificação da taxa de liberação de β -hexosaminidase (β -hex) no sobrenadante da cultura, conforme descrito por Han et al., 2009. Para realização do ensaio, células em confluência foram

tripsinizadas com uma solução de tripsina 0,125% (Gibco BRL) e EDTA 0,02% (Sigma Chemical Co.), centrifugadas a 1000 rpm por 5 min e $1,25 \times 10^5$ células/poço foram semeadas em placas de 48 poços. Para avaliação da desgranulação anafilática, as células foram sensibilizadas com IgE anti-DNP (1 $\mu\text{g/mL}$, Sigma Chemical Co.) e incubadas por 20 h. Em seguida, as células foram incubadas com os derivados **R-99** e **R-123** (10^{-8} a 10^{-5} M) ou veículo (DMSO 0,1%) durante 1 h. Após esse período, as células foram estimuladas com DNP-BSA (10 ng/mL , Sigma Chemical Co.) em meio tyrode durante 45 min. O sobrenadante foi recolhido e as células foram lisadas com 20 μL de Triton X-100 1%. Em seguida, 10 μL do sobrenadante da cultura ou do lisado celular foi incubado com 40 μL do substrato (p-nitrofenil-B-D.2-acetamido-2-deoxi-glicopiranosídeo 4 mM em tampão de citrato de sódio, pH 4,5). A reação foi interrompida com a adição de 150 μL de glicina 0,2 M. A secreção de β -hexosaminidase foi mensurada através de um espectrofotômetro no comprimento de onda de 405 nm. A liberação de β -hexosaminidase foi expressa como uma porcentagem da β -hexosaminidase total presente na célula.

1.3.11 Modelo de asma experimental induzida por ovalbumina

O modelo experimental de asma brônquica foi desenvolvido em animais da linhagem BALB/c machos sensibilizados e desafiados com OVA. Cada animal recebeu uma dose de 50 μg de ovalbumina (OVA) e 5,0 mg de hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) dissolvidos em salina e administrada por via intra-peritoneal (i.p.) no 1º e 14º dia. Durante o 18º ao 24º dia, em um intervalo de 24 h, os camundongos foram tratados por via oral com os derivados **R-99** e **R-123** (5, 15 e 45 mg/kg), dexametasona (0,5 mg/kg) ou veículo (salina + DMSO 5%). Do 21º ao 24º dia os camundongos foram nebulizados durante 30 minutos com ovalbumina a 3% em solução salina, ou apenas salina para o grupo basal, utilizando um nebulizador. Após 24 horas após o último desafio, a lavagem broncoalveolar (BAL) foi realizada utilizando 1,5 mL de solução salina tamponada estéril (PBS) + EDTA 10 mM (LEE et al., 2006; REIS et al., 2015). As alíquotas do lavado foram coletadas para a quantificação dos números total de células e contagem diferencial. O pulmão foi coletado para análise histológica e morfométrica e dosagem de citocinas. Para melhor visualização, a Figura abaixo representa o delineamento experimental do modelo de asma brônquica (Figura 3).

Figura 3 - Delineamento experimental do teste farmacológico de derivados isoxazolina-acilhidrazonas R-99 e R-123 em modelo de asma brônquica experimental



Fonte: Elaborado pela autora (2018).

(D) dia.

1.3.11.1 Avaliação de hiper-reatividade das vias aéreas e função pulmonar

A avaliação da função pulmonar foi realizada através de pletismografia de corpo inteiro invasiva (Buxco). Os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal, com 60 mg/kg de nembutal e curarizados com 1 mg/kg de brometo de pancurônio (Pavulon®). Após traqueostomia para a inserção de uma cânula, os animais foram acomodados em uma cama aquecida para manutenção da temperatura corporal. Em seguida, a cânula endotraqueal foi conectada a um ventilador mecânico com a finalidade de manter os parâmetros de fluxo e volume constantes. Concomitantemente, um cateter preenchido com água foi inserido por via oral para detecção da pressão esofágica. A detecção do fluxo respiratório foi realizada através de um pneumotacógrafo acoplado à câmara do pletismógrafo. Os valores de pressão esofágica e pressão resultante do fluxo respiratório foram registrados e transferidos a um computador através de um transdutor ligado a câmara do pletismógrafo. Os parâmetros de resistência (cmH₂O.s/mL) e elastância (cmH₂O/mL) pulmonares foram determinados a partir processamento dos valores de fluxo e pressão através do *software* ByoSystem XA.

A avaliação da hiper-reatividade das vias aéreas foi realizada mediante aerossolização de concentrações crescentes (3, 9, 27 e 81 mg/mL) de metacolina, onde a resposta a cada dose do agente broncoconstritor foi registrada durante 5 minutos.

1.3.11.2 Lavado broncoalveolar

Após a análise de função pulmonar, os camundongos foram sacrificados através de anestesia terminal com 500 mg/kg tiopental (Thiopentax, Cristália) por via intraperitoneal, e em seguida, a traqueia foi dissecada e canulada. O BAL obtido das lavagens foram centrifugadas a 110 x g durante 10 min, e ao “*pellet*” resultante foi adicionado 250 µL de PBS/EDTA 10 mM. Alíquotas das amostras foram diluídas em Türk (ácido acético glacial 2% e azul de metileno) a uma proporção de 1:10 e a contagem de células totais foi realizada em câmara de Neubauer em microscópio óptico. A contagem diferencial de células mononucleares, eosinófilos e neutrófilos foi realizada em amostras citocentrifugadas a uma rotação de 47 x g, por 5 min (Fanem) e corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa. A avaliação foi feita em microscópio ótico com objetiva de imersão em óleo (objetiva 100x).

1.3.11.3 Obtenção de tecido pulmonar

Após a realização do BAL, os pulmões foram perfundidos, com o auxílio de uma cânula intracardíaca, contendo salina com EDTA 10 mM, seguido da remoção dos pulmões. O lobo direito do pulmão foi fragmentado, congelado em nitrogênio líquido e conservado a -80°C para análises posteriores. O lobo esquerdo foi infundido com formol tamponado a 10% e conservado na mesma solução até o processamento histológico.

1.3.11.4 Determinação dos níveis de citocinas

Os fragmentos do pulmão recolhidos do modelo de asma brônquica induzida por OVA foram armazenados em um freezer -20°C, para a determinação dos níveis citocinas. A quantificação eotaxina 1, IL-5, IL-13, MIP-1 e MCP-1 foram determinadas pela técnica de ELISA sanduíche, utilizando Kits específicos para camundongos, de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA).

1.3.11.5 Análise histopatológica

Os tecidos pulmonares fixados em formalina tamponada a 10% foram posteriormente desidratados e embebidos em parafina. Para exame histológico, seções de

4 µm dos tecidos fixados foram cortados com o auxílio de um micrômetro e colocados em lâminas de vidro, desparafinizados e corados sequencialmente com sirius red pH 10.2 para análise histopatológica em microscópio óptico. Os tecidos também foram corados para a análise da quantificação das fibras de colágeno com o auxílio da coloração de tricrômio de Masson.

1.3.12 Atividade expectorante

A atividade expectorante foi determinada por medição de vermelho de fenol (ENCLER; SZELENYI, 1984). Os animais foram pré-tratados por via oral com os derivados isoxazolina-acilhidrazonas **R-99** e **R-123** (15 mg/kg), ambroxol (5 mg/kg) ou veículo (salina + DMSO 5%). Uma hora após o tratamento, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de vermelho de fenol (5%). Trinta minutos após a administração de vermelho de fenol, os animais foram eutanasiados por exposição a CO₂. Toda a traqueia foi cuidadosamente retirada e colocada em 1 mL de solução salina e imediatamente levada ao ultrassom por um período de 30 min. Posteriormente, foi adicionado 0,1 mL de NaOH 1M para estabilizar o pH do lavado. A concentração de vermelho de fenol foi medida em espectrofotômetro a 546 nm e os resultados foram expressos em µg/mL.

1.3.13 Nocicepção induzida por ácido acético

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

1.3.14 Nociceção induzida por formalina

Uma hora antes da indução por formalina, os camundongos receberam por via oral (v.o.) os derivados **R-99** e **R-123** (15 mg/kg), veículo (salina + DMSO 5%) e por via subcutânea (s.c.) morfina (5 mg/kg). Os animais foram colocados individualmente sob funis de vidro transparente por um período de adaptação de 20 min. Em seguida, cada animal recebeu uma injeção intraplantar, contendo 20 µL de solução de formalina a 2,5 % na pata posterior direita. Logo após a injeção, os animais foram colocados individualmente, sob o funil de vidro e o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi avaliado durante 30 min. Este modelo permite avaliar duas fases de sensibilidade dolorosa: a primeira fase, que ocorre durante os primeiros 5 min após a injeção de formalina (dor de origem neurogênica); e a segunda fase, que ocorre entre 15 e 30 min após administração da formalina, que corresponde a resposta tônica à dor, acompanhada de uma resposta inflamatória, ambas relacionadas à liberação de mediadores inflamatórios (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

1.3.15 Nociceção induzida por capsaicina

Esse teste foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Campos et al. (1997). Diferentes grupos de animais foram tratados por via oral (v.o.) com o veículo (salina + DMSO 5%) e os derivados (**R-99** e **R-123**, 15 mg/kg), e por via intraperitoneal (i.p.) com o vermelho de rutênio (3,0 mg/kg). Em seguida, os animais foram aclimatados em funis de vidro por 20 minutos antes do desafio com 20 µL de capsaicina (agonista TRPV1; 1,6 µg/pata) por 30 ou 60 min após os tratamentos. Os animais foram observados por cinco minutos consecutivos após a injeção de capsaicina. O tempo que o animal passou lambendo a pata posterior direita injetada foi cronometrado e foi considerado como indicativo de nociceção (SAKURADA et al., 1992; CAMPOS et al., 1997).

1.3.16 Alodinia mecânica induzida pelo adjuvante completo de Freund (CFA)

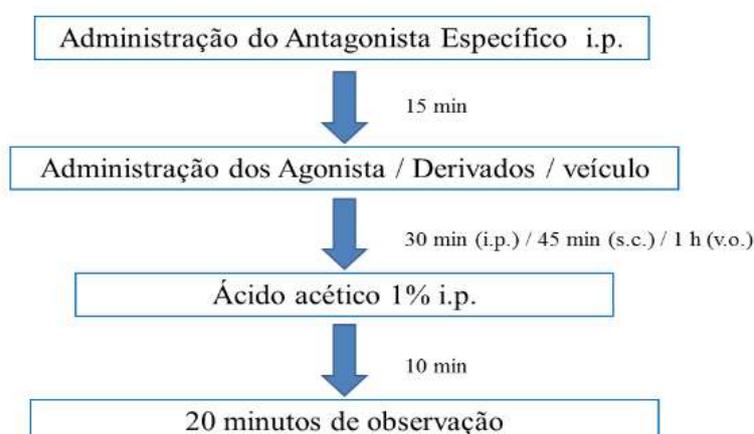
Os camundongos foram colocados sobre uma plataforma com fundo de tela de arame durante 30 minutos para a aclimatação, sendo a reatividade basal ou a alodínia mecânica avaliadas pelo contato da pata traseira direita com o analgesímetro digital Von Frey. No dia anterior à indução da inflamação, a resposta basal de todos os animais foi verificada. Para analisar o efeito preventivo sobre a alodinia mecânica, os animais foram previamente tratados por via oral com os derivados **R-99** e **R-123** (15 mg/kg), veículo

(salina + DMSO 5%) e dexametasona (0,5 mg/kg, v.o.). Seguida uma hora do tratamento, os animais receberam uma injeção de 20 μ L de CFA intraplantar e a alodinia mecânica foi avaliada a cada hora durante 12 horas. Com o intuito de verificar o efeito curativo, os animais receberam 20 μ L de CFA intraplantar e após 24 horas foram tratados por via oral (v.o.) com os derivados **R-99** e **R-123** (15 mg/kg), veículo (salina + DMSO 5%) e dexametasona (0,5 mg/kg), duas vezes ao dia (12 em 12 hs). Seis horas após a primeira dose do tratamento, a alodinia mecânica foi avaliada em intervalos de 24 horas até o 15º dia do experimento. Os animais receberam os tratamentos do 2º ao 6º dia (após a injeção de CFA) com uma pausa do 7º ao 11º dia, e receberam novamente o tratamento entre o 12º e o 15º dia (CUNHA et al., 2004, QUINTÃO et al., 2012).

1.3.17 Análise dos possíveis sistemas envolvidos no mecanismo de ação antinociceptivo

Nesta etapa, foram avaliados os possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito antinociceptivo dos derivados **R-99** e **R-123**. Para isto, analisou-se o envolvimento dos sistemas opioide, adrenérgico e/ou colinérgico através da realização de ensaios farmacológicos *in vivo* utilizando diferentes antagonistas e agonistas. A reversão ou não do efeito antinociceptivo foi estudado no modelo de nocicepção induzido por ácido acético. Para melhor visualização, a figura abaixo representa o protocolo experimental para a determinação do mecanismo de ação (Figura 4).

Figura 4 - Fluxograma do protocolo utilizado no estudo para a determinação do mecanismo de ação dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas aza-bicíclicos **R-99 e **R-123****



Fonte: Elaborado pela autora (2018).

1.3.17.1 Participação do sistema opioide

Para avaliar a participação do sistema opioide no efeito antinociceptivo dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas aza-bicíclicos, os animais foram pré-tratados com naloxona (5 mg/kg, i.p.), um antagonista opioide não-seletivo, 15 min antes da administração da morfina (5 mg/kg, s.c.); dos derivados **R-99** e **R-123** (15 mg/kg, v.o.); e do veículo (salina + DMSO 5%). Outro grupo de animais foi tratado somente com as substâncias: morfina (5 mg/kg, s.c.), derivados **R-99** e **R-123** (15 mg/kg, v.o.), e veículo (salina + DMSO 5%). Decorrido 1 h para os animais tratados por v.o. e 45 min para a via s.c., todos os grupos receberam uma injeção i.p. de ácido acético 1% (0,1 mL/10g do peso do animal) na cavidade peritoneal. O limiar nociceptivo foi avaliado dez minutos após a aplicação do ácido acético e o número de contorções foi observado durante 20 minutos (DE SOUZA et al., 2009).

1.3.17.2 Participação do sistema α -adrenérgico

Com o intuito de avaliar a possível participação dos receptores α 1-adrenérgicos no efeito antinociceptivo dos derivados **R-99** e **R-123**, animais foram pré-tratados com prazosina (0,15 mg/kg, i.p.), um antagonista dos adrenoreceptores α 1, 15 min antes da administração da fenilefrina (agonista α 1-adrenérgico; 10 mg/kg, i.p.), dos derivados **R-99** e **R-123** (15 mg/kg, v.o.) ou do veículo (salina + DMSO 5%). Outro grupo de animais foi tratado somente com as substâncias: fenilefrina (10 mg/kg, i.p.), derivados **R-99** e **R-123** (15 mg/kg, v.o.) ou veículo (salina + DMSO 5%).

Com o objetivo de avaliar se o efeito antinociceptivo apresentado por **R-99** e **R-123** estaria envolvendo a participação dos receptores α 2-adrenérgicos, os animais foram pré-tratados com ioimbina (antagonista dos receptores α 2-adrenérgicos, 0,5 mg/kg, i.p.), 15 min antes da administração da clonidina (agonista α 2-adrenérgico; 0,1 mg/kg, i.p.), dos derivados **R-99** e **R-123** (15 mg/kg, v.o.) ou do veículo (salina + DMSO 5%). Outro grupo de animais foi tratado somente com as substâncias clonidina (0,1 mg/kg, i.p.), derivados **R-99** e **R-123** (15 mg/kg, v.o.) ou veículo (salina + DMSO 5%).

Decorrido 1 h para os animais tratados por v.o. e 30 min para a via i.p., todos os grupos receberam uma injeção i.p. de ácido acético 1% (0,1 mL/10g do peso do animal) na cavidade peritoneal. O limiar nociceptivo foi avaliado dez minutos após a aplicação

do ácido acético e o número de contorções foi observado durante 20 minutos (DE SOUZA et al., 2009).

1.3.17.3 Participação do Sistema Colinérgico

Para avaliar a possível participação do sistema colinérgico no efeito antinociceptivo dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas, os animais foram pré-tratados com atropina (antagonista colinérgico; 5 mg/kg, i.p.), quinze minutos antes da administração da pilocarpina (5 mg/kg, i.p.), dos derivados **R-99** e **R-123** (15 mg/kg, v.o.) ou do veículo (salina + DMSO 5%). Outro grupo de animais foi tratado somente com as substâncias: pilocarpina (5 mg/kg, i.p.), derivados **R-99** e **R-123** (15 mg/kg, v.o.) ou veículo (salina + DMSO 5%). Decorrido 1 h para os animais tratados por v.o. e 30 min para a via i.p., todos os grupos receberam uma injeção i.p. de ácido acético 1% (0,1 mL/10g do peso do animal) na cavidade peritoneal. O limiar nociceptivo foi avaliado dez minutos após a aplicação do ácido acético e o número de contorções foi observado durante 20 minutos (GUGINSKI et al., 2009).

1.3.17.4 Participação do Óxido Nítrico

Para avaliar se a via da L-arginina-óxido nítrico está envolvida no efeito antinociceptivo dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas, os animais foram pré-tratados com L-arginina (100 mg/kg, i.p.), um precursor da síntese do óxido nítrico, 15 min antes da administração da L-NAME (20 mg/kg, i.p.), dos derivados **R-99** e **R-123** (15 mg/kg, v.o.) ou do veículo (salina + DMSO 5%). Outro grupo de animais foi tratado somente com as substâncias: L-NAME (20 mg/kg, i.p.), derivados **R-99** e **R-123** (15 mg/kg, v.o.) ou veículo (salina + DMSO 5%). Decorrido 1 h para os animais tratados por v.o. e 30 min para a via i.p. todos os grupos receberam uma injeção i.p. de ácido acético 1% (0,1 mL/10g do peso do animal) na cavidade peritoneal. O limiar nociceptivo foi avaliado dez minutos após a aplicação do ácido acético e o número de contorções foi observado durante 20 minutos (KHALID et al., 2012).

1.3.17.5 Participação dos canais de K⁺ dependentes de ATP

Para avaliar a possível participação dos canais de K⁺ dependentes de ATP no efeito antinociceptivo dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas, os animais foram pré-

tratados com glibenclamida (10 mg/kg, i.p.), um bloqueador de *canais* de K^+ ATP-dependentes, 15 min antes da administração dos derivados **R-99** e **R-123** (15 mg/kg, v.o.) ou do veículo (salina + DMSO 5%). Outro grupo de animais foram tratados somente com os derivados **R-99** e **R-123** (15 mg/kg, v.o.) e com o veículo (salina + DMSO 5%). Decorrido 1 h para os animais tratados por v.o. e 30 min para a via i.p., todos os grupos receberam uma injeção i.p. de ácido acético 1% (0,1 mL/10g do peso do animal) na cavidade peritoneal. O limiar nociceptivo foi avaliado dez minutos após a aplicação do ácido acético e o número de contorções foi observado durante 20 minutos (KHALID et al., 2012).

1.3.18 Avaliação da coordenação motora (teste do rota-rod)

Esse teste permite avaliar se os tratamentos promovem alteração na coordenação motora dos animais por sedação e/ou relaxamento muscular (DUNHAM; MIYA, 1957). O aparelho do rota-rod (Insight®, Brasil) é constituído de uma barra, subdividida em quatro compartimentos (HOLZMANN et al., 2011). A barra gira a uma velocidade constante de 25 rpm. Os animais foram selecionados previamente a fim de eliminar aqueles que não permaneceram na barra por dois períodos consecutivos de 60 segundos. Os animais foram tratados com o veículo (salina + DMSO 5%, v.o.), **R-99** e **R-123** (15 mg/kg, v.o.) e diazepam (10 mg/kg, v.o.), 60 minutos antes de serem colocados no aparelho. Os resultados foram expressos como o tempo em segundos que os animais permanecem na barra do equipamento. O *cut-off* foi de 60 segundos.

1.3.19 Modelo do campo aberto (*open field*)

Este teste é baseado na metodologia descrita por Sielgel (1946) e validado por Archer (1973). Foi utilizado para avaliar a ação dos derivados **R-99** e **R-123** sobre a atividade locomotora, procurando assim, eliminar a hipótese de que o animal estivesse sob um efeito depressor do Sistema Nervoso Central (SNC), ao invés do efeito antinociceptivo esperado. O modelo do campo aberto é utilizado para a avaliação de compostos estimulantes ou depressores do SNC e permite observar como o animal se comporta em um ambiente novo medindo o seu estado emocional. Os animais foram tratados com os derivados **R-99** e **R-123** (15 mg/kg, v.o.), diazepam (10 mg/kg, v.o.) ou veículo (salina + DMSO 5%, v.o.) 1 h antes de serem submetidos ao teste. O aparelho consiste em uma caixa (30 x 15 x 30 cm) dividida em nove quadrados. Cada animal foi

colocado individualmente em um canto da caixa. Para avaliar esta atividade foram registrados os seguintes parâmetros: movimentação espontânea dos animais (número de cruzamentos com as quatro patas entre as divisões do campo, definida como exploração horizontal), número de comportamentos de auto-limpeza (*grooming*), número de levantamentos (*rearing* conhecida como exploração vertical) e defecação (número de bolos fecais), durante um período de 5 min.

1.3.20 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm EPM (erro padrão da média) ou média \pm DPM (desvio padrão da média), no modelo de expectoração. A significância estatística entre os grupos foi avaliada por análise de variância de uma via (ANOVA), ou duas vias (ANOVA), dependendo do modelo, seguida do teste de Tukey com intervalo de confiança de 95% ou 99%, utilizando o software Graph Pad prism. 7.0. Valores de “p” menores que 0,05 ($p < 0,05$) ou 0,01 ($p < 0,01$) foram considerados como indicativos de significância.

Os experimentos de alodinia mecânica induzida por CFA foram estatisticamente avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) por duas vias seguido pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, utilizando o software *Graph Pad prism. 7.0*. Valores de “p” menores que 0,01 ($p < 0,01$) foram considerados como indicativos de significância.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DERIVADOS ISOXAZOLINA-ACILHIDRAZONAS

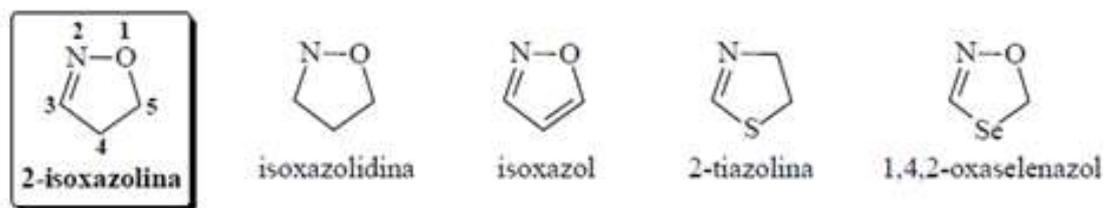
A conjugação de características estruturais definidas de dois compostos bioativos distintos, em uma nova molécula, representa a estratégia de hibridação molecular de um composto protótipo (REIS et al., 2011). Assim, hibridação molecular entre os núcleos isoxazolínicos e acilhidrazonas, funcionalidade que apresenta inúmeras atividades biológicas, como veremos a seguir, potencializou os efeitos farmacológicos das novas substâncias. Estudos realizados por Mota (2013) demonstraram que derivados isoxazolina-acilhidrazonas possuem atividades anti-inflamatórias e analgésicas promissoras.

2.1.1 Propriedades biológicas das isoxazolininas

Compostos heterocíclicos possuem papéis importantes na medicina e nos sistemas biológicos. A maioria dos fármacos e compostos naturais, por exemplo cafeína, morfina, nicotina, cefalosporinas e penicilinas, consiste em compostos heterocíclicos (SARKER; NAHAR, 2011). Esses compostos são encontrados na maioria das preparações de fármacos conhecidas como antibióticos, neurotrópicos, cardiovasculares, anticarcinogênicos, entre outros (STEFANI, 2009).

Os compostos orgânicos que possuem anéis pentagonais contendo dois ou mais heteroátomos como nitrogênio, oxigênio, selênio ou enxofre na sua estrutura apresentam uma função importante na síntese de novos fármacos (Figura 5). Diferentes atividades são apresentadas por esses compostos orgânicos devido a alterações que o heteroátomo causa nas propriedades estruturais e eletrônicas da molécula por conta da presença de pares de elétrons e da diferença de eletronegatividade entre o heteroátomo e o carbono na estrutura cíclica levando a novas propriedades físico-químicas e reatividade, as quais podem ser exploradas na preparação de compostos orgânicos com propriedades específicas (TAVARES, 2010). Heterocíclicos de cinco membros, contendo átomos de oxigênio e nitrogênio ligados entre si, tem despertado grande interesse, devido ao grande potencial biológico que essas substâncias apresentam.

Figura 5 - Exemplos de heterocíclicos pentagonais.

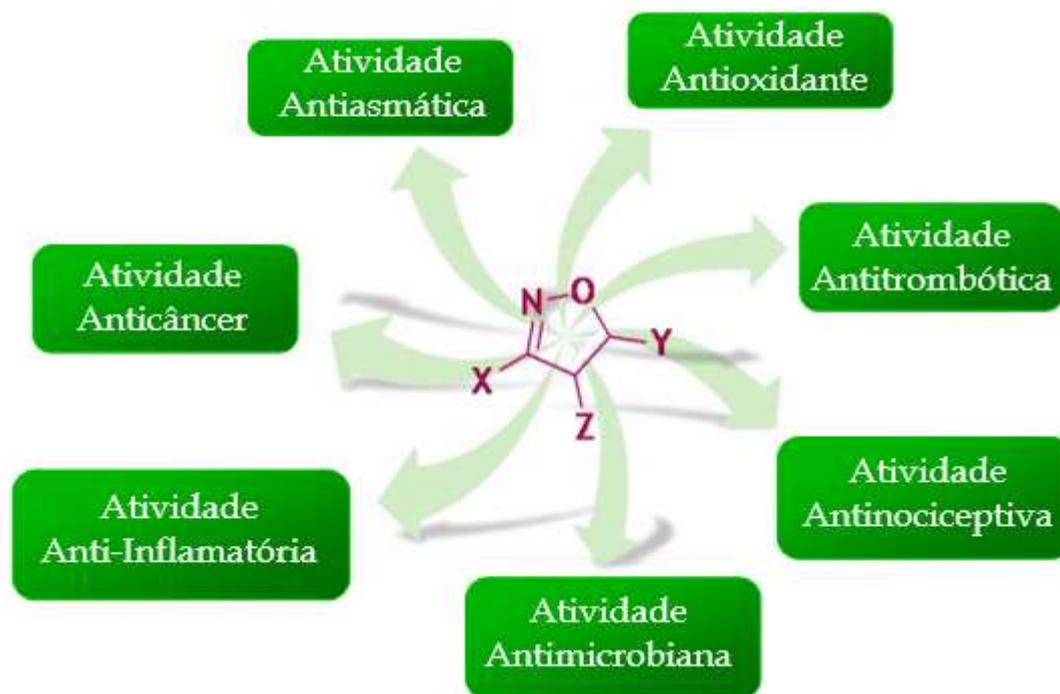


Fonte: MOTA, 2013

Dos heterocíclicos descritos acima, particularmente as 2-isoxazolininas despertam grande interesse em estratégias sintéticas que visam a obtenção de substâncias com potenciais atividades biológicas. O anel isoxazolinínico é um representante importante do grupo dos ciclos 1,2-azóis. Tem como característica a presença de dois heteroátomos, um átomo de oxigênio na posição 1 e um átomo de nitrogênio na posição 2 do anel, com uma insaturação sp^2 entre a ligação N – C (Figura 5) (TAVARES, 2010).

A síntese de moléculas com potencial aplicação em diversas áreas da química orgânica leva em consideração os grupamentos laterais das espécies envolvidas na cicloadição. Os intermediários contendo o anel isoxazolina com grupos laterais reativos possibilitam uma variedade de transformações em suas estruturas, possibilitando a síntese de novas moléculas com inúmeras atividades farmacológicas como antibacteriana (PATEL; KUMARI; PATEL, 2014), antifúngica (BASAPPA et al., 2003; PATEL; KUMARI; PATEL, 2014), antioxidante (KALIRAJAN et al., 2012), antitrombótica (QUAN et al., 2003), anti-inflamatória (BASAPPA et al., 2004; PARK et al., 2006; ALAM et al., 2011; GHIDINI et al., 2014), anticâncer (KAMAL et al., 2011; KHAZIR et al., 2013), anti-hiperglicêmico (GOYARD et al., 2016), analgésica (REIS et al., 2011), antiasmática (DUPLANTIER et al., 2001; GHIDINI et al., 2014), afinidade e eficácia sobre receptores β -adrenérgicos (DALLANOCE et al., 2006), agonista seletivo de receptores colinérgicos nicotínicos $\alpha 7$ (DALLANOCE et al., 2011) entre outros (Figura 6).

Figura 6 - Atividades biológicas dos compostos contendo o anel isoxazolina.



Fonte: Elaborado pela autora (2018)

A literatura relata vários exemplos de compostos bioativos, contendo o núcleo 2-isoxazolina, que tem apresentado os mais diversos tipos de atividade biológica (ALMEIDA, 2008). Substâncias contendo 2-isoxazolininas em suas estruturas são relatadas como antagonistas dos receptores da superfície celular, glicoproteína IIb/IIIa, impedindo a ligação do fibrinogênio e conseqüentemente a agregação plaquetária, sendo portanto, um atrativo representante do arsenal terapêutico no tratamento de aterosclerose e trombose (WITYAK et al, 1999; ALMEIDA, 2008). Outros estudos com relação à atividade antitrombótica também mostraram que os derivados isoxazolininas atuam como potentes inibidores do fator Xa (PRUITT et al, 2000). A inibição do fator Xa tem surgido como um alvo atrativo para aplicação terapêutica, potencial no tratamento de trombose venosa e arterial (QUAN et al, 2003).

Também há muitos relatos de atividade anti-inflamatória e analgésica para substâncias que apresentam o núcleo 2-isoxazolina. Relatou-se recentemente que substâncias esteroidais, contendo o núcleo 2-isoxazolina em sua estrutura, apresentaram excelente atividade anti-inflamatória e alta afinidade com os glico-receptores. Essas

substâncias mostraram-se, em média, 5 vezes mais potentes que a prednisolona (PARK et al, 2006).

Bassapa et al. (2004) sintetizaram vários derivados isoxazolininas que apresentaram ação inibitória da fosfolipase A2, uma classe de enzimas que catalisa a hidrólise de fosfolipídios da membrana celular no ácido araquidônico, este é metabolizado pelas cicloxigenases 1 e 2 (COX) e lipoxigenases (LOX) na produção dos mediadores inflamatórios, tais como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos. Derivados de 2-isoxazolininas apresentaram atividades inibidoras de enzimas proteolíticas, envolvidas em processos inflamatórios crônicos, como artrite reumática, enfisema pulmonar, entre outros, relatados por Groutas e colaboradores (1995).

Estudos realizados por Ghidini et al. (2015) demonstraram que derivados isoxazolinina inibiam o TNF α , consequentemente inibindo a liberação de IL-8, e inibiram também o óxido nítrico (NO). Além disso, estes derivados apresentaram atividade no modelo de inflamação alérgica pulmonar em ratos. Vários pesquisadores têm investigado a interação de 2-isoxazolininas com os receptores β 1 e β 2 adrenérgicos. Os derivados 2-isoxazolininas estudados apresentaram ação antagonista com este tipo de receptor (BRESCHI et al., 1996; CONTI et al., 1998; DALLANOCE et al., 2006).

Amici e colaboradores (2003) demonstraram que derivados de 2-isoxazolininas apresentaram alta afinidade pelos receptores muscarínicos M1, encontrados nos gânglios parassimpáticos e tecido neuronal, com ação agonista, sendo, portanto, um potencial fármaco no tratamento de doenças degenerativas, como a doença de Alzheimer. Além de apresentarem atividade sobre receptores muscarínicos, análogos 2-isoxazolininas são caracterizados como potentes e seletivos agonistas α 7 nicotínicos, com maior afinidade para receptores nicotínicos neuronais de acetilcolina (nAChRs) α 7 e α 4 β 2 (DALLANOCE et al, 2011).

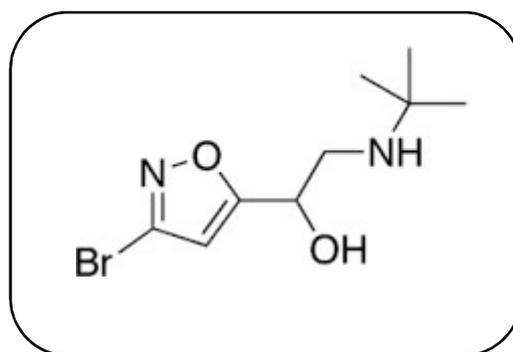
Estudos recentes demonstram que derivados isoxazolininas bloqueiam a regulação do estímulo do canal iônico de cloro dos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) e L-glutamato específico dos invertebrados, pulgas e carrapatos, agindo como ectoparasitocidas, sem apresentar efeitos colaterais em gatos e cachorros (ZHANG et al, 2016; MCTIER et al, 2016).

O anel de isoxazolinina está estruturalmente relacionado com o broxaterol [hidroclorato de 1-(3-bromo-5-isoxazolil)-2-(tert-butil-amino)-etanol]. Este composto é um agonista β 2-adrenérgico potente e seletivo, desenvolvido como um potencial agente

broncodilatador na terapia da asma (NAVA et al, 1992; BEHR et al, 2006; SARKER; NAHAR, 2011) (Figura 7).

Os efeitos secundários mais frequentes associados com broxaterol foram tremores, nervosismo e palpitações. Geralmente esses sintomas ocorriam de forma leve, transitória e relacionada com a dose (ZIMENT, 1989).

Figura 7 - Estrutura química do Broxaterol.

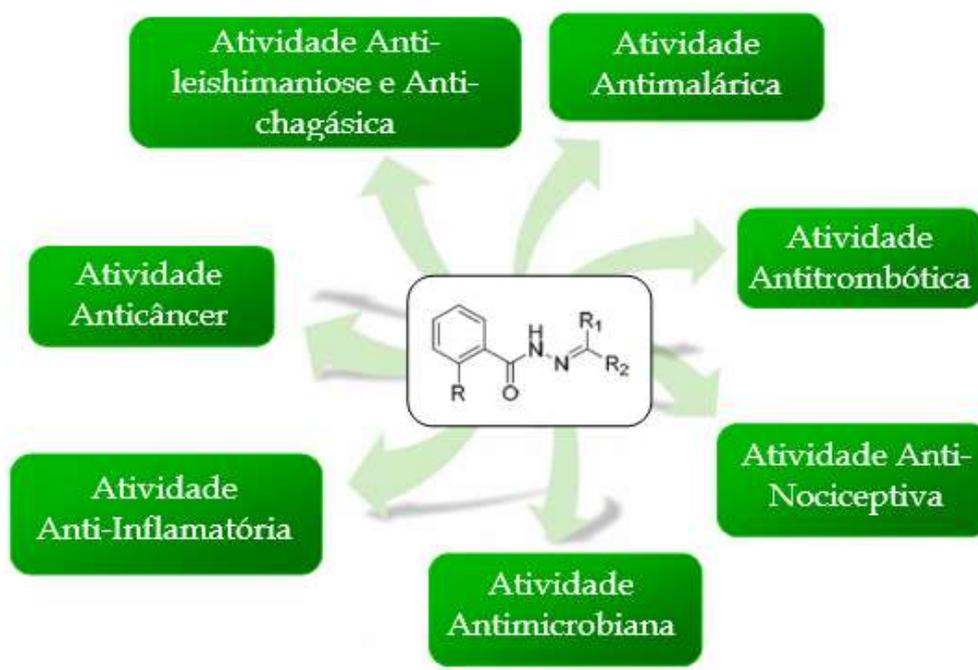


Fonte: SARKER; NAHAR (2011).

2.1.2 Propriedades biológicas das acilhidrazonas

Moléculas contendo a função acilhidrazona vêm sendo estudadas devido as suas diversas propriedades farmacológicas. Na literatura encontram-se relatos de propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antitrombóticas (FRAGA et al., 2000; BARREIRO et al., 2002; CUNHA et al., 2002; LIMA et al., 2008; AVILA et al., 2010; ÜNSAL-TAN et al., 2010; SILVA et al., 2010; HERNÁNDEZ et al., 2012a). Os mecanismos de ação destes compostos podem envolver a inibição de enzimas pró-inflamatórias como as COXs e a 5-LOX (HIGGS; VANE, 1983; SILVA et al, 2010; HERNÁNDEZ et al., 2012a). Alguns trabalhos também demonstram atividades antitumoral e antiviral (TIAN et al., 2009; JIN et al., 2010; CUI et al., 2010; YU; SHI; KE; 2015, RUPIANI et al., 2015). Derivados acilhidrazônicos também são candidatos a fármacos contra doenças negligenciadas como tuberculose, doença de Chagas e leishmaniose exibindo excelentes índices de seletividade (CARVALHO et al., 2012; HERNÁNDEZ et al., 2012b), além de apresentarem atividade antibacteriana e antimalárica (MELNYK et al., 2006; WANG et al., 2012; JIN et al., 2012) (Figura 8)..

Figura 8 - Atividades biológicas dos compostos contendo a função N-acilhidrazona.



Fonte: Elaborado pela autora (2018)

2.2 INFLAMAÇÃO

2.2.1 Fisiopatologia da inflamação

A inflamação é uma reação complexa envolvendo componentes celulares e moleculares. É um processo fisiológico acionado toda vez em que um agente agressor físico, químico ou biológico, ultrapassa uma barreira primária de defesa do corpo humano, camada epitelial e/ou endotelial e suas estruturas especializadas. A reação inflamatória envolve o reconhecimento do estímulo lesivo, para sua posterior destruição e tentativa de reconstruir o tecido danificado. Portanto, a inflamação tem como objetivo principal recompor a homeostase do tecido lesado pela ativação dos componentes específicos e não específicos da imunidade (GALLIN et al., 1992; PAUL, 1998, NATHAN, 2002, ZHOU et al., 2007).

O processo de reconhecimento, a geração de células efetoras e de seus produtos (citocinas e anticorpos) são importantes. O processo inflamatório é orquestrado por uma interação entre mediadores e células inflamatórias, que podem ser dividido em três etapas:

1) Fase aguda, caracterizada por vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar; 2) Fase subaguda, caracterizada pela infiltração de leucócitos e células fagocitárias; 3) Fase crônica proliferativa onde ocorre a degeneração do tecido e fibrose (SACCA; CUFF; RUDDLE, 1997; MURI; SPOSITO; METSAVAHT, 2009).

O reconhecimento a uma agente agressor desencadeia a ativação e a amplificação do sistema imune resultante da ativação de células e liberação de diversos mediadores responsáveis pela resposta inflamatória. No entanto, se a destruição do agente agressor e o processo de reparo não ocorrem de maneira eficiente e sincronizada, a resposta inflamatória pode levar a uma lesão tecidual persistente, induzida pelo acúmulo de leucócitos e colágeno, entre outras substâncias que podem ser prejudiciais ao organismo (NATHAN, 2002). Quando a resposta inflamatória é excessiva e prolongada pode levar a diversas desordens que resultam nas patologias mais prevalentes, como as doenças reumáticas, diabetes, autoimunes, doença de Alzheimer e aterosclerose (SERHAN; CHIANG, 2004).

A característica clássica da inflamação aguda é a vasodilatação, que é produzida por diversos mediadores como: histamina, prostaglandina E2 (PGE2), interleucina 1 β (IL-1 β), óxido nítrico (NO), dentre outros. Primeiramente a vasodilatação é mediada pelo NO e prostaglandinas vasodilatadoras (PGE2 e PGI2). O NO é produzido a partir da L-arginina pela ação do óxido nítrico sintase (NOS). Os leucócitos ativados produzem NOS induzível (iNOS) depois da exposição a produtos microbianos e citocinas pró-inflamatórias (VALLANCE; CHAN, 2001; CHIU et al., 2011). O edema é provocado por fluxo de proteínas do leito vascular para o interstício como resultado da ação de mediadores como a histamina, bradicinina (BK), leucotrienos C4, D4 e E4 (LTC4, LTD4 e LTE4), substância P (SP), componentes do sistema complemento e fator de ativação plaquetária (PAF). Estes mediadores favorecem o aumento da permeabilidade vascular ao plasma e proteínas (DENZLINGER et al., 1985; ARYA; KUMAR, 2005).

