

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - PPGCF

UMA NOVA CARBOXIMIDAMINA MODULA A
NOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA E COMPORTAMENTO
DOENTIO EM MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VIVO*

LÍVIA CHRISTINE RIBEIRO HILGENBERG

MANAUS

2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - PPGCF**

LÍVIA CHRISTINE RIBEIRO HILGENBERG

**UMA NOVA CARBOXIMIDAMINA MODULA A
NOCICEPÇÃO INFLAMATÓRIA E COMPORTAMENTO
DOENTIO EM MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Clarice de Carvalho Veloso Moura

Co-orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

MANAUS

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Hilgenberg, Livia Christine Ribeiro
H644u Uma nova carboximidamina modula a nocicepção inflamatória e
comportamento doentio em modelos experimentais in vivo / Livia
Christine Ribeiro Hilgenberg. 2019
71 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Clarice de Carvalho Veloso Moura
Coorientadora: Emerson Silva Lima
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Inflamação. 2. Nocicepção. 3. Comportamento doentio. 4.
Carboximidamina. I. Moura, Clarice de Carvalho Veloso II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

“Uma nova carboximidamina modula a nocicepção inflamatória e comportamento doentio em modelos experimentais in vivo”

DISCENTE: LÍVIA CHRISTINE RIBEIRO HILGENBERG

PARECER:

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 06/12/2019.



Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Coordenador do PPGCF

A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:

Clarice de Carvalho Veloso Moura
Profa. Dra. Clarice de Carvalho Veloso Moura
Orientadora e presidente da banca

Geane Antiques Lourenço
Profa. Dra. Geane Antiques Lourenço
Membro externo (UFAM)

Marne Carvalho de Vasconcellos
Profa. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos
Membro interno (UFAM)

Dedico este trabalho à Deus, ao meu esposo Denis Hilgenberg, ao meu filho Vinícius Hilgenberg e a meus pais Maronilson e Claudete, que estiveram ao meu lado em todos os momentos. Agradeço por sonharem comigo os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo Seu infinito amor, pela dádiva da vida, por ter me dado sabedoria e força para lidar com os desafios, na busca da realização de meu objetivo.

Ao meu esposo Denis, por seu precioso apoio, incentivo, companheirismo em todos os momentos difíceis dessa caminhada e ao meu filho Vinícius, meu grande estímulo.

À minha família, iniciando com os meus pais, que sempre estiveram na torcida pela concretização dos meus objetivos. Aos meus irmãos Rodrigo e Alessandro, que emitiram mensagens e pensamentos positivos na minha direção, contribuindo com seus incentivos. Aos meus sogros Nelson e Daroni, pelo carinho e torcida.

A minha orientadora Clarice Veloso, pelos seus ensinamentos, competência, dedicação, sempre presente e disposta a ajudar. Ao meu co-orientador Emerson Lima, pelo seu ensinamento, suporte e por fornecer sempre o que foi preciso com disposição. E a todos os professores que contribuíram para a realização desse trabalho.

Ao colaborador Leonard, que transmitiu seus conhecimentos e com eles muito me ajudou, além de sua sempre inteira disponibilidade. A colaboradora Giovana, que foi muito importante, me auxiliando na execução de vários testes.

A todos os amigos e amigas que fiz durante o mestrado e que foram imprescindíveis nesses anos. Nossos encontros científicos, nossos momentos de descontração, incentivos, risadas e até choros. Feliz em ter conhecido vocês e levarei um pedacinho de cada um sempre comigo.

A agência de financiamento Capes, pela bolsa concedida.

A Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao PPGCF pela oportunidade de cursar o mestrado.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A inflamação é uma reação fisiológica e protetora do corpo humano, desencadeada por patógenos e lesões do tecido, a qual resulta na ativação do sistema imune. Dentre os sinais clínicos da inflamação, a dor é o mais desagradável e acarreta em redução da qualidade de vida de muitas pessoas. O aumento de citocinas pró-inflamatórias, durante o curso de uma infecção, faz com que os indivíduos doentes desenvolvam um conjunto de mudanças comportamentais adaptativas, coletivamente denominadas de comportamento doentio. A inflamação, portanto, se tornou um alvo terapêutico imperativo para novas intervenções farmacológicas. Para o tratamento da inflamação e da dor, fármacos anti-inflamatórios são utilizados na prática clínica, os quais, entretanto, apresentam diversos efeitos colaterais e eficácia limitada, incitando a busca por novos medicamentos eficazes e com efeitos adversos mínimos. Por isso, a presente pesquisa, objetivou verificar as propriedades farmacológicas de uma nova carboximidamina, a DCHA, na modulação da nocicepção e da inflamação em modelos animais. A DCHA foi utilizada para avaliar os efeitos antinociceptivos em camundongos, por meio do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina e teste da placa quente. O efeito anti-inflamatório da DCHA foi avaliado no comportamento doentio induzido por lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos, por meio dos testes de campo aberto e nado forçado. Além disso, avaliou-se, também, a expressão do RNAm de iNOS e citocinas pró-inflamatórias (IL- β , TNF- α e IL-6) do sangue, fígado e rim desses animais, por meio do teste de PCR quantitativo em tempo real. A atividade locomotora foi avaliada no teste de campo aberto. Os experimentos foram realizados com a devida aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), no processo nº 037/2018. A DCHA reduziu o número de contorções induzidas por ácido acético e o tempo de lambida da pata em ambas as fases no teste da formalina, bem como aumentou o tempo de latência no teste da placa quente. Combinando os resultados de modelos químicos e térmicos de nocicepção, pode-se sugerir que a substância apresenta efeito antinociceptivo mediado periféricamente e centralmente. A administração de lipopolissacarídeo (LPS, 100 μ g/kg, i.p.) induziu alterações comportamentais em camundongos, observado através do aumento no tempo que o animal permaneceu boiando no nado forçado e na diminuição da atividade locomotora e exploratória no campo aberto, assim como aumentou a expressão de RNAm de iNOS e das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6. O pré-tratamento com DCHA atenuou as alterações comportamentais induzidas pelo LPS, bem como reduziu significativamente a expressão de iNOS e das citocinas pró-inflamatórias nos camundongos. Os resultados experimentais do presente estudo demonstraram que a substância DCHA apresentou ação antinociceptiva e anti-inflamatória *in vivo*. As ações anti-inflamatórias obtidas sugerem ser devido à redução de citocinas pró-inflamatórias. Enfim, os resultados apontam para o potencial farmacológico da substância como um novo medicamento anti-inflamatório.

Palavras-chave: inflamação; nocicepção; comportamento doentio; carboximidamina.

ABSTRACT

Inflammation is a physiological and protective reaction of the human body, triggered by pathogens and tissue damage, which results in activation of the immune system. Among the clinical signs of inflammation, pain is the most unpleasant and leads to reduced quality of life for many people. The increase in proinflammatory cytokines during the course of an infection causes sick individuals to develop a set of adaptive behavioral changes, collectively referred to as sick behavior. Inflammation, therefore, has become an imperative therapeutic target for new pharmacological interventions. For the treatment of inflammation and pain, anti-inflammatory drugs are used in clinical practice, which, however, have several side effects and limited effectiveness, stimulating the search for new effective drugs with minimal side effects. Therefore, this research aimed to verify the pharmacological properties of a new carboximidamine, DCHA, in the modulation of nociception and inflammation in animal models. The DCHA was used to evaluate the antinociceptive effects in mice by the acetic acid-induced abdominal contortions test, formalin test and hot plate test. The anti-inflammatory effect of DCHA was evaluated on lipopolysaccharide (LPS) -induced sick behavior in mice by open-field and forced swimming tests. In addition, we also evaluated the expression of iNOS mRNA and proinflammatory cytokines (IL- β , TNF- α and IL-6) from the blood, liver and kidney of these animals by quantitative real time PCR. Locomotor activity was assessed in the open field test. The experiments were carried out with the proper approval of the Animal Use Ethics Committee of the Federal University of Amazonas, with the process number 037/2018. DCHA reduced the number of acetic acid-induced contortions and paw licking time in both phases of the formalin test, as well as increased latency time in the hot plate test. Combining the results of chemical and thermal nociception models, it can be suggested that the substance has peripherally and centrally mediated antinociceptive effect. The administration of lipopolysaccharide (LPS, 100 μ g / kg, ip) induced behavioral changes in mice, observed by increasing the time it spent floating in the forced swimming test and decreasing the locomotor and exploratory activity in the open field test, as well as increasing iNOS mRNA expression and pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α and IL-6. DCHA pretreatment attenuated LPS-induced behavioral changes as well as significantly reduced expression of iNOS and proinflammatory cytokines in mice. The experimental results of the present study showed that the substance DCHA showed antinociceptive and anti-inflammatory effects *in vivo*. The anti-inflammatory effect obtained suggest to be due to the reduction of proinflammatory cytokines. Finally, the results lead to the pharmacological potential of the substance as a new anti-inflammatory drug.