A inflamação pode se manifestar como um processo agudo ou crônico. A inflamação aguda tem duração relativamente curta, de minutos, horas ou alguns dias, e suas principais características são o aumento do fluxo sanguíneo, resultando em eritema, seguido pelo extravasamento de plasma e de proteínas plasmáticas, que contribuem para o desenvolvimento do edema. A migração celular, outro fenômeno marcante, ocorre como resultado da produção local de vários mediadores inflamatórios com atividade

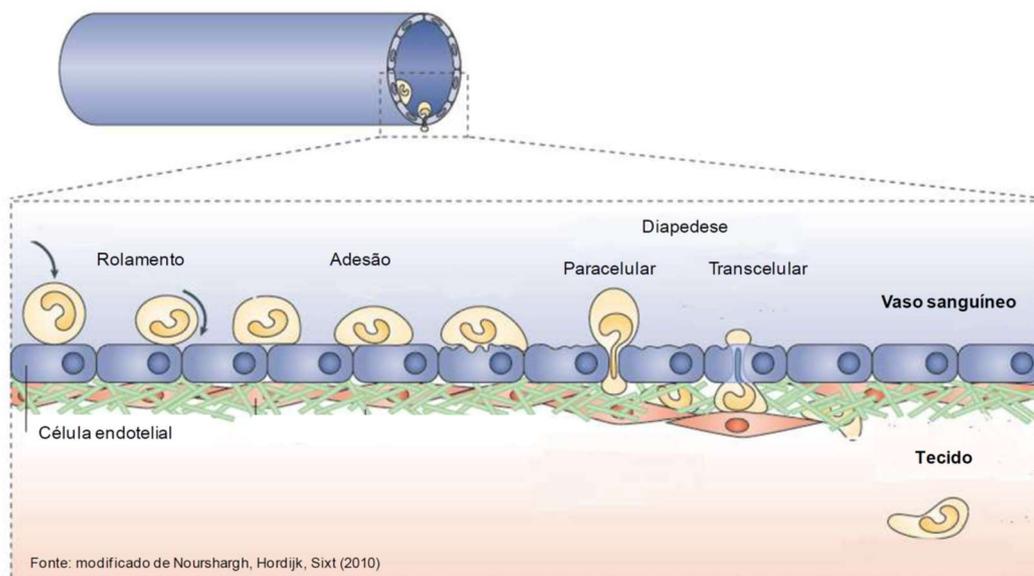
quimiotática e de alterações das proteínas de membrana do endotélio vascular (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

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

Os eventos celulares são marcados pela saída das células circulantes da luz do vaso e a migração de leucócitos (principalmente neutrófilos e monócitos) para o sítio inflamatório. Esse fenômeno segue algumas fases como: rolamento dos leucócitos pelo endotélio, adesão firme, transmigração ou diapedese e quimiotaxia (Figura 9). Todas estas etapas do processo de migração leucocitária são dependentes da expressão pelos leucócitos e pelas células endoteliais de moléculas de adesão: selectinas (que são formadas por três variedades: E-selectina, P-selectina e a L-selectina), as integrinas, as imunoglobulinas e as caderinas; de mediadores quimiotáticos como a interleucina-8 (IL-8), o fator do complemento C5a e o LTB4 (KELLY; KWANG; KUBES, 2007; BILATE, 2007).

Durante o processo inflamatório agudo ocorrem diversos eventos mediados por componentes solúveis, celulares e vasculares que induzem alterações morfológicas e bioquímicas. Entre eles, podemos observar três eventos principais: (a) aumento do calibre das arteríolas, capilares e vênulas, cujo objetivo é causar um aumento de permeabilidade e de fluxo sanguíneo; (b) exsudação de líquido, incluindo proteínas plasmáticas como albumina, fatores do complemento e anticorpos, e (c) migração de leucócitos do espaço intravascular para o foco inflamatório (Figura 9) (GALLIN et al., 1992; PAUL, 1998).

Figura 9 - Migração de neutrófilos. Para alcançar o foco inflamatório, os neutrófilos da corrente sanguínea são ativados e realizam o processo de rolamento, adesão e diapedese.



Fonte: modificado de NOURSHARGH; HORDIJK; SIXT (2010).

O estímulo inflamatório induz a formação e a liberação de substâncias farmacologicamente ativas, capazes de gerar mudanças na morfologia e integridade das células endoteliais. Fatores solúveis, como histamina e cininas, promovem alterações no fluxo sanguíneo e na permeabilidade vascular. Várias células têm sido responsabilizadas por iniciar a cascata de eventos dos processos inflamatórios. Entre elas, destacam-se os mastócitos, que são células que sintetizam e estocam no interior dos seus grânulos mediadores inflamatórios, como a própria histamina e proteases. Além desses, ocorre produção e liberação de leucotrienos, prostaglandinas, citocinas do tipo IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-14, TNF- α e de quimiocinas como MIP-1 α e MCP-1 (BENOIST; MATHIS, 2002).

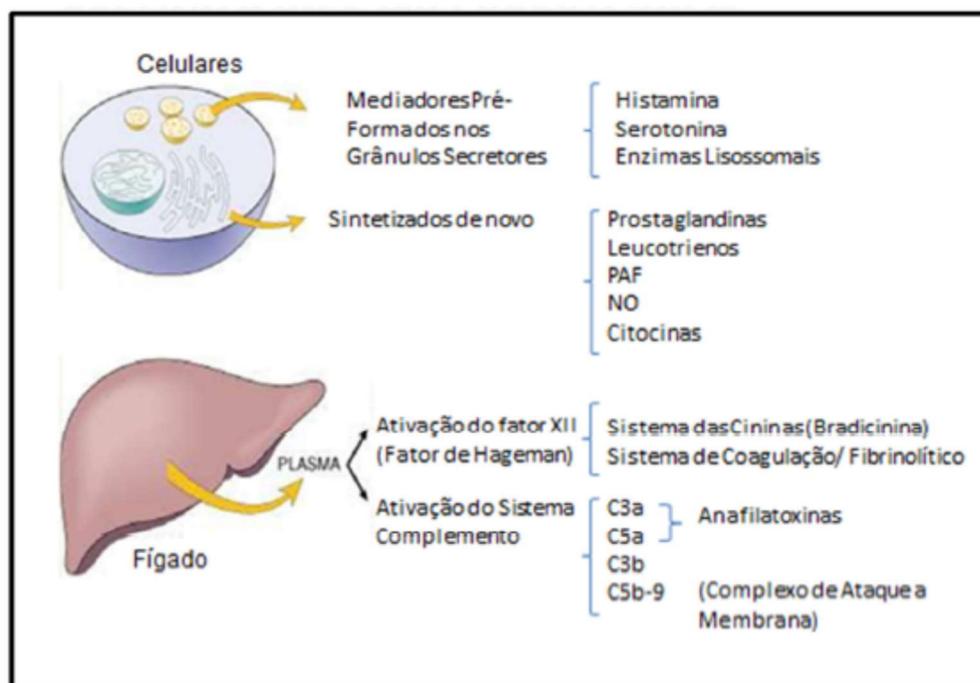
A inflamação crônica ocorre quando há um estímulo agressor persistente, que ocasiona a destruição contínua dos tecidos, tentativas de cicatrização por reparo fibroso, além de respostas auto-imunes (ZHANG; CAO; ZHANG, 2009). É uma inflamação de longa duração e está associada à presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, alterações histológicas, fibrose e necrose tecidual, prolongando-se por períodos bem mais extensos que a inflamação aguda. Ocorre quando há um estímulo agressor persistente, que ocasiona uma destruição contínua dos tecidos e há tentativas de cicatrização por reparo fibroso além de respostas auto-imunes (FERREIRA; LORENZETTI; POOLE, 1993; ZHANG; CAO; ZHANG, 2009).

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

2.2.2 Mediadores químicos da inflamação

Os fenômenos da inflamação são mediados por substâncias químicas, cuja interação é complexa. Elas são oriundas do plasma, leucócitos, plaquetas, endotélio e tecido conjuntivo (Figura 10).

Figura 10 - Mediadores químicos da inflamação.



Fonte: KUMAR; ABBAS; FAUSTO (2005).

Vários mediadores inflamatórios, como bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, serotonina, histamina, substância P, tromboxanos, fator de ativação plaquetária, adenosina, adenosina trifosfato (ATP), prótons e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio atuam no desenvolvimento da resposta inflamatória. As citocinas

são um grupo diversificado de peptídeos e glicopeptídeos que coordenam e ativam as respostas das células do sistema imune. As citocinas são secretadas por diferentes células em resposta a uma variedade de estímulos e induzem efeitos característicos sobre o crescimento, a motilidade, a diferenciação e a função das células alvo. Essas substâncias também atuam em vários processos como cicatrização, hematopoese e angiogênese. Uma determinada citocina pode ser secretada individualmente ou como parte de uma resposta coordenada, juntamente com outras citocinas não relacionadas. Além disso, uma citocina pode induzir a expressão de outras citocinas ou mediadores, induzindo, assim, uma cascata de efeitos biológicos que amplificam a resposta inflamatória e influenciam a sua evolução. Interleucinas (ILs), interferons (IFNs), fatores estimuladores de colônia (CSFs), quimiocinas e o fator de crescimento transformante beta (TGF β) fazem parte desse grupo (COLLINS, 1999; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Além dessas citocinas, destacam-se os fatores de necrose tumoral (TNFs). Estes mediadores que exercem um papel fundamental nas inflamações aguda e crônica e no desenvolvimento de desordens autoimunes e câncer. Entre os diversos tipos de TNF, destacam-se o TNF- α e o TNF- β , produzidos principalmente por macrófagos e linfócitos T, respectivamente (TANSEY; SZYMKOWSKI, 2009). As interações dos TNFs com seus receptores, TNFR1 ou TNFR2, podem resultar na ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) e da proteína ativadora-1 (AP-1), responsáveis pela transcrição de genes para citocinas inflamatórias diversas. Além de estimularem a produção de vários mediadores inflamatórios, os TNFs podem induzir apoptose, formação de espécies reativas de oxigênio e necrose (CHU, 2013).

2.2.3 Resposta imune e inflamação

O sistema imune é responsável pelos processos de reparo tecidual como também pela defesa do organismo e a resposta imune pode ser classificada em imunidade inata e adquirida. 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).

Na imunidade inata, os macrófagos entram em ação secretando 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 interferon gama (IFN- γ), que são liberadas por linfócitos e NK (JANEWAY et al., 2010; PARSLOW et al., 2004). Dentre os mediadores que atuam como vasodilatadores e contribuem para a migração leucocitária está a bradicinina. Ela estimula a produção de uma cascata de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-8, IL-6 e IL-1 β) e a liberação de prostaglandinas e aminas simpaticomiméticas, que induzem a hipernocicepção e a dor (CUNHA et al., 1992; VERRI, 2007).

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

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

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

ativação de células B, quimiotaxia de leucócitos, ativação dos macrófagos, deposição de fibrina e dor (WATKINS et al., 1995).

2.3 ASMA

A asma é um transtorno inflamatório crônico associada a uma hiperatividade das vias aéreas em resposta a determinados fatores desencadeantes como infecções virais, exercício físico ou exposição a diferentes alérgenos, com a obstrução do fluxo aéreo e com sintomas respiratórios como chiados, tosse e sensação de opressão do tórax (GINA, 2015). Durante um ataque de asma, a mucosa dos brônquios incha, causando estreitamento das vias aéreas e a redução do fluxo de ar para dentro e para fora dos pulmões (WHO, 2016). Essa hiper-reatividade das vias respiratórias é acompanhada do aumento da irritabilidade sensoriais das vias respiratórias e aumento da secreção do muco. A asma é uma doença heterogênea que relaciona a imunopatologia, fenótipos clínicos, e respostas às terapias. As diferentes expressões clínicas da asma envolvem diferentes fatores ambientais que interagem com as vias aéreas para causar inflamação aguda ou crônica, e as contribuições variadas de contração do músculo liso, edema e remodelação dos elementos formados das vias aéreas. A heterogeneidade da asma também se relaciona com a diferente resposta às terapias (HOLGATE, 2008).

2.3.1 Fisiopatologia da asma

Na asma, muitas células e elementos celulares desempenham papéis importantes, tais como: mastócitos, eosinófilos, neutrófilos (especialmente no início súbito, exacerbações fatais, asma ocupacional, e os pacientes que fumam), linfócitos T, macrófagos e células epiteliais. Em indivíduos susceptíveis, esta inflamação causa episódios recorrentes de tosse (especialmente à noite ou no início da manhã), chiado, falta de ar e aperto no peito. Estes episódios são normalmente associados com obstrução ao fluxo aéreo generalizado variável que muitas vezes é reversível espontaneamente ou com tratamento (NAEPP - Programa Nacional para a Educação e Prevenção da Asma dos Estados Unidos, 2007).

A etiologia da asma é multifatorial. A predisposição genética e os fatores de risco ambientais (poluição atmosférica, fumo, ácaro, pólen, poeira) são possíveis fatores associados ao desencadeamento da patologia. A asma caracteriza-se por uma resposta

imediate e ampla a uma reexposição a alérgenos. A resposta imune exacerbada provocada na asma é dependente de linfócitos T CD4⁺, que secretam as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 (ROBINSON et al, 1992; YSSEL et al, 2000; FIREMAN et al, 2003). O início desta resposta ocorre quando alérgenos que entram nas vias aéreas ultrapassam as barreiras do trato respiratório e são reconhecidos, fagocitados, processados e apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) presentes no pulmão (fase de sensibilização) via complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) aos linfócitos T auxiliares (Th) que irão se diferenciar em Th2. Os subtipos de linfócitos T CD4 são classificados em Th1 e Th2 de acordo com o perfil de citocinas liberados por essas células. O subtipo Th2 controla a resposta alérgica através da produção de citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (JUTEL et al, 2002).

Uma vez que as vias aéreas tenham sido sensibilizadas, a reexposição à alérgenos conduz a uma reação de fase aguda, conhecida como reação alérgica de fase imediata ou reação de hipersensibilidade imediata tipo I. Em muitos indivíduos, esse processo pode ser seguido por uma reação de fase tardia (VIGNOLA et al., 2001; GALLI et al, 2008).

A fase imediata da reação alérgica é iniciada quando um indivíduo atópico previamente sensibilizado entra em contato com o alérgeno. Este antígeno se ligará às IgEs que se encontram associadas aos receptores específicos de alta afinidade FcεRI, situado nas membranas de mastócitos e basófilos. A ligação do alérgeno às IgEs promove a ativação dessas células com consequente desgranulação (BOUSQUET et al, 2000). Entre as múltiplas substâncias liberadas imediatamente ou secretadas logo após a ativação dessas células temos a histamina, leucotrienos, substâncias quimiotáticas para eosinófilos e neutrófilos, proteases, heparina e fatores de ativação plaquetária. Esses fatores causam fenômenos como dilatação de vasos sanguíneos locais, atração de eosinófilos e neutrófilos para o local da reação, lesão de tecidos locais pela protease, aumento da permeabilidade capilar e perda de líquidos para os tecidos, e contração de células musculares lisas locais, que, coletivamente, causam o aumento da permeabilidade vascular, broncoconstrição, contração da musculatura lisa, aumento na produção de muco e inflamação local (PAWANKAR, 1999; SILVA; VARGAFTIG, 2005).

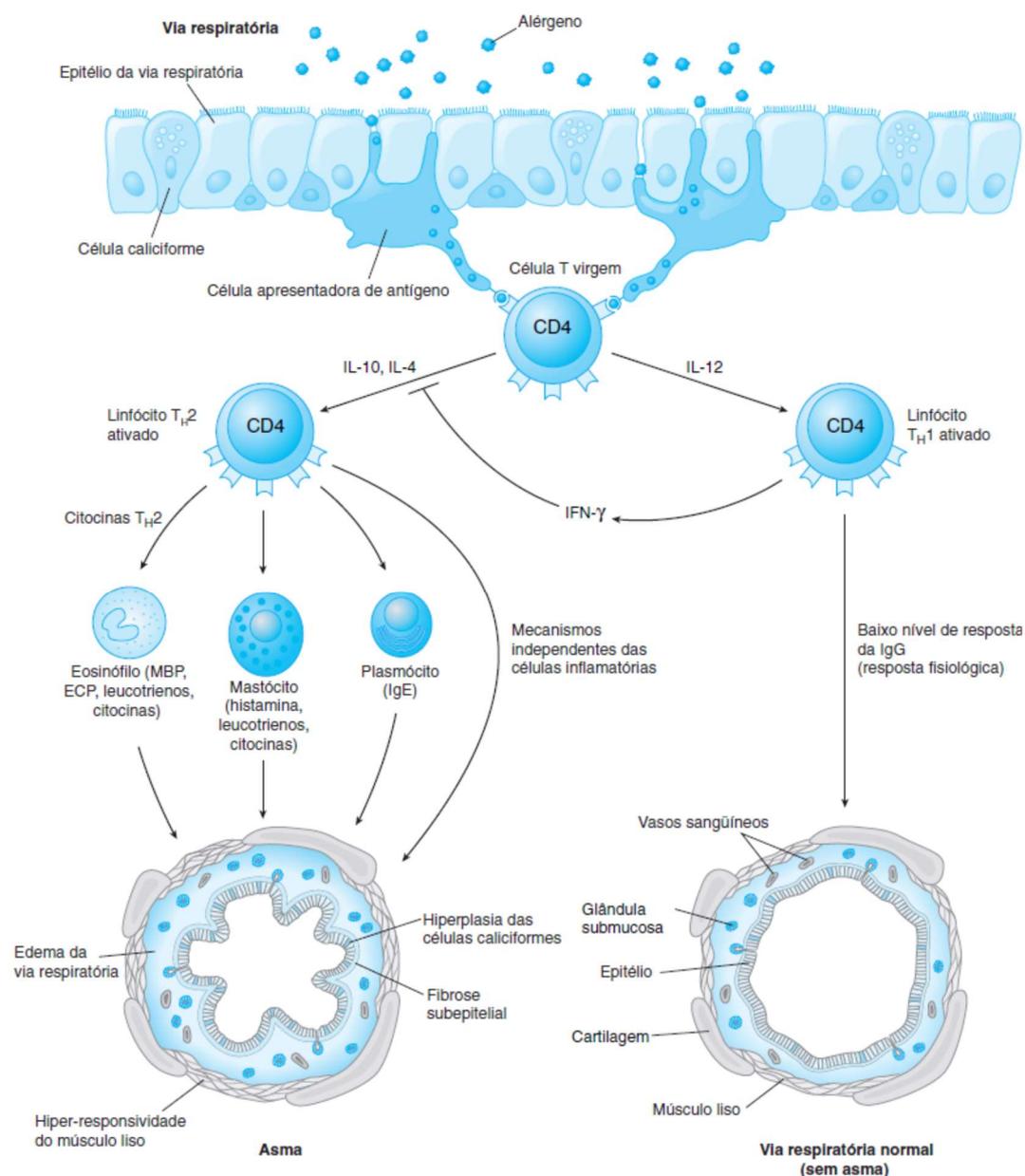
A fase tardia da reação alérgica compreende eventos celulares e a produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios e ocorre entre 6 e 9 h após o contato com o alérgeno. Essa fase envolve o recrutamento e a ativação de eosinófilos, células T CD4⁺, basófilos, neutrófilos e macrófagos. As células Th2 produzem citocinas inflamatórias que

são capazes de amplificar a sua própria proliferação, de células B e eosinófilos, dando continuidade ao ciclo de ativação novamente (BUSSE; ROSENWASSER, 2000). O eosinófilo desempenha um papel central na patogenia das doenças alérgicas por ser uma potente célula efetora citotóxica. Este tipo celular possui um reservatório de proteínas básicas, assim como de mediadores lipídicos e radicais de oxigênio, com grande poder de destruição tecidual e parasitário, podendo causar lesão tecidual (LOPES et al, 2006). Sua função é estimulada por mediadores lipídicos e citocinas liberadas por outras células. A Figura 11 esquematiza os eventos que ocorrem na asma.

A parede das vias aéreas é infiltrada com células T CD4 e eosinófilos. Mastócitos, macrófagos, plasmócitos e neutrófilos são variavelmente aumentados em número. A neutrofilia é encontrada em casos de asma grave ou em exacerbações. No lúmen das vias aéreas, há a presença de muco repleto de macrófagos ativados, linfócitos, eosinófilos e células epiteliais que se desprenderam do tecido danificado. A inflamação persistente em pacientes com asma leva a alterações estruturais no parênquima pulmonar. Essas mudanças histopatológicas, coletivamente chamadas de remodelamento das vias aéreas, resultam da interação entre mediadores inflamatórios e células estromais (COHN et al, 2004).

Os eosinófilos são classificados como granulócitos por causa dos grânulos citotóxicos que compõem a estrutura. Após a desgranulação, essas células liberam proteínas tóxicas tais como neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN), proteína de eosinófilos catiônica (ECP), peroxidase eosinofílica (EPO) e proteína eosinofílica básica principal (MBP). A liberação de grânulos dos eosinófilos, devido à ruptura mecânica causada por lesão externa, infecções parasitárias, ou a ativação mediada por citocina, tais como IL-5, manifesta as respostas inflamatórias (BLANCHARD; ROTHENBERG, 2009).

Figura 11 - Esquema de ativação de linfócitos Th2 por alérgeno e desencadeamento da asma brônquica (GOLAN, 2014). Proteína básica principal (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP), imunoglobulina E (IgE) e imunoglobulina G (IgG).



Fonte: GOLAN et al. (2014).

Estudos ultraestruturais com o uso de anticorpos monoclonais revelaram que a espessura da membrana basal verdadeira está inalterada na asma, ocorrendo na verdade uma deposição de fibras colágenas, o que lhe confere a aparência de espessamento à microscopia ótica (SILVA; VARGAFTIG, 2005). Enquanto na membrana basal verdadeira os miofibroblastos secretam colágeno tipo IV, fibronectina e laminina, na asma, o colágeno subepitelial consiste predominantemente nos tipos III e V, fibronectina,

mas não há laminina. Os miofibroblastos são ativados por diversos componentes da resposta inflamatória, como mastócitos, eosinófilos e macrófagos. Os principais componentes do remodelamento brônquico da asma são: alteração do depósito/degradação de componentes da matriz extracelular, neovascularização da submucosa, hipertrofia e hiperplasia do músculo liso, hiperplasia de glândulas mucosas e alterações do epitélio brônquico (TEMELKOVSKI et al., 1998; WARD et al., 2002; HOMER; ELIAS, 2005).

A persistência do processo inflamatório e o desencadeamento de várias respostas tardias podem culminar para um processo de reparo crônico de natureza progressiva, conhecido como remodelamento pulmonar (DE KLUIJVER et al, 2005).

A asma representa um processo inflamatório crônico das vias aéreas seguido de cicatrização cujo resultado final pode ser uma alteração estrutural denominada remodelamento das vias aéreas. O reparo geralmente envolve dois processos distintos: a regeneração, que é a substituição de tecido lesado por células parenquimatosas do mesmo tipo; e sua substituição pelo tecido conjuntivo e eventual maturação em tecido cicatricial. Em muitos casos, ambos os processos contribuem para a resposta de cicatrização e inflamação. Na asma, os processos de migração, diferenciação e maturação das células, bem como a deposição de tecido conjuntivo, podem ser seguidos pela restituição completa ou alterada da estrutura e da função das vias aéreas, sendo esta última frequentemente vista como fibrose (BOUSQUET et al, 2000).

Os tipos de células inflamatórias mais proeminentes observadas nas vias aéreas afetadas pela asma são mastócitos, eosinófilos, células Th2 e neutrófilos, e estas células imunes demonstraram ter papéis específicos na progressão da inflamação para o remodelamento das vias respiratórias em pacientes asmáticos (JEFFERY et al. 2000). Embora as células Th2 tenham sido conhecidas há muito tempo pelo seu papel nas respostas inflamatórias alérgicas crônicas, mais recentemente foi demonstrado que essas células contribuem especificamente para a remodelação pulmonar através do aumento da hiperplasia do músculo liso e da metaplasia epitelial (ROYCE et al, 2012). Além disso, a infiltração eosinofílica observada na inflamação das vias aéreas resulta em níveis aumentados do fator de transformação do crescimento β derivado de eosinófilos (TGF β), uma potente citocina profibrótica conhecida por estimular a diferenciação de fibroblastos e a deposição de colágeno, levando a fibrose subepitelial e posterior rigidez das paredes traqueobrônquicas (BARNES, 2008c).

A fibrose é um processo dinâmico que envolve o equilíbrio das metaloproteinases da matriz (MMPs) e seus inibidores, os inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs). A MMP-9 é encontrada em quantidades exageradas no escarro e nas biópsias de pacientes com asma. A MMP-8 é a MMP principal encontrada em locais de cicatrização normal da ferida e é produzida e ativada de forma exagerada em feridas não cicatrizantes - um paradigma intrigante para a via aérea asmática. TIMP-1 também está presente em quantidades exageradas no escarro e biópsias de pacientes com asma. Os níveis de TIMP-1 correlacionam-se com a obstrução asmática das vias aéreas e a produção exagerada de TIMP-1 pode participar na geração de fibrose asmática das vias aéreas. Além disso, em alguns distúrbios fibróticos reversíveis, a resolução da fibrose está temporariamente associada a uma diminuição acentuada na expressão de TIMP-1 e TIMP-2 (ELIAS et al, 1999).

Também se demonstrou que os mastócitos contribuem para a remodelação das vias aéreas através da liberação de mediadores inflamatórios tais como triptase, histamina e outras citocinas (BARNES, 2008c).

2.3.2 Terapia antiasmática

A terapêutica antiasmática engloba duas categorias: fármacos utilizados para o alívio rápido de sintomas nos casos de crises (broncodilatadores) e fármacos com ação preventiva em longo prazo (principalmente os anti-inflamatórios) (KATZUNG, 2008). O tratamento da asma inclui fármacos que reduzem a quantidade de IgE ligada aos mastócitos (omalizumabe), fármacos que evitam a desgranulação mastocitária (cromoglicato dissódico e nedocromil), bloqueadores da ação dos produtos liberados na via das lipoxigenases (antileucotrienos), fármacos que inibem o efeito da acetilcolina liberada pelos nervos motores vagais (anticolinérgicos), ou fármacos com capacidade relaxante direta nas vias aéreas (agonistas β_2 adrenérgicos e teofilina). Como a asma é também caracterizada pelo aumento de processos inflamatórios, outra alternativa terapêutica é o uso de anti-inflamatórios esteroidais (glicocorticoides) que reduzem a inflamação nas vias aéreas. Atualmente a terapêutica antiasmática, em particular a conjugação de fármacos por via inalatória, é bastante eficaz, segura e acessível. Todavia, a utilização prolongada de corticosteróides por via inalatória levanta algumas questões devido aos seus efeitos adversos (BARNES, 2010).

2.3.2.1 Agonistas β_2 adrenérgicos

Os agonistas β_2 adrenérgicos são os broncodilatadores mais eficazes (BARNES, 2008a). A ação broncodilatadora deve-se ao seu efeito agonista sobre os β adrenoreceptores, uma vez que a estimulação dos receptores β_2 adrenérgicos ativa a adenilatociclase (AC). Esta enzima induz o aumento do AMP cíclico intracelular, e dá-se então uma diminuição da atividade miosina-cinase de cadeia leve, o que conseqüentemente, resultará no relaxamento da musculatura lisa das vias aéreas. Promove ainda a estabilização da membrana dos mastócitos, estimulação do músculo esquelético e estimulação da motilidade ciliar da mucosa, facilitando a remoção de muco (BARNES, 2008a; CAZZOLA et al, 2013).

2.3.2.2 Anticolinérgicos

Os fármacos anticolinérgicos têm ganhado um papel importante como complemento na terapia antiasmática, uma vez que na fisiopatologia da asma ocorre o aumento do tônus do musculo liso que promove situações de broncoconstrição, edema e secreção de muco. O tônus da musculatura lisa, a produção e secreção de muco apresentam uma regulação neuro-hormonal onde interveem receptores muscarínicos encontrados nas vias respiratórias. Ao ser exercido um estímulo nos receptores M1 existentes nos gânglios parassimpáticos, é desencadeado um impulso nervoso que aumenta o tônus colinérgico broncoconstritor. Por outro lado, a estimulação de receptores M2 pré-sinápticos impede a liberação do mediador. A acetilcolina exerce a sua função broncoconstritora e produtora de muco atuando nos receptores M1 e M3. No músculo liso das vias respiratórias, além de receptores muscarínicos também se encontram receptores adrenérgicos, principalmente β_2 , que ao serem estimulados promovem o relaxamento da musculatura lisa. Já os receptores M2 estão localizados nos terminais colinérgicos e ao serem estimulados são responsáveis pela inibição da liberação de acetilcolina, promovendo a diminuição do tônus muscular (SMITH, 2013; SOLER; RAMSDELL, 2014). Desta forma, a acetilcolina exerce uma função reguladora das vias aéreas, tendo uma grande capacidade broncoconstritora e estimuladora de secreções. A desregulação de receptores muscarínicos desempenha um papel importante no desenvolvimento da fisiopatologia da asma (KUMMER; LIPS; PFEIL, 2008).

2.3.2.3 Metilxantinas

As metilxantinas inibem as fosfodiesterases III e IV, aumentando a concentração de AMPc e GMPc, o que conseqüentemente, provocará o relaxamento e a dilatação dos brônquios, estando desta forma indicadas no alívio rápido de sintomas. Já o seu papel anti-inflamatório é consequência do bloqueio dos receptores A1 e A2 da adenosina, da inibição da liberação de mediadores dos mastócitos como a fosfodiesterase 4 (PDE4) e da ativação da histona deacetilase 2 (HDAC2), inibindo assim a síntese de proteínas inflamatórias. Outros efeitos das metilxantinas englobam a melhoria da contratilidade do diafragma, diminuindo assim a sua fadiga, aumentam a estimulação de centros respiratórios medulares, melhorando a atividade simpática e a clearance mucociliar (BARNES, 2013).

2.3.2.4 Corticosteróides

Segundo Daley-Yates (2015) a elevada lipofilicidade dos corticosteroides permite-lhes atravessar a membrana celular e estabelecer interações com receptores citoplasmáticos. Assim, os corticosteróides participam na regulação genética através do seu efeito inibitório na acetilação da histona no núcleo da célula, podendo induzir ou reprimir a transcrição de genes específicos que codificam proteínas pró-inflamatórias e estimulando as anti-inflamatórias. Segundo Katzung (2008), Padden, Skoner e Hochhaus (2008), outros fatores que também contribuem para as poderosas propriedades anti-inflamatórias são o fato dos corticosteróides serem responsáveis pela redução da síntese de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas e leucotrienos, diminuindo a permeabilidade vascular, a presença de edema e a produção e secreção de muco. Estes fármacos são também responsáveis pelo aumento do número de receptores β_2 adrenérgicos, tornando-os desta forma, mais sensíveis à estimulação β_2 adrenérgica. Apesar de não atuarem diretamente no músculo liso brônquico provocando a sua dilatação, o seu efeito anti-inflamatório é consequência da inibição das citocinas inflamatórias, que diminuem a hiper-reatividade brônquica reduzindo a frequência de crises agudas de asma, quando tomados de forma regular (KATZUNG, 2008).

A asma foi implicada como uma doença inflamatória crônica e isto foi confirmado quando o potente corticosteroide prednisolona mostrou-se benéfico em pacientes com a doença. Alguns estudos com prednisolona oral destacaram que os níveis de eosinófilos

no sangue não foram alterados em pacientes que não respondiam ao tratamento. Esta evidência precoce levou ao desenvolvimento do conceito de asma resistente a corticosteroides (DURHAM et al, 2016). No entanto, a introdução de corticosteroides inalados (CSI) resultou em uma melhora drástica dos sintomas na maioria dos pacientes asmáticos do que estudos anteriores indicando que apenas 40% deles responderam bem, apresentando uma melhoria no volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1). Em comum com a maioria das doenças inflamatórias crônicas, os corticosteróides são capazes de atenuar a inflamação nas vias aéreas levando a uma reversão na queda do VEF1 associado à doença e uma redução na hiperresponsividade das vias aéreas (AHR). No entanto, CSIs não curam muitos dos sintomas de asma fazendo com que haja o retorno inflamação e a descontinuação do seu uso pelo paciente (DURHAM et al, 2016).

2.3.2.5 Antileucotrienos

Segundo Laidlaw e Boyce (2012) os leucotrienos cisteínicos são eicosanoides inflamatórios provenientes de mastócitos e eosinófilos, e resultam do metabolismo do ácido araquidônico. Na fisiopatologia da asma, os leucotrienos D4 quando inalados provocam uma broncoconstrição muito superior à constrição provocada pela metacolina ou histamina (GUIMARÃES; MOURA; SILVA, 2006). Além do seu efeito broncoconstritor, estes também apresentam um papel fundamental nos processos inflamatórios das vias aéreas, na medida em que promovem a secreção de muco, aumentam a permeabilidade vascular e interferem no recrutamento de eosinófilos (LAIDLAW; BOYCE, 2012). O zafirlucaste e montelucaste, sendo antagonistas dos receptores do CysLT1, impedem a ação de broncospasmo, inflamação da parede e quimiotaxia provocada pelos mesmos. O zileuton, ao inibir a 5-lipoxigenase, impede a síntese de leucotrienos. É um fármaco pouco utilizado, pois é necessário tomar 4 vezes ao dia (GUIMARÃES; MOURA; SILVA, 2006).

2.3.2.6 Anticorpos anti-IgE

IgE tem um papel central na patogênese da asma alérgica; a importância dos efeitos imunorreguladores mediadas por IgE de células dendríticas em dirigir a resposta inflamatória Th2 tem sido demonstrada. Omalizumabe, um anticorpo anti-IgE, pode inibir toda a cascata alérgica, impedindo a fase precoce e tardia da resposta alérgica (HOLGATE et al, 2005). Dados de ensaios clínicos realizados por Djukanovic e

colaboradores (2016), têm demonstrado uma redução significativa nas taxas de exacerbação da asma alérgica grave e outros desfechos clínicos, bem como a redução do uso de corticosteróide oral. Estudos têm mostrado maior eficácia do omalizumabe em adultos, e em crianças com asma grave não controlada mostrou uma redução na exacerbação após 2 anos de tratamento (KORN et al., 2009; DESCHILDRE et al, 2015; DJUKANOVIC et al, 2016).

2.3.2.7 Inibição de mediadores inflamatórios na asma

Mais de 100 mediadores estão envolvidos na inflamação asmática, incluindo várias citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. O bloqueio de um único mediador provavelmente é pouco eficaz nesta doença complexa, e os antagonistas desses mediadores até agora não provaram ser muito eficazes em comparação com as drogas que têm um amplo espectro de efeitos anti-inflamatórios, tais como corticosteroides. No entanto, o bloqueio citocinas Th2 tais como IL-4, IL-5 e IL-13, mesmo não sendo completamente explorada, tem mostrado alguns resultados promissores em pacientes selecionados com asma (ADCOCK; CARAMORI; CHUNG, 2008).

2.3.2.7.1 Anticorpos anti-IL-5

Entre os diversos mediadores solúveis que regulam a inflamação das vias aéreas na asma, a interleucina-5 (IL-5), produzida pelos linfócitos Th2, desempenha um papel importante na maturação, diferenciação, recrutamento e sobrevivência de eosinófilos. Estudos com camundongos knockout para IL-5 confirmam o importante papel que essa citocina desempenha nos modelos de asma apresentando uma eosinofilia e AHR marcadamente suprimidas. Os anticorpos monoclonais humanizados anti-IL-5 (mAbs), mepolizumabe, benralizumabe e reslizumabe têm sido desenvolvidos para uso clínico (CARAMORI et al, 2008).

Foi demonstrado em estudos anteriores que o uso de mepolizumabe em asmáticos com sintomatologia leve a moderada foi muito eficaz na redução da expectoração e da eosinofilia no sangue periférico, mas não teve efeito sobre os sinais clínicos da doença (LECKIE et al, 2000). Estudos posteriores mostraram que a mesma dose de mepolizumabe apenas reduziu parcialmente o número de eosinófilos nas biópsias

brônquicas de pacientes asmáticos, o que pode ter contribuído para a persistência dos sintomas (FLOOD-PAGE et al, 2003).

Dois outros anticorpos monoclonais humanizados anti-IL-5, benralizumabe e reslizumabe, apresentaram efeitos semelhantes a mepolizumabe no que diz respeito a diminuir as taxas em pacientes asmáticos com a doença mal controlada e com altos níveis de eosinófilos no sangue, apesar de doses elevadas de terapia CSI administradas (DURHAM et al, 2016). O mecanismo de ação do benralizumabe difere das ações de anticorpos monoclonais que se ligam à própria IL-5 evitando que essa interleucina se ligue ao seu receptor (PHAM et al, 2016). O reslizumabe reduz eosinófilos no escarro em pacientes com asma eosinofílica que é mal controlada com altas doses de CSIs em comparação com placebo (CASTRO et al, 2015).

2.3.2.7.2 Anticorpos anti-IL-4 e anti-IL-13

A IL-13 desempenha um papel crítico em diversos aspectos da inflamação das vias aéreas e remodelação epitelial, incluindo a metaplasia de células caliciformes e a sinalização epitelial-mesenquimal. Isto leva a um aumento da fibrose subepitelial ou hiperplasia do músculo liso das vias aéreas (NAROZNA et al, 2016). O bloqueio da IL-13, mas não de IL-4, em modelos animais de asma impede o desenvolvimento de AHR após ser desafiado com o alérgeno, apesar de uma forte resposta eosinofílica. Além disso, a IL-13 é eficaz em bloquear as ações do receptor IL-13Ra2, incluindo a produção de IgE, eosinofilia pulmonar e a AHR em modelos animais de asma (WILLS-KARP, 2004).

As IL-4 e IL-13 são importantes no acúmulo de eosinófilos e são fatores essenciais na síntese de IgE por células B. Também contribuem para produção de muco, fibrose brônquica e das vias aéreas hiperresponsividade na asma. Aumento dos níveis de IL-13 têm sido relatados na expectoração e biopsias de brônquios de pacientes com asma, correlacionando-se com a eosinofilia. Tralokinumabe (CAT-354 -MedImmune) é um anticorpo anti-IL-13 mAb IgG4 humanizado injetável para o potencial tratamento da asma (WALSH, 2015).

Estudos mostram que o uso de anti-IL-4 e anti-IL-13 em conjunto na asma eosinofílica moderada a severa e persistente, apresenta-se mais eficaz do que sua inibição isolada. Estudos com lebrikizumabe (anticorpo monoclonal humanizado IgG4 que se liga especificamente a IL-13 e inibindo sua função) e tralokinumabe relataram melhoria na

função pulmonar, entretanto não reduziu os sintomas de asma. A utilização desses mAbs reduziram o uso de β -agonistas com conseqüente melhoria da qualidade de vida (CORREN et al, 2011). Dupilumabe (anticorpo monoclonal humano dirigido contra a subunidade alfa partilhada dos receptores de interleucina-4 e que bloqueia a sinalização a partir da interleucina-4 e interleucina-13) reduziu significativamente a IgE sérica, eotaxina-3, regulação/ativação de quimiocinas e NO, todos associado com inflamação mediada por linfócitos Th2 (WENZEL et al, 2013).

2.3.3 Modelos murinos de inflamação

A pleurisia induzida por carragenina fornece uma significativa lesão com infiltração maciça de neutrófilos no espaço alveolar, e distorção significativa da arquitetura alveolar normal (LUZ et al., 2016). Foi originalmente desenvolvido em ratos (SPECTOR; WILLOUGHBY, 1958) e mais tarde reproduzido em camundongos (HENRIQUES et al., 1990). Embora a pleurisia induzida pela carragenina não seja um modelo de asma, a administração desse agente flogístico na cavidade pleural proporciona um ambiente inflamatório semelhante ao observado em pacientes com fenótipo de asma neutrofílica, caracterizado por uma polarização Th1/Th17. O desequilíbrio entre a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, as atividades enzimáticas pró-inflamatórias e as alterações histológicas no tecido pulmonar são as semelhanças mais notáveis (LUZ et al., 2016).

É um modelo de inflamação caracterizado por uma resposta inflamatória do tipo bifásica que mimetiza a resposta inflamatória que ocorre na asma em humanos. Na primeira fase (4 h) ocorre o aumento da infiltração de leucócitos, principalmente neutrófilos, bem como a exsudação na cavidade pleural. Já na segunda fase (48 h), observa-se, além do exsudato, o aumento de células mononucleares (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). É um modelo que também possibilita o estudo sobre a liberação de mediadores, enzimas e influxo celular no lavado pleural de animais como camundongos ou ratos (HENRIQUES et al., 1990; SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996).

Desta forma, o modelo da pleurisia é útil para se estudar a inflamação propriamente dita, e também, fármacos ou produtos naturais que possuem propriedades anti-inflamatórias. A técnica de pleurisia possui vantagens em relação às outras técnicas, pois a partir da coleta dos lavados da cavidade pleural é possível analisar e quantificar

diversos parâmetros inflamatórios como celularidade, exsudação, mediadores pró-inflamatórios (citocinas, NO, entre outros), além da participação de enzimas como MPO e adenosina-deaminase (ADA), sem necessitar recorrer a procedimentos complicados de extração e quantificação. Uma outra vantagem adicional em relação aos modelos citados é a sua fácil execução, pois diferentes agentes flogísticos (específicos e não específicos) podem ser estudados. Neste trabalho, optou-se pelo modelo experimental da pleurisia. A escolha deste modelo foi baseada em evidências já comentadas acima, destacando sua utilidade, servindo para o estudo da reação inflamatória, bem como avaliação das propriedades anti-inflamatórias. Como citado, o volume de fluido extravasado, o acúmulo de células e os mediadores químicos que participam da reação podem ser quali e quantitativamente analisados.

2.3.4 Modelo experimental de asma brônquica

Os camundongos são amplamente utilizados como modelos experimentais por apresentarem uma resposta alérgica que se assemelha, em certos aspectos, à asma humana, incluindo as respostas de fase aguda e de fase tardia e a hiper-responsividade brônquica (BRAUN; TSCHERNIG, 2006; CONEJERO et al., 2007). Além disso, a revolução científica e o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular possibilitaram a produção de camundongos transgênicos e nocautes e o desenvolvimento de ferramentas específicas para a experimentação em camundongos, como os anticorpos monoclonais (BRAUN; TSCHERNIG, 2006).

Vários modelos de inflamação pulmonar alérgica em ratos e camundongos têm sido descritos, sendo aqueles baseados em sensibilização sistêmica de proteína antigênica como a ovalbumina e subsequente desafio por inalação, de grande aceitação. Nesses modelos, o desenvolvimento de eosinofilia, da hiper-reatividade aérea após o estímulo colinérgico e o aumento na produção de IL-4 e IL-5 têm sido demonstrados (ELWOOD et al., 1991; GERHOLD et al., 2002).

2.4 DOR

2.4.1 Fisiopatologia da dor

A dor é uma experiência complexa que envolve não apenas a transdução da informação gerada pelo estímulo nocivo, mas também é uma experiência

multidimensional na qual estão envolvidos vários componentes: motivacionais, emocionais, sensório-discriminativo, afetivos e cognitivos (WHO, 2012; FEIN, 2011). Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 1983), a dor é uma experiência sensorial e emocional associada com potenciais ou reais lesões, que tem uma conotação individual e sofre influências de experiências anteriores.

A dor caracteriza-se por uma resposta orgânica protetora, pois alerta o indivíduo para uma lesão iminente ou real dos tecidos, induzindo surgimento de respostas reflexas e comportamentais coordenadas com o intuito de manter o dano tecidual o mais controlado possível (WOOLF; MANNION, 1999).

A classificação da dor é diversificada e depende do critério adotado. A dor pode ser caracterizada segundo critérios temporais e do ponto de vista fisiológicos. De acordo com critérios temporais é classificada em transitória, aguda ou crônica. Na dor do tipo transitória os nociceptores podem ser ativados sem necessariamente ocorrerem danos no tecido. Este tipo de dor tem como função a proteção do organismo contra danos físicos provocados pelo meio ou ainda devido ao estresse excessivo dos tecidos corpóreos (LOESER; MELZACK, 1999). A dor aguda está associada com uma lesão tecidual recente, ativação de nociceptores no local da lesão, podendo persistir por dias ou semanas, desaparecendo quando a injúria é sanada (CARR; GOUDAS, 1999). Já a dor crônica ocorre devido a uma patologia ou lesão, podendo ser perpetuada por diferentes fatores causais e permanecer por meses ou anos. A dor crônica é distinta da aguda pelo fato de ocorrer plasticidade do sistema nervoso central e periférico e por manter-se após recuperação tecidual, o que torna difícil o tratamento com fármacos (LOESER; MELZACK, 1999; MILLAN, 1999).

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

A dor nociceptiva consiste na estimulação persistente de nociceptores (térmico, químico ou mecânico), ativando continuamente as vias centrais da dor. Surge quando a lesão tissular ativa os receptores específicos que são sensíveis a estímulos nocivos. Esses nociceptores podem responder ao calor, frio, vibração e substâncias químicas liberadas pelos tecidos em resposta à privação de oxigênio, rompimento do tecido ou inflamação (MILLAN, 1999; WHO, 2012).

A dor neuropática segundo o comitê de Taxonomia da IASP é definida como “uma consequência direta de lesão ou doença que afete o sistema somatosensorial” (LOESER; TREEDE, 2008). Qualquer processo que causa danos aos nervos, tais como metabólico, traumático, infeccioso, isquêmico, tóxico ou condições patológicas imunomediadas podem resultar em dor neuropática. Além disso, a dor neuropática pode ser causada pela compressão do nervo ou o processamento anormal de sinais de dor pelo cérebro e medula espinhal (WHO, 2012). Essa dor pode resultar de lesão ou disfunção de estruturas centrais ou periféricas do sistema nervoso caracterizando-se por dor espontânea, provocada por estímulos normalmente inócuos (alodinia) ou por uma sensibilidade exacerbada a estímulos nocivos ou não nocivos (hiperalgesia) (CUNHA et al., 2004).

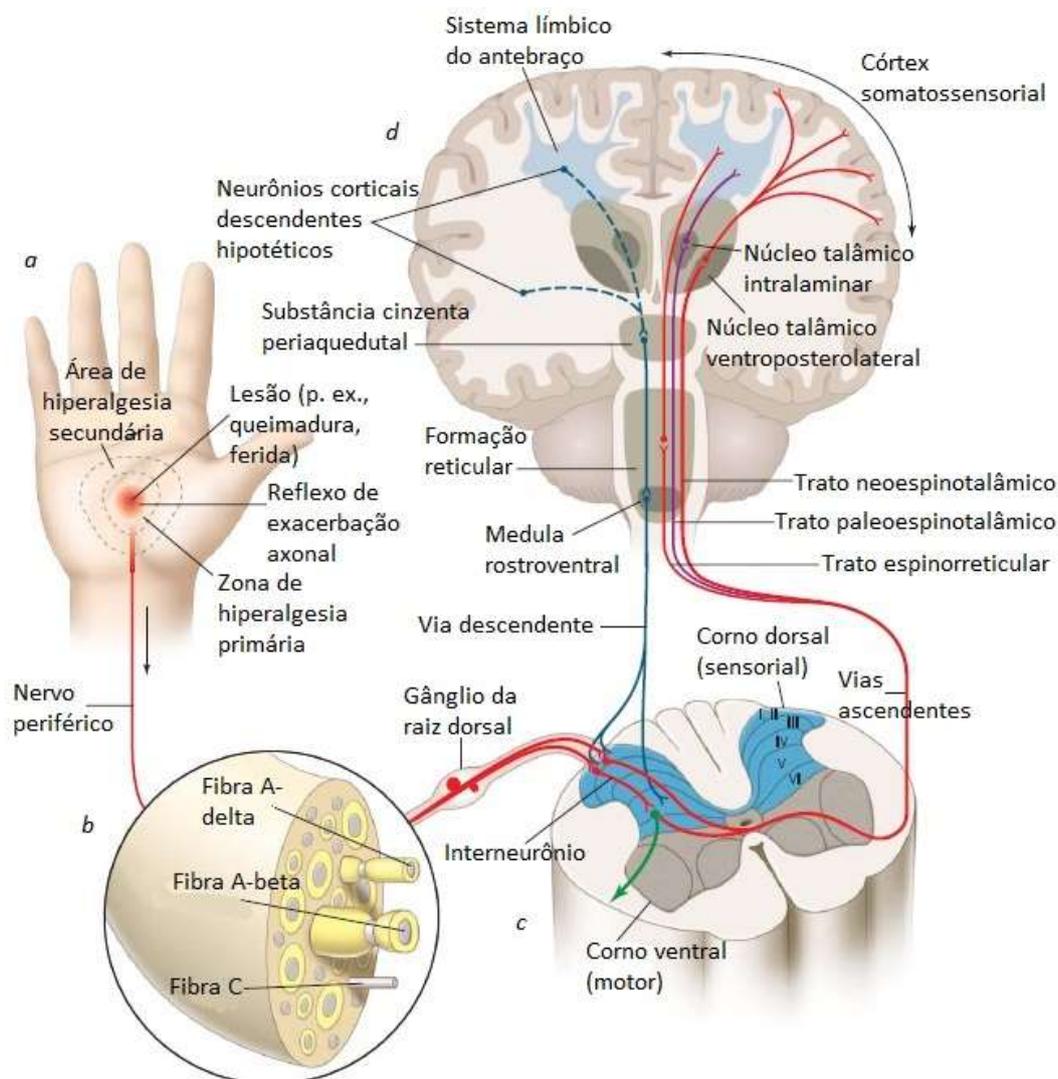
A dor psicogênica, por sua vez, está relacionada à prevalência de fatores psicológicos na gênese da sensação dolorosa. Esse tipo de dor pode ser observado em distúrbios psicológicos como na depressão e na ansiedade generalizada (FÜRST, 1999). A verdadeira dor psicogênica é muito rara (WHO, 2012).

E por fim, a dor inflamatória é aquela iniciada por uma lesão tecidual ou inflamação, manifestada espontaneamente ou por meio de uma hiperalgesia. A nociceção ocorre quando um tecido inflamado torna-se mais sensível a estímulos que normalmente não produzem ou produzem pouca dor, sendo este um fenômeno característico desse tipo de dor (FANTONI, 2012).

A dor compreende três mecanismos básicos: a transdução, que é a ativação dos nociceptores por um estímulo nódico (que pode ser mecânico, térmico ou químico); a transmissão, que é o conjunto de vias que permitem que o impulso nervoso seja conduzido ao SNC; e a modulação, que são as vias responsáveis pela supressão da dor ativadas pelas próprias vias nociceptivas (PORTO, 2004).

No processo de transdução, no caso da sensação dolorosa, ocorre uma amplificação dos eventos pela liberação local de uma grande variedade de substâncias químicas denominadas genericamente de substâncias algogênicas, que surgem em grande quantidade nos tecidos em decorrência de processos inflamatórios, traumáticos ou isquêmicos. Essas substâncias incluem serotonina, bradicinina, noradrenalina, histamina, citocinas, substância P, prostaglandinas e leucotrienos (MARQUEZ, 2004) (Figura 12).

Figura 12 - Mecanismo básico da dor. Processamento sensorial no corno dorsal da medula espinal.



Fonte: Adaptado de OAKLANDER (2011)

(a) A estimulação das fibras C pela lesão intradérmica produz dor espontânea e dor provocada por toques leves no local da lesão (hiperalgesia primária). Além disso, uma área de hiperalgesia secundária (dor mecânica aumentada após um estímulo nocivo) fora da área da lesão primária é produzida pela ativação dos receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) junto ao sistema nervoso central (SNC), que ocorre em consequência do tráfico de impulsos nociceptores aferentes.

(b) Quando ativados por estímulos mecânicos, térmicos ou químicos, os nociceptores conduzem impulsos aferentes na direção da medula espinal.

(c) O corno dorsal da medula espinal constitui o 1º centro de retransmissão sensorial junto ao SNC. Os sinais nociceptores que chegam são submetidos a uma considerável modulação antes da deflagração dos sinais ascendentes.

(d) Quando há ativação de áreas localizadas no tálamo e no córtex cerebral, as projeções secundárias ao nível do trato espinotalâmico, trato da coluna dorsal e outras vias nociceptoras levam à percepção consciente da dor.

A transmissão da dor envolve uma interação complexa de estruturas centrais e periféricas desde a pele, vísceras ou outros tecidos até o córtex cerebral (Figura 12). O

termo “nocicepção” refere-se à percepção do sinal no sistema nervoso central evocado pela ativação de receptores sensoriais especializados (os nociceptores), existentes no local da lesão, que fornecem informações sobre a lesão tecidual ocasionada por estímulos nocivos (FÜRST, 1999; FEIN, 2011). A informação do estímulo nocivo é transmitida principalmente através de dois diferentes tipos de neurônios nociceptivos aferentes primários, que conduzem o estímulo em diferentes velocidades, caracterizados como fibras do tipo A δ e C. As fibras aferentes de primeira ordem, relacionadas com a condução do estímulo doloroso são classificadas de acordo com sua estrutura, diâmetro e velocidade de condução em três tipos: fibras C, fibras A- β , fibras A- δ (RANG et al., 2001) (Figura 13). As fibras tipo C caracterizam-se por serem amielinizadas, possuem diâmetro de 0,4 a 1,2 μm e velocidade de condução que varia de 0,5 a 2,0 m/s. Estas fibras apresentam receptores termosensíveis (que respondem ao frio e ao calor), mecanonociceptores de baixo limiar e receptores específicos para substâncias alogênicas (tais como íons potássio, acetilcolina, enzimas proteolíticas, serotonina, prostaglandinas, substância P e histamina). Muitas fibras C, com receptores de alto limiar, estão associadas a nociceptores do tipo polimodais (MENSE, 1983; MILLAN, 1999).

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

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

Figura 13 - Diferentes tipos de neurônios sensoriais primários, responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC.

Tipo de fibra	 Aα e Aβ	 Aδ (I e II)	 C
Mielinização	Muita	Pouca	Ausente
Diâmetro	10μm	2 - 6μm	0.4 - 1.2μm
Velocidade de condução	30 - 100m/s	12 - 30m/s	0.5 - 2m/s
Temperatura	Não reconhece	Tipo I > 53°C Tipo II > 43°C	> 43°C
Tipo de sinal	Propriocepção Toque leve	Nocicepção (térmica, mecânica e química)	Nocicepção (térmica, mecânica e química)

Fonte: Adaptado de JULIUS, BASBAUM (2001) e BASBAUM et al. (2009).

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

Os nociceptores *polimodais* respondem aos estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos; possuem pequenas fibras C amielinizadas que conduzem impulsos em velocidade menor que 3 m/s. Vale ainda lembrar que as pequenas fibras Aδ-β mielinizadas carregam informação de nocicepção responsável pela sensação de dor acentuada em *picada* e as pequenas fibras C amielinizadas carregam informação responsável pela sensação fraca em *queimação* (FEIN, 2011).

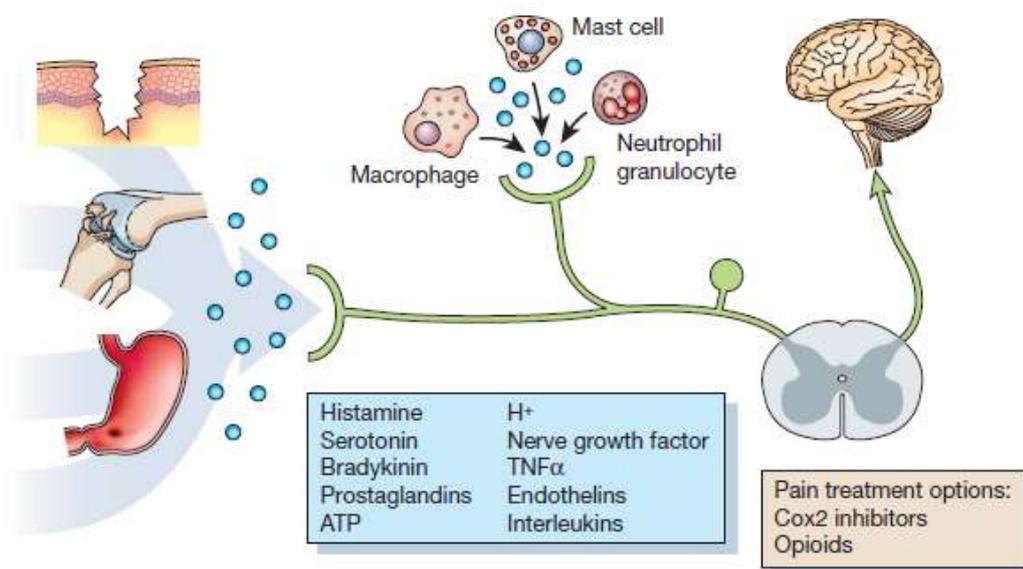
Os nociceptores *silenciosos* são ativados por estímulos químicos e mediadores inflamatórios, respondendo a estímulos mecânicos e térmicos somente depois de serem

ativados. Estes nociceptores também possuem pequenas fibras C amielinizadas que conduzem impulsos em velocidade menor que 3 m/s (FEIN, 2011).

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

A dor se inicia em áreas periféricas fora do sistema nervoso central (cérebro e medula espinhal) (BASBAUM; JULIUS, 2006). Estímulos dolorosos são detectados por receptores fisiológicos tais como os nociceptores, que conduzem impulsos pelas fibras C, que respondem a estímulos químicos, como por bradicinina ou prostaglandina, bem como pelas fibras A- δ , que respondem a estímulos de pressão intensa ou térmicos (DESPOPOULOS; SILBERNAGL, 2000). Essas fibras se inserem na raiz dorsal da medula espinhal, e então são conduzidas ao cérebro. Quando o agente nocivo é detectado pela extremidade periférica dos nociceptores, na pele ou algum outro órgão, um impulso elétrico é disparado e propagado por toda a fibra nervosa até atingir uma região da medula espinhal (BASBAUM; JULIUS, 2006) (Figura 14).

Figura 14 - Via de condução de estímulos dolorosos



Fonte: SCHOLZ; WOOLF (2002).

A percepção da sensação nociceptiva tem início a nível periférico, por nociceptores e das fibras a eles associados, sendo então transmitida até o SNC. Para tanto os nociceptores fazem sinapse no corno dorsal com neurônios de segunda ordem. Esses neurônios cruzam a medula espinhal para ascender pelo trato espinotalâmico, com suas

fibras terminando principalmente no tálamo. No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios pela cápsula interna ao córtex somatosensor, onde ocorre a somatização do estímulo nocivo, ou emitem axônios para o giro cingulado anterior, onde existe o componente emocional da dor. Esta é a chamada via clássica e é também a principal via de condução da dor, apesar de existirem outros possíveis caminhos envolvendo diferentes estruturas nervosas (BESSON, 1999).

A modulação é o processo pelo qual a transmissão é facilitada ou inibida envolvendo circuitos nervosos e substâncias bioquímicas endógenas. A dor não depende somente da natureza e da intensidade do estímulo. É influenciada por fatores psicossociais e neurosensitivos. Sofre uma modulação no sistema nervoso central, e da interação entre os estímulos nociceptivos e fatores moduladores, que resultam na experiência neurosensitiva da dor. A qualidade e a quantidade da dor dependem (e varia de pessoa para pessoa) do entendimento da situação geradora da dor, experiência prévia com o desencadeador álgico, cultura, da atenção, ansiedade e capacidade da pessoa em se abstrair das sensações nóxicas (distração) e dos sentimentos de controle da dor (MARQUEZ, 2011). A modulação medular da dor se faz por intermédio de três mecanismos: bloqueio dos receptores das substâncias neurotransmissoras; inibição da liberação desses neurotransmissores e estrangulamento ou impedimento do processo de transmissão nociceptiva. Na modulação hetero-segmentar, denominado sistema descendente de controle da dor ou supramedular, os neurônios que emergem e terminam no corno dorsal da medula podendo ser ativados por estimulação aferente ou por via descendente. A modulação supra-segmentar, de modo geral, reduz a liberação de neurotransmissores nas terminações das fibras aferentes na região pré-sináptica, promovendo direta ou indiretamente a inibição de interneurônios excitatórios ou excitação de interneurônios inibitórios (DRUMMOND, 2005).

2.4.2 Mediadores químicos envolvidos no processo nociceptivo

Os mediadores químicos interagem com canais de íons na membrana plasmática do nociceptor utilizando os mecanismos de sinalização, como os usados em outra parte do sistema nervoso. Esses mediadores podem agir diretamente nos canais de íons controlados por ligante (LGICs) – os ionotrópicos ou indiretamente via receptores acoplados à proteína G (GPCRs) ou receptores da tirosina quinase (RTKs) – os metabotrópicos (FEIN, 2011). Os neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, macrófagos são

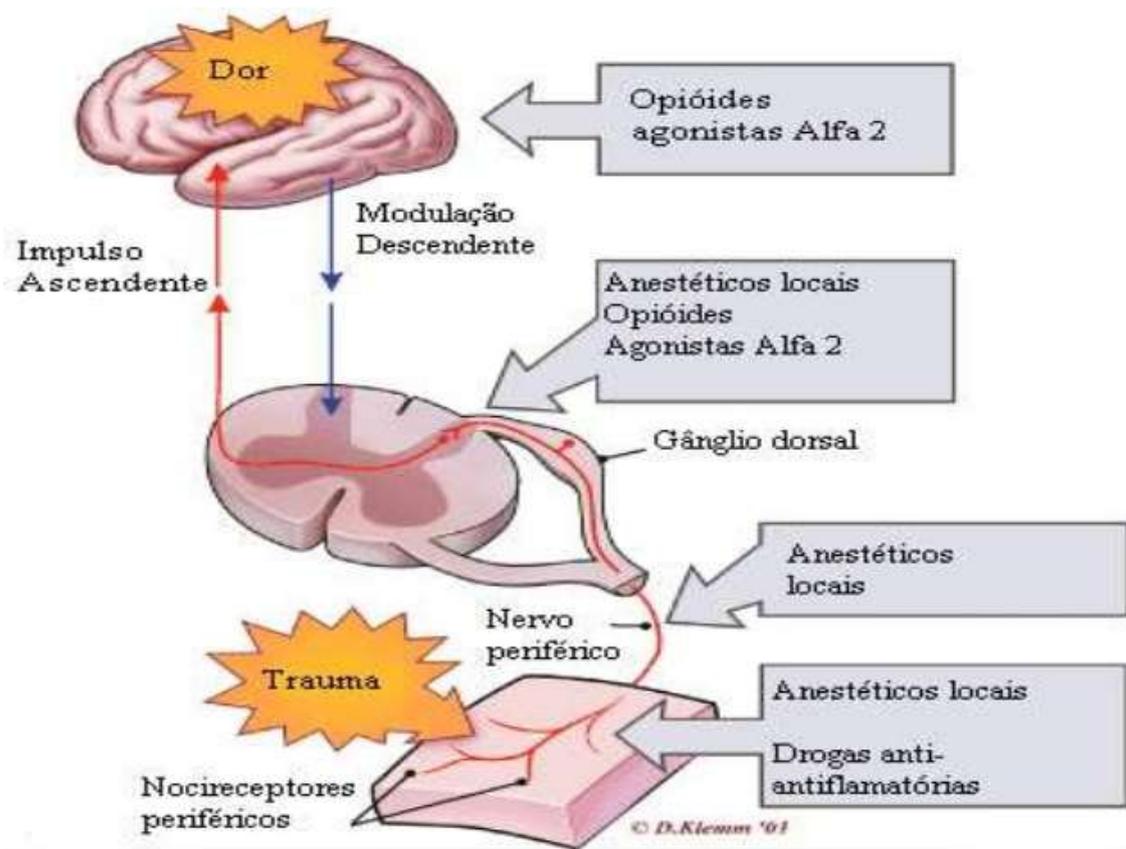
células capazes de produzir vários mediadores inflamatórios e/ou nociceptivos como histamina, serotonina (5-HT), prostaglandinas, leucotrienos, fator de agregação plaquetária (PAF), citocinas, quimiocinas, TNF- α , trifosfato de adenosina (ATP), proteases, fator de crescimento neural (NGF), entre outros. Algumas substâncias químicas como a bradicinina, 5-HT, histamina, prótons e K⁺ excitam os nociceptores. Outras, no entanto, como as prostaglandinas e a substância P aumentam a sensibilidade das terminações nociceptivas. Esses mediadores podem estar relacionados tanto com a inflamação quanto com a dor (FEIN, 2011).

2.4.3 Mediadores e modulação na medula espinhal

Os mecanismos envolvidos na transdução da dor envolvem a interação dos mediadores inflamatórios e/ou nociceptores com canais iônicos de membrana dependente de voltagem (canais de sódio, potássio, cálcio, cloro, entre outros), canais iônicos operados por receptor (receptor N-metil-D-aspartato - NMDA, receptor colinérgico nicotínico), receptores associados a tirosina quinase (fator de crescimento neural - NGF, receptores tirosina quinase A - TrkA, entre outros) ou com receptores de membrana que usualmente encontram-se acoplados a proteínas regulatórias denominadas de proteínas G, como acontece com os receptores de prostaglandinas e bradicinina (MILLAN, 1999; CALIXTO et al., 2000).

Os mecanismos descendentes desempenham seu papel de modulação da resposta nociceptiva através de sua atuação sobre os receptores presentes nas fibras primárias aferentes e em neurônios do corno dorsal como, os interneurônios excitatórios, interneurônios inibitórios e neurônios de projeção. Além disso, os sistemas de neurotransmissores, como por exemplo, os sistemas opioides, neuropeptidérgico, noradrenérgico, gabaérgico, glutamatérgico, além de canabinóides endógenos entre outras substâncias também estão envolvidos no processo de modulação descendente (MILLAN, 2002) (Figura 15).

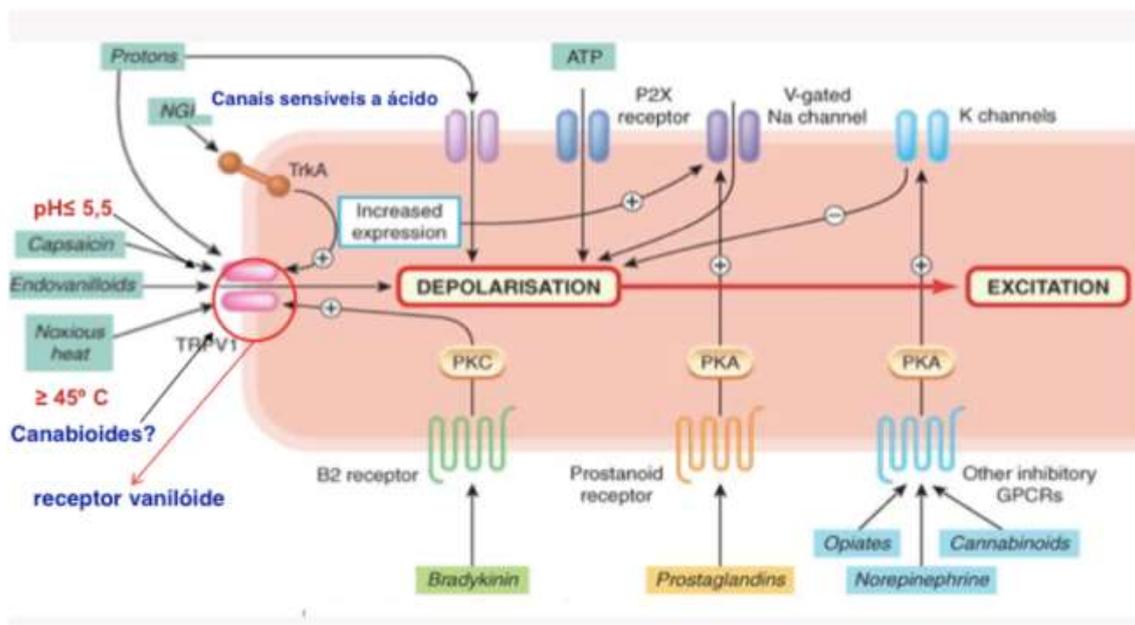
Figura 15 - A via da dor e intervenções que podem modular a atividade em cada ponto



Fonte: Adaptado de: GOTTSCHALK; SMITH (2001).

Sabe-se que grande número de receptores está envolvido na transmissão dolorosa. Estes receptores estão localizados pré e pós-sinápticamente na terminação central do aferente primário nociceptivo. São observados em posição pré-sináptica receptores opioides μ/δ , κ , GABA B, $\alpha 2$ -adrenérgicos, neurocinina 1 e 5-hidroxitriptamina 2 (5HT2) (BESSON et al, 1999). Na posição pós-sináptica encontram-se receptores ácido gama-aminobutírico A, B (GABA A, B), alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA), N-metil-D-aspartato (NMDA), μ , μ/δ , $\alpha 2$ -adrenérgicos, 5HT1B, adenosina. A riqueza de neurotransmissores, neuromoduladores e receptores da sinapse entre aferente primário e neurônio do corno dorsal da medula espinhal faz prever a importância e complexidade da área (Figura 16) (MILLAN, 1999).

Figura 16 - Neurotransmissores e neuromoduladores espinhais



Fonte: Adaptado de <https://medexpertconsult.wordpress.com/tag/neuroanatomia/>

2.4.3.1 Sistema opioide e antinocicepção

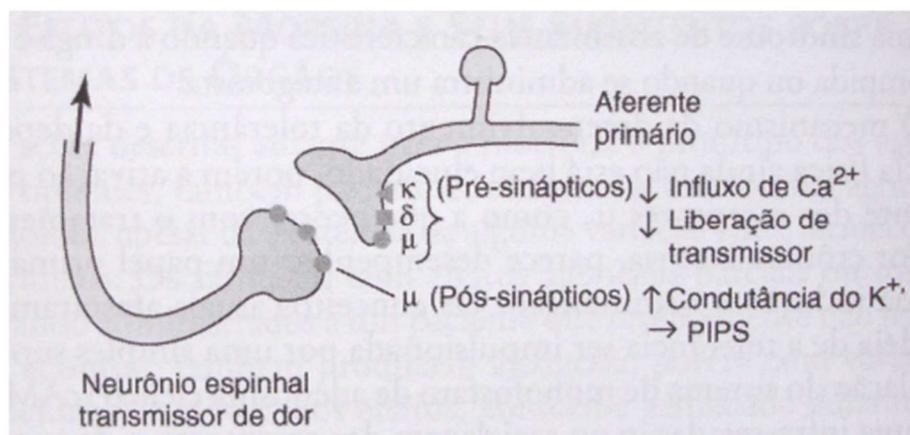
O termo opioide aplica-se a qualquer substância que produza efeitos semelhantes aos da morfina e que estes efeitos sejam bloqueados por antagonistas como a naloxona (DHAWAN et al., 1996).

Os opioides promovem analgesia agindo em diversos locais. No mesencéfalo, ativam as vias inibitórias descendentes; nos neurônios de segunda ordem, impedem a transmissão ascendente da informação nociceptiva; nas terminações de fibras C na medula espinhal, previnem a liberação de neurotransmissores nociceptivos; e na periferia inibem a ativação dos nociceptores e de células que liberam mediadores inflamatórios (VANDERAH, 2007).

Os receptores opioides são divididos em três principais grupos: receptores mu (μ), delta (δ) e kappa (κ) que respondem aos agonistas opioides. Acredita-se que os receptores μ sejam responsáveis pela maioria dos efeitos analgésicos dos opioides; os receptores δ , provavelmente são mais importantes na periferia, mas também podem contribuir para a analgesia e os receptores κ contribuem para a analgesia no sítio espinhal. Em nível molecular, os receptores opioides se acoplam às proteínas G e assim, afetam a regulação dos canais iônicos, modulam o processamento do Ca^{++} e alteram a fosforilação das

proteínas. Os opioides agem sobre os neurônios por duas ações: fechando os canais de Ca^{++} regulados por voltagem nas terminações nervosas pré-sinápticas e, portanto, reduzem a liberação de transmissor; e hiperpolarizam, assim inibem neurônios pós sinápticos através da abertura dos canais de K^+ (GUTSTEIN et al., 1998; KATZUNG, 2008) (Figuras 17 e 18).

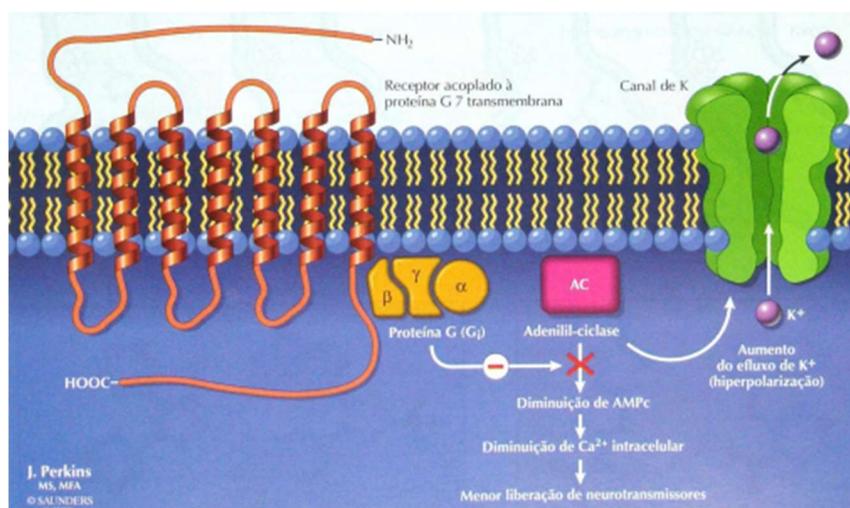
Figura 17 - Locais de ação dos opioides na medula espinal



Fonte: KATZUNG (2008).

Os agonistas μ , κ , e δ reduzem a liberação de transmissor das terminações pré-sinápticas de aferentes primários nociceptivos. Os agonistas μ também hiperpolarizam os neurônios transmissores de dor de segunda ordem, ao aumentar a condutância do potássio, produzindo um potencial pós-sináptico inibitório.

Figura 18 - Os opioides ativam pré e pós-sinápticamente os RaPGs-7 (receptor acoplado da proteína G 7) transmembrana ao longo das vias transmissoras da dor.



Fonte: BEYZAROV et al. (2006).

Os efeitos celulares envolvem o aumento do efluxo de K^+ neuronal (hiperpolarização dos neurônios, tornando menos provável sua resposta a estímulos dolorosos) e a inibição do influxo de Ca^{++} (diminuição da liberação de neurotransmissores pelos neurônios localizados ao longo da via transmissora da dor).

A morfina é o principal fármaco analgésico encontrado no ópio bruto e por isso é o agonista protótipo dos receptores opioides. O mecanismo de ação da morfina envolve a interação da mesma com receptores opioides situados no sistema nervoso central e no trato gastrointestinal. Os opiáceos causam hiperpolarização das células neuronais, inibição do disparo nervoso e inibição pré-sináptica da liberação de transmissor. A morfina age em receptores, nas lâminas I e II da substância gelatinosa da medula espinhal, e diminui a liberação de substância P, a qual modula a percepção da dor na medula espinhal. Essa molécula também parece inibir a liberação de muitos transmissores dos neurônios terminais que recebem estímulos nociceptivos à dor (DHAWAN et al., 1996; HARVEY; CHAMPE, 1998).

2.4.3.2 Canais de K^+ _{ATP} e antinocicepção

Os canais iônicos pertencem a uma família de proteínas que formam poros macromoleculares através de membranas lipoprotéicas e que se encarregam de controlar o fluxo de partículas carregadas eletricamente (íons) entre o meio interno e externo das células (HERNANDÉZ; FÉLIX, 2001). Uma das funções mais marcantes dos canais de K^+ está na manutenção do potencial de repouso da membrana de todas as células. No entanto, à medida que os estudos acerca desses canais se intensificam, novas funções são atribuídas a eles (HILLE, 2001).

Todos os tipos de canais de K^+ estão envolvidos no processo de antinocicepção. A abertura de canais de K^+ e o conseqüente aumento da condutância a esse íon para o exterior da célula leva a hiperpolarização celular, assim não ocorrendo a propagação do estímulo nociceptivo (RANG et al, 2012). A abertura dos canais de K^+ desempenha um papel importante na antinocicepção induzida por muitos agonistas de receptores acoplados à proteína G como os opioides assim como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) dentre outros fármacos. Dentre os vários tipos de canais de potássio envolvidos na antinocicepção o mais estudado é o canal de potássio sensível à ATP (K^+ _{ATP}) tanto central quanto periféricamente (TSANTOULAS; MCMAHON, 2014; OCANA et al, 2004). Desta forma, sugeriu-se que fármacos como a morfina agem através da via do NO ativando a enzima guanilato ciclase (GC) aumentando assim a produção de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) que irá ativar a proteína quinase G (PKG), levando à ativação dos canais de K^+ , causando hiperpolarização das membranas diminuindo assim a excitabilidade neuronal (FEIN, 2012).

2.4.3.3 Sistema muscarínico e antinocicepção

Numerosos estudos têm indicado um papel do sistema colinérgico central na inibição da nocicepção, seja pela ação de vias descendentes inibitórias colinérgicas, ativação de outras vias descendentes inibitórias, ou pela sua própria liberação de acetilcolina (ACh) a partir de interneurônios inibitórios localizados no corno dorsal (MILLAN, 2002). A ACh modula a nocicepção por um padrão complexo de efeitos, mediando via múltiplas classes de receptores, incluindo receptores muscarínicos e nicotínicos. Os receptores muscarínicos M1, M3 e M5 estão positivamente acoplados à proteína Gq/11, e sua ativação aumenta a atividade da fosfolipase C (PLC), enquanto que os receptores M2 e M4 são acoplados a proteína Gi/0, refletindo na supressão da atividade da adenilil ciclase (AC) e das correntes de Ca^{++} , e ainda, os receptores M2 ativam os canais de K^+ (MILLAN, 2002). Tem sido descrito na literatura que os receptores M2 e M4 são os principais responsáveis por estes efeitos antinociceptivo (WESS et al., 2003).

2.4.3.4 Sistema adrenérgico e antinocicepção

O sistema noradrenérgico é considerado como o principal sistema de controle descendente da dor originado do tronco cerebral, sendo que a noradrenalina liberada a partir dos axônios descendentes controla a atividade dos neurônios nociceptivos no corno dorsal. Os receptores opioides tipo μ , juntamente com os receptores adrenérgicos $\alpha 2$ interagem na modulação do processo nociceptivo. A ativação de $\alpha 2$ -adrenoceptores no SNC produz analgesia em numerosos modelos comportamentais de dor, incluindo o teste da formalina. Contudo, na periferia, os mecanismos adrenérgicos parecem ser pró-nociceptivos, embora alguns dados sejam conflitantes (HAMALAINEN; PERTOVAARA, 1995; HONG; ABBOTT, 1996; MILLAN, 1999; MANSIKKA et al., 2002).

Os receptores adrenérgicos mais expressivos nas vias descendentes inibitórias são os $\alpha 2$ (principalmente $\alpha 2A$). Estes receptores estão acoplados à proteína G inibitória (Gi/0) e provocam a inibição da adenilil ciclase (AC), aumentam as correntes de potássio (K^+) e suprimem as correntes de cálcio (Ca^{++}). Estes mecanismos são os responsáveis pela atividade antinociceptiva destes receptores. No corno dorsal, a ativação destes receptores provoca uma redução moderada da estimulação dos neurônios de projeção pelas fibras aferentes primárias, e também uma redução na liberação de transmissores

pró-nociceptivos, como a substância P e o glutamato, a partir dos terminais centrais destas. Os receptores α_2 adrenérgicos também podem desempenhar a atividade antinociceptiva por permitir interações com outros transmissores como a galanina, GABA e encefalinas, uma vez que as vias descendentes inibitórias adrenérgicas estão localizadas com estes transmissores (FÜRST, 1999; MILLAN, 1999). Os receptores α_1 -adrenérgicos também apresentam um papel importante na modulação da nocicepção. Eles são acoplados positivamente a proteína G estimulatória (Gq) e ativam canais de Ca^{++} e a PLC, mobilizando Ca^{++} intracelular e, portanto, exercem ação fundamentalmente excitatória sobre a atividade neuronal (HOWE et al., 1983).

2.4.4 Tratamento farmacológico da dor: fármacos analgésicos

Considerando a complexa relação existente entre a lesão e o aparecimento da dor, não é surpreendente que o controle farmacológico efetivo da dor neuropática ainda constitua um grande desafio para a comunidade médico-científica, uma vez que esta síndrome mostra-se resistente a uma série de fármacos com propriedades analgésicas marcadas em quadros de dor aguda. Entre as opções de tratamento disponíveis encontram-se os opioides, anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), adesivos tópicos de lidocaína e capsaicina, além de fármacos que não foram originalmente desenvolvidos para o tratamento de dor, como anticonvulsivantes e antidepressivos tricíclicos (ATTAL et al., 2010).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são classificados por sua estrutura química e pela atividade inibitória específica para enzimas associadas à produção de eicosanoides (produção de prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos, leucotrienos, lipoxinas, etc.). Esses fármacos têm sido amplamente utilizados no tratamento da dor e inflamação desde a introdução do ácido acetilsalicílico (aspirina) em 1897. Os AINEs apresentam diferentes graus de atividade anti-inflamatória, analgésica e antipirética e estão entre os medicamentos mais utilizados no mundo. Eles apresentam vantagens sobre os analgésicos narcóticos, pois não produzem sedação ou ataxia. Nas situações que necessitam de maior ação analgésica, os AINEs podem ser combinados com os opioides, pois os anti-inflamatórios não esteroidais conferem sinergismo quando utilizados em combinação com os narcóticos, diminuindo a dose requerida deles (FANTONI, 2012).

Outra classe muito importante e potente de fármacos para o tratamento da dor são os chamados opioides. Fármacos opioides, como a morfina, são analgésicos fortes utilizados para dor crônica. Entretanto, essa classe de medicamentos possui ação central e elevado risco de depressão respiratória, tolerância, constipação e dependência física (CAVALCANTI; MADDALENA, 2003; RAEHAL; WALKER, BOHN, 2005). Esses fármacos agem em receptores opioides, que fazem parte da grande família de receptores acoplados a proteína-G e estão espalhados por todo o corpo, mas especialmente no sistema nervoso (RAEHAL; WALKER; BOHN, 2005). Nos neurônios nociceptores os receptores opioides são responsáveis por diversas ações envolvidas com o controle da sensação dolorosa, entre elas a inibição da adenilato-ciclase diminuindo a síntese intracelular de AMPc, além de inativar canais de Ca^{++} voltagem-dependente. Estas ações resultam numa redução da liberação de neurotransmissores envolvidos na indução do processo doloroso (CHEVLEN, 2003).

Outros fármacos também podem modular a transmissão nociceptiva e dessa forma controlar a dor, como os antidepressivos tricíclicos, os anticonvulsivantes, os bloqueadores de canais de sódio, os neurolépticos, os esteróides, entre outros. No entanto, a efetividade desses fármacos é muito variável entre os indivíduos, assim como outros tratamentos alternativos, por vezes pouco eficientes, como a acupuntura (MCFAARLANE; JONES; HANNAFORD, 2006).

Diante do exposto, o emprego do arsenal terapêutico atual raramente resulta na eliminação da dor. Ao contrário, muitos pacientes continuam refratários aos tratamentos, seja pela persistência das crises ou por efeitos colaterais indesejáveis (ATTAL et al., 2010). Diante deste contexto, a procura de novas terapias é importante para a descoberta de novos fármacos com um melhor efeito analgésico, que utilize doses menores e com efeitos colaterais reduzidos. No entanto, a necessidade de se identificar novos fármacos que possam ser úteis no tratamento da dor neuropática continua sendo de grande interesse.

2.4.5 Modelo experimental para análise dos possíveis sistemas envolvidos no mecanismo de ação antinociceptiva

O modelo químico de nociceção de contorções abdominais em camundongos baseia-se na contagem das contorções da parede abdominal seguidas de torção do tronco e extensão dos membros posteriores (writhing), como resposta reflexa à irritação

peritoneal e à peritonite produzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético (SOARES et al., 2009; SILVA et al., 2013).