Keywords: inflammation; nociception; sick behavior; carboximidamine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sinalização intracelular induzida por lipopolissacarídeo.....	27
Figura 2 – Reação de condensação entre naringenina e aminoguanidina, formando a DCHA..	29
Figura 3 – Fluxograma de planejamento dos ensaios experimentais.....	34
Figura 4 - Efeito da DCHA e de seu veículo no número de cruzamento de linhas no aparato de campo aberto em camundongos, para avaliação da coordenação motora.....	45
Figura 5 – Efeito da DCHA e da associação de naringenina + aminoguanidina no número de contorções induzidas por ácido acético 0,9% em camundongos.....	47
Figura 6 - Efeito da DCHA no tempo de lambida da pata dos camundongos na primeira e segunda fase do teste da formalina.....	49
Figura 7 – Efeito da DCHA no tempo de reação de latência na placa quente em camundongos.....	51
Figura 8 – Efeito da DCHA e da associação de naringenina + aminoguanidina no número de cruzamentos de linhas no aparato de campo aberto em camundongos.....	53
Figura 9 - Efeito da DCHA e da associação de naringenina + aminoguanidina no tempo gasto flutuando no teste de nado forçado em camundongos.....	55
Figura 10 - Efeito da DCHA e da associação de naringenina + aminoguanidina na expressão de RNAm de iNOS, IL-1 β , TNF- α e IL-6 do sangue, fígado e rim de camundongos.....	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Genes alvos de camundongos investigados nos ensaios de PCR em tempo real (Life Technologies).....	42
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AINEs	Anti-inflamatórios não esteróides
AG	Aminoguanidina
ATP	Adenosina trifosfato
CD-14	Cluster de diferenciação 14
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DEXA	Dexametasona
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
IFN- γ	Intérferon-gama
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
IL-33	Interleucina 33

INDO	Indometacina
DCHA	Substância semi-sintética naringenina com aminoguanidina
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FTIR	Infravermelho por transformada de Fourier
GADPH	Glicerinaldeído-3 fosfato-desidrogenase
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
IRAKs	Quinase associada ao receptor da IL-1
LBP	Proteína ligadora de LPS (<i>LPS binding protein</i>)
LPS	Lipopolissacarídeo
LOX	Lipoxigenase
MD2	Fator de diferenciação mielóide 2
MORF	Morfina
MyD88	Gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88 (<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>)
NAR + AM	Naringenina e aminoguanidina
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NG	Naringenina
NGF	Fator de crescimento do nervo
NIK	Quinase indutora de NF-KB
NO•	Óxido nítrico
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NOS	Óxido nítrico sintase
PCR	Reação em cadeia da polimerase

PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PGs	Prostaglandinas
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PKA	Proteína quinase A
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
TLRs	Receptor Toll-like
TLR4	Receptor Toll-like 4
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAFs	Fator associado ao receptor de TNF
TRP	Receptor de potencial transitório
TRPA1	Receptor de potencial transitório anquirina tipo 1
TRPM3	Receptor de potencial transitório melastatina tipo 3
TRPM8	Receptor de potencial transitório melastatina tipo 8
TRPV-1	Receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1
TRPV4	Receptor de potencial transitório vanilóide tipo 4
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
VCAM-1	Molécula 1 de adesão celular vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{g/kg}$	Micrograma por kilograma
mg/kg	Miligramas por kilograma
ml/kg	Mililitro por kilograma
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
Δ	Delta
κ	Kappa
μl	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celcius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Aspectos gerais da inflamação.....	19
2.2 Dor de origem inflamatória.....	23
2.3 Comportamento doentio induzido por citocinas.....	24
2.4 Tratamento farmacológico.....	28
2.5 DCHA: Uma nova Carboximidamina.....	29
3. OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo Geral.....	33
3.2 Objetivos Específicos.....	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Delineamento experimental.....	34
4.2 Substância.....	34
4.3 Procedimentos experimentais.....	35
4.3.1 Animais.....	35
4.3.2 Avaliação da coordenação motora.....	36
4.3.2.1 Teste de campo aberto.....	36
4.3.3 Avaliação da atividade antinociceptiva.....	37
4.3.3.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	37
4.3.3.2 Teste da formalina.....	37
4.3.3.3 Teste da placa quente.....	38
4.3.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória.....	39
4.3.4.1 Comportamento doentio induzido por LPS.....	39
4.3.4.1.1 Teste de campo aberto.....	40
4.3.4.1.2 Teste de nado forçado.....	40
4.3.4.1.3 Obtenção do RNA total.....	41
4.3.4.1.4 PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	42
4.4 Análise estatística.....	43
5. RESULTADOS	44
5.1 Teste de coordenação motora.....	44

5.2 Contorções abdominais induzidas por ácido acético	46
5.3 Teste da formalina	48
5.4 Teste da placa quente	50
5.5 Comportamento doentio induzido por LPS	52
5.5.1 Teste de campo aberto	52
5.5.2 Teste de nado forçado.....	54
5.5.3 RT-PCR quantitativo em tempo real	56
6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	60
7. CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXO - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA (CEUA).....	73

1. INTRODUÇÃO

A inflamação constitui uma resposta protetora do sistema imunológico do corpo contra invasões microbianas, entrada de antígenos, lesão ou dano de células e tecidos. Se a resposta inflamatória é bem-sucedida e controlada, leva à eliminação de estímulos prejudiciais e restaura a fisiologia normal (TASNEEM et al., 2019).

Alguns estudos vêm demonstrando que a inflamação desencadeia a ativação das células imunes residentes e inatas, as quais provocam a produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios: histamina, bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos e citocinas, reguladores da migração celular, quimiotaxia e proliferação de maneira altamente coordenada (LOPES et al., 2017; BATISTA et al., 2018; TASNEEM et al., 2019).

Esses produtos oriundos da inflamação mostraram que podem ativar os neurônios nociceptivos. Com efeito, a dor, sendo uma das características da inflamação, resulta de interações neuroimunes, podendo as citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos secretados pelas células imunológicas, sensibilizar diretamente os nociceptores, com um aumento da capacidade de resposta, e provocar hiperalgesia e dor de origem inflamatória (LOPES et al., 2017; ZUCOLOTO et al., 2017a).

No curso de uma infecção, o organismo reconhece rapidamente bactérias e ativam a resposta imune. Principal componente da membrana externa das bactérias gram-negativas, o lipopolissacarídeo (LPS) é comumente utilizado para desencadear neuroinflamação, induzindo uma ampla gama de citocinas pró-inflamatórias, com alterações comportamentais delas resultantes, alterações essas coletivamente denominadas por "comportamento doentio", caracterizada por febre, mal-estar, aumento da sensibilidade à dor, perda de atividade, perda de apetite, cognição prejudicada, ansiedade e depressão (MING; SAWICKI; BEKAR, 2015; OISHI et al., 2015; HUFFMAN et al., 2019).

Constituem, na maioria dos processos fisiopatológicos, como causa subjacente, a inflamação e a dor. Para o tratamento dessas condições, a utilização de fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) é uma prática clínica comum, sendo as atuais intervenções terapêuticas dirigidas à inibição da formação de mediadores inflamatórios. Entretanto, apresentam esses fármacos certas limitações e efeitos colaterais que aumentam com a cronicidade do seu uso, podendo causar toxicidade gastrointestinal grave (OLONODE; ADERIBIGBE; BAKRE, 2015; PINHO-RIBEIRO et al., 2016; RAJU et al., 2016; ZUCOLOTO et al., 2017a).

Assim, os efeitos colaterais indesejáveis, associados ao uso prolongado de AINEs, propendem a limitar sua utilidade clínica, incitando a busca e o desenvolvimento de novos medicamentos anti-inflamatórios eficazes com efeitos adversos mínimos. Sendo assim, a inflamação se tornou um alvo terapêutico imperativo para novas intervenções farmacológicas, uma vez que desempenha papel crítico durante a patologia de diversas doenças (RAJU et al., 2016; ZUCOLOTO et al., 2017a; TASNEEM et al., 2019).

Nova carboximidamina, a DCHA - naringenina com aminoguanidina, produto da reação de condensação entre essas duas substâncias, apresenta um potencial de atividades antioxidante, antiglicante e anti-inflamatória, podendo ser um candidato promissor no desenvolvimento de novo fármaco para doenças de perfil inflamatório.

Por se tratar de uma substância inédita e de potencial terapêutico, o presente estudo teve por objetivo investigar, com base em testes experimentais *in vivo*, a atividade farmacológica da DCHA na coordenação motora, nocicepção inflamatória, nocicepção central e no comportamento doentio induzido por lipopolissacarídeo, bem como na expressão gênica de citocinas envolvidas em tal ação modulatória.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da inflamação

A inflamação é o resultado de uma reação fisiológica e protetora do corpo humano, desencadeada por patógenos e lesões do tecido, comumente descrita como uma sequência de etapas reguladas por células do sistema imune, em uma tentativa para restabelecer a homeostase do tecido (DVORAKOVA; LANDA, 2017; YI, 2017; ZUCOLOTO et al., 2017a).

Esse processo caracteriza-se pela produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios: histamina, bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos e citocinas, causando o aparecimento de sinais cardinais de inflamação, como dor, calor, vermelhidão, inchaço, inclusive, em alguns casos, perda da função do tecido afetado (YI, 2017; BATISTA et al., 2018).

No processo inflamatório, distingue-se a inflamação aguda, manifestada, estritamente falando, por sinais cardinais de inflamação; e a crônica, esta, podendo ocorrer na ausência de sinais cardinais (KUPRASH; NEDOSPASOV, 2016).

Inicia-se o processo inflamatório pelo reconhecimento de patógenos ou de lesão do tecido, feito pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), presentes em células imunes, como: macrófagos, leucócitos, neutrófilos e mastócitos, células essas que são atraídas para o local da lesão. Esses receptores reconhecem padrões moleculares associados a dano (DAMPs) ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) expressos por micróbios. Esse processo de detecção de patógenos por meio de receptores ou produtos liberados por células necróticas, como ATP e IL-33, resulta na produção e na secreção de mediadores pró-inflamatórios (citocinas, histamina, óxido nítrico, leucotrienos e prostaglandinas), e na ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB), com a consequente translocação do NF-κB para o núcleo, resultando na transcrição de citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-

8) e moléculas de adesão, tais como: E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 (DVORAKOVA; LANDA, 2017; ZUCOLOTO et al., 2017a).

As citocinas pró-inflamatórias exercem uma grande ação nas células endoteliais, causando a expressão de ICAM-1 ou VCAM-1. Essas moléculas de adesão fazem com que as células imunes ativadas (os neutrófilos), existentes na corrente sanguínea, se juntem à parede vascular e migrem para o local das infecções, a fim de eliminar o patógeno e reparar o tecido em resposta à inflamação aguda (FILIPPI, 2016; CHOUSTERMAN; SWIRSKI; WEBER, 2017).

Nessa reação do organismo, cabe destacar a atuação de alguns mediadores pró-inflamatórios, como:

Histamina

A histamina - pertencente à classe de aminas vasoativas, derivada da histidina, por descarboxilação – provoca vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. É produzida e armazenada, principalmente, em mastócitos e basófilos, estando presente em suas granulações (BATISTA et al., 2018; BRANCO et al., 2018).

Óxido nítrico

O óxido nítrico, produzido pelo metabolismo da L – arginina, por meio das atividades das sintases do óxido nítrico (NOS), sendo já descritos três diferentes isoformas de NOS, codificadas por genes distintos: as isoformas neuronal (Nos1, NosI, nNOS), endotelial (Nos3, NosIII, eNOS) e a NOS induzida (Nos2, NosII, iNos), sendo que as atividades da eNOS e da nNOS resultam em baixos níveis de NO, envolvidos principalmente em processos fisiológicos. A terceira isoforma iNOS gera elevados níveis de NO em resposta a mediadores inflamatórios e/ou a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). A expressão de iNOS é induzida por inflamação. O NO tem uma relevante função, na regulação das respostas inflamatórias e imunológicas (SPILLER et al., 2019).

Liberado pelas células endoteliais, o óxido nítrico propaga-se nas células musculares lisas, causando seu relaxamento e promovendo, assim, a vasodilatação (DVORAKOVA; LANDA, 2017).

O NO está envolvido em uma variedade de condições inflamatórias, estando nelas incluídas a artrite reumatoide, aterosclerose, sepse e asma, sendo sua liberação uma das respostas inflamatórias mais características das células expostas a toxinas de membranas externas de bactérias, como LPS (AKIHISA et al., 2017).

Citocinas

Citocinas são proteínas secretadas e responsáveis por mediar a reação inflamatória no sistema imune inato. Dividem-se em várias categorias: interleucinas, quimiocinas, interferons, fator de necrose tumoral e fatores de crescimento. As da primeira categoria (interleucinas) constituem o grupo mais importante de citocinas liberadas nos processos infecciosos, por abranger uma variedade de proteínas secretadas por leucócitos, células endoteliais, macrófagos e glia, dentre outras, as quais contribuem para a sinalização celular e provocam a ativação, proliferação e morte e/ou mobilidade das células imunes. Dividem-se, ainda, em interleucinas pró e anti-inflamatórias, sendo que as pró-inflamatórias são responsáveis pela ativação celular, danos nos tecidos e necrose; e as segundas (anti-inflamatórias), objetivam amenizar e, finalmente, reverter o processo inflamatório (CHOUSTERMAN; SWIRSKI; WEBER, 2017); (TOTSCH; SORGE, 2017).

A citocina pró-inflamatória - fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) - representa um importante mediador de respostas inflamatórias, sendo liberada por células imunes ativadas, como macrófagos e monócitos. O aumento de sua produção envolve uma gama diversa de doenças infecciosas e inflamatórias. O TNF- α induz a produção de IL-1 β em leucócitos, de modo que ambas ativam o epitélio vascular, induzem a resposta febril e medeiam na migração

e no recrutamento de células imunes efetoras (CHOODEJ; PUDHOM; MITSUNAGA, 2018; MILLET et al., 2018).

Desse modo, à resposta inflamatória, segue-se uma resposta anti-inflamatória compensatória, regulada pela citocina IL-10, que inibe a produção de IL-1 β , TNF, IL-6 e várias outras citocinas inflamatórias, limitando o dano decorrente dos mediadores inflamatórios e promovendo o reparo do tecido e a restauração da homeostase (MILLET et al., 2018).

Prostaglandinas

O ácido araquidônico (AA), quando metabolizado pela via da ciclooxigenase (COX), forma os prostanóides: prostaglandinas (PGs), tromboxanos e prostaciclina; quando pela via da 5-lipoxigenase (5-LOX), dá origem a leucotrienos (LTs) (BIEREN, 2017).

As prostaglandinas, em cuja síntese estão envolvidas as ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2), são responsáveis por manter a homeostase e mediar a inflamação. Enquanto a atividade da COX-1 produz os níveis basais de prostaglandina, a COX-2 aumenta os níveis de prostaglandina, após receber estimulação, como no processo inflamatório. A prostaglandina E₂ (PGE₂) exerce um papel importante na sensibilização de neurônios após estímulos inflamatórios repetitivos por meio da ativação da proteína quinase A (PKA) e sua regulação do canal para sódio Nav 1.8 (TOTSCH; SORGE, 2017).

Importantes para o sistema imunológico, convém mencionar a PGE₂ e a prostaciclina PGI₂, como reguladores da migração e da ativação das principais células imunes (BIEREN, 2017).

Bradicinina

Trata-se de um peptídeo que medeia a inflamação e exerce um significativo papel na sensibilização dos neurônios. Produzido no plasma, funciona como um vasodilatador poderoso. A bradicinina, presente no mecanismo da dor, exerce, pela ativação de seus receptores, uma

função na regulação positiva do fator de crescimento do nervo (NGF), aumentando a ativação do receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1) (TOTSCH; SORGE, 2017).

Sendo a inflamação e a dor o fundamento de quase todos os processos fisiopatológicos, cabe destacar, a seguir, a dor de origem inflamatória (ZUCOLOTO et al., 2017a).

2.2 Dor de origem inflamatória

Os estímulos nocivos são sinais de danos iminentes aos tecidos, de modo que sua detecção é essencial à sobrevivência. A sensação de dor, por eles produzida, é diminuída, de modo geral, à proporção que a inflamação vai sendo resolvida (WOLLER et al., 2019).

Existentes nos estágios agudos e crônicos da maioria dos estímulos nocivos e em muitas doenças, a dor e a inflamação têm grande importância fisiológica na manutenção e integridade dos tecidos. As dores agudas e crônicas são distintas: a primeira, pelo fato de ocorrer por estímulo nociceptivo; a segunda, por ser causada por inflamação ou neuropatias (SILVA et al., 2018b).

Como resposta a estímulos com dano tecidual real ou potencial, a dor constitui uma resposta de adaptação essencial à proteção da integridade do organismo, podendo ser gerada por respostas mal-adaptativas do organismo, prejudiciais às atividades diárias e a qualidade de vida. A sensibilização de nociceptores, neurônios somatossensoriais, por estímulos nocivos, podem motivar a persistência e a exacerbação da dor. A IL-33, por sua vez, leva a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β e prostaglandina E₂ (PGE₂), mediadores inflamatórios atuantes sobre os neurônios nociceptivos, facilitando sua ativação e aumentando a sensibilidade à dor, caracterizado por um estado denominado hiperalgesia, tornando, assim, a experiência da dor mais desagradável que a habitual (PINHO-RIBEIRO et al., 2016).

Foram identificados recentemente, como receptores-chave da dor, os seguintes canais iônicos: canais de receptores de potencial transitório (TRP), canais ATP, canais iônicos

sensíveis ao ácido, dentre outros, com abertura que causa o influxo de cátions que despolarizam os neurônios sensoriais. Alguns canais TRP, dentre os anteriormente mencionados, como o TRPV1-4, o TRPA1 e o TRPM8, despertaram considerável atenção, ao mostrarem-se expressos em nociceptores, em que funcionam como detectores e transdutores para estímulos térmicos, químicos e mecânicos, estando a ativação ou sensibilização desses canais envolvida profundamente na condição patológica da dor. Segundo estudos, membros da família TRP, como o TRPV1, TRPV4 e TRPA1, agem como substrato final para mediadores inflamatórios, envolvidos na patogênese da dor inflamatória (DAI, 2016; FISCHER et al., 2017).

Resultando da ativação e sensibilização da via da dor nociceptiva por uma variedade de mediadores liberados nos locais de inflamação tecidual, a dor inflamatória se expressa pela redução do limiar de ativação dos nociceptores e um aumento da responsividade dos neurônios sensoriais. Os mediadores mencionados, compreendendo as citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio, proteínas quinases, aminas vasoativas, lipídios, ATP, prostaglandina E₂ (PGE₂), bradicinina, fator de crescimento do nervo (NGF), ácidos e outros fatores, são liberados por infiltração de leucócitos, células endoteliais vasculares ou mastócitos residentes em tecidos após lesão tecidual (DAI, 2016; ZUCOLOTO et al., 2017a; SPILLER et al., 2019).

Sintoma comum de uma variedade de doenças inflamatórias, a dor inflamatória pode ocorrer por diferentes estímulos, tais como: infecção, trauma, antígeno e radiação (DOLUNAY et al., 2017).

2.3 Comportamento doentio induzido por citocinas

O comportamento doentio é uma resposta fisiológica do hospedeiro a uma infecção, desencadeada pela ativação do sistema imune inato periférico e de suas vias de sinalização por estruturas específicas oriundas de patógenos, resposta essa que está associada a um conjunto de

mudanças endócrinas, autonômicas e comportamentais, além de serem essenciais para a homeostase e a sobrevivência do hospedeiro (MALLIK et al., 2016; SHAIKH et al., 2016; ZHANG et al., 2016; LIMA et al., 2018).

Como parte da resposta imune inata do hospedeiro, a inflamação inicia-se pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), capazes de reconhecer os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Existem, já identificados, vários tipos de famílias de PRR, incluindo receptores Toll-like (TLRs), receptores de lectina do tipo c, dentre outros, localizados na superfície celular externa ou na membrana endossômica (YI, 2017).

Os receptores Toll-like (TLRs) reconhecem estruturas moleculares derivadas de microorganismos, sendo mais estudado o receptor Toll-like 4 (TLR4), expresso por muitos tipos de células, principalmente por macrófagos, monócitos e granulócitos, uma vez que reconhece sobretudo o lipopolissacarídeo (LPS), um componente de membrana externa de bactérias Gram-negativas que funciona como uma endotoxina, sendo um padrão molecular associado a patógenos (PAMP), ativador do sistema imunológico. O LPS protege a bactéria do ambiente, inibe a entrada de compostos tóxicos, como antibióticos, sendo o componente-chave na interação fisiopatológica das bactérias com os organismos hospedeiros (HAMESCH et al., 2015; CAI et al., 2016; SHAIKH et al., 2016; CHUNG et al., 2017; YI, 2017; ZUCOLOTO et al., 2017b; LIMA et al., 2018).