O modelo de nocicepção induzida por ácido acético em camundongos é sensível à avaliação de drogas analgésicas, no entanto, pode ser visto como um modelo geral, não seletivo, para estudos de drogas antinociceptivas, uma vez que a irritação local produzida pela injeção intraperitoneal do ácido acético, provoca a liberação de uma variedade de mediadores, tais como a substância P, bradicininas, prostaglandinas, bem como das citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α (COUTO et al., 2011; PINHEIRO et al., 2011). Alguns investigadores têm associado este método com a liberação de prostanoídes, em geral, níveis elevados de PGE2 e PGF2 α , bem como produtos da lipoxigenase em fluidos peritoneais (VERMA et al., 2005; SILVA et al., 2013).

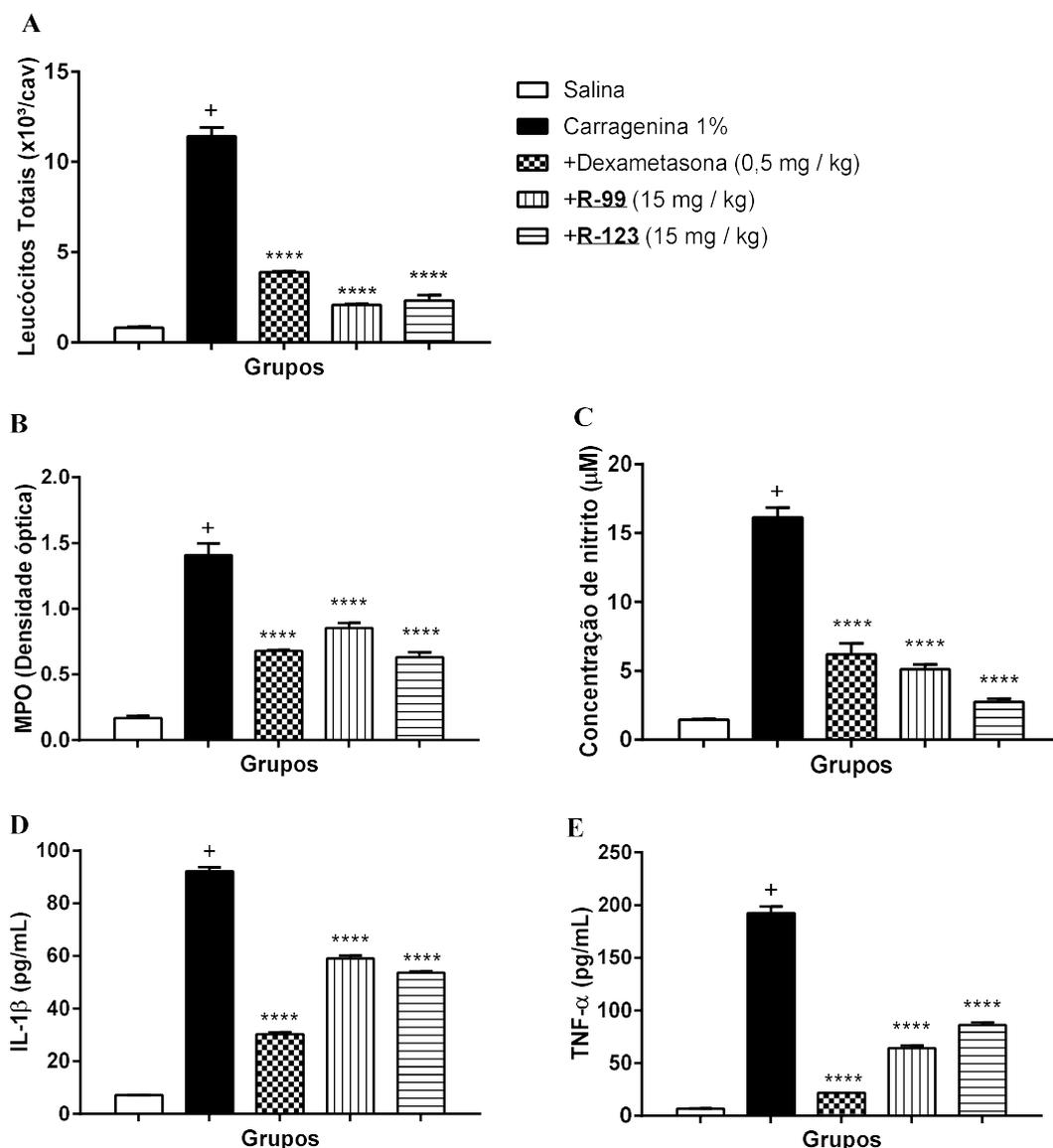
A administração intraperitoneal de ácido acético induz a liberação de prostaglandinas, mas também a liberação de mediadores do sistema nervoso simpático (aminas - norepinefrina e acetilcolina) (DUARTE et al., 1988; BORSATO et al., 2000). Portanto, pode-se concluir que tanto substâncias com atividade anti-inflamatória como anticolinérgicos ou anti-adrenérgicos podem estar envolvidos na atividade analgésica periférica (FERREIRA et al., 2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PLEURISIA INDUZIDA POR CARRAGENINA

Os resultados do teste da pleurisia induzida por carragenina encontram-se na Figura 19 A. A partir desse modelo foi realizada a determinação dos níveis de MPO, NO e a quantificação das citocinas IL-1 β e TNF- α , além da análise histológica dos pulmões. Os dois compostos (**R-99** e **R-123**) apresentaram atividade anti-inflamatória indicada por uma diminuição significativa na migração leucocitária para a cavidade torácica quando comparados ao grupo controle. Não houve diferença significativa entre os derivados **R-99** e **R-123** na dose de 15 mg/kg cujo percentuais de inibição foram de 81,9 e 79,7 %, respectivamente. Os compostos **R-99** e **R-123** reduziram a atividade da enzima MPO com percentual de inibição de 39,4% e 55,1%, respectivamente, em relação ao grupo controle. A dexametasona, fármaco de referência, também reduziu a atividade da MPO em 51,7% (Figura 19 B). Os derivados diminuíram as concentrações de NO (nitrito/nitrato) com percentuais de inibição de 68,3% para o **R-99** e 82,9% para o **R-123**, em comparação ao grupo controle. Os compostos **R-99** e **R-123** foram capazes de reduzir as concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (Figura 19 D) e TNF- α (Figura 19 E).

Figura 19 – Efeito dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas aza-bicíclicos (R-99 e R-123) na pleurisia induzida por carragenina.



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

Leucócitos totais (A), atividade de MPO no tecido pulmonar (B), concentração de nitrito (C), e concentrações de citocinas IL-1β (D) e TNF-α (E) do exsudato pleural. ****p < 0,0001. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo carragenina.

A pleurisia está associada a uma acentuada reação inflamatória nas vias respiratórias, e é reproduzida experimentalmente através da administração de agentes pró-inflamatórios na cavidade pleural (DALMARCO; FRODE, 2007). Estudos anteriores demonstraram que a pleurisia induzida por carragenina em camundongos constitui um interessante modelo experimental, caracterizado por duas fases distintas: uma no início (4 h) caracterizada pela liberação de mediadores químicos como a

histamina, serotonina (5-hidroxitriptamina – 5-HT), bradicinina e prostaglandinas, e uma fase tardia (48 h), que envolve principalmente o fator de ativação plaquetária (PAF) e leucotrienos. Na primeira fase, ocorre um aumento de leucócitos polimorfonucleares, da atividade da enzima MPO, dos níveis dos metabólitos do NO (nitrito e nitrito), exsudação em nível local e ainda há a participação de citocinas do tipo pró-inflamatórias como a IL-1 β e TNF- α (DALMARCO, FRODE, MEDEIROS, 2004; KOO et al., 2006; ROSA et al., 2017; DUARTE et al., 2018). Sabe-se que vários mediadores químicos estão envolvidos nessa inflamação, como também espécies reativas de oxigênio (ROS) liberados pelos neutrófilos, dentre elas o peróxido de hidrogênio, aniôn superóxido e radicais hidroxilas, além da enzima adenosina-deaminase (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996; 1999; FRÖDE; MEDEIROS, 2001; FRÖDE; SOUZA; CALIXTO, 2001; DALMARCO; FRÖDE; MEDEIROS, 2002, 2004; CORSINI et al., 2005).

Muitos estudos têm demonstrado que a liberação da MPO pelos leucócitos no sítio de inflamação reflete a ativação de neutrófilos (FRÖDE; MEDEIROS, 2001; LAU et al., 2005; ARATANI, 2018). A inibição desta enzima corrobora com a diminuição no número de leucócitos observados neste estudo. Além disso, é reconhecido que esta enzima participa da defesa do hospedeiro auxiliando na destruição do agente externo por meio da liberação de ROS e também pode estar envolvida na progressão de lesões teciduais em processos inflamatórios crônicos (HANSSON; OLSSON; NAUSEEF, 2006).

O óxido nítrico (NO) tem um papel complexo na inflamação, relatado como tendo propriedades anti- e pro-inflamatórias. O NO derivado de eNOS é considerado benéfico por inibir a adesão e migração de células inflamatórias. Quando é produzido pela iNOS se torna um importante mediador pró-inflamatório envolvido na inflamação (CUZZOCREA et al., 2000; FARO et al., 2014). A iNOS, é induzida por vários mecanismos relacionados com as citocinas inflamatórias (IFN- γ , IL-1 β e TNF- α), e está relacionado com a vasodilatação que ocorre nas fases iniciais do processo (VANNI et al., 2007). Estudos relataram que na pleurisia induzida por carragenina em camundongos ocorre um aumento da migração de leucócitos e dos níveis de metabólitos do NO, (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1999; DALMARCO; FRÖDE; MEDEIROS, 2002, 2004). Nossos dados mostraram que o **R-99** e o **R-123** reduziram os níveis de NO, inibiram a migração leucocitária, além de diminuir a concentração da enzima MPO, ou seja, as substâncias testadas reduziram o número de leucócitos e a ativação leucocitária provavelmente agindo sobre a expressão de iNOS.

Na pleurisia induzida por carragenina, tanto a IL-1 β como o TNF- α promovem aumento do número de leucócitos e neutrófilos no lavado da cavidade torácica (FRODE; SOUZA; CALIXTO, 2001). Estudos *in vitro* relataram que o TNF- α induziu significativamente a expressão de moléculas de adesão E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 e a ativação do NF- κ B em culturas de células endoteliais da microvasculatura pulmonar humana (JIANG et al., 2005). Outros estudos demonstraram que a inibição de leucócitos foi associada à inibição dos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF α e IL-1 β , que são reconhecidas por estimularem a migração celular e a expressão de moléculas de adesão (BORISH; STEINKE, 2003; MOLLER; VILLIGER, 2006). Esses dados corroboram com os nossos resultados comprovando que a inibição dessas duas citocinas agem reduzindo o número de leucócitos na cavidade torácica.

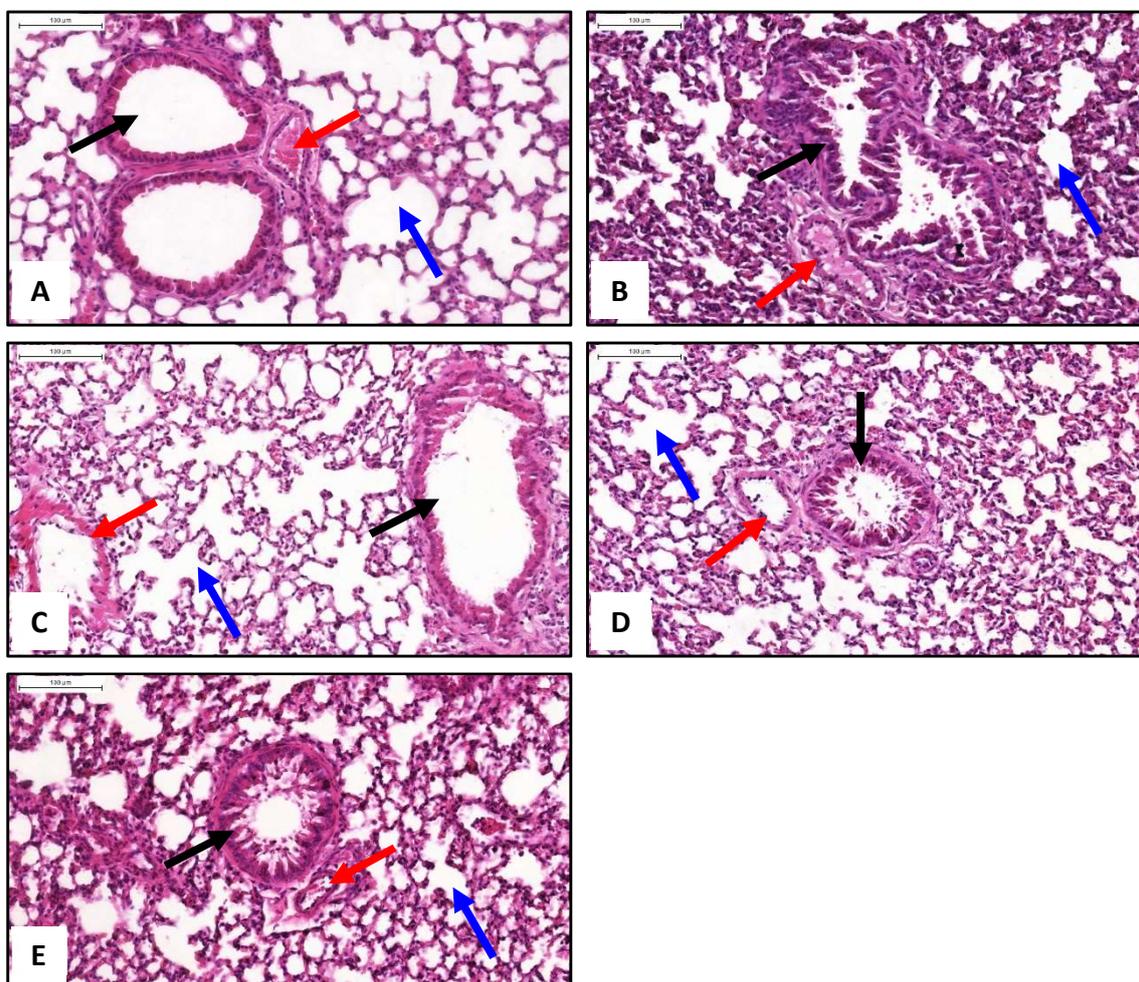
Stojanovic e colaboradores (2007) demonstraram que compostos isoxazolinicos possuíam atividade sobre a migração leucocitária e atividade sobre a enzima MPO, além de reduzir as concentrações de IL-1 β e TNF α . Silva (2015), estudando derivados acilhidrazônicos verificou atividade sobre esses mediadores inflamatórios na pleurisia induzida por carragenina. Esses achados corroboram com os obtidos pelos derivados isoxazolina-acilhidrazonas aza-bicíclicos **R-99** e **R-123**, que apresentaram significativa atividade anti-inflamatória demonstrada pela inibição do influxo de leucócitos, e a modulação desta resposta foi associada à diminuição da atividade da enzima MPO e de mediadores pró-inflamatórios como NO, IL-1 β e TNF α .

3.1.1 Análise histopatológica do pulmão

A análise histológica dos tecidos pulmonares do grupo salina mostrou um tecido bastante preservado (Fig. 20 A). Em contraste, os animais com a pleurisia induzida pela carragenina exibiram áreas desiguais de infiltração leucocitária – grau 3, constituídos por linfócitos, neutrófilos e macrófagos, hemorragia leve, congestão, aumento da parede epitelial de revestimento e hiperplasia alveolar devido ao aumento da celularidade, com consequente diminuição do lúmen alveolar (Fig. 20 B). Os pulmões dos camundongos pré-tratados por via oral com dexametasona e com os derivados **R-99** e **R-123** apresentaram preservação do epitélio de revestimento dos alvéolos e aumento do lúmen alveolar, além de reduzirem significativamente a infiltração leucocitária – grau 1, quando comparados ao grupo controle (Fig. 20 C, D e E, respectivamente). Outro parâmetro

observado nos cortes histológicos foi a hipertrofia do epitélio brônquico nos animais (Fig. 20 B) que foi reduzida com a administração dos tratamentos (Fig 20 C, D e E).

Figura 20 - Efeitos dos derivados R-99 e R-123 sobre as mudanças histopatológicas do tecido pulmonar dos animais na pleurisia induzida por carragenina em camundongos.



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

Os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina. (A) grupo basal tratados com solução salina estéril (NaCl 0,9%); (B) grupo controle: inflamação induzida por carragenina e tratado com salina; (C) grupo fármaco padrão: inflamação induzida por carragenina e tratado com dexametasona, 0,5 mg/kg; (D) e (E) grupo tratado com os derivados em estudo: inflamação induzida por carragenina e tratado com os derivados R-99 e R-123, 15 mg/kg, respectivamente. HE, 100 μm. (→) alvéolos; (→) brônquios; (→) vasos sanguíneos.

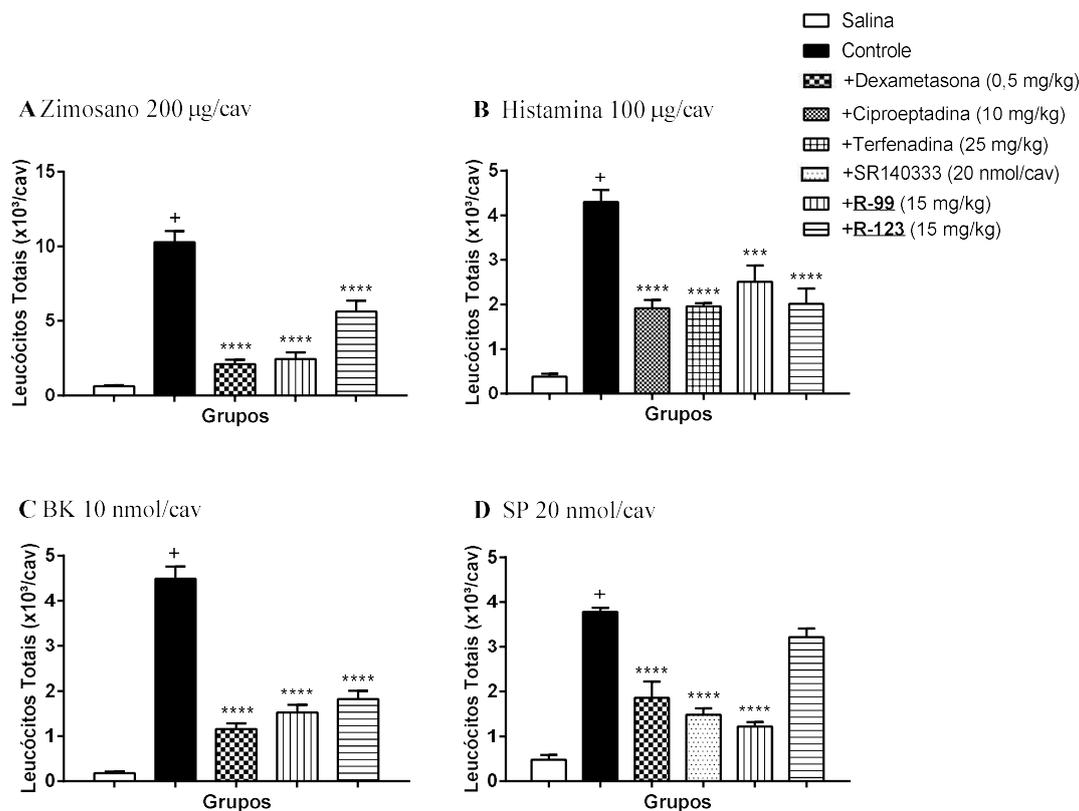
Em comparação aos camundongos onde a pleurisia foi induzida por solução salina, os camundongos que tiveram a pleurisia induzida por carragenina apresentaram alterações patológicas dos pulmões com infiltração de células inflamatórias e edema local. Os resultados mostraram que os derivados R-99 e R-123 diminuíram a inflamação

pulmonar nos animais inflamados. Nas análises microscópicas observamos que a pleurisia induzida por carragenina apresentou um infiltrado celular perivascular e peribronquiolar. As análises histológicas mostraram que, quando administrados os pré-tratamentos 1 hora antes da indução da pleurisia, mudanças morfológicas foram significativamente suprimidas no pulmão, tal como edema, acúmulo de células inflamatórias e espessura alveolar, reduzindo desse modo a lesão pulmonar.

3.2 PLEURISIA INDUZIDA POR DIVERSOS AGENTES FLOGÍSTICOS

Os resultados da atividade anti-inflamatória no teste da pleurisia induzida por zimosano encontram-se descritos na Figura 21 A. Os compostos **R-99** e **R-123** apresentaram atividade anti-inflamatória indicada por uma diminuição significativa na migração celular em 76,3 e 45,1 % (com diferença estatística entre eles - $**p<0,01$), respectivamente, quando comparados ao grupo controle zimosano. Já no teste da pleurisia induzida por histamina (Figura 21 B) os derivados **R-99** e **R-123** apresentaram diminuição significativa na migração celular (41,7 e 53%, respectivamente) em relação ao grupo controle histamina. Na Figura 21 C observamos que os dois compostos testados diminuíram a migração leucocitária para a cavidade torácica dos animais quando comparados ao grupo controle de 66% para **R-99** e 59,4 % para **R-123** no modelo de pleurisia induzida por bradicinina. Os resultados do teste da pleurisia induzida por substância P encontram-se na Figura 21 D. O composto **R-99** diminuiu significativamente a migração celular em 67,7% quando comparado ao grupo controle. Todavia, o composto **R-123** não apresentou atividade inibitória sobre a migração leucocitária induzida por substância P.

Figura 21 - Efeito no tratamento com os derivados R-99 e R-123 na migração de leucócitos totais para a cavidade pleural dos animais no teste de pleurisia induzida por diversos agentes flogísticos.



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

(A) Zimosano; (B) Histamina; (C) Bradicina; (D) Substância P. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle.

Inúmeras substâncias são conhecidas por induzir a pleurisia em camundongos, promovendo a liberação de diferentes mediadores inflamatórios (DALMARCO; FRODE, 2007). O influxo de leucócitos do sangue para o local da inflamação desempenha um importante papel na modulação da resposta inflamatória (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1996). Dentre os agentes flogísticos utilizados, o zimosano provoca a inflamação através da indução de uma grande variedade de mediadores inflamatórios que incluem componentes do sistema complemento, prostaglandinas, leucotrienos, fator de agregação plaquetária, radicais livres de oxigênio e enzimas lisossômicas, além de ativar diretamente os macrófagos. Após serem ativados, os macrófagos liberam enzimas lisossômicas, metabólitos reativos de oxigênio, ácido araquidônico e TNF- α (VOLMAN; HENDRIKS; GORIS, 2004). Estudos realizados por Silva e colaboradores (2010) demonstraram que derivados acilhidrazônicos possuem atividade anti-inflamatória

inibindo a migração leucocitária na peritonite induzida por zimosano, corroborando dessa forma com nosso estudo onde as nossas substâncias que possuem a função acilhidrazona também apresentaram atividade inibindo a migração leucocitária no modelo de pleurisia induzida por zimosano. Em testes *in vitro* onde células foram estimuladas por zimosano, compostos isoxazolínicos testados por Stojanovic et al. (2007) apresentaram inibição de mediadores químicos, como IL-1 β e TNF α . Estes resultados corroboram com os dados obtidos no nosso estudo. Como os derivados **R-99** e **R-123** inibiram a inflamação induzida por zimosano, podemos inferir que estes agem provavelmente inibindo o sistema complemento e mediadores específicos liberados durante a inflamação induzida por zimosano, entretanto testes específicos precisam ser realizados para comprovar esta hipótese. Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa (MOTA, 2013) comprovaram que esses derivados agem inibindo citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF α) e aminas vasoativas (histamina e serotonina), demonstrados nos testes de bolsão de ar e edema de pata induzido por histamina e serotonina.

Sabendo que a histamina é um mediador pró-inflamatório que está envolvido na quimiotaxia celular e na exsudação, além da ativação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , IL-6 e IL-1 β) e na contração da musculatura lisa (JUTEL; BLASER; AKDIS, 2005; AKDIS; SIMONS, 2006; HASHIMOTO; OHATA; HONDA, 2006), testamos o modelo de pleurisia induzido por esse agente flogístico para confirmar a atuação do **R-99** e **R-123** ao inibir essa amina vasoativa confirmando os estudos anteriores. Saleh, Calixto e Medeiros (1999) demonstraram a participação da histamina via ativação de seu receptor H1 no modelo de pleurisia induzida por carragenina em camundongos. Observou-se nesse estudo que os animais quando foram tratados com terfenadina, antagonista seletivo de receptores H1, apresentaram uma inibição na migração de leucócitos e de polimorfonucleares na cavidade pleural. Provavelmente, os nossos derivados agem inibindo ativação dos receptores H1.

Em concordância com os dados obtido no nosso estudo, Silva (2015) demonstrou que compostos com a função acilhidrazona atuaram sobre a pleurisia induzida por zimosano e histamina, inibindo a migração leucocitária para a cavidade pleural. Este autor sugeriu uma possível ação desses compostos sobre a histamina e intermediários produzidos após a ativação do sistema complemento.

A bradicinina atua sobre dois tipos de receptores, B1 e B2. O receptor B1 está relacionado com o aumento da produção eosinofílica na medula óssea e sua transmigração para as vias aéreas na asma (VASQUEZ-PINTO et al., 2010). A expressão do receptor

B1 é induzida por várias citocinas pró-inflamatórias diferentes incluindo IL-1 β , TNF- α ou IFN γ . Estes estímulos agem sobre uma via de sinalização comum envolvendo o NF κ B, que é o responsável pela indução do receptor de bradicinina B1 (EL-KADY et al., 2016). Os principais efeitos mediados pelo receptor de bradicinina B1 incluem vasodilatação, extravasamento de proteína plasmática, mediação de dor, ativação de interações leucócitos/células endoteliais, e recrutamento leucocitário (ELLIS; FOZARD, 2002).

Os derivados **R-99** e **R-123** reduziram a migração leucocitária na inflamação induzida por BK, inibindo provavelmente os receptores B1, que são expressos em condições patológicas nas vias aéreas, e/ou inibindo a ação de mediadores que modulam esse receptor, como a IL-1 β e o TNF- α . Resultados semelhantes foram encontrados no uso de antagonistas desse receptor. Vasquez-Pinto et al. (2010) mostraram que, num modelo murino de inflamação alérgica das vias aéreas, o antagonista do receptor B1 tem um efeito inibitório sobre os eosinófilos, além de aumentar a produção de citocinas envolvidas na reparação tecidual (TGF- β e VEGF). Já os estudos realizados por El-Kady e colaboradores (2016) demonstraram que antagonistas do receptor B1 de bradicinina modulam a fase tardia da inflamação pulmonar alérgica, diminuindo o infiltrado leucocitário, principalmente o número de eosinófilos, e diminuem também os níveis de IL-1 β e IgE específico para OVA (IgE anti-OVA).

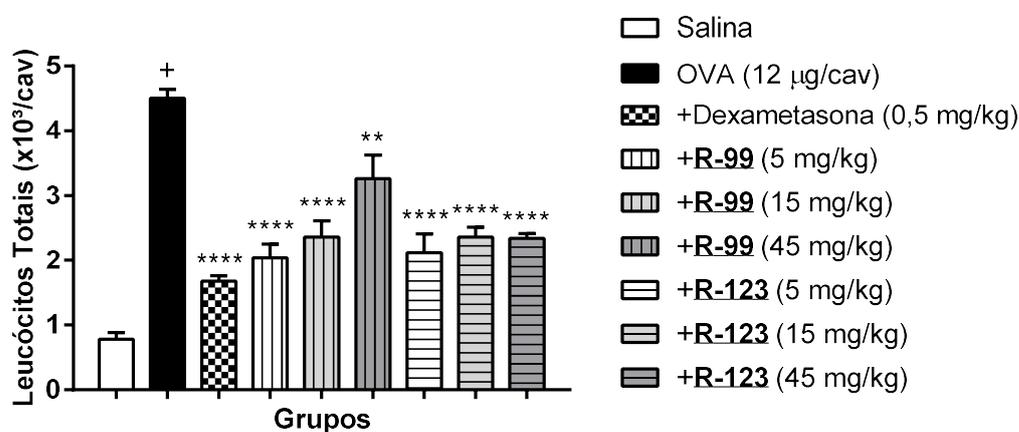
Sabe-se que a substância P (SP) age como agonista de receptores de neuroquinina 1 (NK-1), que uma vez ativado desencadeia a transdução de sinais de diversas cascatas que geram respostas inflamatórias, aumentando a liberação de NO e com ação sinérgica sobre cininas, em especial a bradicinina (BERTRAND; GEPPETTI, 1996; HALL; MORTON, 1997; HOLZER, 1998). Um estudo relatou que em animais previamente tratados com antagonistas específicos para os receptores NK1, NK2 e NK3 (SR140333, SR48968 e SR142801, respectivamente) diminuíram o fluxo de leucócitos para a cavidade peritoneal no modelo de hiperalgesia induzida por formalina, em ratos (SANTOS et al., 2003). Outro estudo revelou que a SP age via receptor de taquicinina NK1 promovendo a migração leucocitária induzida por TNF- α , no modelo de inflamação cutânea, em camundongos (COSTA et al., 2006). Um ponto em comum desses estudos é que há a necessidade de antagonizar o receptor NK1 para que haja redução do influxo leucocitário. Os dados apresentados no nosso estudo mostraram que o derivado **R-99** reduziu a migração leucocitária para a cavidade pleural provavelmente antagonizando com o receptor NK1.

Portanto, os resultados do presente trabalho sugerem que a atividade anti-inflamatória dos derivados **R-99** e **R-123** está relacionada com a capacidade de inibir a ação da histamina e bradicinina. A única diferença encontrada entre esses dois derivados – que possuem o mesmo núcleo, diferindo só os radicais entre si – foi a possível atividade antagonista a receptores NK1 que o **R-99** apresentou ao inibir a SP.

3.3 PLEURISIA ALÉRGICA INDUZIDA POR OVALBUMINA

Para avaliar se os derivados **R-99** e **R-123** também apresentam atividade na inflamação alérgica, foi utilizado o modelo de pleurisia induzido por OVA em camundongos BALB/c. Os animais tratados com os derivados apresentaram significativa redução na migração leucocitária para a cavidade torácica quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 22). Os compostos **R-99** e **R-123**, nas doses de 5, 15 e 45 mg/kg, apresentaram inibição de 54,3; 47,1; 26,9; 52,5; 47,1 e 47,5 %, respectivamente. A dexametasona apresentou uma inibição de 62,3%.

Figura 22 - Efeito do tratamento com os derivados **R-99** e **R-123** na migração de leucócitos totais para a cavidade pleural dos animais no teste de pleurisia induzida por ovalbumina.



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

Os resultados estão descritos como média \pm erro padrão da média. **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle.

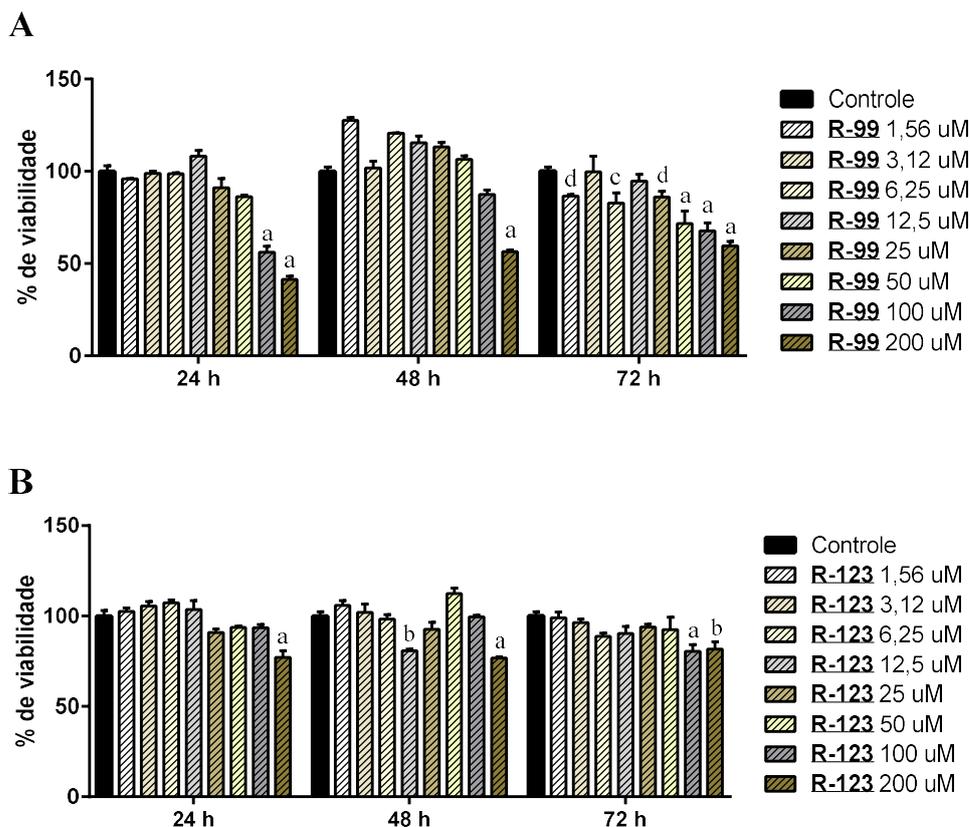
A inflamação alérgica no modelo de pleurisia induzida por OVA reproduz uma resposta inflamatória eosinofílica identificada como uma alteração na patogênese de doenças alérgicas (AGRA et al., 2016). Essas reações que requerem sensibilização específica para o alérgeno e reexposição ao antígeno provocam ativação e a secreção de

uma gama de mediadores em células alvo que danificam diretamente o tecido adjacente e induzem a infiltração de leucócitos, contribuindo para a exacerbação da resposta inflamatória (BARNES, 2011). Os derivados **R-99** e **R-123** reduziram a infiltração leucocitária, principalmente a eosinofílica, levando à redução de danos teciduais na cavidade pleural. Os mediadores inflamatórios derivados de eosinófilos podem ser medidos em pacientes asmáticos no lavado broncoalveolar, na expectoração e no epitélio que está danificado (BRIGHTLING et al., 2003). Além disso, o infiltrado eosinofílico clinicamente tem sido correlacionado com a hiper-responsividade das vias aéreas (SIDDIQUI et al., 2007).

3.4 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR EM MASTÓCITOS DA LINHAGEM P815

Os resultados obtidos demonstraram que o derivado **R-99** não apresentou toxicidade nas concentrações abaixo de 50 μM à cultura de células P815 de mastócitos de camundongos, por meio do ensaio de MTT. O **R-99** no tempo de 24 h apresentou uma viabilidade celular de $56,2 \pm 6,5\%$ e $41,5 \pm 3,5\%$ nas concentrações de 100 μM e 200 μM , respectivamente. No tempo de 48 h a porcentagem da viabilidade celular da concentração de 200 μM foi de $56,6 \pm 1,7\%$, e em 72 h foi de $59,7 \pm 4,7\%$ (Figura 23 A). Enquanto a menor porcentagem da viabilidade celular apresentada pelo **R-123** foi de $77,1 \pm 7,5\%$ em 24 h, e $76,7 \pm 1,5\%$ em 48 h na concentração de 200 μM , ou seja, não é citotóxico em nenhuma das concentrações testadas (Figura 23 B).

Figura 23 - Efeito do tratamento com os compostos **R-99** e **R-123** sobre a viabilidade celular (%) medido pelo teste de MTT em diferentes tempos nas células da linhagem P815 tratadas com diferentes concentrações de **R-99** (A) e **R-123** (B).



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

Os resultados representam a média \pm Erro Padrão da Média de 2 replicatas por grupo. ^a $p < 0.0001$, ^b $p < 0.001$, ^c $p < 0.01$, ^d $p < 0.05$. Significativos após análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle.

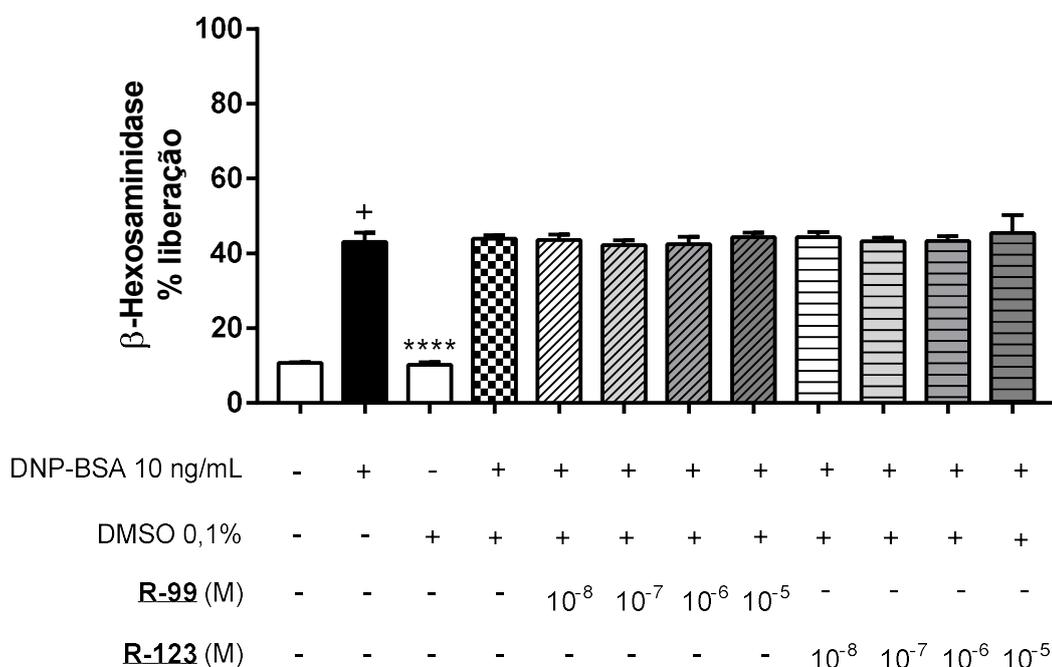
Para avaliar o efeito dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas aza-bicíclicos **R-99** e **R-123**, o primeiro ensaio realizado foi o de citotoxicidade que teve como princípio verificar a viabilidade celular do mastócito murino da linhagem P815. Devido a proporcionalidade da quantidade de cristais de formazan gerados e a funcionalidade mitocondrial das células é possível verificar o número de células viáveis, detectando as células vivas, metabolicamente ativas, e o sinal é dependente do grau de ativação dessas células (MOSMANN, 1983; PRINSLOO; PIETERS; BEZUIDENHOUT, 2013). 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).

As células da linhagem P815 continuaram viáveis após o tratamento com os derivados isoxazolina-acilhidrazonas. O **R-123** pode ser considerado um composto muito ativo pois apresentou uma viabilidade celular acima de 70 % em todas as concentrações testadas. Enquanto que o **R-99**, nas concentrações de 100 e 200 μM reduziram a viabilidade, sendo consideradas como fracamente a moderadamente ativas.

3.5 AVALIAÇÃO DE CÉLULAS ALVO “*IN VITRO*” - MASTÓCITOS

Avaliamos o efeito dos derivados **R-99** e **R-123** em uma linhagem de mastócitos, RBL-2H3. Observamos que células sensibilizadas com IgE anti-DNP-BSA foram responsivas ao desafio com DNP-BSA, uma vez que a taxa de liberação de β -hexosaminidase no sobrenadante elevou-se de aproximadamente 10% para 46% em resposta à estimulação. O tratamento com **R-99** e **R-123** em diferentes concentrações foi incapaz de impedir a desgranulação passiva de mastócitos induzida pelo desafio antigênico (Figura 24).

Figura 24 - Efeito do tratamento com os compostos **R-99** e **R-123** sobre desgranulação anafilática de mastócitos. Células da linhagem RBL-2H3 foram sensibilizadas com IgE anti-DNP-BSA e tratadas com diferentes concentrações de **R-99** e **R-123** durante 1 h.



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

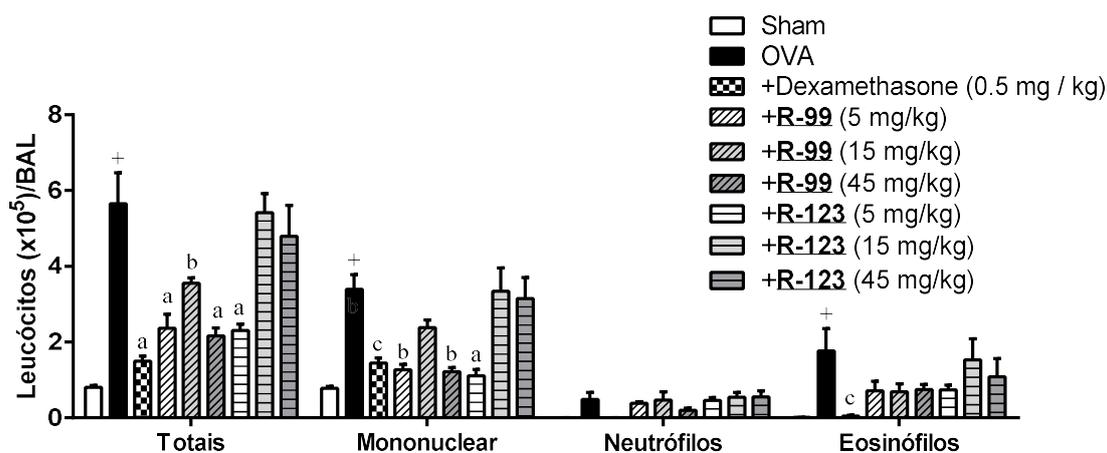
Os resultados representam a média \pm Erro Padrão da Média de 3 replicatas por grupo. **** $p < 0,0001$. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo não estimulado.