A administração de endotoxina LPS, em uma única dose, injetada em roedores, tem desencadeado neles a liberação de citocinas pró-inflamatórias (produzidas por monócitos e macrófagos ativados em resposta a infecções), bem como a interleucina-1 (IL-1), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), que levam a ativação do sistema imune inato, enviando sinais inflamatórios através de vias neuro-humorais no cérebro, resultando em um “comportamento doentio”, caracterizado por comportamentos depressivos, tais como: anedonia e diminuição da atividade locomotora; redução do comportamento

exploratório; adipsia; anorexia; febre e sonolência. Essas condições fisiopatológicas nos animais, induzidos por LPS, assemelham-se às dos humanos. Além disso, o LPS e os mediadores inflamatórios agem sinergicamente, aumentando a sensibilidade à dor (MALLIK et al., 2016; PINHO-RIBEIRO et al., 2016; SAVIGNAC et al., 2016; SHAIKH et al., 2016; ZHANG et al., 2016; LIMA et al., 2018; NANDEESH et al., 2018).

As citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e/ou prostaglandinas de liberação periférica agem, principalmente nos receptores neuronais, por meio da estimulação dos nervos aferentes primários ou da difusão direta no parênquima cerebral. Já as citocinas liberadas do sistema nervoso central medeiam o comportamento doentio, por meio de efeito parácrino. Esses mediadores inflamatórios acessam o cérebro por vários caminhos, provocando, assim, o comportamento doentio (MALLIK et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

A união do LPS à proteína ligante de LPS (LBP) possui afinidade pelo fator de diferenciação mielóide 2 (MD2) e pelo cluster de diferenciação 14 (CD 14), os quais, juntos, ligam-se ao receptor Toll-like 4 (TLR4). Quando ativado, esse complexo transduz sinais para proteínas intracelulares especializadas (MyD88, IRAKs, TRAFs e NIK), redundando numa rede multifacetada de respostas celulares, com a ativação da via do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-KB), produção de várias citocinas inflamatórias, incluindo TNF- α , interleucina (IL) -1 α / β , IL-6, IL-12, IL-18 e fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), Interferon-gama (IFN- γ), prostaglandina (PGE₂), dentre outros (HAMESCH et al., 2015; YI, 2017; ZUCOLOTO et al., 2017b).

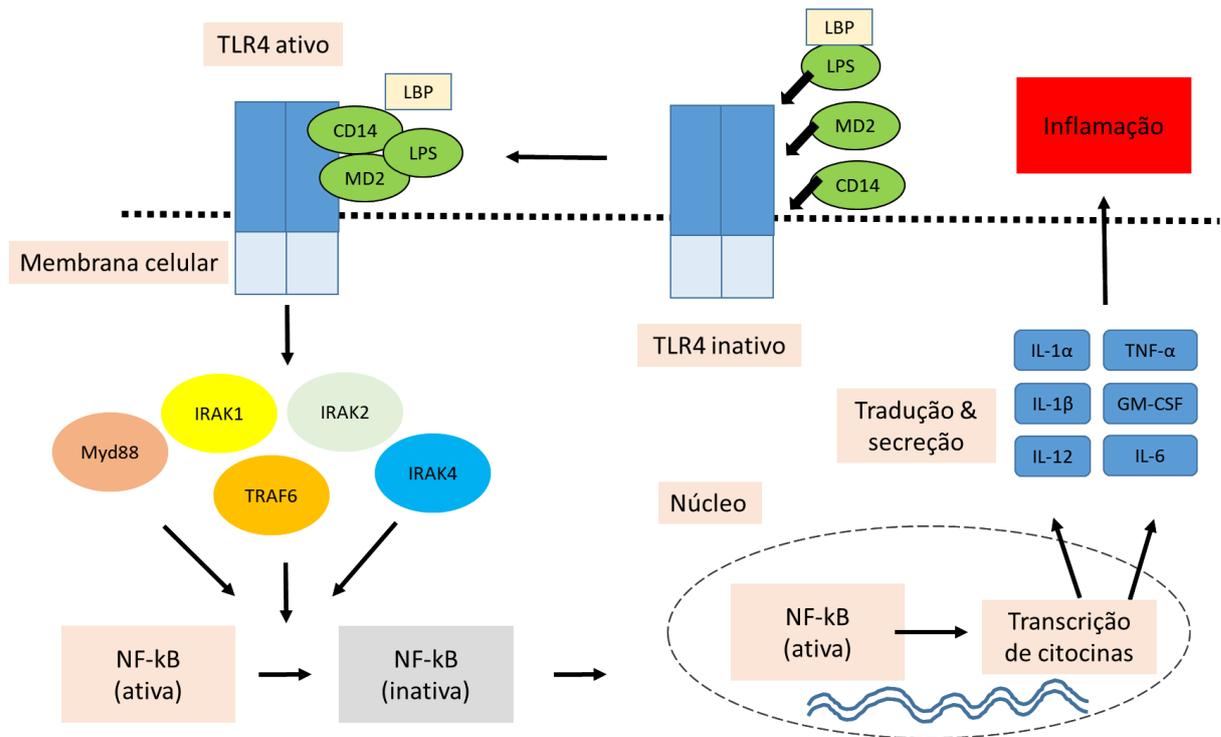


Figura 1 - Sinalização induzida por lipopolissacarídeo (LPS). TLR4: receptor tipo Toll-like 4; LPB: proteína ligante de LPS; CD14: cluster de diferenciação 14; MD2: fator de diferenciação mielóide 2; IRAK1/2/4: cinase 1/2/4 associada ao receptor de IL-1; MyD88: gene 88 de resposta primária à diferenciação mielóide; TRAF6: fator 6 associado ao receptor de TNF; NF-κB: fator nuclear kappa B; TNF-α: fator de necrose tumoral-α; GM-CSF: fator estimulador de colônias de macrófagos de granulócitos; IL: interleucina.

Fonte: Adaptado de HAMESCH et al., 2015.

Os mediadores inflamatórios liberados amplificam a resposta inflamatória e suas manifestações clínicas. A IL-1β e o TNF-α, por exemplo, estimulam as células endoteliais, aumentando o recrutamento de leucócitos, além da modulação de células imunes e neurônios sensoriais. Além disso, o IFN-γ e o IL-6 exercem papéis importantes na modulação de macrófagos e monócitos. Já a PGE₂, transpondo a barreira hematoencefálica, atua em regiões específicas do cérebro, ou seja, no órgão vascular da lâmina terminal e na área pré-óptica ventromedial do hipotálamo anterior, causando vasoconstrição cutânea, redução da sudorese e

aumento da produção de calor pelo metabolismo do tecido adiposo marrom, culminando esses eventos em mudanças na temperatura corporal (CAI et al., 2016; ZUCOLOTO et al., 2017b).

Para combater a inflamação e a hiperalgesia, induzidas por LPS em animais, recentes estudos demonstram os efeitos benéficos, parciais ou totais, no tratamento delas com antioxidantes, antiinflamatórios e analgésicos, provenientes de fontes sintéticas ou naturais (SHAIKH et al., 2016; ZUCOLOTO et al., 2017b).

2.4 Tratamento farmacológico

A maioria dos processos fisiopatológicos têm como causa subjacente a inflamação e a dor, sendo que, em muitos casos, a inflamação induz a dor. As atuais intervenções terapêuticas, portanto, estão dirigidas à inibição da formação de mediadores inflamatórios (OLONODE; ADERIBIGBE; BAKRE, 2015; ZUCOLOTO et al., 2017a).

Em decorrência da ação dos mediadores inflamatórios na hiperalgesia, a utilização de fármacos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), no tratamento da dor e de condições inflamatórias, é uma prática clínica comum. Esses fármacos apresentam algumas limitações e efeitos colaterais que aumentam com a cronicidade do seu uso, podendo causar toxicidade gastrointestinal grave, tais como: sangramento gástrico e surgimento de úlceras estomacais. Têm sido associados alguns AINEs, como os inibidores da COX-2, ao aumento da pressão arterial, aumento do risco de insuficiência cardíaca congestiva, trombose e infarto do miocárdio (PINHO-RIBEIRO et al., 2016; RAJU et al., 2016; ZUCOLOTO et al., 2017a).

Desse modo, associados ao uso prolongado de AINEs, os efeitos colaterais indesejáveis tendem a limitar sua utilidade clínica, estimulando a busca e o desenvolvimento de novos medicamentos anti-inflamatórios eficazes com efeitos adversos mínimos (RAJU et al., 2016; ZUCOLOTO et al., 2017a).

2.5 DCHA: Uma nova Carboximidamina

DCHA é um sólido cristalino com coloração acinzentada, caracterizada como uma hidrazina carboximidamina (2E)-2-[5,7-diidroxi-2-(4-hidroxifenil)-2,3-dihidro-4H-cromen-4-ilideno), obtida da reação entre a naringenina e aminoguanidina por condensação seguida de uma desidratação. A substância foi sintetizada pela Dra. Ana Cristina da Silva Pinto, no Laboratório de Atividades Biológicas –Biophar da UFAM, durante o seu projeto de pós-doutoramento, sob a supervisão do Prof. Dr. Emerson Silva Lima.

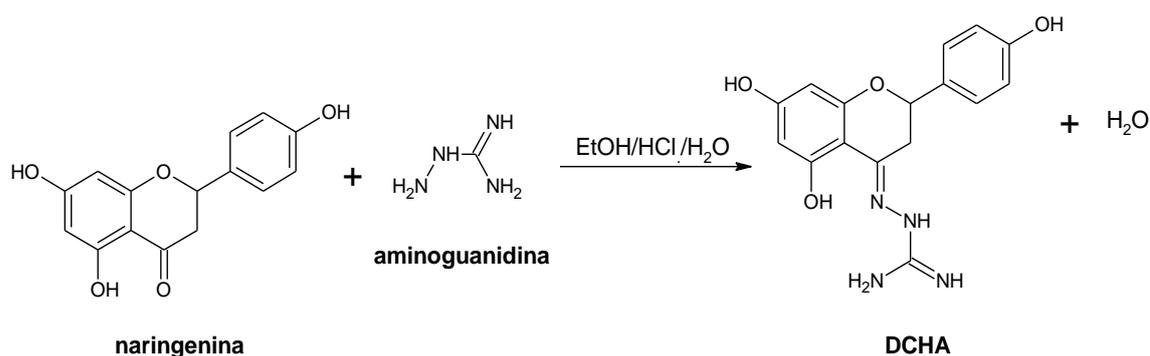


Figura 2 - Reação de condensação entre naringenina e aminoguanidina em meio ácido alcoólico, formando a DCHA.

A DCHA é uma substância inédita, cujas atividades biológicas estão sendo objeto de pesquisa e ensaios por nosso grupo, com vistas ao desenvolvimento de nova droga para doenças inflamatórias. É composta de duas substâncias: a naringenina e a aminoguanidina, cujas funções serão objeto, a seguir, de sucinta explanação.

Naringenina

A naringenina é, dentre os flavonóides, um flavonóide flavona que possui uma vasta gama de atividades biológicas e farmacológicas, capaz de modular as respostas inflamatórias agudas e crônicas, apresentando-se como um potencial agente terapêutico para o controle de diversas doenças de perfil inflamatório (ZENG et al., 2018).

Os flavonoides são compostos que pertencem a uma classe de metabólitos secundários, encontrados em plantas e fungos. Acham-se em frutas, grãos, vegetais, caules, raízes, chás, flores e vinhos. Descritos e categorizados em flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, catequinas e antocianidinas, os flavonoides têm diferentes atividades farmacológicas, como atividade antioxidante, antialérgica, antibacteriana, anti-inflamatória, antimutagênica e anticancerígena (OH, 2016; PATEL; SINGH; PATEL, 2018).

Como pertencente aos flavonóides flavonas, a naringenina é encontrada principalmente em frutas cítricas, como limão, toranja, laranja, tangerina e legumes. Sob o ponto de vista farmacológico, possui as seguintes propriedades: é anticancerígeno, antimutagênico, anti-inflamatório, antioxidante, com atividades antiproliferativas e antiaterogênicas (MANCHOPE; CASAGRANDE; VERRI-JR, 2017; PATEL; SINGH; PATEL, 2018).

Pesquisas que utilizaram o sistema de cultura de células (células cancerígenas, hepatócitos, macrófagos e adipócitos), demonstraram que é possível a naringenina inibir, nessas mesmas células, a resposta inflamatória. Além disso, estudos em vários modelos animais comprovaram potenciais terapêuticos da naringenina no tratamento de distúrbios associados à inflamação, como: sepse, hepatite aguda, fibrose e câncer (ZENG et al., 2018).

Embora o mecanismo de ação da naringenina não esteja totalmente elucidado, pesquisas recentes mostraram que ela suspende a produção de citocinas inflamatórias por meio de mecanismos transcricionais e pós-transcricionais, inibindo a expressão de mRNA de citocina (ZENG et al., 2018).

Há evidências sugerindo que a naringenina pode ser usada para fins terapêuticos, devido sua capacidade em modular respostas inflamatórias. Por causa dos mediadores inflamatórios em doenças que diminuem a qualidade de vida dos pacientes, sua atividade anti-

inflamatória desperta grande interesse, principalmente em virtude da dor inflamatória (PINHO-RIBEIRO et al., 2016; ZENG et al., 2018).

A naringenina atua como inibidora: do comportamento semelhante a dor induzida por estímulos inflamatórios como ácido acético, formalina, capsaicina, carragenina, ânion superóxido e LPS; e da ativação de NFκB induzida por LPS e carragenina *in vivo* e *in vitro*, o que contribui para a inibição da IL-33, da produção de TNFα, IL-1β e IL-6 e da expressão de RNAm de ciclo-oxigenase 2. A naringenina atua, ainda, por mecanismos que compreendem a inibição do recrutamento de leucócitos, estresse oxidativo, ativação de NFκB e produção de citocinas pró-hiperalgésicas nas células imunológicas, como macrófagos. Além disso, a naringenina modula canais de TRP, como TRVP1, TRPM3 e TRPM8, diminuindo a dor e ativando uma via de sinalização de NO que induz a hiperpolarização dos neurônios nociceptores (MANCHOPE; CASAGRANDE; VERRI-JR, 2017).

Naringenina, portanto, demonstra ampla ação terapêutica em vários modelos de dor inflamatória (MANCHOPE; CASAGRANDE; VERRI-JR, 2017).

Aminoguanidina

Trata-se de um composto de fenil-hidrazina com muitos efeitos biológicos e função não tóxica. Age como um inibidor seletivo da iNOS, podendo inibir as complicações diabéticas patológicas e melhorar o quadro clínico do diabético (SONG et al., 2017).

Estudos vem apontando a Aminoguanidina (AG) como uma substância inibidora específica da NOS induzível (iNOS) e da inflamação, além de redutora da neurodegeneração na encefalomielite auto-imune experimental em animais (SIL et al., 2017).

Por tanto, o estudo da DCHA, é de suma importância na busca de elucidar o potencial farmacológico dessa nova molécula na nocicepção inflamatória e central e no comportamento doentio induzido por LPS, em modelo experimental *in vivo*, gerando perspectivas para o

desenvolvimento de novo fármaco que poderá ser mais eficaz no tratamento de doenças de perfil inflamatório.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar as propriedades farmacológicas da nova carboximidamina – DCHA, em modelo de nocicepção e inflamação *in vivo*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da DCHA na modulação da nocicepção inflamatória e central em camundongos;
- Verificar a ação da substância DCHA na coordenação motora de camundongos;
- Investigar o efeito da DCHA no comportamento doentio induzido por LPS em camundongos;
- Determinar a ação da DCHA na expressão gênica de iNOS e mediadores pró-inflamatórios IL-1 β , TNF- α e IL-6, no sangue, fígado e rim de camundongos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

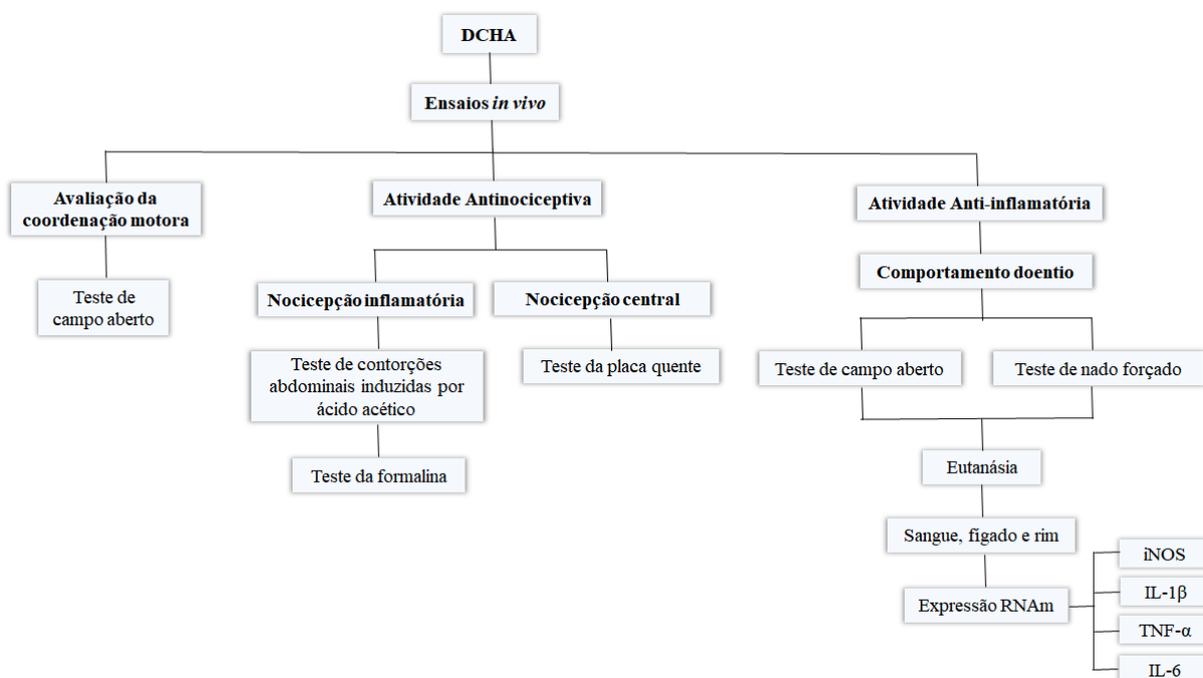


Figura 3 - Fluxograma de planejamento dos ensaios experimentais. A substância DCHA foi submetida a testes *in vivo*, para avaliação de sua atividade farmacológica na coordenação motora, nociceção inflamatória e central e no comportamento doentio induzido por LPS, bem como na expressão de RNAm de iNOS e citocinas pró-inflamatórias envolvidas em tal ação modulatória.

4.2 Substância

DCHA

Substância obtida por condensação entre naringenina com aminoguanidina, a DCHA é caracterizada como uma hidrazina carboximidamina (2E)-2-[5,7-diidroxi-2-(4-hidroxifenil)-2,3-dihidro-4H-cromen-4-ilideno). As substâncias (naringenina e aminoguanidina) foram cedidas pelo co-orientador Prof. Dr. Emerson Silva Lima, provenientes do estoque do Laboratório de Atividades Biológicas (Biophar) e utilizadas na semissíntese da DCHA. Essa

semissíntese foi realizada em conjunto com a Dra. Ana Cristina da Silva Pinto, do Laboratório de atividades biológicas – Biophar.

A identificação da estrutura química da DCHA foi realizada mediante espectrometria de massas sequencial (ESI-MS/MS-MS) e da ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C) nos Laboratórios de espectrometria de massas e RMN da Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas. E também por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (SOUZA, R. O. S, 2019).

4.3 Procedimentos experimentais

4.3.1 Animais

A pesquisa com a utilização de animais de laboratório neste projeto foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), no processo nº 037/2018. O parecer de aprovação está anexado ao trabalho (ver ANEXO).

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações normativas, no tocante ao cuidado e ao uso de animais de laboratório.

No estudo, foram utilizados 153 camundongos Swiss Webster (*Mus musculus*), machos, pesando entre 25-40g. Esses animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Amazonas, alojados em gaiolas padrão, em salas de temperatura controlada $22 \pm 2,0^\circ\text{C}$, com um ciclo de claro/escuro de 12 horas e acesso a água e ração *ad libitum*.

Para avaliar a nocicepção inflamatória, foi realizado o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético e o teste da formalina; e para a nocicepção central, o teste da placa quente. Já para verificar o comportamento doentio induzido por LPS, fez-se o teste de campo

aberto e o teste de nado forçado. No intuito de descartar a presença de substâncias que pudessem promover relaxamento muscular ou sedação a interferir na atividade do composto foi realizado o teste de campo aberto para avaliação da coordenação motora.