Os mastócitos desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de respostas alérgicas (AMIN, 2012). A RBL-2H3 é uma linhagem celular de leucemia basofílica isolada e clonada a partir de células basofílicas de ratos Wistar. As características biológicas dessas células são bastante semelhantes à dos mastócitos maduros humanos. Essa linhagem tem sido amplamente utilizada para os estudos de interações IgE (Fc ϵ RI), via de sinalização de degranulação e diferentes aspectos da secreção nas células (BO et al., 2011). Diante da importância dos mastócitos na patogênese da asma, foi verificado o efeito dos derivados **R-99** e **R-123** sobre a degranulação anafilática de células da linhagem RBL-2H3. Foi observado que a taxa de liberação de β -hexosaminidase não foi modificada pelo tratamento com os derivados. A enzima β -hexosaminidase é uma exoglicosidase localizada nos mastócitos, está associada a grânulos e é liberada em paralelo à histamina após a ativação do mastócito. A liberação de β -hexosaminidase é proporcional ao grau de degranulação, e é comumente utilizada como marcador clínico para a degranulação nos mastócitos (BO et al., 2011).

3.6 MODELO DE ASMA EXPERIMENTAL INDUZIDA POR OVALBUMINA

A migração de células inflamatórias para o espaço broncoalveolar é uma característica importante da asma alérgica e o tratamento com os derivados isoxazolina-acilhidrazonas **R-99** (nas doses de 5, 15 e 45 mg/kg) e **R-123** (na dose de 5 mg/kg), uma hora antes de cada desafio, reduziram o número de células inflamatórias presentes do BAL, quando comparado ao grupo controle OVA (Figura 25). A redução dessas células presentes no lavado foi de 58,2%, 37,2%, 61,7% e 59,2%, respectivamente. O tratamento com dexametasona também inibiu a quantidade de células inflamatórias no BAL em 73,5%, quando comparado ao grupo controle OVA.

Figura 25 - Efeito do tratamento com os derivados isoxazolina-acilhidrazonas aza-bicíclicos R-99 e R-123 sobre inflamação alérgica das vias aéreas induzida por ovalbumina (OVA).



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

Leucócitos totais, células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos foram diferenciados em amostras de lavado broncoalveolar. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média (n=5). ^ap<0.0001, ^bp<0.001, ^cp<0.01, ^dp<0.05. Significativos após análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo desafiado por OVA.

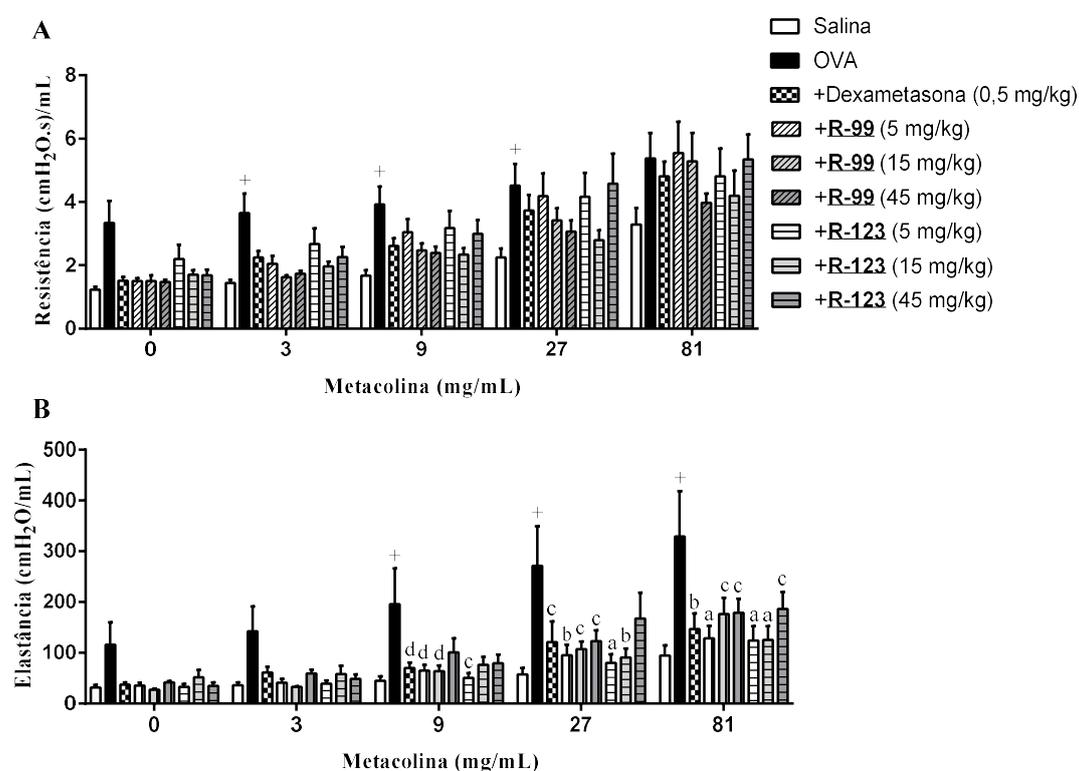
A asma alérgica é caracterizada por um intenso influxo de eosinófilos e linfócitos no BAL (SIDDQUI; SECOR; SILBART, 2013). As principais características da asma aguda incluem uma resposta exagerada das vias aéreas aos estímulos, como a metacolina (hiperresponsabilidade das vias aéreas, AHR) e a inflamação das vias aéreas ricas em eosinófilos (REDDY; LAKSHMI; REDDY, 2012). Nesse modelo animal é observado as principais características da asma alérgica, entre elas, a hiper-reatividade das vias aéreas, recrutamento de eosinófilos para o pulmão, extravasamento de plasma, muco e broncoconstrição (BLYTH et al., 1996). Os dados obtidos no ensaio de inflamação alérgica mostraram que os derivados R-99 e R-123 foram eficientes na prevenção da inflamação brônquica induzida por OVA.

3.6.1 Avaliação de hiper-reatividade das vias aéreas e função pulmonar

A ação de R-99 e R-123 sobre a função pulmonar e a hiper-reatividade das vias aéreas de camundongos sensibilizados e desafiados com OVA. Os animais submetidos ao desafio antigênico apresentaram níveis basais de resistência pulmonar aumentados em relação aos seus respectivos controles. Mediante a aerossolização de concentrações crescentes (3 – 81 mg/mL) do agente colinérgico broncoconstritor, metacolina, observou-se a intensificação da resposta de resistência pulmonar de maneira concentraçõ-

dependente, tanto nos animais controle como nos animais desafiados com OVA, sendo esses últimos nitidamente mais reativos à estimulação. A administração profilática das doses dos derivados **R-99** e **R-123** (5, 15 e 45 mg/kg) não apresentaram efeito inibitório sobre a resposta de resistência pulmonar produzida pelas concentrações de 3, 9, 27 e 81 mg/mL de metacolina nos animais antígenicamente desafiados (Figura 26 A). Ao observamos a elastância pulmonar, verificamos a presença de níveis basais mais elevados nos animais expostos ao alérgeno, quando comparado ao grupo controle. Isso foi evidenciado por uma resposta acentuada quando esses animais foram submetidos à estimulação com metacolina, tornando-se notória a presença de hiper-reatividade no quadro asmático. Nessas condições, o pré-tratamento com os compostos **R-99** e **R-123** em todas as concentrações testadas inibiram as alterações de elastância pulmonar pelas concentrações de 9, 27 e 81 mg/mL de metacolina quando comparado ao grupo controle ovoalbumina (Figura 26 B).

Figura 26 - Efeito do tratamento com derivados isoxazolina-acilhidrazonas **R-99 e **R-123** sobre a função pulmonar e hiper-reatividade das vias aéreas em camundongos ativamente sensibilizados, nos dias 0 e 14, e desafiados com ovoalbumina no 21º ao 24º dia após a sensibilização.**



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

O tratamento com **R-99** e **R-123** (5, 15 e 45 mg/kg) foi realizado, por via oral, 1 h antes de cada desafio antígeno. Os parâmetros de resistência (A) e elastância (B) pulmonares foram analisados perante aerossolização de PBS ou metacolina (3 – 81 mg/mL), 24 h após a última nebulização de OVA, com ajuda

de metodologia baseada na técnica de pletismografia barométrica de corpo inteiro invasiva. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média (n=5). ^ap<0.0001, ^bp<0.001, ^cp<0.01, ^dp<0.05. Significativos após análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo desafiado por OVA.

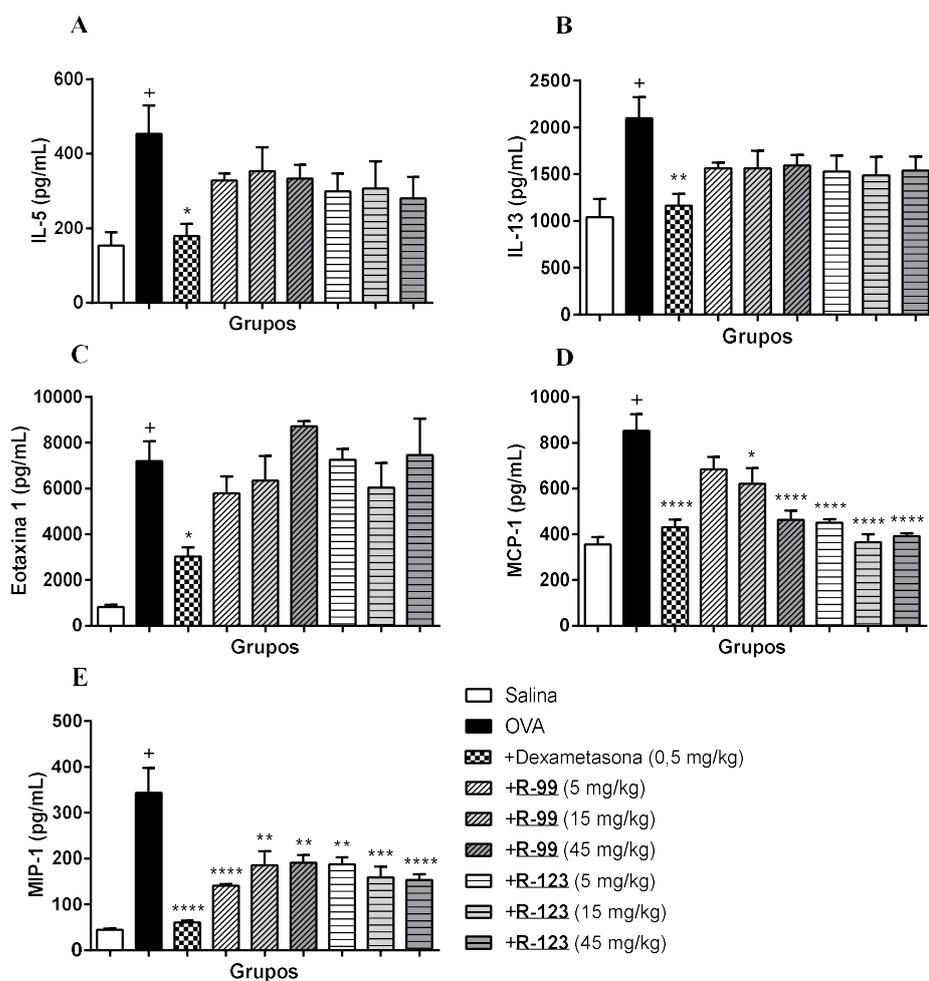
A hiper-responsividade das vias aéreas (AHR) é uma característica fisiopatológica importante da asma (HWANG; PAIK; YEE, 2017). O tratamento com os derivados isoxazolina-acilhidrazonas não alterou a resistência do sistema respiratório (a resistência central das vias aéreas), porém diminuiu a elastância do tecido pulmonar nos camundongos “asmáticos” induzidos por OVA. Os dados mostraram ainda que provocações antigênicas com OVA causaram alterações na mecânica ventilatória, levando ao aumento dos níveis basais de resistência e elastância pulmonares, evidenciando assim um alto grau de comprometimento dos pulmões desses animais. A aerossolização de metacolina revelou a presença de hiper-reatividade no quadro, ao ser verificada a intensificação da resposta de resistência e elastância pulmonares. A presença de hiper-reatividade frente à estimulação com metacolina converge com relatos da literatura que ressaltam intensas manifestações de constrição das vias aéreas quando pacientes asmáticos são submetidos a provocações com agentes broncoconstritores (CAIN, 2001; BUSSE, 2010; BRANNAN; LOUGHEED, 2012).

Verificamos que o tratamento com **R-99** e **R-123** foram eficientes na prevenção da inflamação brônquica e da produção de mediadores inflamatórios induzida pela provocação com ovoalbumina. Os compostos não foram eficazes em prevenir o aumento da resistência, mas agiram na elastância pulmonar. A elasticidade pulmonar é determinada primariamente pela presença de constituintes elásticos e musculares na composição tecidual do órgão, e por outro componente não tecidual, que é a tensão superficial na interface ar-líquido nos alvéolos. Todos esses elementos juntos podem ser quantificados pela elastância (SUKI; STAMENOVIC; HUBMAYR, 2011). A elastância captura a rigidez elástica do sistema respiratório na frequência de ventilação. Se medido em condições de peito fechado, inclui uma contribuição do pulmão, das paredes do tórax e das vias aéreas. Já a resistência das vias aéreas é determinada pelas dimensões internas das suas várias ramificações. A via aérea pulmonar começa com a traqueia e continua através de uma série de bifurcações até atingir os bronquíolos terminais. A resistência avalia quantitativamente o nível de constrição nos pulmões (BATES, 2009).

3.6.2 Determinação dos níveis de citocinas

A análise da produção de mediadores da inflamação mostrou uma acentuada geração de IL-5 (Figura 27 A), IL-13 (Figura 27 B), eotaxina-1 (Figura 27 C), MCP-1 (Figura 27 D) e MIP-1 (Figura 27 E) nos pulmões de camundongos desafiados com OVA, comparado aos animais instilados apenas com salina. Os compostos **R-99** e **R-123** não inibiram a produção de IL-5, IL-13 e eotaxina-1, entretanto, foi observado uma redução significativa de MCP-1 (**R-99** nas doses de 15 e 45 mg/kg; **R-123** em todas as doses testadas), e MIP-1 (todas as doses testadas dos dois compostos) no tecido pulmonar (Figura 27 D e E, respectivamente) quando comparado ao grupo controle OVA.

Figura 27 - Efeito do tratamento com derivados isoxazolina-acilhidrazonas **R-99 e **R-123** sobre a geração de citocinas e quimiocinas nos pulmões de camundongos ativamente sensibilizados nos dias 0 e 14 e desafiados com OVA no 21º ao 24º dia após a sensibilização.**



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

O tratamento com **R-99** e **R-123** (5, 15 e 45 mg/kg) foi realizado, por via oral, 1 hora antes de cada desafio antigênico. Foram quantificados os níveis teciduais de IL-5 (A), IL-13 (B), eotaxina-1 (C), MCP-1 (D) e MIP-1 (E), através do método de ELISA. Os resultados representam a média \pm Erro Padrão da Média (n=5). ****p<0.0001, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo desafiado por OVA.

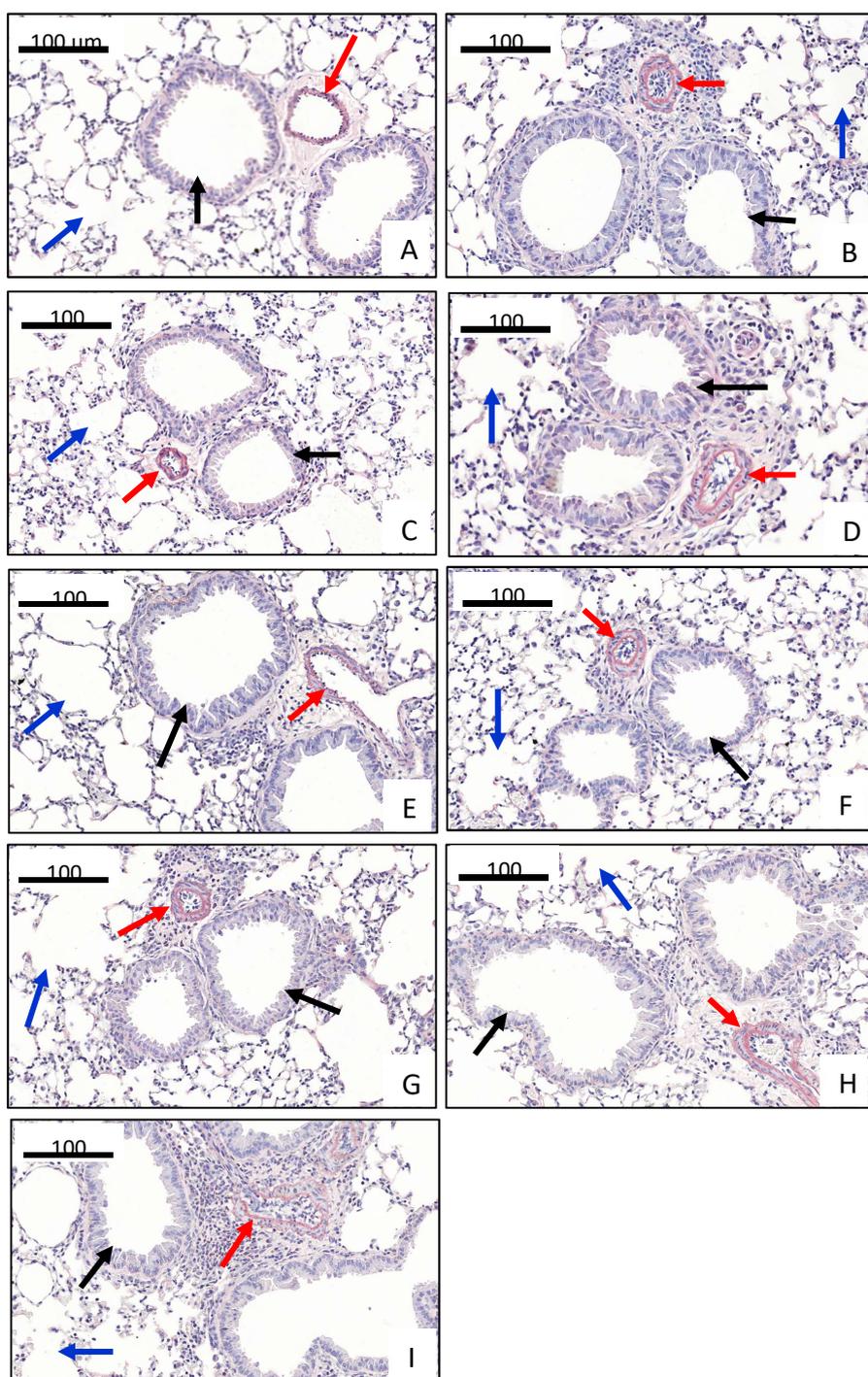
Os dados obtidos no presente trabalho mostraram que a provocação de camundongos sensibilizados com ovoalbumina aumentaram o número de células inflamatórias no espaço broncoalveolar, com a presença de grande número de eosinófilos, células mononucleares e neutrófilos. Esse fenômeno foi ainda associado ao aumento nos níveis teciduais de citocinas de perfil Th2, como IL-5 e IL-13, e das quimiocinas eotaxina-1, MCP-1 e MIP-1. Os nossos compostos não apresentaram efeito sobre as citocinas do perfil Th2 (IL-5 e IL-13) e nem sobre a eotaxina-1. A sua ação anti-inflamatória nesse modelo está relacionada a inibição de quimiocinas que estão relacionadas com células mononucleares (MCP-1 e MIP-1), e provavelmente com as citocinas de perfil Th1 (IL-1 β e TNF- α). A MCP-1 tem uma potente ação quimioatraente para monócitos, enquanto que a MIP-1 são cruciais para a quimiotaxia de células T da circulação para o tecido inflamado e também participam da regulação da migração transendotelial de monócitos, células dendríticas e células NK- natural killer (DESHMANE et al., 2009; MAURER; STEBUT, 2004).

3.6.3 Análise histopatológica do pulmão

A análise do tecido pulmonar corado com sirius red pH 10.2 (Fig. 28) revelou que as áreas peribronquiolar e perivascular, dos animais sensibilizados e desafiados com OVA e tratados com o veículo, apresentaram um grande número de leucócitos, com significativo aumento do número de eosinófilos e células mononucleares (Fig. 28 B). O tratamento com dexametasona (0,5 mg/kg), **R-99** (5, 15 e 45 mg/kg) e **R-123** (5 e 15 mg/kg) (Fig. 28 C, D, E, F, G e H, respectivamente) reduziram significativamente a infiltração leucocitária nestas regiões quando comparados ao controle desafiado (Fig. 28 B). Outro parâmetro observado nos cortes histológicos foi a hipertrofia do epitélio brônquico nos animais alérgicos (Fig. 28 B) que foi reduzida com a administração dos tratamentos (Fig. 28 C, 28 E - I). Também foi observado que o grupo desafiado apresentou um aumento da parede epitelial de revestimento e diminuição da luz dos alvéolos, brônquios e bronquíolos e não houve preservação do epitélio de revestimento (Fig. 28 B). Os grupos tratados com dexametasona, **R-99** e **R-123** (Fig. 28 C, D e E, respectivamente)

demonstraram que houve conservação de brônquios, bronquíolos e do tecido epitelial de revestimento, todavia só ocorreu aumento da luz alveolar nos grupos tratados com os derivados isoxazolina-acilhidrazonas **R-99** (5 e 15 mg/kg) e **R-123** (5, 15 e 45 mg/kg) (Fig. 28 D, E, G, H e I, respectivamente).

Figura 28 - Efeitos dos derivados isoxazolina-acilhidrazona sobre as mudanças histopatológicas do tecido pulmonar de animais alérgicos e marcação de eosinófilos teciduais.



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

Os tecidos foram corados com Sirius red pH 10.2. (A) grupo basal sensibilizado e desafiado com salina; (B) grupo alérgico: sensibilizado e desafiado com OVA e tratado com salina; (C) grupo alérgico desafiado e tratado com dexametasona, 0,5 mg/kg; (D, E e F) grupo alérgico desafiado e tratado com o derivado isoxazolina-acilhidrazona **R-99**, 5, 15 e 45 mg/kg, respectivamente; (G, H e I) grupo alérgico desafiado e tratado com o derivado isoxazolina-acilhidrazona **R-123**, 5, 15 e 45 mg/kg, respectivamente. Sirius red pH 10.2, 100 µm. (→) alvéolos; (→) brônquios; (→) vasos sanguíneos.

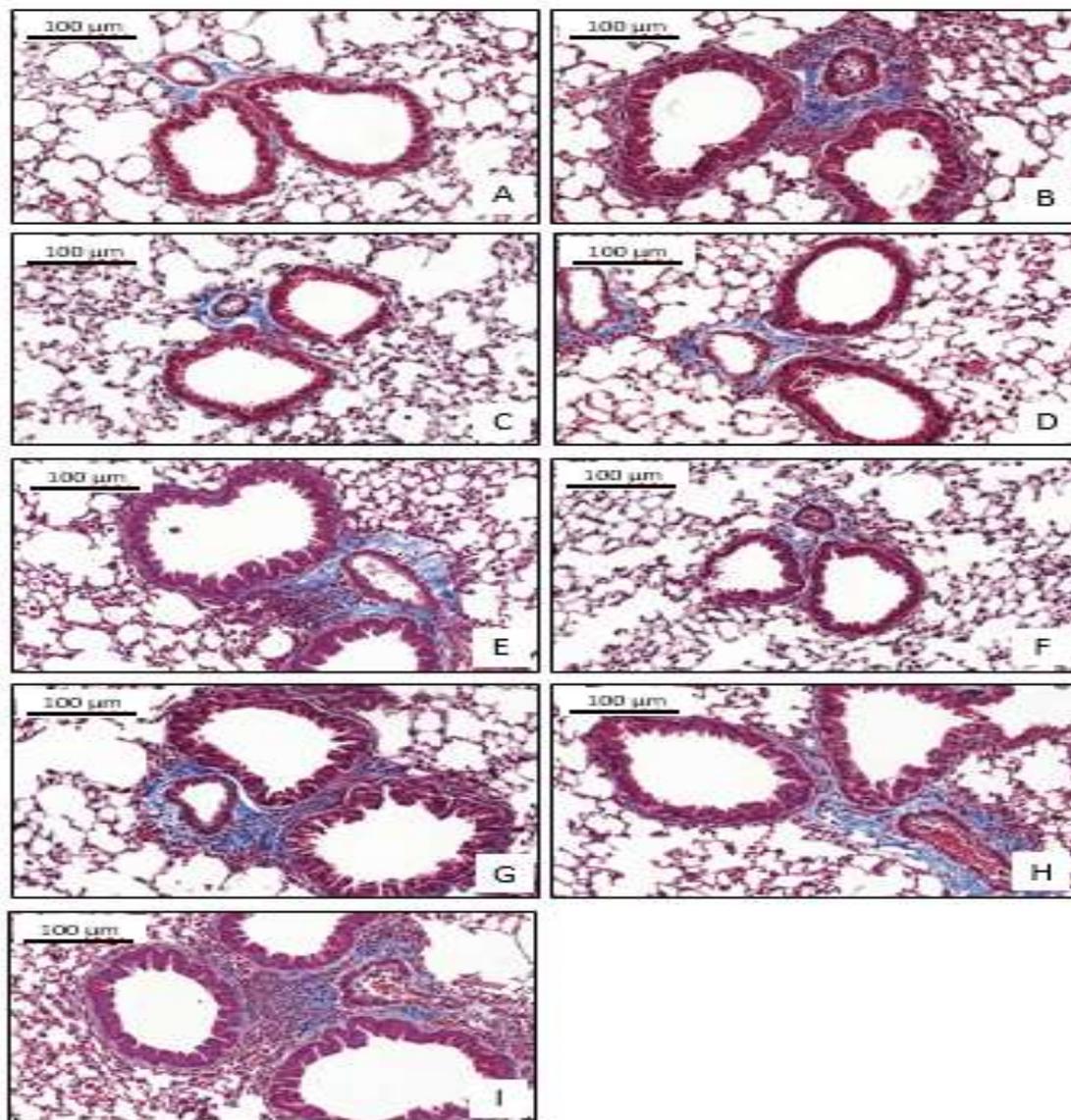
As principais características histopatológicas das alergias pulmonares incluem o acúmulo de células inflamatórias, principalmente eosinófilos, dentro do pulmão, presença de células calciformes metaplásicas no epitélio das vias respiratórias, as quais apresentam um fenótipo secretor de muco, além de mastócitos e linfócitos (BARNES et al., 2008).

As modificações estruturais asmáticas típicas incluem danos epiteliais, hiperplasia da glândula mucosa, deposição de colágeno e proteoglicanos na membrana basal subepitelial, angiogênese e aumento da massa do músculo liso nas vias aéreas (BOULET, 2018). Os dados histológicos obtidos no nosso estudo confirmam os achados relacionados à contagem celular no BAL, demonstrando que os grupos tratados (dexametasona 0,5 mg/kg, **R-99** 5, 15 e 45 mg/kg e **R-123** 5 mg/kg) apresentaram significativa diminuição do infiltrado celular quando comparados com o controle asmático. Na análise histológica dos pulmões dos animais do grupo induzido por OVA, observou-se aumento da parede epitelial de revestimento e diminuição da luz dos alvéolos, intenso infiltrado leucocitário perivascular e peribronquiolar, basofilia nuclear e não houve preservação do epitélio de revestimento dos alvéolos, brônquios e bronquíolos terminais. Nos animais tratados com dexametasona, a análise histológica mostrou conservação do tecido epitelial de revestimento, brônquios, bronquíolos e aumento da luz alveolar. Nos grupos **R-99** e **R-123** foram observados a preservação do tecido epitelial de revestimento, do epitélio de revestimento dos alvéolos, brônquios, bronquíolos e aumento da luz alveolar. Todos os grupos tratados, exceto **R-123** 15 e 45 mg/kg, apresentaram diminuição do infiltrado leucocitário quando comparados com o grupo controle OVA. O grupo salina apresentou alvéolos íntegros, brônquios e bronquíolos terminais com epitélio de revestimento conservados, tecido conjuntivo mucoso conservado, vasos sanguíneos com endotélio preservado e preservação do tecido epitelial de revestimento.

As análises dos cortes histológicos de tecido pulmonares corados com tricrômio de Masson demonstraram a presença de fibras colágenas nas áreas peribronquiolar e, principalmente, perivascular, no grupo sensibilizado e desafiado com OVA (Fig. 29 B). O número de fibras colágenas apresentou-se reduzidas no grupo basal, animais desafiados

com salina (Fig. 29 A). O tratamento com dexametasona, **R-99** e **R-123**, em todas as doses, aparentemente reduziram o número de fibras colágenas (Fig. 29 C, D, E, F, G, H e I), quando comparamos ao grupo desafiado por OVA (Fig, 29 B).

Figura 29 - Efeitos dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas **R-99 e **R-123** sobre a análise de fibras colágenas nas vias aéreas de animais sensibilizados e broncoprovocados**



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

Os tecidos foram corados com tricrômio de Masson. (A) grupo basal sensibilizado e desafiado com salina; (B) grupo alérgico: sensibilizado e desafiado com OVA e tratado com salina; (C) grupo alérgico desafiado e tratado com dexametasona, 0,5 mg/kg; (D, E e F) grupo alérgico desafiado e tratado com o derivado isoxazolina-acilhidrazona **R-99**, 5, 15 e 45 mg/kg, respectivamente; (G, H e I) grupo alérgico desafiado e tratado com o derivado isoxazolina-acilhidrazona **R-123**, 5, 15 e 45 mg/kg, respectivamente. Tricrômio de Masson, 100 µm.

A deposição de colágeno, outro parâmetro histológico que avaliamos, é um potente marcador do processo de remodelamento pulmonar. Correlações clínicas foram

encontradas entre a gravidade da asma, AHR e deposição subepitelial de colágeno tipos I e III nas vias aéreas. A fibrose subepitelial tem sido associada à gravidade da asma e, em asma grave, observa-se aumento da espessura da parede da via aérea (BERGERON; TULIC; HAMID, 2010). Nossos resultados histológicos corroboram com o teste da hiper-reatividade das vias aéreas e função pulmonar onde podemos observar que os derivados **R-99** e **R-123** agiram na elastância melhorando a elasticidade pulmonar. Ao observarmos histologicamente os pulmões, constatamos que a quantidade de fibras colágenas desses grupos tratados está diminuída.

Os corticosteróides inalados ajudam a restaurar a integridade epitelial e podem prevenir alterações vasculares e deposição de componentes da matriz extracelular nas vias aéreas, mas seu efeito na deposição de colágeno é limitado. Em modelos animais, os antagonistas dos receptores de leucotrienos e os anticolinérgicos demonstraram influenciar características de remodelação das vias aéreas, como a metaplasia das células caliciformes, a espessura do músculo liso e a fibrose das vias aéreas, mas se esses efeitos também acontecem em seres humanos permanecem incertos (BOULET, 2018).

3.7 ATIVIDADE EXPECTORANTE

Os resultados da atividade expectorante encontram-se na Tabela 1. Os compostos **R-99** e **R-123** apresentaram atividade expectorante, 224,1% e 326,0%, respectivamente, indicada por um aumento da excreção do vermelho de fenol pela via respiratória quando comparados ao grupo controle. O fármaco padrão, o ambroxol aumentou a expectoração do vermelho de fenol em 387,8%.

Tabela 1 – Atividade expectorante dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas **R-99** e **R-123**.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Densidade óptica (546 nm)	Concentração de vermelho de fenol ($\mu\text{g/mL}$)	Aumento da expectoração (%)
Controle	-	0,133 \pm 0,03	1,19 \pm 0,31	-
<u>R-99</u>	15	0,412 \pm 0,12	3,87 \pm 1,16****	224,1
<u>R-123</u>	15	0,536 \pm 0,10	5,09 \pm 1,00****	326,0
Ambroxol	5	0,610 \pm 0,11	5,82 \pm 1,06****	387,8

Fonte: Dados da pesquisa (2018).

Os resultados representam a média \pm desvio padrão da média. ****p < 0,0001. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle.

O muco das vias aéreas é um gel não homogêneo e viscoelástico que consiste em grande parte de água, sal e um pouco de proteínas secretadas por células das glândulas submucosas, e quantidades menores de mucina, secretadas pelas células epiteliais da superfície caliciforme (KING; RUBIN, 2002). Esse muco contribui para proteger da inalação de substâncias irritantes no ar, partículas e microrganismos, prendendo material estranho em sua matriz viscosa (TESFAIGZI et al., 2000). O desequilíbrio entre a mucina e o volume de água e sal pode levar a diminuição da limpeza do muco na doença pulmonar obstrutiva crônica e na asma, porque a eficácia do batimento mucociliar estará reduzida pelo aumento da viscosidade do muco. A retenção de muco pode induzir a inflamação e tosse (RUBIN; TOMKIEWICZ; KING, 1997).

A abordagem experimental utilizada nesta pesquisa foi baseada na administração i.p. do vermelho de fenol que em parte é absorvido sistemicamente e a outra é excretada nas vias respiratórias onde podem ser coletados e quantificados. Este método oferece a vantagem de avaliar a função secretora do sistema respiratório como um todo. Foi mostrado que a concentração de vermelho fenol no fluido do trato respiratório é capaz de agir como um marcador para secreção de mucina e água, e que esta secreção pode ser influenciada pela administração de vários fármacos com atividade expectorante (ENCLER; SZELENYI, 1984). Os derivados estudados apresentaram significativa

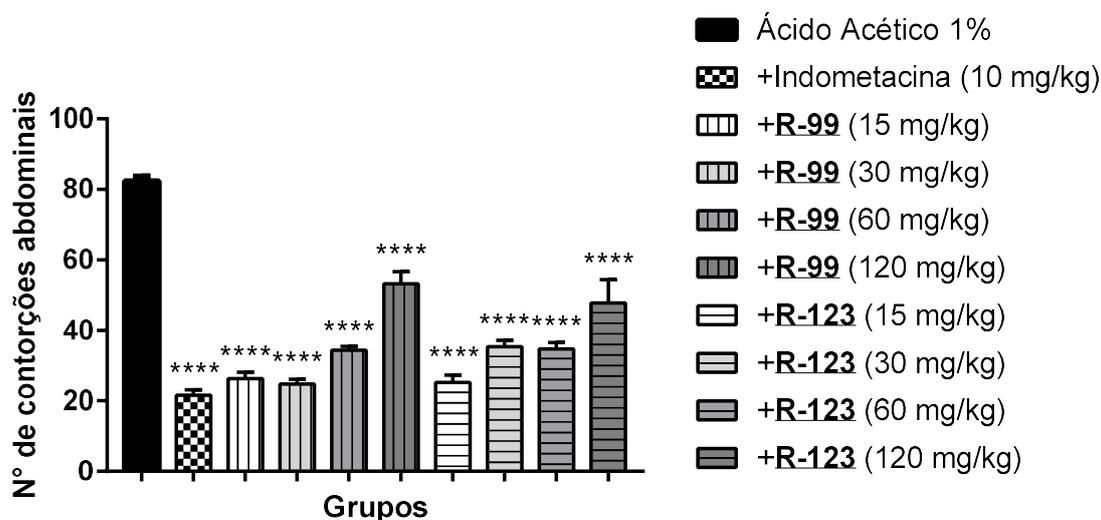
atividade expectorante, alterando a consistência do muco e aumentando o volume das secreções respiratórias, o que acaba facilitando sua eliminação.

A maioria dos fármacos expectorantes podem aumentar a secreção do muco e diluir o escarro no trato respiratório de modo a ser facilmente expectorado com o movimento ciliar (HAN et al., 2010). Expectorantes são usados para aliviar a tosse, aumentando a secreção das vias respiratórias, reduzindo assim a viscosidade e tornando a tosse mais eficaz. O mecanismo de ação de expectorantes não está completamente elucidado (KAGAN; LAVY; HOFFMAN, 2009).

3.8 NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO

O número médio de contorções abdominais após injeção do ácido acético em animais do grupo controle foi de $82,4 \pm 3,0$. Uma redução significativa das contorções abdominais [$21,5 \pm 3,5$ (73,8%)] foi observada em animais tratados com o fármaco padrão, indometacina. As doses de para os o composto **R-99** na doses de 15, 30, 60 e 120 mg/kg reduziram as contorções abdominais em [$26,4 \pm 3,8$ (68,8%), $24,8 \pm 3,0$ (69,9%), $34,4 \pm 2,4$ (58,3%) e $53,2 \pm 7,6$ (35,4%), respectivamente], enquanto que no **R-123** o número de contorções abdominais reduzidos foram de [$25,2 \pm 4,9$ (69,4%), $35,4 \pm 4,0$ (57,0%), $34,8 \pm 4,0$ (57,8%) e $47,8 \pm 14,6$ (42,0%), respectivamente], conforme mostrado na Figura 30. Essa redução ao estímulo algico do ácido acético demonstra que os derivados em estudo possuem atividade antinociceptiva frente a nocicepção visceral. A dose escolhida para a realização dos testes posteriores foi de 15 mg/kg, a menor dose utilizada que apresentou melhor resultado.

Figura 30 - Número de contorções abdominais (média ± erro médio padrão) nos grupos tratados com os derivados R-99 e R-123 no teste de contorções abdominais induzido por ácido acético.



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

****p < 0,0001. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle.

A dor é a causa mais comum para a busca de atendimento médico. Embora o alívio adequado da dor seja alcançado com os agentes analgésicos disponíveis, como os opioides ou anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), alguns de seus efeitos colaterais são as principais limitações ao seu uso rotineiro na terapia. A pesquisa sobre a dor enfoca na descoberta de drogas mais potentes e com os mínimos efeitos colaterais. É necessário levar em conta que a dor e a inflamação são processos complexos em que vários mediadores químicos como: autacoides, neurotransmissores e diferentes neuromoduladores (histamina, serotonina, adrenalina, glutamato, prostanoídes, acetilcolina e citocinas) estão envolvidos (MOGILSKI et al., 2015). O uso de modelos experimentais é imprescindível para detecção das propriedades antinociceptivas de uma substância, uma vez que diferentes estímulos mimetizam diferentes tipos de dor e revelam a natureza antinociceptiva de um composto teste (BERGEROT et al., 2006).

O teste de contorções abdominais avalia a ação analgésica por dor neurogênica (periférica), central ou inflamatória, de maneira não específica. O ácido acético causa a liberação de mediadores endógenos como PGE₂ e PGF₂α, histamina, bradicinina e serotonina, além de estimular as terminações nervosas diretamente pela redução do pH (FRANÇA et al., 2001, GUO et al., 2008). A redução do número de contorções

abdominais em resposta ao ácido acético é obtida por uma variedade de substâncias, que agem de diferentes maneiras, como por exemplo: anti-inflamatórios não-esteroidais, anticolinérgicos, narcóticos, anti-histamínicos bloqueadores de receptores H1 e H2 e anticonvulsivantes (STEPANOVIC-PETROVIC et al., 2008; ZANBOORI et al., 2008). Os derivados **R-99** e **R-123** reduziram o número de contorções abdominais em todas as doses testadas. Por ser um modelo sensível e pouco específico foi utilizado como triagem inicial, sendo dado continuidade à pesquisa realizando os testes de nocicepção induzido por formalina e capsaicina.

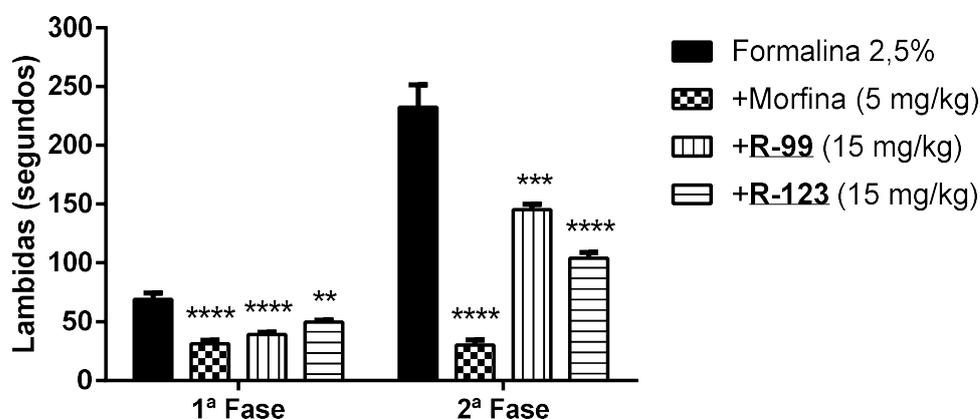
3.9 NOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA FORMALINA

Os resultados apresentados na Figura 31 mostram que os derivados **R-99** e **R-123** (15 mg/kg) causaram inibição na primeira fase do teste da formalina (dor neurogênica), diminuindo em 43% e 28%, respectivamente, o tempo de lambida da pata em relação ao grupo controle.

Na segunda fase (dor inflamatória) os derivados **R-123** e **R-99** também foram capazes de reduzir de forma significativa a dor induzida pela injeção de formalina, diminuindo em 38% e 55%, respectivamente, o tempo de lambida da pata em comparação ao grupo controle.

A morfina, droga de referência, na dose de 5 mg/kg inibiu o número de lambidas em 55% na primeira fase e 87% na segunda fase do teste da formalina.

Figura 31 - Efeito dos derivados **R-99** e **R-123** (15 mg/kg, v.o.) e morfina (5 mg/kg, s.c.) no teste de nocicepção induzido por formalina em camundongos.



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

Os resultados representam a média \pm erro padrão da média. **** $p < 0,0001$. *** $p < 0,001$. ** $p < 0,01$. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle.