Em todos os procedimentos experimentais, foram utilizados grupos de 4 – 6 animais e adotado um jejum de 3 – 4 horas, antes dos tratamentos orais. Após a realização dos testes, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com Cetamina e Xilazina (1:1; 50 mg/kg de peso) e eutanasiados por deslocamento cervical. Em seguida, entregues ao Biotério Central da Universidade Federal do Amazonas para realização do descarte.

4.3.2 Avaliação da coordenação motora

4.3.2.1 Teste de campo aberto

Para descartar possíveis efeitos relaxantes musculares inespecíficos ou sedativos, da substância DCHA, a atividade locomotora espontânea dos camundongos foi avaliada no aparato de campo aberto, segundo a metodologia de Archer (1973), com modificações.

O aparato de campo aberto consiste num círculo de isopor medindo 40 cm de diâmetro e 30 cm de altura, cujo piso é dividido em 21 quadrados iguais, sendo: 9 centrais e 12 periféricos. Na avaliação, grupos de animais (n = 5 - 6) foram pré-tratados com o veículo salina (10 ml/kg, v.o.) ou DCHA (10mg/kg, v.o.) 1 hora antes do teste.

Cada animal foi colocado inicialmente no centro da arena do campo aberto, no qual tiveram deambulação livre gravada por 5 minutos, através de uma câmera de vídeo posicionada acima do aparato, para posterior observação e quantificação da frequência de locomoção (número de quadrados atravessados pelo animal com todas as suas patas).

As travessias de linhas entre os quadrados centrais e os periféricos foram contados separadamente, assim como os cruzamentos totais e *rearings* (ambas as patas dianteiras levantadas do chão). Para este ensaio, cada camundongo foi usado apenas uma vez.

4.3.3 Avaliação da atividade antinociceptiva

4.3.3.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

Teste baseado na metodologia de Koster, Anderson e Beer (1959), com modificações, no qual a resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético 0,9% (0,1 ml/10 g), diluído em solução salina (0,9%).

Para este experimento, grupos de 4 - 5 camundongos receberam os seguintes tipos de pré-tratamento: no grupo 1, os animais receberam o veículo (salina), via oral, no volume de 10 ml/kg; no grupo 2, receberam a indometacina, via oral, na dose de 10 mg/kg; nos grupos 3 e 4, receberam por via oral a substância DCHA nas doses de 1 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, e, no grupo 5, receberam naringenina 10 mg/kg e aminoguanidina 10 mg/kg, via oral.

Uma hora após o pré-tratamento, todos os animais receberam as injeções intraperitoneais de solução de ácido acético a 0,9% e foram então colocados em uma caixa de plástico transparente com paredes fechadas, para observação da resposta nociceptiva, que consiste em contorções abdominais, caracterizadas por contrações do músculo abdominal seguidas de alongamento dos membros posteriores, as quais foram quantificadas e registradas num período de 0 – 20 minutos.

4.3.3.2 Teste da formalina

Este teste foi baseado no método introdutório de Dubuisson e Dennis (1977), adaptado por Hunskaar, Fasmer e Hole (1985) para camundongos, com modificações. Uma solução de formalina 2,5 %, em água destilada, foi injetada no volume de 30,0 µl/pata na superfície plantar da pata posterior direita (injeção intraplantar, i.pl.) em camundongos *swiss*, após 1 hora do pré-tratamento com a substância teste e as substâncias de referência.

Nesse procedimento experimental, foram utilizados grupos de 4 - 6 camundongos. No grupo 1, os animais receberam o veículo (solução salina), no volume de 10 ml/kg, via oral. O grupo 2 recebeu a morfina, na dose de 10 mg/kg, via oral. O grupo 3 recebeu a indometacina, na dose de 10 mg/kg, via oral. Os grupos 4,5 e 6, receberam por via oral a substância DCHA, nas doses de 1 mg/kg, 10 mg/kg e 20 mg/kg, respectivamente. Após 1 hora dos tratamentos orais, todos os grupos receberam a injeção de formalina.

O tempo em segundos (s) em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada (*licking time*) e o índice de nocicepção foram avaliados e cronometrados em dois intervalos de tempo após a injeção: 0,0 -5,0 minutos (primeira fase ou dor neurogênica) e 15,0 - 30,0 minutos (segunda fase ou dor inflamatória).

4.3.3.3 Teste da placa quente

Este teste foi inicialmente descrito por Woolfe & Macdonald (1944) e adaptado por Couto et al. (2011), com modificações. É um modelo específico para a detecção de substâncias analgésicas de efeito central.

Foram utilizados grupos de 4 animais, os quais, no grupo 1, receberam o veículo (solução salina), no volume de 10 ml/kg, via oral; no grupo 2, receberam a morfina, na dose de 10 mg/kg, via oral; nos grupos 3 e 4, receberam por via oral a substância DCHA, nas doses de 1 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente.

Os camundongos foram colocados individualmente no equipamento que consiste de uma placa aquecida eletricamente com temperatura constante de 50 ± 5 °C, dentro de parede de Plexiglas para restringir sua locomoção. A resposta nociceptiva, caracterizada pelo lamber das patas ou pelo saltar na placa aquecida, foi verificada antes da administração de qualquer substância (leitura basal) e 30, 60 e 120 minutos após a administração oral das substâncias.

Esse teste foi executado por meio de um cronômetro acoplado ao equipamento, o qual, no momento em que cada animal apresentou a resposta nociceptiva na placa aquecida, foi interrompido, registrando-se esse tempo de resposta de cada um deles. O tempo máximo permitido para permanência dos animais na placa aquecida foi de 20 segundos, a fim de prevenir lesões nas patas.

4.3.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória

4.3.4.1 Comportamento doentio induzido por lipopolissacarídeo

O comportamento doentio foi induzido em camundongos através de injeções de LPS na cavidade peritoneal. O LPS de *Escherichia coli* (0111: B4) foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As alterações comportamentais que resultaram desse procedimento foram avaliadas por meio dos testes de campo aberto e teste de nado forçado.

Na realização dos testes, foram utilizados grupos de 4 – 6 animais. Os animais dos grupos 1 e 2 receberam o veículo (solução salina), no volume de 10 ml/kg, via oral; os do grupo 3, a indometacina, na dose de 10 mg/kg, via oral; os do grupo 4, a substância DCHA, na dose de 1 mg/kg, via oral; os do grupo 5, a substância DCHA, na dose de 10 mg/kg, via oral e os do grupo 6, naringenina 10 mg/kg + aminoguanidina 10 mg/kg, via oral.

Após 30 minutos do pré-tratamento, foi administrado injeção de salina (10 ml/kg) nos animais do grupo 1 e LPS (preparada em solução salina 0,9%), na concentração de 100 µg/kg, nos demais grupos, intraperitonealmente.

Duas horas após a administração das injeções, os animais foram então submetidos aos testes comportamentais (teste de campo aberto e teste de nado forçado), filmados por 5 minutos e 6 minutos respectivamente, para posterior análise e coleta dos resultados. Ao final desses testes, os animais foram eutanasiados e realizada a coleta do sangue por punção direta cardíaca e a retirada dos órgãos (fígado e rim). Em seguida, foi realizada a extração de RNA total dessas

amostras, para a quantificação da expressão gênica de iNOS e de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6) por PCR quantitativo em tempo real.

4.3.4.1.1 Teste de campo aberto

Atividade exploratória e locomotora dos camundongos foi avaliada no aparato de campo aberto, segundo a metodologia de Archer (1973), com modificações.

O teste foi realizado no aparato de campo aberto que consiste em um círculo de isopor medindo 40 cm de diâmetro e 30 cm de altura, cujo piso é dividido em 21 quadrados iguais, sendo, 9 centrais e 12 periféricos.

Cada animal foi colocado inicialmente no centro da arena do campo aberto, no qual tiveram deambulação livre gravada por 5 minutos, através de uma câmera de vídeo posicionada acima do aparato, para posterior observação e quantificação da frequência de locomoção (número de quadrados atravessados pelo animal com todas as suas patas).

As travessias de linhas entre os quadrados centrais e os periféricos foram contados separadamente, assim como os cruzamentos totais e *rearings* (ambas as patas dianteiras levantadas do chão). Para este ensaio, cada camundongo foi usado apenas uma vez.

4.3.4.1.2 Teste de nado forçado

Utilizou-se o teste do nado forçado, para avaliar a redução da mobilidade dos animais no comportamento depressivo. Este teste foi realizado segundo método original descrito por Porsolt et al. (1997), com adaptações.

Camundongos foram colocados em um cilindro de vidro (19 cm de altura, 15 cm de diâmetro) preenchido com água (temperatura 25°C) até uma profundidade de 14 cm, de modo que ficaram nadando ou flutuando, sem que os membros posteriores ou a cauda deles tocassem o fundo do cilindro.

Os animais foram colocados individualmente no cilindro e filmados por 6 minutos. A duração total da imobilidade foi registrada durante os últimos 4 minutos de um período de 6 minutos. A duração da flutuação (isto é, o tempo durante o qual os animais fizeram apenas os menores movimentos necessários para manter suas cabeças acima da água) foi registrada.

4.3.4.1.3 Obtenção do RNA total

O RNA total das amostras de sangue, fígado e rim dos camundongos foi extraído utilizando-se a metodologia do tiocianato de guanidina e fenol (Sambrook, 2002), empregando-se o reagente Trizol (Life Technologies, EUA).

Sumariamente, 200µl de sangue total e aproximadamente 100mg do tecido hepático e renal foram, imediatamente após a coleta, tratados com 400µl de trizol cada um deles e armazenados à -80°C até o momento da extração.

A extração do RNA total foi realizada após descongelamento das amostras, homogeneizando-as com trizol por 5 minutos à temperatura ambiente (20 a 30°C), permitindo dessa forma, a dissolução completa dos complexos de proteínas nucleares.

Adicionou-se então 200µl de clorofórmio gelado às amostras, seguida de agitação vigorosa em agitador vórtex por 15 segundos, com incubação por 3 minutos a temperatura ambiente. Após este tempo, foi realizada centrifugação a 10000rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada na temperatura de 5°C.