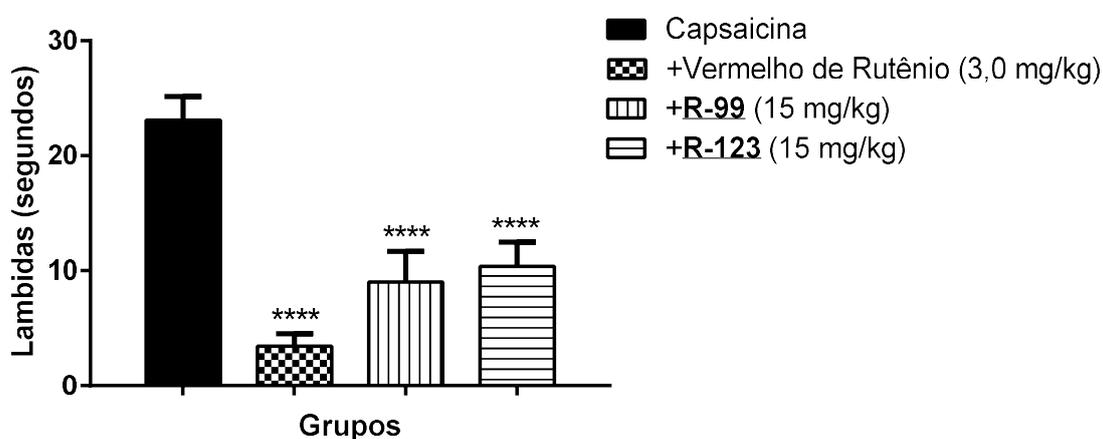
A injeção subcutânea de formalina age como um estímulo nocivo e induz uma dor difusa, moderada e de longa duração que possui profunda conexão com uma lesão tissular, o que faz deste teste um modelo válido de dor clínica. Após a injeção de formalina na pata, o comportamento nociceptivo pode ser dividido em duas fases: uma resposta rápida (primeira fase) que se inicia imediatamente após a injeção e se estende pelos primeiros 5 minutos (dor neurogênica ou aguda), é causada pela ativação do *receptor de potencial* transitório da *anquirina 1* (TRPA1) (MCNAMARA et al., 2007), estando relacionada com a estimulação química direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e, em parte, das fibras do tipo A δ e está associada à liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e substância P; e uma resposta tardia prolongada (segunda fase) que ocorre entre 15 e 30 minutos após a injeção de formalina sendo mediada por uma combinação do acesso periférico e sensibilização dos neurônios da medula espinhal e está relacionada com a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, como bradicinina, prostaglandinas, serotonina, entre outros (HUNSKAAR; HOLE, 1987). Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os derivados **R-99** e **R-123** inibiram significativamente o tempo de lambida da pata dos animais nas duas fases do teste, mostrando uma provável ação central como também possíveis indicações de um efeito antinociceptivo relacionado à inibição de mediadores inflamatórios.

Os mecanismos nociceptivos envolvidos no teste da formalina indicam que o efeito em ambas as fases do teste pode estar intimamente relacionado à ativação dos receptores do tipo TRPV1 (HWANG et al., 2000) e que substâncias que modulam este receptor reduzem a nocicepção induzida pela formalina, sugerindo a participação deste receptor no modelo de nocicepção (SANTOS et al., 1997). Alguns estudos prévios também demonstraram o envolvimento do receptor TRPV1 nas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético por estarem envolvidos em processos nociceptivos periféricos de dor somática e visceral (IKEDA et al., 2001; AKBAR et al., 2008; JURIK et al., 2014). Para confirmar se os derivados estudados podem estar atuando via receptores TRPV1, foi realizado o teste de nocicepção induzida por capsaicina.

3.10 NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR CAPSAICINA

O tratamento dos animais com os derivados **R-99** e **R-123** reduziram significativamente a dor neurogênica induzida pela injeção de capsaicina, diminuindo em 61,0% e 55,2%, respectivamente, o tempo em que o animal passou lambendo a pata em relação ao grupo controle (Figura 32). O vermelho de rutênio, antagonista não competitivo utilizado como fármaco de referência, reduziu significativamente a nocicepção induzida por capsaicina, apresentando uma inibição de 85,1% em comparação com o controle.

Figura 32 - Efeito dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas aza-bicíclicos **R-99** e **R-123** (15 mg/kg, v.o.) e vermelho de rutênio (3 mg/kg, i.p.) no teste de nocicepção induzida por capsaicina em camundongos.



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

Os resultados representam a média \pm erro padrão da média. ****p < 0,0001. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle.

O modelo nocicepção induzido por capsaicina foi proposto por Sakurada et al. (1992) para o estudo de compostos que atuam sobre a dor de origem neurôgenica. A injeção de capsaicina induz estimulação direta dos neurônios nociceptivos e causa a liberação de vários neuropeptídeos envolvidos na transmissão dolorosa, incluindo principalmente as taquicininas (substância P, neurocinina A e neurocinina B) (SAKURADA et al., 1992; 1993). Assim, esse teste foi empregado com o objetivo de evidenciar a possível interação dos derivados com esses neuropeptídios, além de verificar a participação de receptores TRPV1 periféricos.

A capsaicina é o principal agente pungente contido nas pimentas vermelhas e causa dor, queimação e irritação, estimulando pequenos neurônios sensoriais (LEE; LEE; OH, 2005). Seu mecanismo de ação consiste na ligação de nociceptores (receptores específicos situados na pele), observando-se primariamente um estado de excitação neuronal seguido de aumento da sensibilidade local. Nesta fase verificam-se sensações de queimação, picada e prurido, associados à vasodilatação cutânea (FLORES, CASTRO, NASCIMENTO, 2012). Seu efeito nociceptivo se deve à ligação com o receptor TRPV1 presente na membrana de diversos nociceptores, especialmente nas fibras aferentes primárias A e C que transmitem a sensação de dor (GEPPETTI; MATERAZZI; NICOLETTI, 2006).

A injeção intraplantar de capsaicina leva ao aumento na ativação de nociceptores presentes nas fibras aferentes primária do tipo C e A- δ , na ativação de receptores TRPV1 e causa o acúmulo de Ca^{+2} , que é necessário para a liberação de neurotransmissores e para a inflamação neurogênica (SAKURADA et al., 2003). Além disso, gera um comportamento padronizado de nocicepção, como morder e lamber a pata afetada, interferindo nos limiares de nocicepção mecânica e térmica. Isto ocorre pela indução da estimulação direta dos receptores específicos da nocicepção, propiciando a liberação da substância P (SP), um dos neuropeptídeos envolvidos na dor (NAH et al., 2000; SAWYNOK; REID; MEISNER, 2006).

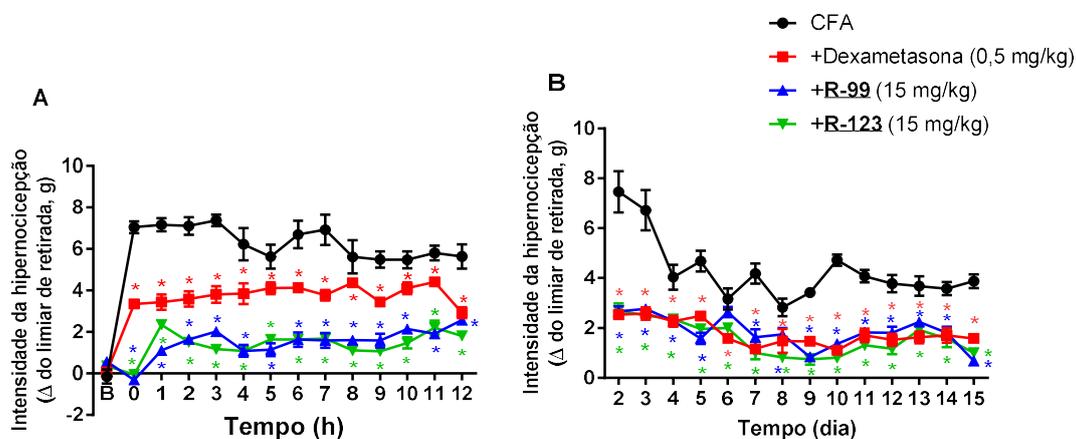
Os derivados **R-99** e **R-123** inibiram a nocicepção induzida por capsaicina, agindo provavelmente sobre os receptores TRPV1, reduzindo assim a liberação de neurotransmissores e da inflamação neurogênica. Como a capsaicina também libera SP de receptores específicos, o composto **R-99** também age provavelmente por essa via, inibindo a SP, através da inibição do receptor NK1, levando à resposta anti-nociceptiva.

Os modelos experimentais baseados em testes mecânicos permitem avaliar o aumento da sensibilidade do nociceptor a estímulos inócuos (alodinia) ou nocivos (hiperalgesia). Porém, além de estimular os nociceptores das fibras A- δ e C, podem ser ativados mecanorreceptores, resultando em estímulos inespecíficos que nem sempre refletem a neurofisiologia da nocicepção (LE BARS et al., 2001). Os efeitos apresentados pelos compostos, **R-99** e **R-123**, frente à resposta hipernociceptiva induzida por carragenina, foram significativos, pois demonstram que agem modulando a resposta nociceptiva sobre as fibras A- δ e C. Essa atividade pode ser possível devido à inibição de mediadores químicos que atuam sobre nociceptores, como a histamina, serotonina, NO e prostaglandinas.

3.11 ALODÍNIA MECÂNICA INDUZIDA PELO ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND (CFA)

A injeção de CFA foi capaz de induzir uma alodínia mecânica de longa duração em camundongos, caracterizada pelo aumento significativo na frequência de retirada da pata após estimulação mecânica. O tratamento preventivo com os derivados **R-99** e **R-123** foi capaz de inibir a alodínia mecânica durante as primeiras 12 horas (Figura 33 A). O tratamento diário com os derivados **R-99** e **R-123** (2 vezes ao dia), diminuiu significativamente a alodínia mecânica a partir do 1º dia de tratamento com inibição máxima de 82,5% no 15º dia para o **R-99** e 83% no 10º dia para o **R-123**. A suspensão do tratamento com os derivados no 7º dia após a injeção de CFA, não restabeleceu a alodínia mecânica. O tratamento com os derivados foi reiniciado no 12º dia após o CFA e mantido até o 15º dia, continuando a causar ação antialodínica (Figura 33 B). A indometacina também foi capaz de inibir a hipernociceção mecânica induzida pelo CFA tanto no tratamento preventivo, como no curativo (Figura 33 A e B).

Figura 33 - Efeito dos derivados **R-99 e **R-123** (15 mg/kg, v.o.) e dexametasona (0,5 mg/kg, v.o.), sobre a hiperalgesia mecânica plantar induzida por CFA em camundongos.**



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

Os resultados representam a variação do limiar da retirada da pata em gramas (intensidade da hipernociceção), onde cada ponto representa média \pm erro padrão da média de 5 animais por grupo. * $p < 0,001$. Significativos após análise de variância (ANOVA) por duas vias seguido pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle. Tem que dizer o que representa o A e o B.

O método algésimétrico do von Frey eletrônico é utilizado para avaliar, através do estímulo mecânico inócua e crescente (alodínia mecânica), a sensibilidade tecidual (limiar tátil e limiar mecânico nociceptivo) provocada pela incisão (HARTRICK et al.,

1997, STUBHAUG et al., 1997; PEDERSEN et al., 1998; MOLLER et al., 1998). Este teste continua a ser o único teste que pode ser utilizado de forma confiável, não só em ratos, mas também em camundongos. É derivado de um procedimento clínico para avaliar a alodinia, especialmente em pacientes com dor neuropática (BARROT, 2012).

Para avaliar um possível efeito dos derivados **R-99** e **R-123** sobre a dor crônica, foi utilizado o modelo de alodinia mecânica persistente induzida por CFA. A administração local de CFA causa extravasamento plasmático de células inflamatórias com aumento nos níveis de diversos mediadores inflamatórios, tais como citocinas, neutrofinas, eicosanoides, histamina, serotonina (BURSTEIN et al, 2004). O Fator de Crescimento Neuronal (FCN) é uma neutrofina especialmente relacionada à sensibilização neuronal. Ele é capaz de aumentar a expressão de diversos nociceptores envolvidos na dor, como aqueles ativados pela bradicinina (B1 e B2), importantes tanto na manutenção da hiperalgesia inflamatória persistente quanto na amplificação da formação do edema. Os mecanismos pelos quais o CFA desenvolve a dor crônica estão relacionados com o aumento da expressão dos canais de sódio e potássio, responsáveis pela excitabilidade neuronal, além do aumento de citocinas a nível periférico e central (MENDELL; BASBAUM; BUSHNELL, 2009; WATKINS; MILLIGAN; MAIER, 2001). No nosso estudo, observamos que **R-99** e **R-123** administrado diariamente diminuíram a hipernocicepção persistente e edema de pata induzidos pela administração intraplantar de CFA.

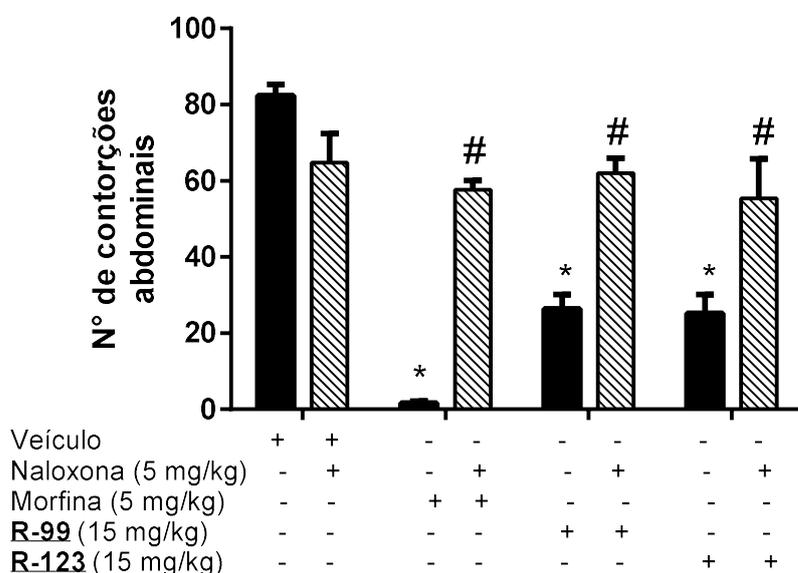
Depois de analisar o efeito antinociceptivo dos derivados **R-99** e **R-123**, tanto em nível central como periférico, o próximo passo foi elucidar os mecanismos pelos quais os compostos testados exercem esta ação. A investigação dos mecanismos de ação de psicofármacos geralmente está relacionada com a interação farmacológica que ocorre entre receptores e ligantes durante a transmissão neuronal. Este estudo baseia-se na utilização de antagonistas farmacológicos conhecidos, os quais, uma vez administrados previamente, bloqueiam os efeitos decorrentes da ativação do receptor específico, impedindo que a substância em estudo possa se ligar a este receptor e promover sua ação. Caso a via de sinalização bloqueada não seja um mecanismo usado pela substância teste, o efeito não será alterado (BENEDITO, 2013).

3.12 ANÁLISE DOS POSSÍVEIS SISTEMAS ENVOLVIDOS NO MECANISMO DE AÇÃO ANTINOCICEPTIVA

3.12.1 Participação do sistema opioide

Os resultados apresentados na Figura 34 demonstram que o pré-tratamento com naloxona (antagonista não seletivo de receptores opioides), reverteu completamente o efeito antinociceptivo causado pela morfina e pelos compostos **R-99** e **R-123** quando analisado no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético.

Figura 34 - Influência do pré-tratamento de camundongos com naloxona (5 mg/kg i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado pelos derivados isoxazolina-acilhidrazona aza-bicíclicos **R-99 (15 mg/kg, v.o.) e **R-123** (15 mg/kg, v.o.) no modelo de nocicepção induzido por ácido acético.**



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

Colunas pretas: tratamento com os derivados, veículos ou agonista; colunas tracejadas: pré-tratada com o antagonista e tratamento. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média de 5 animais por grupo. * $p < 0,001$. Significativos após análise de variância (ANOVA) por uma via seguido pelo teste de Tukey quando comparados ao grupo controle. # $p < 0,001$. Significativos após análise de variância (ANOVA) por uma via seguido pelo teste de Tukey quando comparados ao grupo tratado.

Inicialmente, foi avaliado o mecanismo de ação sobre os receptores opioides. Os opioides são analgésicos eficientes, que causam efeitos colaterais, como depressão respiratória, disforia, tolerância e dependência (BENYHE, 1994). A morfina é o principal fármaco deste grupo, e bastante utilizada para comparar a potência analgésica de novas substâncias. A antinocicepção é decorrente da ativação de receptores opioides que

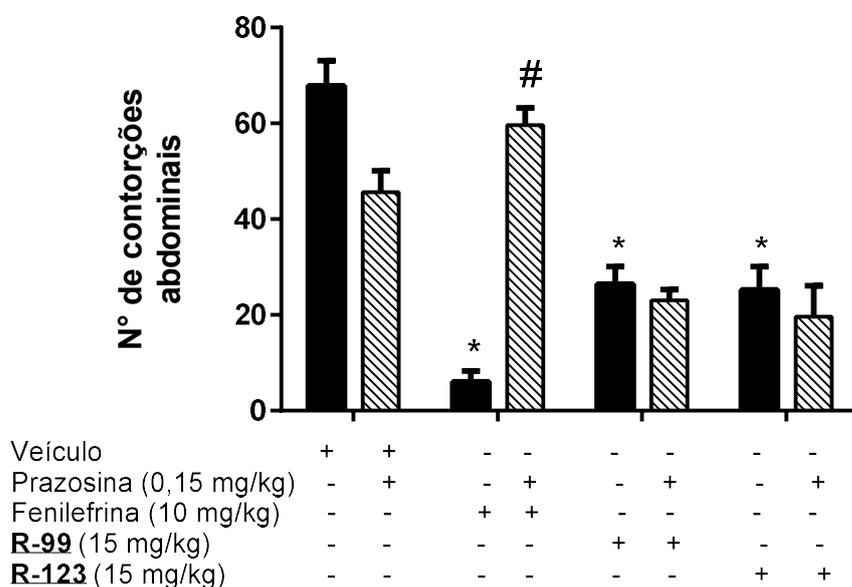
compõem uma família de receptores de membrana acoplados a proteína G. Existem cinco tipos destes receptores: μ (mi), σ (sigma), κ (kappa), δ (delta) e ϵ (epson) que, uma vez acoplados a proteína G, irão produzir duas ações: (a) diminuir o influxo de cálcio para dentro da célula e/ou inibir a adenilato ciclase, reduzindo os níveis de AMPc; e (b) ativar os canais de potássio. Ambas as ações levam a uma hiperpolarização neuronal (STEIN et al., 1989).

Os compostos estudados apresentaram atividade semelhante aos opioides, porém o tipo de receptor em que agem especificamente ainda não foi estabelecido. Sabe-se que eles agem modulando a percepção da dor por agirem a nível central, no córtex cerebral. Esses resultados corroboram com os resultados da primeira fase do teste de formalina, confirmando a sua ação neurogênica.

3.12.2 Participação do sistema α -adrenérgico

Os resultados apresentados na Figura 35 mostram que o pré-tratamento com prazosina (antagonista não seletivo de receptores α_1 -adrenérgicos), reverteu completamente o efeito antinociceptivo causado pela fenilefrina no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético. Entretanto, a prazosina não apresentou ação quando os compostos **R-99** e **R-123** foram testados.

Figura 35 - Influência do pré-tratamento de camundongos com prazosina (0,15 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado pelos derivados isoxazolina-acilhidrazona aza-bicíclicos **R-99** (15 mg/kg, v.o.) e **R-123** (15 mg/kg, v.o.) na nocicepção induzido por ácido acético.

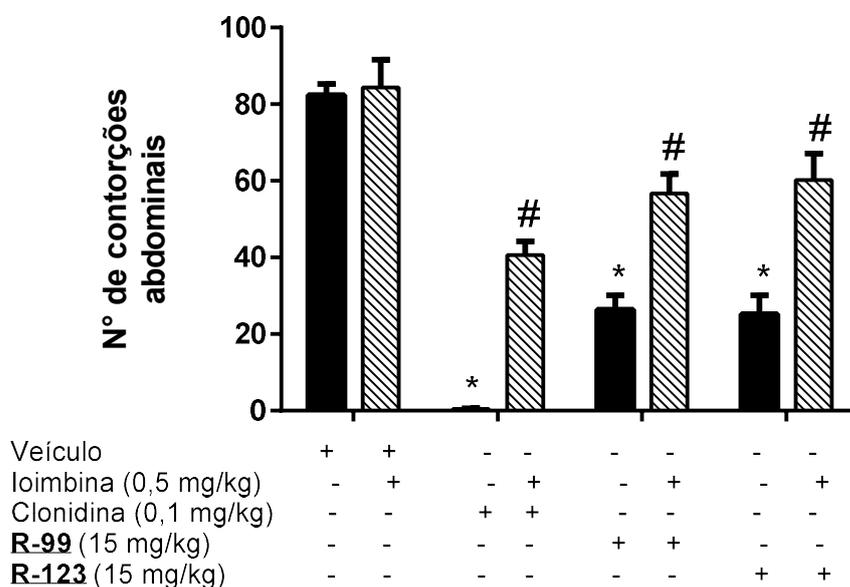


Fonte: Dados da pesquisa (2018).

Colunas pretas: tratamento com os derivados, veículos ou agonista; colunas tracejadas: pré-tratada com o antagonista e tratamento. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média de 5 animais por grupo. * $p < 0,001$. Significativos após análise de variância (ANOVA) por uma via seguido pelo teste de Tukey quando comparados ao grupo controle. # $p < 0,001$. Significativos após análise de variância (ANOVA) por uma via seguido pelo teste de Tukey quando comparados ao grupo tratado.

Os resultados apresentados na Figura 36 demonstram que o pré-tratamento com ioimbina (antagonista não seletivo de receptores α_2 -adrenérgicos), reverteu completamente o efeito antinociceptivo causado pela clonidina e pelos compostos **R-99** e **R-123** no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético.

Figura 36 - Influência do pré-tratamento de camundongos com ioimbina (0,5 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado pelos derivados isoxazolina-acilhidrazona aza-bicíclicos **R-99** (15 mg/kg, v.o.) e **R-123** (15 mg/kg, v.o.) no modelo de nociceção induzido por ácido acético.



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

Colunas pretas: grupos tratados com os derivados, veículos ou agonista; colunas tracejadas: grupos pré-tratados com o antagonista e tratamento. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média de 5 animais por grupo. * $p < 0,001$. Significativos após análise de variância (ANOVA) por uma via seguido pelo teste de Tukey quando comparados ao grupo controle. # $p < 0,001$. Significativos após análise de variância (ANOVA) por uma via seguido pelo teste de Tukey quando comparados ao grupo tratado.

Outra via estudada foi a noradrenérgica. Esta é ativada pela noradrenalina liberada das projeções bulboespinhais para os neurônios do corno dorsal da medula espinhal, modulando a excitabilidade desses neurônios através da ativação dos α_1 e α_2 -adrenoreceptores (NICHOLSON et al., 2005). Estudos realizados por Butelman e colaboradores (1998) demonstraram que a aplicação sistêmica dos agonistas α_1 (fenilefrina) e α_2 (clonidina) causam efeitos analgésicos em diversos modelos animais de dor e que são antagonizados pela prazosina e ioimbina, respectivamente.

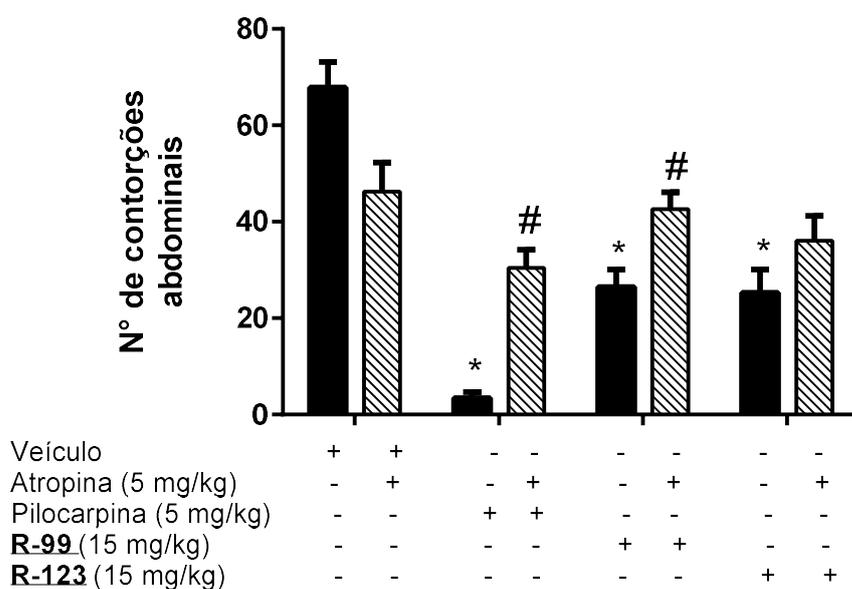
Outros estudos relatam a utilização da fenilefrina em anestesia raquidiana sugerindo aumento do efeito analgésico, vasoconstrição no local da administração e diminuição dos efeitos tóxicos sistêmicos do anestésico (IMBELLONI, 2001). Agonistas α_2 -adrenérgicos potencializam o efeito da analgesia subaracnóide através da liberação de β -endorfinas, porém acentuam o quadro hipotensivo provocado pelo anestésico local. A clonidina aumenta a liberação de noradrenalina em resposta à estimulação neural e potencializa o seu efeito inibitório sobre as fibras A- δ e C, responsáveis pela condução

do estímulo doloroso (KAWASAKI et al, 2003; UMEDA et al., 1996). Como os derivados **R-99** e **R-123** apresentaram somente ação antagonista aos receptores α_2 -adrenérgicos, a sua ação analgésica se deve a inibição da condução do estímulo doloroso, agindo de forma semelhante a clonidina.

3.12.3 Participação do sistema colinérgico

Os resultados apresentados na Figura 37 mostram que o pré-tratamento com atropina (antagonista não seletivo de receptores colinérgicos), reverteu completamente o efeito antinociceptivo causado pela pilocarpina e pelo composto estudado **R-99** quando analisado no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético. Enquanto que o derivado **R-123** não teve seu efeito revertido pelo pré-tratamento com o antagonista.

Figura 37 - Influência do pré-tratamento de camundongos com atropina (5 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado pelos derivados isoxazolina-acilhidrazona aza-bicíclicos **R-99 (15 mg/kg, v.o.) e **R-123** (15 mg/kg, v.o.) no modelo de nocicepção induzido por ácido acético.**



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

Colunas pretas: animais tratados com os derivados, veículos ou agonista; colunas tracejadas: grupos pré-tratados com o antagonista e derivados em estudo. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média de 5 animais por grupo. * $p < 0,001$. Significativos após análise de variância (ANOVA) por uma via seguido pelo teste de Tukey quando comparados ao grupo controle. # $p < 0,001$. Significativos após análise de variância (ANOVA) por uma via seguido pelo teste de Tukey quando comparados ao grupo tratado.

As funções das vias colinérgicas são complexas, mas envolvem, em geral, a junção neuromuscular, o sistema nervoso autônomo e o sistema nervoso central. Existem

dois tipos principais de receptores colinérgicos: os receptores nicotínicos, que são canais iônicos dependentes de ligantes; e os receptores muscarínicos, que pertencem à superfamília das proteínas G. Os agonistas do receptor colinérgico podem ser divididos em agentes seletivos dos receptores muscarínicos e receptores nicotínicos, embora seja observada alguma reatividade cruzada com praticamente todos esses agentes. Os agonistas dos receptores muscarínicos são utilizados clinicamente no diagnóstico da asma e como mióticos (agentes que provocam constrição da pupila). Os agonistas dos receptores nicotínicos são utilizados clinicamente para indução de paralisia muscular (GOLAN et al, 2014)

São identificados cinco tipos distintos de receptores muscarínicos, aqueles com numeração ímpar (M1, M3, M5) atuam através da via do fosfato inositol, enquanto os receptores com numeração par (M2, M4) atuam inibindo a adenilato ciclase, reduzindo o AMPc intracelular (RANG; DALE, 2012).

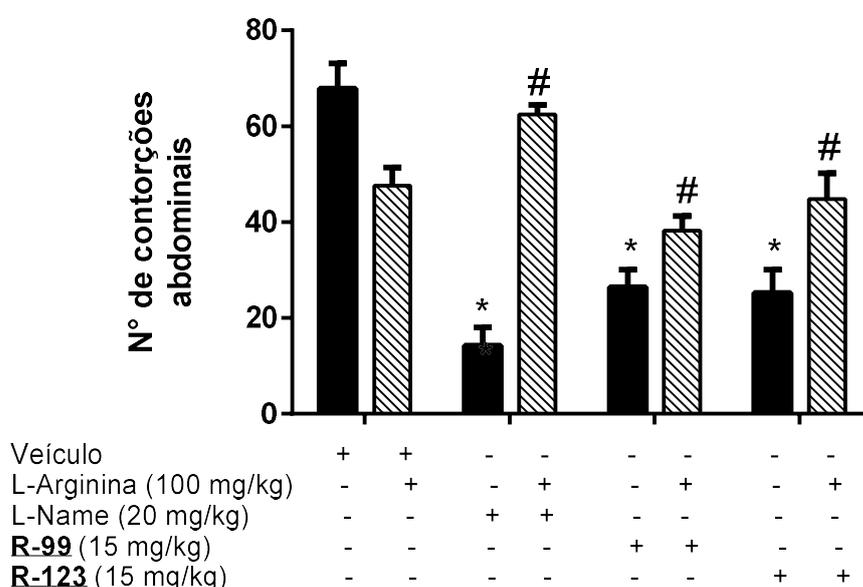
Os estudos sobre a via colinérgica muscarínica mostram que a ativação do receptor M2 é capaz de reduzir a resposta periférica de nociceptores frente a estímulos nócicos. No corno dorsal da medula espinhal, a estimulação de receptores muscarínicos M2 e M4 contribui para o efeito analgésico através da desinibição dos interneurônios inibitórios da lâmina II reduzindo a transmissão nociceptiva (WESS et al., 2003).

A pilocarpina é um alcalóide colinomimético de ocorrência natural. Trata-se de uma amina terciária que é rapidamente absorvida pela córnea do olho e tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. É um agonista dos receptores muscarínicos e não é afetada pela colinesterase. A pilocarpina deve ser utilizada no lugar dos inibidores da acetilcolinesterase (AChE) para o tratamento do glaucoma de ângulo fechado (GOLAN et al, 2014). Na analgesia, a pilocarpina tem sido relatada como um antinociceptivo para determinado número de espécies, mas esse efeito não é universal (GREEN; KITCHEN, 1986). Uma exceção importante da atividade antinociceptiva destes agonistas muscarínicos é um estudo com primatas não humanos. Usando o macaco *rhesus*, Pert e Maxey (1975) não conseguiram mostrar qualquer antinocicepção para a pilocarpina. Da mesma forma a resposta nociceptiva do macaco esquilo não foi afetada por esse fármaco (HOUSER; HOUSER, 1973; GREEN; KITCHEN, 1986). Neste trabalho, os resultados após o pré-tratamento com atropina mostraram a reversão do efeito antinociceptivo do derivado **R-99**, sugerindo que tal efeito seja mediado pela via muscarínica.

3.12.4 Participação do óxido nítrico

Os resultados apresentados na Figura 38 mostram que o pré-tratamento com L-arginina (precursor da síntese de óxido nítrico), reverteu completamente o efeito antinociceptivo causado pela L-NAME (um inibidor não seletivo do óxido nítrico sintase) e pelos compostos **R-99** e **R-123** no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético.

Figura 38 - Influência do pré-tratamento de camundongos com L-arginina (100 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado pelos derivados isoxazolina-acilhidrazona aza-bicíclicos **R-99 (15 mg/kg, v.o.) e **R-123** (15 mg/kg, v.o.) no teste de nocicepção induzido por ácido acético.**



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

Colunas pretas: tratamento com os derivados, veículos ou agonista; colunas tracejadas: pré-tratada com o antagonista e tratamento. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média de 5 animais por grupo. * $p < 0,001$. Significativos após análise de variância (ANOVA) por uma via seguido pelo teste de Tukey quando comparados ao grupo controle. # $p < 0,001$. Significativos após análise de variância (ANOVA) por uma via seguido pelo teste de Tukey quando comparados ao grupo tratado.

A via da L-arginina-óxido nítrico exerce um papel importante na modulação da nocicepção. O efeito nociceptivo do NO envolve a estimulação da guanilil ciclase solúvel, resultando na conversão de trifosfato de guanossina em cGMP, que, por sua vez, modula a atividade de muitos alvos nas células, incluindo PKG, canais iônicos e fosfodiesterases (CURY et al., 2011). A participação do NO na atividade antinociceptiva dos derivados **R-99** e **R-123** foi investigado através do pré-tratamento com a L-arginina em camundongos, e os resultados mostram que os compostos agem dependentes dessa via.

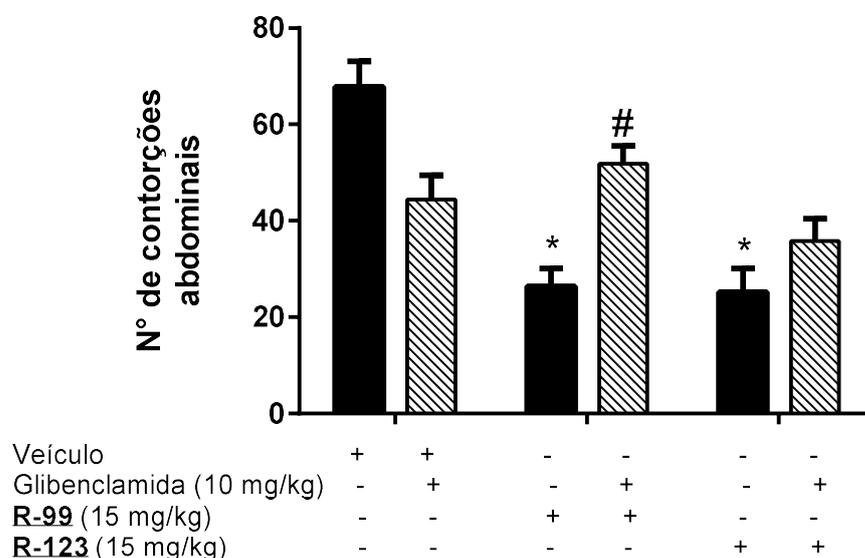
Chen et al. (2010) demonstraram que o pré-tratamento com L-NAME (inibidor de NOS não seletivo) atenuou significativamente a hiperalgesia induzida pela injeção intraplantar (i.pl.) de CFA em camundongos. O pré-tratamento com L-NAME impediu o aumento das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β e do edema induzido por CFA, como também aumentou a expressão do gene da citocina anti-inflamatória IL-10. Estes resultados confirmaram uma grande interação entre o NO e as citocinas na periferia, sugerindo um feedback na modulação da dor inflamatória. O papel do NO na dor crônica, na neuropática e na enxaqueca parece estar ligado à estimulação glutamatérgica (receptores NMDA) (MILLAN, 1999).

Todas as substâncias testadas foram capazes de reverter significativamente a antinocicepção induzida pelo ácido acético, o que demonstra o envolvimento dessa via no controle da dor. Esses dados corroboram com os resultados prévios onde esses derivados mostraram-se eficientes na inibição de NO produzido por modelos de inflamação aguda (REFERÊNCIA: artigo1 do doutorado e artigo do mestrado).

3.12.5 Participação dos canais de K⁺ dependentes de ATP

Os resultados apresentados na Figura 39 mostram que o pré-tratamento com glibenclamida (bloqueador dos canais de K⁺ dependentes de ATP), reverteu completamente o efeito antinociceptivo causado pelo composto **R-99** no modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético. Enquanto que o derivado **R-123** não teve seu efeito revertido pelo pré-tratamento com o bloqueador de canais de K⁺_{ATP}.

Figura 39 - Influência do pré-tratamento de camundongos com glibenclamida (10 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo causado pelos derivados isoxazolina-acilhidrazona aza-bicíclicos **R-99** (15 mg/kg, v.o.) e **R-123** (15 mg/kg, v.o.) no modelo de nociceção induzido por ácido acético.



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

Colunas pretas: grupos tratados com os derivados, veículos ou agonista; colunas tracejadas: animais pré-tratados com o antagonista e tratamento. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média de 5 animais por grupo. * $p < 0,001$. Significativos após análise de variância (ANOVA) por uma via seguido pelo teste de Tukey quando comparados ao grupo controle. # $p < 0,001$. Significativos após análise de variância (ANOVA) por uma via seguido pelo teste de Tukey quando comparados ao grupo tratado.

A participação dos canais de K^+ no mecanismo de ação dos derivados **R-99** e **R-123** foi investigada no modelo de contorções abdominais induzido por ácido acético, através do uso de glibenclamida. Os resultados apontam para uma participação desses canais no mecanismo de ação do **R-99**, não estando envolvidos para o composto **R-123**.

A ativação dos canais de K^+ dependentes conduz a hiperpolarização celular, diminui os níveis de Ca^{++} intracelulares e reduz a liberação de neurotransmissores, levando a antinociceção (LOPES et al, 2012). Assim, o bloqueio desses canais por diferentes inibidores pode reduzir a ação analgésica, indicando que esse efeito depende da abertura dos canais de K^+ (ALVES et al., 2004).

Sugere-se que o derivado **R-99** age através de um mecanismo opioide, que exerce efeito sobre a abertura dos canais de K^+ , reduzindo assim a excitabilidade neuronal e consequentemente um efeito inibitório a nível celular.

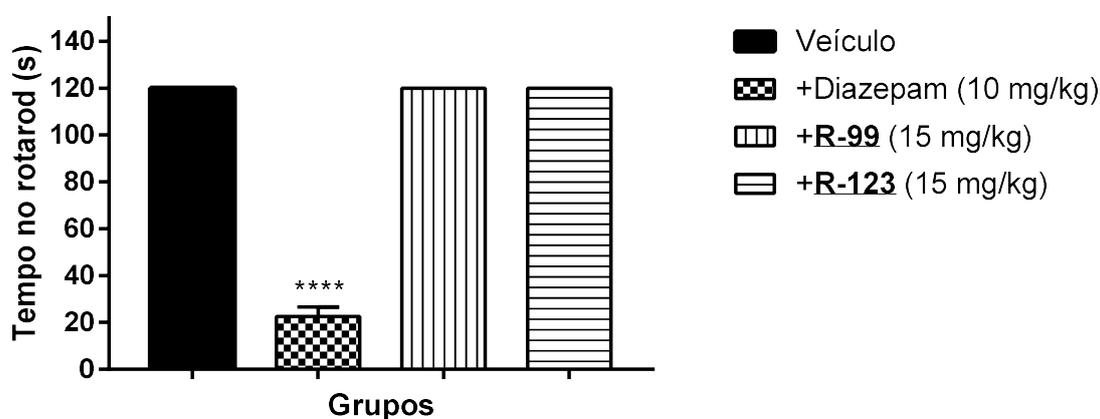
Com o intuito de excluir a possibilidade da ação antinociceptiva dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas estar relacionada a distúrbios não-específicos da atividade locomotora dos animais foram realizados os testes de campo aberto e *rota-rod*.

3.13 TESTES DO *ROTA ROD* E CAMPO ABERTO

Os derivados **R-99** e **R-123** não conseguiram produzir qualquer efeito significativo na frequência de locomoção ou na coordenação motora no *rota rod* (tempo de permanência na barra giratória), indicando que a antinocicepção observada não estava relacionada à sedação ou à anormalidade motora (Figura 40).

O composto **R-99** também não causou alteração no comportamento exploratório dos animais. Em contraste, o diazepam reduziu significativamente a frequência de locomoção, o comportamento exploratório (evidenciado pelo número reduzido de cruzamentos e levantamentos) (Figura 41 A e 41 B) e a coordenação motora (evidenciada pelo tempo reduzido no *rota rod*). O composto **R-123** elevou o comportamento exploratório (aumento do número de levantamentos).

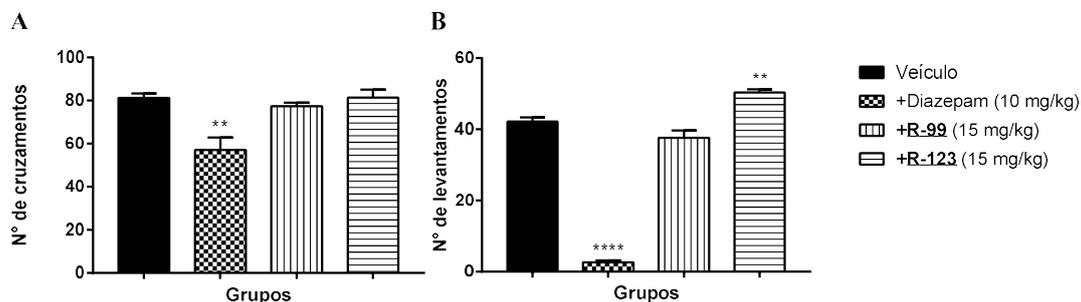
Figura 40 - Efeitos dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas aza-bicíclicos **R-99** e **R-123** (15 mg/kg, v.o.) e diazepam (10 mg/kg, v.o.) no desempenho dos camundongos no Teste da Barra Giratória (*rota rod*).



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média de 5 animais por grupo. ****p<0,0001. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle.

Figura 41 - Efeitos dos derivados isoxazolina-acilhidrazonas aza-bicíclicos R-99 e R-123 (15 mg/kg, v.o.) e diazepam (10 mg/kg, v.o.) no número de cruzamentos (A) e número de levantamentos (B) conforme avaliado pelo teste de campo aberto.



Fonte: Dados da pesquisa (2018).

Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média de 5 animais por grupo. **** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 99%, quando comparados ao grupo controle.