Depois desse procedimento, três fases foram observadas. Os sobrenadantes, contendo RNA, foram retirados e transferidos para novos tubos eppendorf estéreis. Nesses tubos, realizou-se a precipitação do RNA com adição de 300µl de isopropanol puro 99% (PA) gelado, seguida de centrifugação a 10000rpm por 10 minutos a 5°C.

Posteriormente, foram removidos, cautelosamente, de cada tubo, os sobrenadantes e lavados os precipitados de RNA obtidos, adicionando-se 400µl de etanol 75% gelado. Após adição do etanol, os tubos foram homogeneizados cuidadosamente, seguido de centrifugação a

12000rpm por 10 minutos a 5°C. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram completamente retirados dos tubos. O processo acima foi, então, repetido por 2 vezes.

Após a lavagem, os tubos, que continham os precipitados (*pellets*) de RNA, foram deixados abertos em estufa estéril a 50-60°C por 10 a 20 minutos, tendo-se o cuidado de não deixar o precipitado RNA secar completamente, permitindo-se, dessa forma, uma dissolução melhor.

Os *pellets* de RNA, secos e livres do etanol, foram ressuspendidos com 100µl de água DEPC ultra pura (UNI-R3071-UNISCIENCE) e armazenado a -80°C até o momento da conversão em DNA complementar (cDNA).

4.3.4.1.4 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A síntese do cDNA foi realizada a partir de 3,0µg de RNA (aproximadamente 5µl), utilizando-se o KIT (*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*, Applied Biosystems, EUA), de conformidade com o protocolo do fabricante.

Para testar a qualidade do cDNA, foi realizada amplificação pela técnica de PCR para o gene GAPDH – gene expresso constitutivamente, o qual foi amplificado em todas as amostras, confirmando a correta transcrição reversa. O cDNA resultante foi então quantificado no equipamento de PCR em tempo real *QuantStudio 6 Flex* (ThermoFisher), utilizando-se placas de 96 poços (0,1ml), fundamentado na metodologia de expressão gênica pelo sistema *TaqMan* (Quadro 1).

Quadro 1 - Genes alvos de camundongos investigados nos ensaios de PCR em tempo real (Life Technologies)

Gene	Identificação
Interleucina 1 Beta (IL-1 β)	Mm00434228_m1
Factor de necrose tumoral Alfa (TNF- α)	Mm00443258_m1
Interleucina 6 (IL-6)	Mm00446190_m1
Óxido nítrico sintase induzida (iNOS)	Mm00440502_m1

Glicerinaldeído-3 fosfato-desidrogenase (GAPDH)	Mm03302249_g1
--	---------------

Para cada reação qPCR, diluiu-se os cDNAs obtidos para uma diluição final 1:20, com as reações realizadas no volume final de 12 μ L, contendo: 5,0 μ L da solução *TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)*, 0,5 μ l de cada sonda específica, 3 μ L de cDNA proveniente do RT-PCR na diluição 1:20 e 3,5 μ l de água ultra pura.

Todas quantificações dos níveis de expressão foram determinadas em triplicatas, utilizando-se o gene GAPDH como controle endógeno para cada amostra. O nível de expressão foi calculado pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Schmittgen e Livak, 2008), considerando-se amostras de controle negativo como calibrador dos experimentos.

4.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando o software GraphPad versão 6.0 e expressos como média \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média). As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram calculadas pela aplicação de uma análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni ($p < 0,05$ foram considerados significativos).

5. RESULTADOS

5.1 Teste de coordenação motora

Neste teste, observou-se que os animais do grupo 1 tratados com veículo (salina, via oral, volume de 10 ml/kg) e do grupo 2 tratados com DCHA (dose de 10 mg/kg, via oral) mantiveram quase o mesmo comportamento exploratório, com relação ao número de cruzamentos de linhas centrais, periféricos, totais e *rearings*, não apresentando restrição na locomoção, indicando, dessa forma, que a substância DCHA não apresenta atividade sedativa ou relaxante muscular.

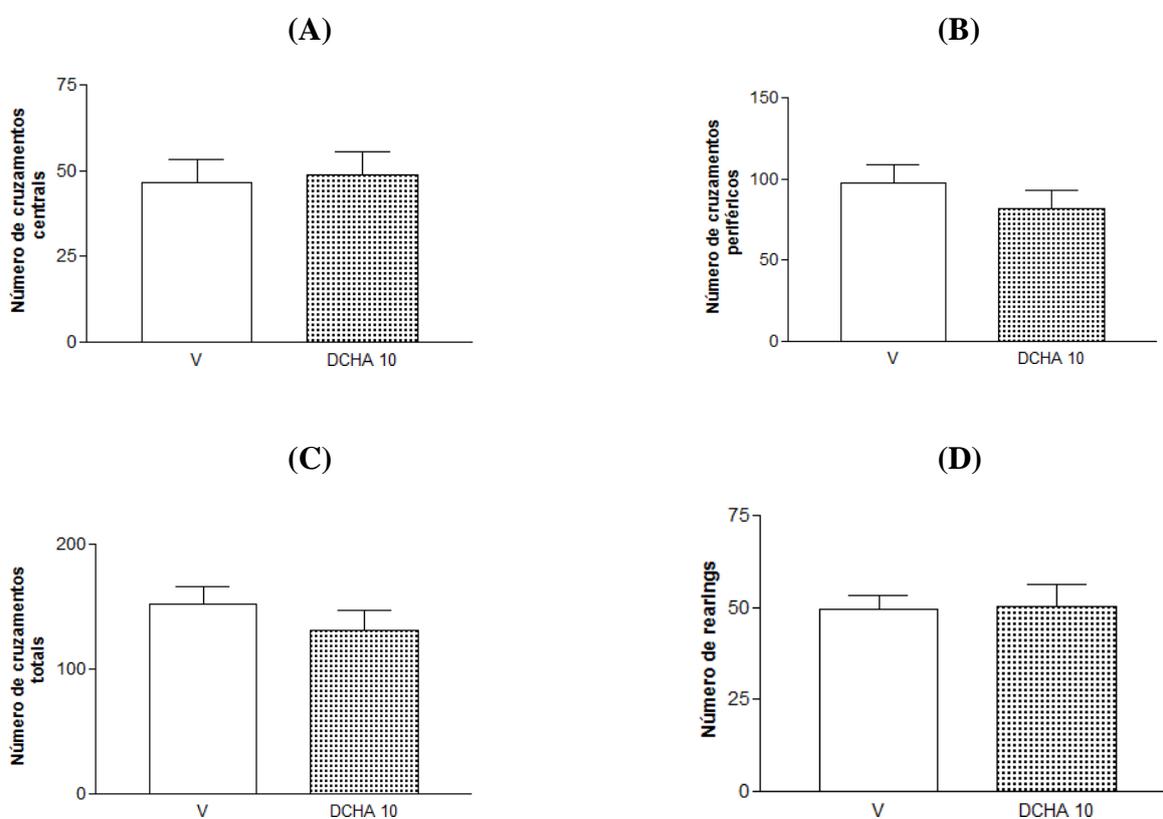


Figura 4 – Efeito do pré-tratamento com veículo (V, 10 ml/kg, via oral) e DCHA (10 mg/kg, via oral) no número de cruzamentos de linhas centrais (A), periféricos (B), totais (C) e *rearings* (D) no aparato de campo aberto em camundongos, para avaliação da coordenação motora. Foi quantificada a frequência de locomoção por 5 minutos. Cada coluna representa a média \pm DPM.

5.2 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

Neste teste, como demonstra a figura 5, os animais do grupo 2, tratados com a indometacina (dose de 10 mg/kg, via oral), apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) do número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, quando comparados com os animais do grupo controle 1, que receberam o veículo (salina, volume de 10 ml/kg, via oral) no pré-tratamento.

Apenas os animais do grupo 4, que receberam DCHA (na dose de 10mg/kg, via oral) foram eficazes em reduzir significativamente ($p < 0,05$) o número de contorções abdominais, quando comparados ao grupo 1.

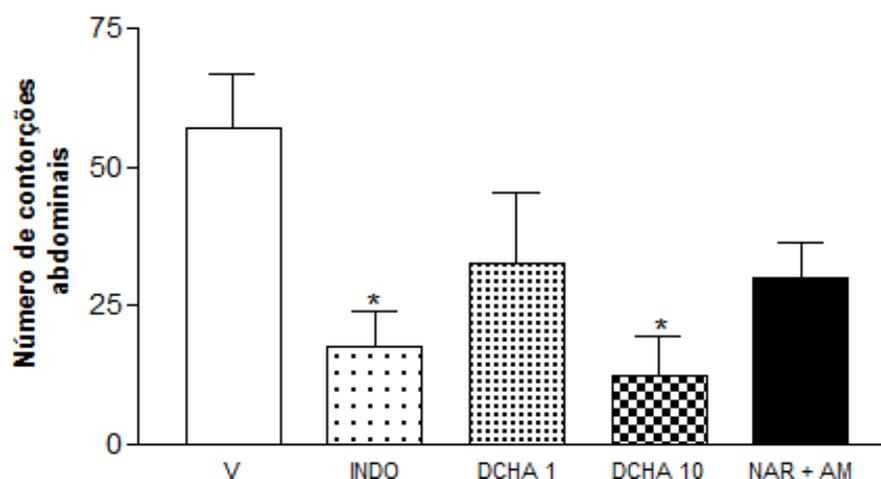


Figura 5 - Efeito da substância DCHA e da associação de naringenina + aminoguanidina no número de contrações abdominais induzidas por ácido acético 0,9% em camundongos. Animais foram pré-tratados com o veículo (salina, no volume de 10 ml/kg, via oral) no Grupo 1, indometacina (dose de 10 mg/kg, via oral) no Grupo 2, DCHA (dose de 1 e 10 mg/kg) nos Grupos 3 e 4, respectivamente, e naringenina (10mg/kg) + aminoguanidina (10 mg/kg), via oral, no Grupo 5. Uma hora após os pré-tratamentos, administrou-se injeção de ácido acético a 0,9 %, na cavidade peritoneal dos animais, sendo em seguida, realizada a contagem de contrações durante o tempo de 0-20 minutos. Cada coluna representa a média \pm DPM do número de contrações abdominais. * representa significância estatística $P < 0,05$, quando comparado ao Grupo 1.