O teste de campo aberto tem por finalidade avaliar a atividade exploratória e locomotora dos animais. A tendência natural do animal em um novo ambiente é explorá-lo, apesar da tensão e do conflito causado neste ambiente (MONTGOMERY, 1958). Assim, a locomoção e o número de levantamentos (elevações nas patas traseiras) em roedores são os parâmetros comportamentais mais usados para descrever influências da administração de fármacos no Sistema Nervoso Central (SNC) (ARAKAWA; IKEDA, 1991; REX; STEPHENS, FINK, 1996), como também discutir a especificidade desses efeitos, caso seja estimulante, sedativa, ansiolítica ou ansiogênica (LISTER, 1987).

O efeito sedativo é caracterizado pela diminuição das respostas de cruzamentos associado a uma diminuição no número de respostas de levantamento, enquanto que um aumento no número de respostas de levantamento associado a um aumento no número de cruzamentos é considerado um efeito estimulante (PRUT; BELZUNG, 2003).

A atividade de levantamento (*rearing*) também está relacionada com a hiperatividade dopaminérgica. Estudos apontam que o aumento da atividade dopaminérgica elícita um maior comportamento de elevações nas patas traseiras (SWANSON et al., 1997).

O teste de *rota rod*, ou teste da barra giratória, tem o intuito de avaliar um possível déficit na coordenação motora. Quanto mais intenso for o efeito relaxante muscular menos tempo o animal conseguirá se equilibrar sobre a barra giratória. No entanto, esse modelo não é específico, uma vez que mede indistintamente, efeitos neurológicos,

estimulantes e depressores sobre a coordenação motora (DALLMEIER; CARLINI, 1981). Comprovando então que os derivados **R-99** e **R-123** não agem como relaxante muscular, nem como sedativo.

Neste trabalho foi confirmado que os derivados isoxazolina-acilhidrazonas **R-99** e **R-123** possuem um importante efeito anti-nociceptivo em modelos de nocicepção aguda e crônica em camundongos, agindo predominantemente por um mecanismo periférico com envolvimento dos sistemas opioide e α 2-adrenérgico, dos receptores TRVP1 e na via L-arginina-óxido nítrico. O **R-99** também apresentou envolvimento com o sistema colinérgico, especificamente nos receptores muscarínicos, e canais de potássio.

Também podemos confirmar que atividade anti-inflamatória dos derivados em estudo está relacionada com a capacidade de inibir a ação da histamina, bradicinina e proteínas do sistema complemento. O **R-99** também apresentou uma possível atividade antagonista a receptores NK1 ao inibir a SP, além de agir na inibição de citocinas (IL-1 β e TNF- α) e NO.

4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que os derivados isoxazolina-acilhidrazonas **R-99** e **R-123** apresentaram efeito anti-inflamatório, mucolítico, anti-asmático e analgésico, uma vez que:

➤ **No modelo murino de inflamação aguda:**

- O tratamento com os derivados **R-99** e **R-123** promoveram a inibição da migração leucocitária no modelo experimental de pleurisia induzida por diferentes agentes flogísticos: carragenina, zimosano, histamina e bradicinina;
- O tratamento com **R-99** inibiu a migração de leucócitos na pleurisia induzida por SP;
- O mecanismo de ação anti-inflamatório parece estar relacionado à inibição da enzima mieloperoxidase, citocinas (TNF α e IL-1 β), ativação do sistema complemento, bem como de mediadores pró-inflamatórios (óxido nítrico, bradicinina, histamina e substância P).

➤ **No modelo murino de inflamação alérgica:**

- A quantidade de leucócitos totais presentes na cavidade pleural foi reduzida pelo tratamento com ambos derivados isoxazolina-acilhidrazonas.

➤ **No modelo murino de atividade expectorante:**

- Os derivados em estudo apresentaram atividade expectorante através do aumento da excreção de vermelho de fenol pelas vias aéreas.

➤ **No modelo de asma brônquica:**

- A quantidade de leucócitos totais presentes na cavidade pleural foi reduzida pelo tratamento com ambos derivados isoxazolina-acilhidrazonas, diminuindo a migração de células mononucleares através, principalmente, da inibição da MIP-1 e MCP-1;

- Na AHR os derivados atuaram na elastância pulmonar não agindo na resistência pulmonar. Conseqüentemente não agem inibindo a broncoconstrição, mas sim a inflamação do tecido pulmonar e sua elasticidade, diminuindo as alterações histopatológicas.

➤ **No modelo de analgesia:**

- Os compostos **R-99** e **R-123** possuem atividade antinociceptiva tanto na fase neurogênica quanto na inflamatória, sugerindo que elas agem a nível central e inibindo mediadores inflamatórios;
- O **R-99** e **R-123** diminuíram a hipernocicepção persistente e edema de pata induzidos pela administração intra-plantar de CFA;
- A antinocicepção produzida pelos compostos **R-99** e **R-123** envolvem o sistema opioide e o sistema adrenérgico, através dos receptores α_2 , além dos receptores TRVP1 e na via L-arginina-óxido nítrico;
- O tratamento com **R-99** inibiu a nocicepção envolvendo o sistema colinérgico, especificamente receptores muscarínicos, e canais de potássio;
- Os derivados **R-99** e **R-123** não agem como relaxante muscular, nem como sedativo.

REFERÊNCIAS

- III CONSENSO BRASILEIRO NO MANEJO DA ASMA - Capítulo III - tratamento. **Jornal de Pneumologia**. v. 28, supl. 1, p. 9-21. 2002. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-35862002000700006&lng=en&nrm=iso>. Acessado em 16 de fevereiro de 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-35862002000700006>
- ABBOTT, F.V.; FRANKLIN, K.B. Noncompetitive antagonism of morphine analgesia by diazepam in the formalin test. **Pharmacology Biochemical Behavior**, v.24, p. 319-321, 1986.
- ADCOCK, I. M.; CARAMORI, G.; CHUNG, K. F. New targets for drug development in asthma. **Lancet**. v. 372, n. 20, p. 1073–1087, 2008.
- AGRA, L. C.; LINS, M. P.; MARQUES, P. S.; SMANIOTTO, S.; MELO, C. B.; LAGENTE, V.; BARRETO, E. Uvaol attenuates pleuritis and eosinophilic inflammation in ovalbumin-induced allergy in mice. **European Journal of Pharmacology**. v. 780, p. 232–242. 2016.
- AKBAR, A.; YIANGOU, Y.; FACER, P.; WALTERS, J. R.; ANAND, P.; GHOSH, S. Increased capsaicin receptor TRPV1- expressing sensory fibres in irritable bowel syndrome and their correlation with abdominal pain. **Gut**. v. 57, n. 7, p. 923-929. 2008. doi: 10.1136/gut.2007.138982. Epub 2008 Feb 5.
- AKDIS, C. A.; SIMONS, F. E. Histamine receptors are hot in immunopharmacology. **European Journal Pharmacology**. v. 533, n. 1-3, p. 69-76. 2006.
- ALAM, A.; PAL, C.; GOYAL, M.; KUNDU, M. K.; KUMAR, R.; IQBAL, M. S.; DEY, S.; BINDU, S.; SARKAR, S.; PAL, U.; MAITI, N. C.; ADHIKARI, S.; BANDYOPADHYAY, U. Synthesis and bio-evaluation of human macrophage migration inhibitory factor inhibitor to develop anti-inflammatory agent. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 7365–7373. 2011.
- ALLEY, M. C.; SCUDIÈRE, D. A.; MONKS, A.; HURSEY, M. L.; CZERWINSKI, M. J.; FINE, D.; ABBOTT, B. J.; MAYO, J. G.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**. v. 48. p. 589-601. 1988.
- ALLISON, D.; DELANCEY, E.; RAMEY, H.; WILLIAMS, C.; ALSHARIF, Z. A.; AL-KHATTABI, H.; ONTKO, A.; GILMORE, D.; ALAM, M. A. Synthesis and antimicrobial studies of novel derivatives of 4-(4-formyl-3-phenyl-1H-pyrazol-1-yl)benzoic acid as potente anti-Acinetobacter baumannii agentes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 27, n. 3, p. 387-392. 2017.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**. v.1000, n. 1-2, p. 40-56, 2004.
- ALMEIDA, V. M. Síntese assimétrica de 3-carboxamidas enantiomericamente puras e de hidrazidas e aril-hidrazonas, derivadas do novo heterocíclico 7-(benzoi)-2-

isoxazolina[5,4-b] pirrolidina. Avaliação das atividades biológicas". Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2008.

ALVES, D. P.; TATSUO, M. A.; LEITE, R.; DUARTE, I. D. Diclofenac-induced peripheral antinociception is associated with ATP-sensitive K⁺ channels activation. **Life Science**. v. 74, n. 20, p. 2577-2591. 2004.

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

AMICI, M.; CONTI, P.; FASOLI, E.; BAROCELLI, E.; BALLABENI, V.; BERTINI, S.; DE MICHELI, C. Synthesis and in vitro pharmacology of novel heterocyclic muscarinic ligands. **II Farmaco**. V. 58, n. 9, p. 739-748. 2003.

AMIN, K. The role of mast cells in allergic inflammation. **Respiratory Medicine**. v. 106, n. 1, p. 9-14. 2012.

ARAKAWA; O.; IKEDA; T. Apomorphine effect on single and paired rat open-field behavior. **Physiology & Behavior**. v. 50, n. 1, p. 189-194. 1991.

ARATANI, Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 640, p. 47-52. 2018. doi: 10.1016/j.abb.2018.01.004.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**. v.21, n.2, p.205-235, 1973.

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

ATTAL, N., et al. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2009 revision. **European Journal Neurology**. Apr 9. 2010.

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

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.

BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**. v. 211, p. 39–50. 2012.

BARNES, P. J. Drugs for airway disease. **Medicine**. v. 36, n. 4, p. 181-190, 2008a.

BARNES, P. J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Nature Reviews Immunology**. vv. 8, p. 183-192. 2008b.

BARNES, P. J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 118, n. 11, p. 3546-3556. 2008c.

BARNES, P. J. New therapies for asthma: is there any progress? **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 31. n. 7, p. 335-343, 2010.

BARNES, P. J. Pathophysiology of allergic inflammation. **Immunological Reviews**. v. 242, n. 1, p. 31–50. 2011.

BARNES, P. J. Theophylline. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 188. n. 8, p. 901-906, 2013.

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

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

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**. v. 139, n. 2, p. 267-84. 2009. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.028.

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

BATES, J.T. **Lung mechanics: An inverse modeling approach**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 150 – 187, 2009.

BEHR, B.; HOFFMANN, C.; OTTOLINA, G.; KLOTZ, K. N. Novel Mutants of the Human α_1 -Adrenergic Receptor Reveal Amino Acids Relevant for Receptor Activation. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 281, n. 26, p. 18120-25. 2006.

BENEDITO, R. B. Estudo do mecanismo de ação antinociceptivo e avaliação histopatológica cerebral do (S)-(-)-álcool perílico em camundongos. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2013.

BENÍTEZ, J.; QUEIROZ, A. C.; CORREIA, I.; ALVES, M. A.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M.; VARELA, J.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H.; MORENO, V.; PESSOA, J. C.; GAMBINO, D. New óxidovanadium(IV) N-acylhydrazone complexes: Promising antileishmanial and antitrypanosomal agentes. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 62, p. 20e27. 2013.

BENOIST, C.; MATHIS, D. Mast cells in autoimmune disease. **Nature**. v. 420, n. 6917, p. 875-878, 2002.

BENYHE, S. Morphine: new aspects in the study of an ancient compound. **Life Science**. v. 55, p. 969-979. 1994.

BERGERON, C.; TULIC, M. K.; HAMID, Q. Airway remodelling in asthma: From benchside to clinical practice. **Canadian Respiratory Journal**. v. 17, n. 4, p. e85-e93. 2010.

BERGEROT, A.; HOLLAND, P. R.; AKERMAN, S.; BARTSCH, T.; AHN, A. H.; MAASSENVANDENBRINK, A.; REUTER, U.; TASSORELLI, C.; SCHOENEN, J.; MITSIKOSTAS, D. D.; VAN DEN MAAGDENBERG, A. M.; GOADSBY, P. J. Animal models of migraine: looking at the component parts of a complex disorder. **European Journal of Neuroscience**. v. 24, n. 6, p. 1517-1534. 2006.

BERTRAND, C.; GEPPETTI, P. Tachykinin and kinin receptor antagonists: therapeutic perspectives in allergic airway disease. **Trends Pharmacology Science**. v. 17, p. 255–259, 1996.

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

BEYZAROV, E.P.; RAWLS, S.M.; RAFFA, R.B. Atlas de Farmacologia de Netter. Ed. Artmed, Porto Alegre, 2006.

BEZERRA-SANTOS, C. R.; BANDEIRA-MELO, C.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; PIUVEZAM, M.R.; BOZZA, P. T.; BARBOSA-FILHO, J. M. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. **International Immunopharmacology**. v. 6, p. 1152–1160, 2006.

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

BLANCHARD, C.; ROTHENBERG, M. E. Biology of the eosinophil. **Advances in Immunology**. v. 101, p. 81–121, 2009.

BLYTH, D. I.; PEDRICK, M. S.; SAVAGE, T. J.; HESSEL, E. M.; FATTAH, D. Lung inflammation and epithelial changes in a murine model of atopic asthma. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. v. 4, p. 425-438. 1996.

BO, P.; RONG, H.; QI-HUA, X.; JIE, G.; YAN-LI, L.; JIAN-RONG, L. Comparison of RBL-2H3 and P815 Cell Lines for Establishing in vitro Model of Mast Cell Degranulation. **Chinese Journal of Natural Medicines**. v. 9, n. 3, p. 0227–0231. 2011.

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

BORGES, W. G. Antileucotrienos. **Revista brasileira de alergologia e imunopatologia**. v. 24, n. 4. 2001. <http://www.asbai.org.br/revistas/Vol244/vol244.htm>

BORISH, L.C., STEINKE, J.W. Cytokines and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 111, S460-475. 2003.

BORSATO, M. L. C.; GRAEL, C. F. F.; SOUZA, G. E. P.; LOPES, N. P. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry** 55: 809-813. 2000.

BOULET, L. P. Airway remodeling in asthma: update on mechanisms and therapeutic approaches. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**. v. 24, n. 1, p. 56-62. 2018. doi: 10.1097/MCP.0000000000000441.

BOUSQUET J, JEFFERY PK, BUSSE WW, JOHNSON M, VIGNOLA AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 161, n. 5, p. 1720-1745, 2000.

BRANNAN, J. D.; LOUGHEED, M. D. Airway hiperresponsiveness in asthma: mechanisms, clinical significance, and treatment. **Frontiers in Physiology**. v. 3, p. 1-11. 2012. doi: 10.3389/fphys.2012.00460. eCollection 2012.

BRAUN, A.; TSCHERNIG, T. Animal models of asthma: Innovative methods of lung research and new pharmacological targets. **Experimental and Toxicologic Pathology**. v. 57, Supl.2, p. 3-4, 2006.

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

BRESCHI, MC.; MACCHIA, M.; MANERA, M.; MICALI, E.; NARDINI, C.; NENCETTI, S.; ROSSELLO, A.; SCATIZZI, R. Conformationally restrained β -blocking oxime ethers. 3. Synthesis and β -adrenergic antagonistic activity of diastereomeric *anti* and *syn* 2-(5'-(3'-methyl)isoxazolidinyl)-*N*-alkylethanolamines. **European Journal Medical Chemistry**. v. 31, n. 2, p. 159-163. 1996.

BRIGHTLING, C. E.; SYMON, F. A.; BIRRING, S. S.; BRADDING, P.; WARDLAW, A. J.; PAVORD, I. D. Comparison of airway immunopathology of eosinophilic bronchitis and asthma. **Thorax**. v. 58, p. 528-532. 2003. doi:10.1136/thorax.58.6.528

BROIDE, D. H. Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma a progression to remodeling. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 121, n. 3, p. 560-570. 2008.

BURGESON J. R.; GHARAIBEH, D. N.; MOORE, A. L.; LARSON, R. A.; AMBERG, S. M.; BOLKEN, T. C.; HRUBY, D. E.; DAI, D. Lead optimization of an acylhydrazone scaffold possessing antiviral activity against Lassa vírus. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 23, p. 5840-5843. 2013.

BURSTEIN, S. H.; KARST, M.; SCNEIDER, U.; ZURIER, R. B. Ajulenin acid: a novel cannabinoid produces analgesia without a “high”. **Life Science**. v. 75, p. 1513-1522. 2004.

BUSSE, W. W.; ROSENWASSER, L. J. Mechanisms of asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 111, p. 799-804, 2003.

BUTELMAN, E. R.; KO, M-C.; SOBCZYK-KOJIRO, K.; HENRY, M. I.; BEMMEL, B. V.; ZERNIG, G.; WOODS, J. H. Kappa-Opioid receptor binding populations in rhesus monkey. **Brain: Relationship to an Assay of Thermal Antinociception**, v.285, n.2, p.595-601, 1998.

CAIN H. Bronchoprovocation testing. **Clinics in Chest Medicine**. v. 22, n. 4, p. 651-659. 2001.

CALHOUN, W.; CHANG, J.; CARLSON, R. P. Effect of selected antiinflammatory agents and other drugs on zymosan, arachidonic acid, PAF and carrageenan induced paw edema in the mouse. **Agents Actions**. v. 21, n. 3/4, p. 306-309. 1987.

CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**. v. 87, n. 1, p. 1-5. 2000.

CAMPOS, O. P. R.; SANTOS, A. R. S.; VAZ, Z. R.; PINHEIRO, T. R.; PIZZOLATTI, M. G.; CHECHINEL FILHO, V.; MONACHE, F. D.; YUNE Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and preliminary study of a xanthone isolated from *Polygala cyprissias* (Polygalaceae). **Life Science**, v. 61, n.16, p.1619-1630, 1997.

CARAMORI, G.; GRONEBERG, D.; ITO, K.; CASOLARI, P.; ADCOCK, I. M.; PAPI, A. New drugs targeting Th2 lymphocytes in asthma. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**. v. 3, Supl 1, p. S6–S35, 2008.

CARR, D. B.; GOUDAS, L. C. Acute pain. **Lancet**, v. 353, p. 2051-2058, 1999.

CARTMELL, J.; SCHOEPP, D. D. Regulation of neurotransmitter release by metabotropic glutamate receptors. **Journal Neurochemistry**, v. 75, p. 889–907, 2000.

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

CASTRO, M.; ZANGRILLI, J.; WECHSLER, M. E.; BATEMAN, E. D.; BRUSSELLE, G. G.; BARDIN, P.; MURPHY, K.; MASPERO, J. F.; O'BRIEN, C.; KORN, S. Reslizumab for inadequately controlled asthma with elevated blood eosinophil counts: results from two multicentre, parallel, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trials. **The Lancet Respiratory Medicine**. v. 3, n. 5, p. 355-366. 2015. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00042-9. Epub 2015 Feb 23.

CAVALCANTI, I. L.; MADDALENA, M. L. (Edts.). Dor. Saerj. Rio de Janeiro, p.229, 2003.

CAZZOLA, M., PAGE, C. P., ROGLIANI, P., MATERA, M. G. β 2-agonist therapy in lung disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 187, n. 7, p. 690- 696, 2013.

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

CHEN, Y.; WILLCOCKSON, H. H.; VALTSCHANOFF, J. G. Influence of the vanilloid receptor TRPV1 on the activation of spinal cord glia in mouse models of pain. **Experimental Neurology**. v. 220, p. 383-390. 2009.

CHEN, Y.; BOETTGER, M. K.; REIF A.; SCHMITT, A.; UÇEYLER, N.; SOMMER, C. Nitric oxide synthase modulates CFA-induced thermal hyperalgesia through cytokine regulation in mice. **Molecular Pain**. v. 2, p. 6-13. 2010.
<http://www.molecularpain.com/content/6/1/13>

CHEN, Q.; ZHANG, J. W.; CHEN, L. L.; YANG, J.; YANG, X. L.; LING, Y.; YANG, Q. Design and synthesis of chitin synthase inhibitors as potent fungicides. **Chinese Chemical Letters**. v. 28, n. 6, p. 1232-1237.2017.

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

CHEVLEN, E. Opioids: a review. **Current Pain and Headache Reports**, v.7, p.15- 23, 2003.

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

CHO, W. G.; VALTSCHANOFF, J. G. Vanilloid receptor TRPV1-positive sensory afferents in the mouse ankle and knee joints. **Brain Research**. v. 1219, p. 59-65. 2008.

CHU, W. M. Tumor necrosis factor. **Cancer Letters**. v. 328, n. 2, p. 222-5, 2013.

COHN, L.; ELIAS, J. A.; GEOFFREY, L. C. Asthma: Mechanisms of Disease Persistence and Progression. **Annual Review of Immunology**. v. 22, p. 789-815. 2004.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T (Eds.). Robbins pathologic basis of disease. 6th ed. Philadelphia: Saunders. cap. 3, p. 50-88, 1999.

CONEJERO, L.; HIGAKI, Y.; BAEZA, M. L.; FERNÁNDEZ, M.; VARELA-NIETO, I.; ZUBELDIA, J. M. Pollen-induced airway inflammation, hyper-responsiveness and

apoptosis in a murine model of allergy. *Clinical & Experimental Allergy*. v. 37, p. 331-338, 2007.

CONTI, P.; DALLANOCE, C.; DE AMICI, M.; DE MICHELI, C.; KLOTZ, K. N. Synthesis of new Δ^2 -isoxazoline derivatives and their pharmacological characterization as β -adrenergic receptor antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v. 6, n. 4, p. 401-408. 1998.

CORREN, J.; LEMANSKE, R. F.; HANANIA, N. A.; KORENBLAT, P. E.; PARSEY, M. V.; ARRON, J. E.; HARRIS, J. M.; SCHEERENS, H.; WU, L. C.; SU, Z.; MOSESOVA, S.; EISNER, M. D.; BOHEN, S. P.; MATTHEWS, J. G. Lebrizumab Treatment in Adults with Asthma. *The New England Journal of Medicine*. v. 365, p. 1088-1098, 2011.

CORRY, D. B.; RISHI, K.; KANELIS, J.; KISS, A.; SONG, L. Z.; XU, J.; FENG, L.; WERB, Z.; KHERADMAND, F. Decreased allergic lung inflammatory cell egression and increased susceptibility to asphyxiation in MMP2-deficiency. *Nature*. v. 3, p. 347-353. 2003.

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

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

COSTA, S. K. P.; YSHII, L. M.; POSTON, R. N.; MUSCARÁ, M. N.; BRAIN, S. D. Pivotal role of endogenous tachykinins and the NK1 receptor in mediating leukocyte accumulation, in the absence of oedema formation, in response to TNF α in the cutaneous microvasculature. *Journal of Neuroimmunology*, v. 171, p. 99-109. 2006.

COUTO, V. M.; VILELA, F. C.; DIAS, D. F.; SANTOS, M. H.; SONCINI, R.; NASCIMENTO, C. G.; GIUSTI-PAIVA, A. Antinociceptive effect of extract of Emilia sonchifolia in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 134, n. 2, p. 348-353, 2011.

CRUZ, A. A.; COOPER, P. J.; FIGUEIREDO, C. A.; ALCANTARA-NEVES, N. M.; RODRIGUES, L. C.; BARRETO, M. L. **Global issues in allergy and immunology: Parasitic infections and allergy**. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. v. 140, n. 5, p. 1217-1228. 2017.

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

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

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

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

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

CUZZOCREA, S.; ZINGARELLI, B.; CALAPAI, G.; NAVA, F.; CAPUTI, A. P. Zymosan-activated plasma induces paw oedema by nitric oxide and prostaglandin production. **Life Science**. v. 60, n. 3, p. 215-20. 1997.

CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; CALABRO, G.; DUGO, L. Inducible nitric oxide synthase—knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by Carrageenan. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine Home**. v. 162, p. 1859–1866. 2000.

DALLANOCE, C.; AMICI, M.; CARREA, G. F.; SECUNDO, S. C.; MICHELI, C. A chemoenzymatic approach to the synthesis of the stereoisomers of a β -adrenergic receptor antagonist. **Tetrahedron: Asymmetry**. v. 11, n. 13, p. 2741-2751. 2000.

DALLANOCE, C.; MERONI, G.; DE AMICI, M.; HOFFMANN, C.; KLOTZ, K. N.; DE MICHELI, C. Synthesis of enantiopure Δ^2 -isoxazoline derivatives and evaluation of their affinity and efficacy profiles at human β -adrenergic receptor subtypes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.14, p. 13, p. 4393-4401. 2006.

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

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

DALMARCO, E. M.; FRÖDE, T. S. Methotrexate Inhibits Integrin Adhesion Molecules in the Mouse Model of Pleurisy Induced by Carrageenan. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.50, n. 5, p. 777-784. 2007.

- DALEY-YATES, P. T. Inhaled corticosteroids: potency, dose equivalence and therapeutic index. **British Journal of Clinical Pharmacology**. v. 80, n. 3, p. 372-380, 2015.
- DALLMEIER, K.; CARLINI, E. A. Anesthetic, hypothermic, myorelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivatives and natural analogues. **Pharmacology**. v. 22, n. 2, p. 113-127. 1981.
- DE KLUIJVER, J.; SCHRUMPF, J. A.; EVERTSE, C. E.; SONT, J. K.; ROUGHLEY, P. J.; RABE, K. F.; HIEMSTRA, P. S.; MAUAD, T.; STERK, P. J. Bronchial matrix and inflammation respond to inhaled steroids despite ongoing allergen exposure in asthma. **Clinical and Experimental Allergy**. v. 35, n. 10, p. 1361-1369. 2005.
- DE SOUZA, M. M.; PEREIRA, M. A.; ARDENGHI, J. V.; MORA, T. C.; BRESCIANI, L. F.; YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F.; CECHINEL-FILHO, V. Filicene obtained from *Adiantum cuneatum* interacts with the cholinergic, dopaminergic, glutamatergic, GABAergic, and tachykinergic systems to exert antinociceptive effect in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 93, p. 40-46, 2009.
- DENZLINGER, C.; RAPP, S.; HAGMANN, W.; KEPPLER, D. Leukotrienes as mediators in tissue trauma. *Science*. v.230, p.330-332, 1985.
- DESCHILDRE, A.; MARGUET, C.; LANGLOIS, C.; PIN, I.; RITTIÉ, J. L.; DERELLE, J.; TAAM, R. A.; FAYON, M.; BROUARD, J.; DUBUS, J. C.; SIRET, D.; WEISS, L.; POUESSEL, G.; BEGHIN, L.; JUST, J. Real-life long-term omalizumab therapy in children with severe allergic asthma. *European Respiratory Journal*, n. 46, p. 856-859. 2015.
- DESHMANE, S. L.; KREMLEV, S.; AMINI, S.; SAWAYA, B. E. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. **Journal of Interferon & Cytokine Research**. v. 29, n. 6, p. 313-326. 2009
- DESPOPOULOS, A.; SILBERNAGL, S. *Color Atlas of Physiology*. 5 ed. Stuttgart: Thieme, 2000, p. 318.
- DHAWAN, B. N.; CESSÉLIN, F.; RAGHUBIR, R.; REISINE, T.; BRADLEY, P. B.; PROTOGHESE, P. S.; HAMAN, M. Classification of opioid receptors. **Pharmacology Review**. v. 48, p. 567-592. 1996.
- DRUMMOND, J. P. Fisiologia da Nocicepção. In: DRUMMOND, J. P.; MARQUEZ, J. O. *Dor neuropática: Fisiopatologia, Clínica e Terapêutica*. Curitiba: Evidence. 2005.
- DUARTE, J. D. G.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. Participation of the sympathetic system in acetic acid induced writhing in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 21, p. 341-343. 1988.
- DUARTE, L. J.; CHAVES, V. C.; NASCIMENTO, M. V. P. D. S.; CALVETE, E.; LI, M.; CIRAULO, E.; GHIGO, A.; HIRSCH, E.; SIMÕES, C. M. O.; REGINATTO, F. H.; DALMARCO, E. M. Molecular mechanism of action of Pelargonidin-3-O-

glucoside, the main anthocyanin responsible for the anti-inflammatory effect of strawberry fruits. **Food Chemistry**. v. 247, p. 56-65. 2018.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficits in rats and mice. **Journal of the American Pharmacists Association**. v. 46, n. 3, p. 208. 1957.

DURHAM, A. L.; CARAMORI, G.; CHUNG, K. F.; ADCOCK, I. M. Targeted anti-inflammatory therapeutics in asthma and chronic obstructive lung disease. **Translational Research**. v. 167, n. 1, p.192–203, 2016.

DUPLANTIER, A. J.; BECKIUS, G. E.; CHAMBERS, R. J.; CHUPAK, L. S.; JENKINSON, T. H.; KLEIN, A. S.; KRAUS, K. G.; KUDLACZ, E. M.; MCKECHNEY, M. W.; PETTERSSON, M. P.; WHITNEY, C. A.; MILICI, A. J. Isoxazolyl, Oxazolyl, and Thiazolylpropionic Acid Derivatives as Potent $\alpha 4\beta 1$ Integrin Antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v. 11, p. 2593–2596. 2001.

DUTRA, L. A.; GUANAES, J. F. O.; JOHMANN, N.; LOPES PIRES, M. E.; CHIN, C. M.; MARCONDES, S.; DOS SANTOS, J. L. Synthesis, antiplatelet and antithrombotic activities of resveratrol derivatives with NO-donor properties. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 27, n. 11, p. 2450-2453. 2017.

ELIAS, J. A.; ZHU, Z.; CHUPP, G.; HOMER, R. J. Airway remodeling in asthma. **The Journal of Clinical Investigation**. Vv. 104, n. 8, p. 1001-1006. 1999.

ELLIS, K. M.; FOZARD, J. R. Species differences in bradykinin receptor-mediated responses of the airways. **Autonomic and Autacoid Pharmacology**. v. 22, n. 1, p. 3-16. 2002.

EL-KADY, M. M.; GIRGIS, Z. I.; ABD EL-RASHEED, E. A.; SHAKER, O.; ATTALLAH, M. I.; SOLIMAN, A. A. Role of selective blocking of bradykinin receptor subtypes in attenuating allergic airway inflammation in guinea pigs. **European Journal Pharmacology**. v. 788, n. 5, p. 152-159. 2016.

ELWOOD, W.; LOTVALL, J. O.; BARNES, P. J.; CHUNG, K. F. Characterization of allergen-induced bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation in actively sensitized Brown-Norway rats. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 88, p. 951-960, 1991.

ENCLER, H.; SZELENYI, I. Tracheal Phenol Red Secretion, a New Method for Screening Mucosecretolytic Compounds. **Journal of Pharmacological Methods**. v. 11, p. 151-157, 1984.

ERDEM, S. B.; NACAROGLU, H. T.; UNSAL KARKINER, C. S.; GUNAY, I.; CAN, D. Side Effects of Leukotriene Receptor Antagonists in Asthmatic Children. **Iranian Journal of Pediatrics**. 2015 Oct;25(5):e3313. doi: 10.5812/ijp.3313. Epub 2015 Oct 6.

FANTONI, D. Tratamento da Dor na Clínica de Pequenos Animais. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

FARO, M. L. L.; FOX, B.; WHATMORE, J. L.; WINYARD, P. G.; WHITEMAN, M. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. **Nitric Oxide**. v. 41p. 38-47. 2014.

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

FERNANDES, A. Crianças com Dor: o Quotidiano do Trabalho de Dor no Hospital. Coimbra: Quarteto Editora. 2000.

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

FERREIRA, D. S.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; TURATTI, I. C.; BETARELLO, H. L. Avaliação da atividade analgésica de *Miconia ligustroides* (Melastomataceae) utilizando o teste de contorção abdominal em camundongos. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 84, p. 47-49. 2003.

FERREIRA, R. G.; MATSUI, T. C.; GODIN, A. M.; GOMIDES, L. F.; PEREIRA-SILVA, P. E. M.; DUARTE, I. D.G.; 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, p. 198–204, 2012.

FIREMAN, P. Understanding asthma pathophysiology. **Allergy and Asthma Proceedings**. v. 24, p. 79-83. 2003.

FLOOD-PAGE, P.; MENZIES-GOW, A.; PHIPPS, S.; YING, S.; WANGOO, A.; LUDWIG, M. S.; BARNES, N.; ROBINSON, D.; KAY, A. B. Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics. **Journal of Clinical Investigation**. v. 112, p. 1029–1036, 2003.

FLORES, M. P.; CASTRO, A. P. C. R.; NASCIMENTO, J. S. Topical analgesics. **Revista brasileira de anesthesiologia**, v. 62. n. 2, p. 248-252, 2012.

FRAGA, A. G. M.; RODRIGUES, C. R.; MIRANDA, A. L. P.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Synthesis and pharmacological evaluation of novel heterotricyclic acylhydrazone derivatives, designed as PAF antagonists. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 11, p. 285–290. 2000.

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

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

- FREIRE, M. O.; VAN DYKE, T. E. Natural resolution of inflammation. **Periodontology** 2000. v. 63, n. 1, p. 149-164. 2013.
- FRÖDE, T. S.; MEDEIROS, Y. S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators of Inflammation**. v. 10, n. 4, p. 223-227. 2001.
- FRÖDE, 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.162-168. 2001.
- FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**. v. 15, n. 2, p. 129-141. 1999.
- GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. **Nature**. v. 454 p. 445-454, 2008.
- GALLIN, J. I.; GOLDSTEIN, I. M.; SNYDERMAN, R. Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. New York: Raven Press, 1992.
- GEPPETTI, P.; MATERAZZI, S.; NICOLETTI, P. The transient receptor potential vanilloid 1: Role in airway inflammation and disease. **European Journal of Pharmacology**. v. 533, p. 207–214. 2006.
- GERHOLD, K.; et al. Endotoxins prevent murine IgE production, Th2 immune responses, and development of airway eosinophilia but not airway hyperreactivity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 110, p. 110-116, 2002.
- GHIDINI, E.; CAPELLI, A. M.; CARNINI, C.; CENACCHI, V.; MARCHINI, G.; VIRDIS, A.; ITALIA, A.; FACCHINETTI, F. Discovery of a novel isoxazoline derivative of prednisolone endowed with a robust anti-inflammatory profile and suitable for topical pulmonary administration. **Steroids**. v. 95, p. 88-95. 2015. doi: 10.1016/j.steroids.2014.12.016.
- GINA - Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention (2016 update). http://ginasthma.org/wp-content/uploads/2016/04/GINA-2016-main-report_tracked.pdf
- 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.
- GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W. Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia. 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
- GOTTSCHALK, A.; SMITH, D. S. New Concepts in Acute Pain Therapy: Preemptive Analgesia. **American Family Physician**. v. 63, n. 10, p.1979-1984, 2001.

- GOULART, S.; MORITZ, M. I. G.; LANG, K. L.; LIZ, R.; SCHENKEL, E. P.; FRODE, T. S. Anti-inflammatory evaluation of *Solidago chilensis* Meyen in a murine model of pleurisy. **Journal of Ethnopharmacology**. v.113, p. 346–353, 2007.
- GOYARD, D.; KONYA, B.; CHAJISTAMATIOU, A. S.; CHRYSINA, E. D.; LEROY, J.; BALZARIN, S.; TOURNIER, M.; TOUSCH, D.; PETIT, P.; DURET, C.; MAUREL, P.; SOMSAK, L.; DOCSA, T.; GERGELY, P.; PRALY, J.; AZAY-MILHAU, J.; VIDAL, S. Glucose-derived spiro-isoxazolines are anti-hyperglycemic agentes against type 2 diabetes through glycogen phosphorylase inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 108, p. 444-454. 2016.
- GRAVA, A. L. S.; FERRARI, L. F.; PARADA, C. A.; DEFINO, H. L. A. Tratamento farmacológico da hiperalgesia experimentalmente induzida pelo núcleo pulposo. **Revista Brasileira de Ortopedia**. v. 45, n. 6 p. 569-576. 2010.
- GREEN, P. G.; KITCHEN, I. Antinociception opioids and the cholinergic system. **Progress in Neurobiology**. v. 26, n. 2, p. 119-146. 1986.
- GROUTAS, W. C.; VENKATARAMAM, R.; L CHONG, S.; YODER, J. E.; STANGA, M. A.; KIM, E.-H. Isoxazoline derivatives as potential inhibitors of the proteolytic enzymes human leukocyte elastase, cathepsin G and proteinase 3: a structure-activity relationship study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 3, p. 125-128, 1995.
- 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 índole-imidazolidine derivatives. **International Immunopharmacology**. v. 11, p. 1816-22. 2011.
- GUGINSKI, G.; LUIZ, A. P.; SILVA, M. D.; MASSARO, M.; MARTINS, D. F.; CHAVES, J.; MATTOS, R. W.; SILVEIRA, D.; FERREIRA, V. M. M.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S. Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 93, p. 10-16, 2009.
- GUIMARÃES, S., MOURA, D., DA SILVA, P. S. Manual de farmacologia e farmacoterapia. (5a edição). Porto: Porto Editora. 2006.
- GUO, L.; LI, J.; YE, H.; ZHENG, R.; HAO, X. J.; CHEN, W. Y.; JÜ, R.; YAO, Y. R.; YANG, H. F.; YU, X. L.; YE, C. Y.; ZHANG, D. C. Anti-inflammatory and analgesic potency of carboxyamidotriazole, a tumoristatic agent. **American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 325, p. 10-16. 2008.
- GUTSTEIN, H. B.; MANSOUR, A.; WATSON, S. J.; AKIL, H.; FIELDS, H. L. Mu and Kappa receptors in periaqueductal gray and rostral vetromedial medulla. **Neuroreport**, v.9, n.8, p.1777-1781. 1998.
- HALL, J. M.; MORTON, I. K. M. The Pharmacology and Immunopharmacology of kinin receptors. In: FARMER, SG, (eds) The kinin system. New York: Academic Press, p. 9–43, 1997

- HAMALAINEN, M.; PERTOVAARA, A. The Antinociceptive Action of an α_2 -Adrenoceptor Agonist in the Spinal Dorsal Horn Is Due to a Direct Spinal Action and Not to Activation of Descending Inhibition. **Brain Research Bulletin**, v. 37, p. 581-587, 1995.
- HAN, E. H.; PARK, J. H.; KIM, J. Y.; CHUNG, Y. C.; JEONG, H. G. Inhibitory mechanism of saponins derived from roots of *Platycodon grandiflorum* on anaphylactic reaction and IgE-mediated allergic response in mast cells. **Food and Chemical Toxicology**. v. 47, n. 6, p. 1069-1075. 2009.
- HAN, M. K.; AGUSTI, A.; CALVERLEY, P. M.; CELLI, B. R.; CRINER, G.; CURTIS, J. L.; FABBRI, L. M.; GOLDIN, J. G.; JONES, P. W.; MACNEE, W.; MAKE, B. J.; RABE, K. F.; RENNARD, S. I.; SCIURBA, F. C.; SILVERMAN, E. K.; VESTBO, J.; WASHKO, G. R.; WOUTERS, E. F.; MARTINEZ, F. J. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: the future of COPD. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 182, n. 5, p. 598-604. 2010. doi: 10.1164/rccm.200912-1843CC. Epub 2010 Jun 3.
- HANSSON, M.; OLSSON, I.; NAUSEEF, W. M. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 445, n. 2, p. 214-224. 2006.
- HARTRICK, C. T.; WISE, J. J.; PATTERSON, J. S. Preemptive intrathecal ketamine delays mechanical hyperalgesia in the neurophatic rat. **Anesthesia and Analgesia**. v.86, suppl 1, p.557-560. 1997.
- HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C. Farmacologia Ilustrada. 2ª Ed. São Paulo, 1998.
- HASHIMOTO, T.; OHATA, H.; HONDA, K. Lysophosphatidic acid (LPA) induces plasma exudation and histamine release in mice via LPA receptors. **Journal of Pharmacological Sciences**. v. 100, n. 1, p. 82-87. 2006.
- HE, Y. F.; NAN, M. L.; ZHAO, Y. W.; SUN, W. Y.; LI, W.; ZHAO, Q. C. Design, synthesis and evaluation of antitumor activity of new rotundic acid acylhydrazone derivatives. **Z Naturforsch**. v. 71, p. 95–103. 2016.
- HE, H.; XIA, H.; XIA, Q.; REN, Y.; HE, H. Design and optimization of N-acylhydrazone pyrimidine derivatives as *E. coli* PDHc E1 inhibitors: Structure-activity relationship analysis, biological evaluation and molecular docking study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 25, n. 20, p. 5652-5661. 2017.
- HENRIQUES, M. G.; WEG, V. B.; MARTINS, M. A.; SILVA, P. M.; FERNANDES, P. D.; CORDEIRO, R. S.; VARGAFTIG, B. B. Differential inhibition by two hetrazepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. **British Journal of Pharmacology**. v. 99, n. 1, p. 164-168. 1990.
- HERNANDEZ, A. V.; FÉLIX, R. Fisiopatología de los canales iónicos sensibles al voltaje. **Avance y Perspectiva**. v. 20, p, 83-96. 2001.

HERNÁNDEZ, P.; CABRERA, M.; LAVAGGI, M L.; CELANO, L.; TISCORNIA, I.; COSTA, T. R.; THOMSON, L.; BOLLATI-FOGOLIN, M.; MIRANDA, A. L. P.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J.; GONZALEZ, M.; CERECETTO, H. Discovery of new orally effective analgesic and anti-inflammatory hybrid furoxanyl N-acylhydrazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 20, p. 2158–2171. 2012a.

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

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

HILLE, B. Ion Channels of Excitable Membranes. 3^a Ed. Massachusetts: Sinauer. 2001.

HOLGATE, S.; CASALE, T.; WENZEL, S.; BOUSQUET, J.; DENIZ, Y.; REISNER, C. The antiinflammatory effects of omalizumab confirm the central role of IgE in allergic inflammation, **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 115, p. 459-465, 2005.

HOLGATE. Pathogenesis of Asthma (Chapter 78) of Allergy and Allergic Diseases (2nd edition), edited by A.B. Kay, A.; Kaplan, P.; Bousquet J.; Holt. P. G. Blackwell Publishing Ltd; UK publication date: June 2008; ISBN: 9781405157209; <http://www.blackwellpublishing.com/Immunology/>

HOLZER P. Neurogenic vasodilatation and plasma leakage in the skin. **General Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 5–11, 1998.

HOLZMANN, I.; CECHINEL FILHO, V.; MORA, T. C.; CÁCERES, A.; MARTÍNEZ, J. V.; CRUZ, S. M.; DE SOUZA, M. M. Evaluation of Behavioral and Pharmacological Effects of Hydroalcoholic Extract of *Valeriana prionophylla Standl.* from Guatemala. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2011, n. 2011, Article ID 312320, 9 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2011/312320>

HOMER, R.J.; ELIAS, J.A. Airway remodeling in asthma: therapeutic implications of mechanisms. **Physiology**, v. 20, p. 28-35, 2005.

HONG, Y.; ABBOTT, F.V. Contribution of peripheral α 1A-adrenoceptors to pain induced by formalin or by α -methyl-5-hydroxytryptamine plus noradrenaline. **European Journal of Pharmacology**, v. 301, p. 41-48, 1996.

HOUSER, V. P.; HOUSER, F. L. The alteration of aversive threshold with cholinergic and adrenergic agents. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 1, p. 433-444. 1973.

HOWE, J.R.; WANG, J.T.; YAKSH, T.L. Selective antagonism of the antinociceptive effect of intrathecally applied α -adrenergic agonists by intrathecal prazosin and intrathecal yohimbine. **Journal Pharmacology Experimental Therapy**. v. 224, p. 552–558, 1983.

- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**. v. 30, n. 1, p. 103-114. 1987.
- HWANG, S. W.; CHO, H.; KWAK, J.; LEE, S. Y.; KANG, C. J.; JUNG, J.; CHO, S.; MIN, K. H.; SUH, Y. G.; KIM D.; OH, U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 97, p. 6155-6160, 2000.
- HWANG, Y. H.; PAIK, M. J.; YEE, S. T. Diisononyl phthalate induces asthma via modulation of Th1/Th2 equilibrium. **Toxicology Letters**. v. 272, p. 49–59. 2017.
- IASP - International Association for the Study of Pain. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**. v. 16, p. 109–110, 1983.
- IASP - International Association for the Study of Pain. The following pain terminology is updated from "Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage" (pp 209-214) Classification of Chronic Pain, Second Edition, IASP Task Force on Taxonomy, edited by H. Merskey and N. Bogduk, IASP Press, Seattle, ©1994.
- IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Science**, v. 69, p. 2911-2919. 2001.
- IMBELLONI, L. E. Tratado de anestesia raquidiana. Curitiba, 2001.
- INGERSOLL, M. A.; PLATT, A. M.; POTTEAUX, S.; RANDOLPH, G. J. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. **Trends in Immunology**. v. 32, n. 10, p. 470-477. 2011.
- JANEWAY, J. R.; CHARLES, A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- JEFFERY, P. K.; LAITINEN, A.; VENGE, P. Biopsy markers of airway inflammation and remodelling. **Respiratory Medicine**. v. 94 (SUPPLEMENT F), S9-15. 2000.
- JIANG, M.; TSUKAHARA, H.; HAYAKAWA, K.; TODOROKI, Y.; TAMURA, S.; OHSHIMA, Y.; HIRAOKA, M.; MAYUMI, M. Effects of antioxidants and NO on TNF- α -induced adhesion molecule expression in human pulmonary microvascular endothelial cells. **Respiratory Medicine**, v. 99, p. 580-591, 2005.
- JIN, Y.; TAN, Z.; HE, M.; TIAN, B.; TANG, S.; HEWLETT, I.; YANG, M. SAR and molecular mechanism study of novel acylhydrazone compounds targeting HIV-1 CA. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 18, p. 2135–2140. 2010.
- JIN, Y.; ZHONG, A.; GE, C.; PAN, F.; YANG, J.; WU, Y.; XIE, M.; FENG, H. A novel difunctional acylhydrazone with isoxazole and furan heterocycles: Syntheses, structure, spectroscopic properties, antibacterial activities and theoretical studies of (E)-N0-(furan-2-ylmethylene)-5-methylisoxazole-4-carbohydrazide. **Journal of Molecular Structure**. v. 1010, p. 190–196. 2012.

JOLLES, J.; ROMPA-BARENDREGT, J.; GISPEN, W. J. Novelty and grooming behavior in the rat. **Behavioral and Neural Biology**. v. 25, p. 563–572. 1979.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. v. 413, n. 6852, p. 203-10. 2001.

JURIK, A.; RESSLE, A.; SCHMID, R. M.; WOTJAK, C. T.; THOERINGER, C. K. Supraspinal TRPV1 modulates the emotional expression of abdominal pain. **Pain**. v. 155, n. 10, p. 2153-2160. 2014. doi: 10.1016/j.pain.2014.08.012. Epub 2014 Aug 17.

JUTEL, M.; BLASER, K.; AKDIS, C. A. Histamine in chronic allergic responses. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**. v. 15, n. 1, p. 1-8. 2005.

KAGAN, L.; LAVY, E.; HOFFMAN, A. Effect of mode of administration on guaifenesin pharmacokinetics and expectorant action in the rat model. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**. v. 22, n. 3, p. 260-265. 2009. doi: 10.1016/j.pupt.2008.12.020. Epub 2009 Jan 6.

KALIRAJAN, R.; RAFICK, M. H. M.; SANKAR, S.; JUBIE, S. Docking studies, synthesis, characterization and evaluation of their antioxidant and cytotoxic activities of some novel isoxazole-substituted 9-anilinoacridine derivatives. **The ScientificWorld Journal**, v. 2012, Article ID 165258, 6 pages. doi:10.1100/2012/165258

KAMAL, A.; REDDY, J. S.; RAMAIAH, M. J.; DASTAGIRI, D.; BHARATHI E. V.; AZHAR, M. A.; SULTANA, F.; PUSHPAVALLI, S. N.; PAL-BHADRA, M.; JUVEKAR, A.; SEN, S.; ZINGDE, S. Design, synthesis and biological evaluation of 3,5-diaryl-isoxazoline/isoxazole-pyrrolbenzodiazepine conjugates as potential anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 45, p. 3924-3937. 2011.

KASSUYA, C. A. L.; SILVESTRE, A. A.; REHDER, V. L. G.; CALIXTO, J. B. Anti-allodynic and anti-oedematogenic properties of the extract and lignans from *Phyllanthus amarus* in models of persistent inflammatory and neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**. v. 478, p. 145– 153, 2003.

KATZUNG, B. G. *Farmacologia básica e clínica*. 10ª edição. São Paulo: Mc Gram Hill. 2008.

KAWASAKI, Y.; KUMAMOTO, E.; FURUE, H.; YOSHIMURA, M. Alpha 2 adrenoceptor-mediates presynaptic inhibition of primary afferent glutamatergic transmission in rat substantia gelatinosa neurons. **Anesthesiology**, v.98, n.3, p.682-689, 2003.

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

KHALID, M. H.; AKHTAR, M. N.; MOHAMAD, A. S.; PERIMAL, E. K.; AKIRA, A.; ISRAF, D. A.; LAJIS, N.; SULAIMAN, M. R. Antinociceptive effect of

- the essential oil of *Zingiber zerumbet* in mice: possible mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 137, n. 1, p. 345-351. 2011.
- KHAZIR, J.; SINGH, P. P.; REDDY, D. M.; HYDER, I.; SHAFI, S.; SAWANT, S.D.; CHASHOO, G.; MAHAJAN, A.; ALAM, M.S.; SAXENA, A.K.; ARVINDA, S.; GUPTA, B.D.; KUMAR, H. M. S. Synthesis and anticancer activity of novel spiro-isoxazoline and spiro-isoxazolidine derivatives of α -santonin. **European Journal of Medicinal Chemistry**. Available online 2013.
- KIM, H. D.; CHO, H. R.; MOON, S. B.; SHIN, H. D.; YANG, K. J.; PARK, B. R.; JANG, H. J.; KIM, L. S.; LEE, H. S.; KU, S. K. Effects of beta-glucan from *Aureobasidium pullulans* on acute inflammation in mice. **Archives of Pharmacol Research**. v. 30, n. 3, p. 323-328. 2007.
- KING, M.; RUBIN, B. K. Pharmacological approaches to discovery and development of new mucolytic agents. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 54, p. 1475–1490. 2002.
- KONSMAN, J. P.; PARNET, P.; DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: Mechanisms and implications. **Trends in Neurosciences**. v. 25, p. 154–159. 2002.
- KOO, H.J.; LIM, K.H.; JUNG, H.J.; PARK, E.H. Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 3, p. 496-500. 2006.
- KORN, S.; THIELEN, A.; SEYFRIED, S.; TAUBE, C.; KORNMANN, O.; BUHL, R. Omalizumab in patients with severe persistent allergic asthma in a real-life setting in Germany. **Respiratory Medicine**, v. 103, n. 11, p. 1725–1731. 2009.
- KOSTER, R.; BEER, A. M. Acetic acid for analgesic screening. **Fed Proc**. v. 18, p. 412. 1959.
- KOTAS, M. E.; MEDZHITOV, R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. **Cell**. v. 160, n. 5, p. 816-827. 2015.
- KULKARNI, O. P.; LICHTNEKERT, J.; ANDERS, H. J.; MULAY, S. R. The Immune System in Tissue Environments Regaining Homeostasis after Injury: Is "Inflammation" Always Inflammation? **Mediators of Inflammation**. v. 2016, Article ID 2856213, 9 pages. doi: 10.1155/2016/2856213. 2016.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Robbins e Cotran Patologia: bases patológicas das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- KUMMER, W.; LIPS, K. S.; PFEIL, U. The epithelial cholinergic system of the airways. **Histochemistry and Cell Biology**. v. 130, n. 2, p. 219-234, 2008.
- LIDLAW, T. M.; BOYCE, J. A. Cysteinyl leukotriene receptors, old and new; implications for asthma. **Clinical & Experimental Allergy**. v. 42, n. 9, p. 1313-1320, 2012.

- LAU, D.; MOLLNAU, H.; EISERICH, J. P.; FREEMAN, B. A.; DAIBER, A.; GEHLING, U. M.; BRÜMMER, J.; RUDOLPH, V.; MÜNDEL, T.; HEITZER, T.; MEINERTZ, T.; BALDUS, S. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 102, n. 2, p. 431-436. 2005.
- LE BARS D, GOZARIU M, CADDEN SW. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**. v. 53, n. 4, p.597 – 652, 2001.
- LECKIE, M. J.; BRINKE, A.; KHAN, J.; ZUZANA DIAMANT, Z.; O'CONNOR, B. J.; WALLS, C. M.; MATHUR, A. K.; COWLEY, H.C.; CHUNG, K. F.; DJUKANOVIC, R.; HANSEL, T. T.; HOLGATE, S. T.; STERK, P. J.; BARNES, P. J. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. **Lancet**. v. 356, p. 2144–2148, 2000.
- LEE, Y.; LEE, C.; OH, U. Painful Channels in Sensory Neurons. **Molecules and Cells**. v. 20, n. 3, p. 315-324. 2005.
- LEE, K. S.; KIM, S. R.; PARK, S. J.; MIN, K. H.; LEE, K. Y.; JIN, S. M.; YOO, W. H.; LEE, Y.C. Antioxidant down-regulates interleukin-18 expression in asthma. **Molecular Pharmacology**. v. 70, p. 1184-1193, 2006.
- LIMA, L. M.; FRATTANI, F. S.; DOS SANTOS, J. L.; CASTRO, H. C.; FRAGA, C. A.; ZINGALI, R. B.; BARREIRO, E. J. Synthesis and anti-platelet activity of novel arylsulfonate-acylhydrazone derivatives, designed as antithrombotic candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 43, p. 348e356, 2008.
- LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**. v. 92, n. 2, p. 180-185. 1987.
- LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**. v 353, p. 1607-1609, 1999.
- LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**. v. 137, p. 473-477, 2008.
- LOPES, C.; et al. Allergy School Hannover 2006: “Allergy, from diagnosis to treatment”. **Revista Portuguesa de Imunoalergologia**. v. 14, n. 4, p. 355-364, 2006.
- LOPES, L.S.; MARQUES, R. B.; FERNANDES, H. B.; PEREIRA, S.S.; AYRES, M. C.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. Mechanisms of the antinociceptive action of (-) epicatechin obtained from the hydroalcoholic fraction of *Combretum leprosum* Mart & Eic in rodents. **Journal of Biomedical Science**. v.1, p. 19:68. 2012. doi: 10.1186/1423-0127-19-68
- LOSSOS, I. S.; IZBICKI, G.; OR, R.; GOLDSTEIN, R. H.; BREUER, R. The effect of suramin on bleomycin-induced lung injury. **Life Science**. v. 67, n. 23, p. 2873-2881. 2000.
- LUZ, A. B. G.; DA SILVA, C. H. B.; NASCIMENTO, M. V. P. S.; DE CAMPOS FACCHIN, B. M.; BARATTO, B.; FRÖDE, T. S.; REGINATTO, F. H.; DALMARCO,

E. M. The anti-inflammatory effect of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Mate) in a murine model of pleurisy. **International Immunopharmacology**.v. 36, p.165-172, 2016. doi: 10.1016/j.intimp.2016.04.027. Epub 2016 May 4.

MANSIKKA, H.; ZHOU, L.; DONOVAN, D.M.; PERTOVAARA, A.; RAJA, N.S. The role of μ -opioid receptors in inflammatory Hyperalgesia and α 2-adrenoceptor-mediated Antihyperalgesia. **Neuroscience**, v. 113, p. 339-349, 2002.

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

MARQUEZ, J. O. Bases de anatomia e fisiopatologia. **Dor, Diagnóstico & Tratamento**. v. 1, p. 3-10, 2004.

MARQUEZ, J. O. A dor e os seus aspectos multidimensionais. **Ciência e Cultura**. v.63, n.2, p. 28-32. 2011.

MAURER, M.; STEBUT, E. Macrophage inflammatory protein-1. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. v. 36, p. 1882-1886. 2004.

MCFAARLANE, G. J.; JONES, G. T.; HANNAFORD, P. C. Managing low back pain presenting to primary care: where do we go from here? **Pain**, v.122, n.3, p.219-222, 2006.

MCNAMARA, C.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D. M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K. L.; ZHAO, M.; HAYWARD, N. J.; CHONG, J. A.; JULIUS, D.; MORAN, M. M.; FANGER, C. M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **PNAS**. v. 104, n. 33, p. 13525-13530. 2007.

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

MCTIER, T. L.; CHUBB, N.; CURTIS, M. P.; HEDGES, L.; INSKEEP, G. A.; KNAUER, C. S.; MENON, S.; MILLS, B.; PULLINS, A.; ZINSER, E.; WOODS, D. J.; MEEUS, P. Discovery of sarolaner: A novel, orally administered, broad-spectrum, isoxazoline ectoparasiticide for dogs. **Veterinary Parasitology**. v. 222, p. 3-11. 2016.

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

MENDELL, L. M.; BASBAUM, A. I.; BUSHNELL, C. Neutrophins and pain. In: BASBAUM, A. I.; BUSHNELL, C. (Ed.). **Science of pain**. Oxford: Elsevier, 2009.
MENSE, S. Basic neurobiology mechanisms of pain and analgesic. **American Journal of Medicine**. v.75, p. 4-14, 1983.

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

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**. v. 66, p. 355–474. 2002.

MIRANDA, A. S.; BISPO JÚNIOR, W.; SILVA, Y. K.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; CASTRO, R. P.; SABINO, J. R.; LIÃO, L. M.; LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Design, Synthesis, Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Novel Piroxicam Analogues. **Molecules**. v. 17, n. 12, p. 14126-14145. 2012.

MOGILSKI, S.; KUBACKA, M.; REDZICKA, A.; KAZEK, G.; DUDEK, M.; MALINKA, W.; FILIPEK, B. Antinociceptive, anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities of the pyrrolo[3,4-d]pyridazinone derivatives: Possible mechanisms of action. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 133, p. 99–110. 2015.

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

MOLLER, B.; VILLIGER, P.M. Inhibition of IL-1, IL-6, and TNF-alpha in immune-mediated inflammatory diseases. **Springer Seminars in Immunopathology**, v. 27, p. 391-408, 2006.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**. v. 48, n. 4, p. 254-260. 1955.

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

MOTOHIRO, A.; FURUKAWA, T.; YASUMOTO, K.; INOKUCHI, K. Mechanisms involved in acute lung edema induced in dogs by oleic acid. **European Surgical Research**. v. 18, n. 1, p. 50-57. 1986.

MURI, E. M. F.; SPOSITO, M. M. M.; METSAVAHT, L. Anti-inflamatórios não-esteroidais e sua farmacologia local. **Acta Fisiátrica**. v. 16, n. 4, p. 186-190. 2009.

NAH, J. J.; HAHN, J. H.; CHUNG, S.; CHOL, S.; KIM, Y. I.; NAH, S. Y. Effect of ginsenosides, actives components of ginseng, on capsaicin-induced pain-related behavior. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 11, p. 2180-2184, 2000.

NAROZNA, B.; HOFFMANN, A.; SOBKOWIAK, P.; SCHONEICH, N.; BREBOROWICZ, A.; SZCZEPANKIEWICZ, A. Polymorphisms in the interleukin 4, interleukin 4 receptor and interleukin 13 genes and allergic phenotype: A case control study. **Advances in Medical Sciences**. v. 61, p. 40–45, 2016.

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

NAVA, S.; CROTTI, P.; FRACCHIA, C.; RAMPULLA, C. Effect of a beta 2-agonist (broxaterol) on respiratory muscle strength and endurance in patients with COPD with irreversible airway obstruction. **Chest Journal**. v.101, n. 1, p.133-140. 1992.

NICHOLSON, R.; DIXON, A. K.; SPANSWICK, D.; LEE, K. Noradrenergic receptor mRNA expression in adult rat superficial dorsal horn and dorsal root ganglion neurons. **Neuroscience Letters**, v.380, n.3, p.316-321, 2005.

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, n. 5, p. 366-78. 2010. doi: 10.1038/nrm2889.

OAKLANDER, A.L. Chronic pain. **ACP Medicine**. p.1-19. 2011. Disponível em: http://www.medicinanet.com.br/m/conteudos/acp-medicine/5249/dor_cronica_%E2%80%93_anne_louise_oaklander.htm. Acesso em: 06 out. 2016.

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

ORR, P. M.; SHANK, B. C.; BLACK, A. C. The Role of Pain Classification Systems in Pain Management. **Critical Care Nursing Clinics of North America**. v. 29, n. 4, p. 407-418. 2017. doi: 10.1016/j.cnc.2017.08.002. Epub 2017 Sep 21.

PADDEN, J.; SKONER, D.; HOCHHAUS, G. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled glucocorticoids. **Journal of Asthma**. v. 45, Sup. 1, p. 13-24. 2008.

PHAM, T.; DAMERA, G.; NEWBOLD, P.; RANADE, K. Reductions in eosinophil biomarkers by benralizumab in patients with asthma. **Respiratory Medicine**. v. 111, p. 21-29, 2016.

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

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

PATEL, D.; KUMARI, P.; PATEL, N. B. Synthesis and biological evaluation of coumarin based isoxazoles, pyrimidinthiones and pyrimidin-2-ones. **Arabian Journal of Chemistry**. 2014. doi:10.1016/j.arabjc.2014.06.010

PAUL, W. E. *Fundamental Immunology*. New York: Lippincott-Raven, 1998.

- PAWANKAR, R. Mast cell function modulating IgE-mediated allergy. **Allergol. Int.**, v. 48, p. 171–182, 1999.
- PEDERSEN, J. L.; GALLE, T. S.; KEHLET, H. Peripheral analgesic effects of ketamine in acute inflammatory pain. **Anesthesiology**. v.89, suppl 1, p. 58-66. 1998.
- PERT, A.; MAXEY, G. Assymetrical cross-tolerance between morphine and scopolamine induced antinociception in the primate: Differential sites of action. **Psychopharmacologica (Berlin)**. v. 44, p. 139-145. 1975.
- PINHEIRO, B.; SILVA, A.; SOUZA, G.; FIGUEIREDO, J.; CUNHA, F.; LAHLOU, S.; SILVA, J.K.; MAIA, J. G.; SOUSA, P. J. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 188, p. 479–486, 2011.
- PORTO, C. C. Exame clínico: bases para a prática médica. 5ª Ed., Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan, p. 34-40, 2004.
- 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.
- PRUITT, J. R.; PINTO, D. J.; ESTRELLA, M. J.; BOSTROM, L. L.; KNABB, R. M.; WONG, P. C.; WRIGHT, M. R.; WEXLER, R. R. Isoxazolines and isoxazoles as factor Xa inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, p. 685-690, 2000.
- PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxietylike behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**. v. 463, n. 1-3, p. 3-33. 2003.
- QUAN, M. L.; ELLIS, C. D.; HE, M. Y.; LIAUW, A. Y.; LAM, P. Y. S.; ROSSI K. A.; WONG, P. C.; WEXLER R. R. Nonbenzamidine isoxazoline derivatives as factor Xa inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 13, p. 1023-1028, 2003.
- QUINTÃO, N. L. M.; ANTONIALLI, C. S.; SILVA, G. F.; ROCHA, L. W.; SOUZA, M. M.; MALHEIROS, A.; MEYRE-SILVA, C.; RUTH M. LUCINDA-SILVA, R. M.; BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. Aleurites moluccana and its main active ingredient, the flavonoid 2"-O-rhamnosylswertisin, have promising antinociceptive effects in experimental models of hypersensitivity in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 102, p. 302–311. 2012.
- RAEHAL, K. M.; WALKER, J. K.; BOHN, L. M. Morphine side effects in beta-arrestin 2 knockout mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 314, n. 3, p. 1195-1201. 2005. Epub 2005 May 25.
- RANG, H. P.; DALE, M. M. Rang & Dale Farmacologia. 7. ed. São Paulo: Elsevier, 2012.
- REDDY, A. T.; LAKSHMI, S. P.; REDDY, R. C. Murine Model of Allergen Induced Asthma. **Journal of Visualized Experiments**. v. 63, e3771, p. 1-7. 2012. doi: 10.3791/3771

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

REIS, A. C.; ALESSANDRI, A. L.; ATHAYDE, R. M.; PEREZ, D. A.; VAGO, J. P.; ÁVILA, T. V.; FERREIRA, T. P. T.; ARANTES, A. C. S.; COUTINHO, D. S.; RACHID, M.A.; SOUSA, L. P.; MARTINS, M. A.; MENEZES, G. B.; ROSSI, A. G.; TEIXEIRA, M. M.; PINHO, V. Induction of eosinophil apoptosis by hydrogen peroxide promotes the resolution of allergic inflammation. **Cell Death and Disease**. v. 6, e1632, p. 1-10, 2015.

REX, A.; STEPHENS, D. N.; FINK, H. "Anxiolytic" action of diazepam and abecarnil in a modified open field test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 53, n. 4, p. 1005-1011. 1996.

RICE, J. B.; WHITE, A. G.; SCARPATI, L. M.; WAN, G.; NELSON, W. W. Long-term Systemic Corticosteroid Exposure: A Systematic Literature Review. **Clinical Therapeutics**. v. 39, n. 11, p. 2216-2229. 2017.

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

ROBINSON, D. S. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. **New England Journal of Medicine**. v. 326, p. 298-304. 1992.

ROSA, J. S.; MELLO, S. V.; VICENTE, G.; MOON, Y. J.; DALTOÉ, F. P.; LIMA, T. C.; JESUS SOUZA, R.; BIAVATTI, M. W.; FRÖDE, T. S. *Calea uniflora* Less. attenuates the inflammatory response to carrageenan-induced pleurisy in mice. **International Immunopharmacology**. v. 42, p. 139-149. 2017.

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

ROYCE, S. G.; CHENG, V.; SAMUEL, C. S.; TANG, M. L. The regulation of fibrosis in airway remodeling in asthma. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 351, n. 2, p. 167-175. 2012.

RUBIN, B. K.; TOMKIEWICZ, R. P.; KING, M. Mucoactive agents: old and new. In: Wilmott RW, ed: *The Pediatric Lung*. Basel: Birkhauser Publishing, p. 155-179. 1997. DOI: 10.1007/978-3-0348-8960-5_7

RUPIANI, S.; BUONFIGLIO, R.; MANERBA, M.; IANNI, L. D.; VETTRAINO, M.; GIACOMINI, E.; MASETTI, M.; FALCHI, F.; STEFANO, G. D.; ROBERTI, M.; RECANATINI, M. Identification of N-acylhydrazone derivatives as novel lactate dehydrogenase A inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 101, p. 63-70. 2015.

RYAN, G. B.; MAJNO, G. Acute inflammation. A review. **American Journal of Pathology**. v. 86, n. 1, p. 183-276, 1977.

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

SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; MANOME, Y.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K.; OHBA, M. Antinociceptive effects in the formalin and capsaicin tests after intrathecal administration of substance P analogues in mice. **European Journal of Pharmacology**. v. 242, p. 47-52. 1993.

SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacology**. v. 31, n. 12, p. 1279-85. 1992.

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.

SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. **Peptides**. v. 20, p. 949-956. 1999.

SANDILANDS, E. A.; BATEMAN, D. N. Non-steroidal antiinflammatory drugs. **Medicine**. v. 44, n. 3, p. 185-186. 2016.

SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuroscience Letters**, v. 235, p. 73-76, 1997.

SANTOS, D. R.; CALIXTO, J. B.; SOUZA, G. E. Effect of a kinin B2 receptor antagonist on LPS- and cytokine-induced neutrophil migration in rats. **British Journal of Pharmacology**. v. 139, p. 271-278, 2003.

SARKER, S. J.; NAHAR, L. Química para Estudantes de Farmácia. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

SAWYNOK, J.; REID, A.; MEISNER, J. Pain Behaviors Produced by Capsaicin: influence of inflammatory Mediators and Nerve Injury. **The Journal of Pain**, v. 7, n. 2, p. 134-141, 2006.

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

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**. v. 5, Suppl:1062-1067. 2002.

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.

SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. **Journal of Visualized Experiments**, e52434, doi:10.3791/52434 (2015). URL: <http://www.jove.com/video/52434>

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

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

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**. v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SIDDIQUI, S.; HOLLINS, F.; SAHA, S.; BRIGHTLING, C. E. Inflammatory cell microlocalisation and airway dysfunction: cause and effect? **European Respiratory Journal**. v. 30, p. 1043–1056. 2007.

SIELGEL, P. S. A simple electronic device for measurement of gross body weight of small animals. **The Journal of Psychology**. v. 21, p. 227-236. 1946.

SILVA, J. R. L.; VARGAFTIG, B. B. Imunopatologia da asma e da rinosinusite. In: *Asma um grande desafio*. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

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

SILVA, J. C.; SARAIVA, S. R. G. L.; OLIVEIRA, R. G.; ALMEIDA, J. R. G. S. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 94, n. 1, p. 18-23, 2013.

SILVA, S. C. Caracterização farmacológica pré-clínica da atividade anti-inflamatória de novos derivados *n*-acilhidrazônicos. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2015.

SMITH, H. A review of bronchodilators for chronic obstructive pulmonary disease: review. **SA Pharmaceutical Journal**. v. 80, n. 7, p. 9-10, 2013.

SISIGNANO, M.; PARNHAM, M. J.; GEISLINGER, G. Drug Repurposing for the Development of Novel Analgesics. *Trends in Pharmacological Sciences*. v 37, n. 3, p. 172-183. 2016.

SOARES, C. C.; MARQUES, T. M.; RIGOLIN, G. G.; NEIS, E.; FRIAÇA, A. M. V.; SILVA, A. S.; BARRETO, G. S.; LOPES, L. Atividade analgésica do extrato da *Pectis jangadensis* (S. Moore). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, N. 1, p. 77-81, 2009.

SOLER, X.; RAMSDELL, J. Anticholinergics/Antimuscarinic Drugs in Asthma. **Current Allergy and Asthma Reports**. v. 14, n. 12, p. 1-9, 2014.

STEFANI, H. A. Introdução à Química de Compostos Heterocíclicos. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

SPECTOR, W. G.; WILLOUGHBY, D. A. Experimental suppression of the early inflammatory phenomena of turpentine pleurisy in rats. **Nature**. v. 181, n. 4610, p. 708-9. 1958.

STEIN, C.; MILLAN, M. J.; PETER, K.; HERZ, A. Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. **Journal of Pharmacology Experimental Therapy**. Vv. 248, p. 1269-1275. 1989.

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

STOJANOVIC, I.; CUZZOCREA, S.; MANGANO, K.; MAZZON, E.; MILJKOVIC, D.; WANG, M.; DONIA, M.; ABED, Y. A.; KIM, J.; NICOLETTI, F.; STOSIC-GRUJICIC, S.; CLAEISSON, M. In vitro, ex vivo and in vivo immunopharmacological activities of the isoxazoline compound VGX-1027: Modulation of cytokine synthesis and prevention of both organ-specific and systemic autoimmune diseases in murine models. **Clinical Immunology**. v. 123, p. 311-323. 2007.

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

SUKI, B.; STAMENOVIC, D.; HUBMAYR, R. Lung parenchymal mechanics. **Comprehensive Physiology**. v. 1, n.3, p. 1317-1351. 2011. doi: 10.1002/cphy.c100033.

SWANSON, C. J.; HEATH, S.; STRATFORD, T. R.; KELLEY, A. E. Differential behavioral responses to dopaminergic stimulation of nucleus accumbens subregions in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 58, n. 4, p. 933-945. 1997.

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

TANSEY, M. G.; SZYMKOWSKI, D. E. The TNF superfamily in 2009: new pathways, new indications, and new drugs. **Drug Discovery Today**. v. 14, n. 23-24, p. 1082-1088, 2009.

- TAVARES, A. Isoxazolinás. Uma classe de materiais avançados revista. Tese (Doutorado em Farmacologia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2010.
- TEMELKOVSKI, J.; et al. An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolized allergen. **Thorax**, v. 53, p. 849-856, 1998.
- TESFAIGZI, Y.; FISCHER, M. J.; MARTIN, A. J.; SEAGRAVE, J. Bcl-2 in LPS- and allergen-induced hyperplastic mucous cells in airway epithelia of Brown Norway rats. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**. v. 279, n. 6, p. L1210-7. 2000.
- 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.
- TORRE, S. M. D.; VÁZQUEZ, C.; GONZÁLEZ-CHÁVEZ, Z.; YÉPEZ-MULIA, L.; NIETO-MENESES, R.; JASSO-CHÁVEZ, R.; SAAVEDRA, E.; HERNÁNDEZ-LUIS, F. Synthesis and biological evaluation of 2-methyl-1H-benzimidazole-5-carbohydrazides derivatives as modifiers of redox homeostasis of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 27, p. 3403–3407. 2017.
- TSANTOULAS, C.; MCMAHON, S. B. Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. **Trends Neuroscience**. 2014.
- TSAGARELI, M. G.; NOZADZE, I.; TSIKLAURI, N.; GURTSKAIA, G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs attenuate agonist-evoked activation of transient receptor potential channels. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 97, p. 745–751. 2018.
- UMEDA, E.; SATOH, T.; NAGASHIMA, H.; POTTER, P.; TARKOVACS, G.; VIZI, E.S. Alpha_{2A} subtype of presynaptic alpha₂ adrenoceptors modulates the release of [³H]-noradrenaline from rat spinal cord. **Brain Research Bulletin**, v.43, p.129-132, 1996.
- 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.
- VALLANCE, P.; CHAN, N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. **Heart**. v.85, p.342-350, 2001.
- VANDERAH, T. W. Pathophysiology of pain. **Medical Clinics of North America**. v. 91, p. 1-12, 2007.

VANNI, D. S.; HORSTMANN, B.; BENJO, A. M.; DAHER, J. P. L.; KANAANS.; SLEIMAN, M. Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.43, n.3, p.181-189, 2007.

VASQUEZ-PINTO, L. M. C.; NANTEL, F.; SIROIS, P.; JANCAR, S. Bradykinin B1 receptor antagonist R954 inhibits eosinophil activation/proliferation/migration and increases TGF- β and VEGF in a murine model of asthma. **Neuropeptides**. v. 44, p. 107–113. 2010.

VERMA, P. R.; JOHARAPURKAR, A. A.; CHATPALLIWAR, V. A.; ASNANI, A. Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R. Br. in mice. **Journal Ethnopharmacology**. v.102, p. 298–301, 2005.

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

VIEGAS, F. P. D.; SILVA, M. F.; ROCHA, M. D.; CASTELLI, M. R.; RIQUIEL, M. M.; MACHADO, R. P.; VAZ, S. M.; LIMA, L. M. S.; MANCINI, K. C.; OLIVEIRA, P. C. M.; MORAIS, E. P.; GONTIJO, V. S.; SILVA, F. M. R.; PEÇANHA, D. D. F.; CASTRO, N. G.; NEVES, G. A.; GIUSTI-PAIVA, A.; VILELA, F. C.; ORLANDI, L.; CAMPOS, I.; VELOSO, M. P.; COELHO, L. F. L.; IONTA, M.; FERREIRA-SILVA, G. A.; PEREIRA, R. M.; DARDENNE, L. E.; GUEDES, I. A.; CARNEIRO JUNIOR, W. O.; BELLOZI, P. M. Q.; OLIVEIRA, A. C. P.; FERREIRA, F. F.; PRUCCOLI, L.; TAROZZI, A.; VIEGAS JR, C. Design, synthesis and pharmacological evaluation of *N*-benzyl-piperidinyl-aryl-acylhydrazone derivatives as donepezil hybrids: Discovery of novel multi-target anti-alzheimer prototype drug candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 147, p. 48-65. 2018.

VIGNOLA, A. M.; GAGLIARDO, R.; SIENA, A.; CHIAPPARA, G.; BONSIGNORE, M. R.; BOUSQUET, J.; BONSIGNORE, G. Airway remodeling in the pathogenesis of asthma. **Current Allergy and Asthma Reports**. v. 1, n. 2, p. 108-115, 2001.

VOLMAN, T. J.; HENDRIKS, T.; GORIS, R. J. Zymosan-induced generalized inflammation: experimental studies into mechanisms leading to multiple organ dysfunction syndrome. **SHOCK**. v. 23, n. 4, p. 291–297. 2005.

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.

WALSH, G. M. Anti-IL-4/-13 based therapy in asthma. **Expert Opinion on Emerging Drugs**. v. 20, n. 3, p. 349-352, 2015.

WANG, X. L.; ZHANG, Y. B.; TANG, J. F.; YANG, Y. S.; CHEN, R. Q.; ZHANG, F.; ZHU, H. L. Design, synthesis and antibacterial activities of vanillic acylhydrazone

derivatives as potential β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 57, p. 373-382. 2012.

WARD, C.; et al. Airway inflammation, basement membrane thickening and bronchial hyperresponsiveness in asthma. **Thorax**, v. 57, p. 309-316, 2002.

WATKINS, L. R.; MILLIGAN, E. D.; MAIER, S. F. Glial activation: a driving force for pathological pain. **Trends Neuroscience**. v. 24, p. 450-455, 2001.

WESS, J.; DUTTARROY, A.; GOMEZA, J.; ZHANG, W.; YAMADA, M.; FELDER, C.C.; BERNARDINI, N.; REEH, P.W. Muscarinic receptor subtypes mediating central and peripheral antinociception studied with muscarinic receptor knockout mice: a review. **Life Science**. 72: 2047-2054, 2003.

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

WENZEL, S.; FORD, L.; PEARLMAN, D.; SPECTOR, S.; SHER, L.; SKOBIERANDA, F.; WANG, L.; KIRKESSELI, S.; ROCKLIN, R.; BOCK, B.; HAMILTON, J.; MING, J. E.; RADIN, A.; STAHL, N.; YANCOPOULOS, G. D.; GRAHAM, N.; PIROZZI, G. Dupilumab in Persistent Asthma with Elevated Eosinophil Levels. **The New England Journal of Medicine**. v. 368, n. 26, p. 2455-2466, 2013.

WHO. Guidelines on the pharmacological treatment of persisting pain in children with medical illnesses. **World Health Organization**, p. 1-167, 2012.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chronic respiratory diseases. <http://www.who.int/respiratory/en/>. Pesquisado em 20/10/2016.

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

WILLS-KARP, M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. **Immunological Reviews**. v. 202, p. 175-190, 2004.

WITYAK, J.; TOBIN, A. E.; MOUSA, S. A.; WEXLER, R. R.; OLSON, R. E. Isoxazoline GPIIb/IIIa antagonists bearing a phosphoramidate. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**.v. 9, p. 123-126, 1999.

WOOLF, C. J.; MANNION, R. J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms and management. **The Lancet**, v. 353, p. 1959-1964, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chronic respiratory diseases. <http://www.who.int/respiratory/en/>. Pesquisado em 20/10/2016.

YSSEL, H; GROUX, H. Characterization of T cell subpopulation involved in the pathogenesis of asthma and allergic diseases. **International Archives of Allergy and Immunology**. v. 121, p. 10-18. 2000.

YU, X.; SHI, L.; KE, S. Acylhydrazone derivatives as potential anticancer agents: Synthesis, bio-evaluation and mechanism of action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v. 25, p. 5772–5776. 2015.

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

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

ZHANG, Y.; PLATTNER, J. J.; EASOM, E. E.; AKAMA, T.; ZHOU, Y.; WHITE, W. H.; DEFAUW, J. M.; WINKLE, J. R.; BALKO, T. W.; CAO, J.; GE, Z.; YANG, J. Optimization of isoxazoline amide benzoxaboroles for identification of a development candidate as an oral long acting animal ectoparasiticide. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 26, p. 3182–3186. 2016.

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.

ZHOU, Y.; ZHANG, S.; HE, H.; JIANG, W.; HOU, L.; XIE, D.; CAI, M.; PENG, H.; FENG, L. Design and synthesis of highly selective pyruvate dehydrogenase complex E1 inhibitors as bactericides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 26, n. 1, p. 84-95. 2018.

ZIMENT, I. Broxaterol: therapeutic trials and safety profile. **Respiration**. v. 55, Suppl 2, p. 28-40. 1989.

ANEXO A - PARECER DE COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL 1



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

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

Recife, 09 de outubro de 2015.

Ofício nº 91/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.^a Teresinha Gonçalves da Silva**
Departamento de Antibióticos – CCB
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.013748/2015-89

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, “**Efeitos de derivados isoxazolina-acilhidrazona no remodelamento das vias aéreas e parênquima pulmonar em modelo murino de inflamação alérgica**”.

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

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

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

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Antibióticos e biotério do LIKA da UFPE; Animais: camundongos heterogênicos e isogênicos; Linhagem: Swiss e BALB/c; Idade: 60 dias; Peso: 25-30g (Swiss) e 20-25g (BALB/c); Sexo: 120 machos e 30 fêmeas; Nº total de animais: 150.

Atenciosamente,

 Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584

ANEXO B - PARECER DE COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL 2



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

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

Recife, 06 de junho de 2016.

Ofício nº 55/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.^a Teresinha Gonçalves da Silva**

Departamento de Antibióticos

Centro de Biociências

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.017767/2016-65

Certificamos que a proposta intitulada **“Avaliação do efeito dos derivados de isoxazolina-acilhidrazona em diferentes modelos de hipernocicepção inflamatória e neuropática persistente em camundongos e possíveis mecanismos de ação”**, registrada com o nº **23076.017767/2016-65**, sob a responsabilidade de Prof.^a Dr.^a **Teresinha Gonçalves da Silva** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 31/05/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Até 02/2018
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus/Swiss/albina</i>
Nº de animais	175
Peso/Idade	25-30g/60 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Depto de Antibióticos da UFPE

Atenciosamente,

 Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584

ANEXO C - PARECER DE COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL 3



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo CruzVice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de ReferênciaComissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-57/14

Certificamos que o protocolo (P-2/14-2), intitulado "FARMACOLOGIA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO PULMONAR", sob a responsabilidade de PATRICIA MACHADO RODRIGUES E SILVA MARTINS, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 13/10/2018 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 150 Machos de C.Cg-Tg(DO11.10)10Dlo, Idade: 2 Mes(es), Peso: 20,0000 Grama(s).
- 150 Fêmeas de C.Cg-Tg(DO11.10)10Dlo, Idade: 2 Mes(es), Peso: 20,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 6000 Machos de Swiss Webster, Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 1500 Machos de BALB/c-Anx1, Peso: 18,0000 Grama(s).
- 500 Fêmeas de BALB/c-Anx1, Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 3200 Machos de A, Peso: 18,0000 Grama(s).
- 600 Fêmeas de A, Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

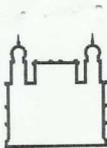
- 2300 Machos de BALB/c An, Peso: 18,0000 Grama(s).
- 500 Fêmeas de BALB/c An, Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 5333 Machos de C57BL/6, Peso: 18,0000 Grama(s).
- 312 Fêmeas de C57BL/6, Peso: 18,0000 Grama(s).

(Continua)

Comissão de Ética no Uso de Animais
Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Manguinhos - Rio de Janeiro / RJ
Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-57/14

(Continuação da Licença Nº LW-57/14, Protocolo Nº P-2/14-2)

Mus musculus

- 200 Machos de B6. 129 P2 - Nos2, Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 200 Machos de B6. 129 - Tnfrs1a, Peso: 18,0000 Grama(s).

Mus musculus

- 2000 Machos de B6. 129, Peso: 18,0000 Grama(s).

- 1000 Fêmeas de B6. 129, Peso: 18,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 13 de outubro de

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04626550
13/10/2014