5.3 Teste da formalina

O tempo de reação dolorosa (tempo de lambida) foi avaliado em dois períodos: de 0 a 5 minutos, na primeira fase, onde a dor neurogênica é causada pela estimulação direta dos nociceptores e de 15 a 30 minutos, na segunda fase, onde a dor inflamatória é causada pela liberação de mediadores inflamatórios.

A Figura 6, se refere a primeira e a segunda fase do teste da formalina. Na primeira fase, os animais dos grupos 2, 5 e 6 tratados com Indometacina (10mg/kg, via oral), DCHA (10mg/kg, via oral) e DCHA (20mg/kg, via oral), respectivamente, não obtiveram uma redução significativa no tempo de lambida da pata injetada com formalina, quando comparados com o grupo 1, controle negativo (salina, 10 ml/kg, via oral). Apenas os animais do grupo 3, tratados com morfina (10 mg/kg, via oral) e grupo 4, tratados com DCHA (dose de 1 mg/kg, via oral) obtiveram uma redução significativa ($P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente) no comportamento do animal de lambar a pata injetada com formalina, quando comparados com o grupo 1.

Com relação a segunda fase do teste da formalina, o grupo 2 (indometacina, 10 mg/kg, via oral) reduziu o tempo de lambida da pata, assim como o grupo 3 (morfina, 10 mg/kg, via oral), e grupos 4, 5 e 6 (DCHA, nas doses de 1, 10 e 20 mg/kg, respectivamente, via oral), gerando diferença estatística significativa nos animais dos grupos 2, 4, 6 ($P < 0,01$), grupo 3 ($P < 0,001$) e grupo 5 ($P < 0,05$), quando comparados com o grupo 1 (controle negativo). Como era de se esperar, a indometacina reduziu o tempo de lambida somente na segunda fase do teste e a morfina diminuiu significativamente ambas as fases. No entanto, os efeitos antinociceptivos foram significativamente mais pronunciados contra a segunda fase (fase inflamatória) deste modelo de nocicepção.

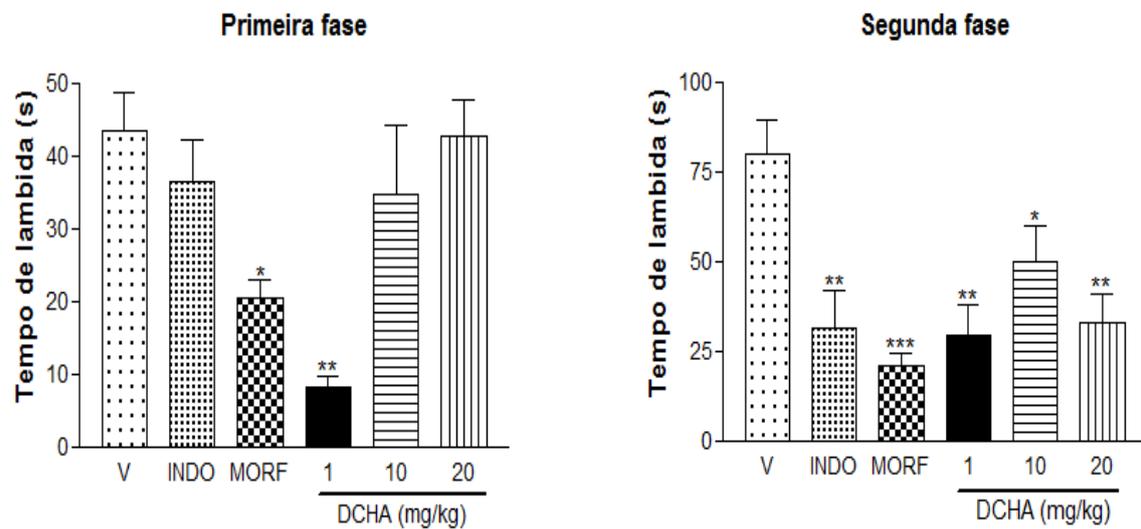


Figura 6 – Efeito da substância DCHA no tempo de lambida da pata dos camundongos na primeira e segunda fase do teste da formalina. Animais pré-tratados com o veículo (salina, volume de 10 ml/kg, via oral) no Grupo 1, indometacina (dose de 10 mg/kg, via oral) no Grupo 2, morfina (dose de 10 mg/kg, via oral) no Grupo 3 e DCHA (doses de 1, 10 e 20 mg/kg, via oral) nos Grupos 4, 5 e 6, respectivamente. Após 1 hora do pré-tratamento, foi observado o tempo de lambida em segundos, durante o intervalo de 0-5 minutos (primeira fase) e 15-30 minutos (segunda fase), após a injeção intraplantar de formalina a 2,5 % na pata posterior direita. Cada coluna representa a média \pm DPM. * representa significância estatística $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ quando comparados ao Grupo 1 (controle negativo).

5.4 Teste da placa quente

De acordo com a Figura 7, o grupo 2 (morfina, 10 mg/kg, via oral) produziu significativamente ($P < 0,05$) antinocicepção contra o limiar térmico em comparação ao grupo 1 (controle negativo salina), atingindo pico máximo no tempo de 30 e 60 minutos. O grupo 3 (DCHA, 1mg/kg, via oral), aumentou a reação de latência na placa quente, atingindo significância ($P < 0,01$) no tempo de 120 minutos após o pré-tratamento, quando comparados ao grupo 1. Com relação ao grupo 4 (DCHA, dose de 10 mg/kg, via oral), não exibiu efeito de proteção nociceptiva durante o teste.

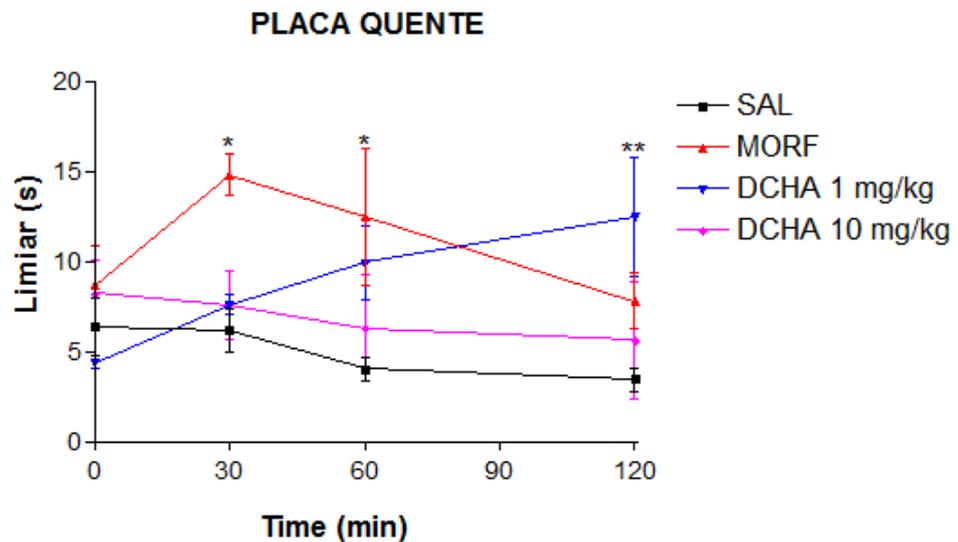


Figura 7 – Efeito da substância DCHA no tempo em segundos de reação de latência de lamber as patas ou saltar na placa quente em camundongos. Os animais foram pré-tratados com salina (10 ml/kg, via oral) no grupo 1, morfina (10 mg/kg, via oral) grupo 2, DCHA (doses de 1 e 10 mg/kg, via oral) nos grupos 3 e 4, respectivamente. Foram realizadas as leituras antes do pré-tratamento (leitura basal) e 30, 60, 90 e 120 minutos após o pré-tratamento oral. Cada coluna representa a média \pm DPM, onde o nível de significância * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$, comparado ao controle (salina).

5.5 Comportamento doentio induzido por LPS

5.5.1 Teste de campo aberto

Neste teste, quatro parâmetros foram observados: número de cruzamentos com as quatro patas nos quadrados centrais, quadrados da periferia, quadrados totais e *rearings*.

Os animais do grupo 2, tratados oralmente com veículo (salina, no volume de 10 ml/kg) e administrados com LPS (dose de 100µg/kg) na cavidade peritoneal, obtiveram uma diminuição significativa no número de cruzamentos de linhas centrais ($P < 0,01$), periféricos ($P < 0,01$) e totais ($P < 0,001$), além do número de levantadas (*rearings*)($P < 0,001$) em comparação com o controle normal, grupo 1, tratados oralmente com veículo (salina, no volume de 10 ml/kg) e administrados intraperitonealmente, com o veículo do LPS (salina, volume de 10ml/kg), demonstrando dessa forma, a redução na atividade locomotora e exploratória deles, uma das características do comportamento doentio.

Como previsto, o anti-inflamatório dexametasona (dose de 1mg/kg, via oral) administrado nos animais do grupo 5, reverteu os efeitos induzidos pelo LPS, resultando no aumentando significativo do número dos cruzamentos centrais ($P < 0,05$), periféricos ($P < 0,01$) e totais ($P < 0,01$), quando comparados ao grupo controle 2.

Com relação ao número de cruzamentos centrais, apenas o grupo 3, pré-tratados com DCHA (na dose de 1 mg/kg, via oral), atenuou significativamente ($P < 0,01$) as alterações induzidas por LPS, comparado ao grupo 2 e aumentou o número de cruzamentos. Quanto ao cruzamento de linha periférico, não houve diferença significativa entre os grupos, porém houve uma tendência de aumento dos cruzamentos em todos os grupos. Nos cruzamentos totais, observou-se que os grupos: 3 e 4 tratados com DCHA (1 e 10 mg/kg, via oral, respectivamente), grupo 6 tratados com Naringenina (10mg/kg) + Aminoguanidina (10mg/kg) reverteram o efeito induzido pelo LPS, resultando no aumento dos cruzamentos totais com significância ($P < 0,05$) em comparação com o grupo tratado com LPS sozinho (grupo 2).

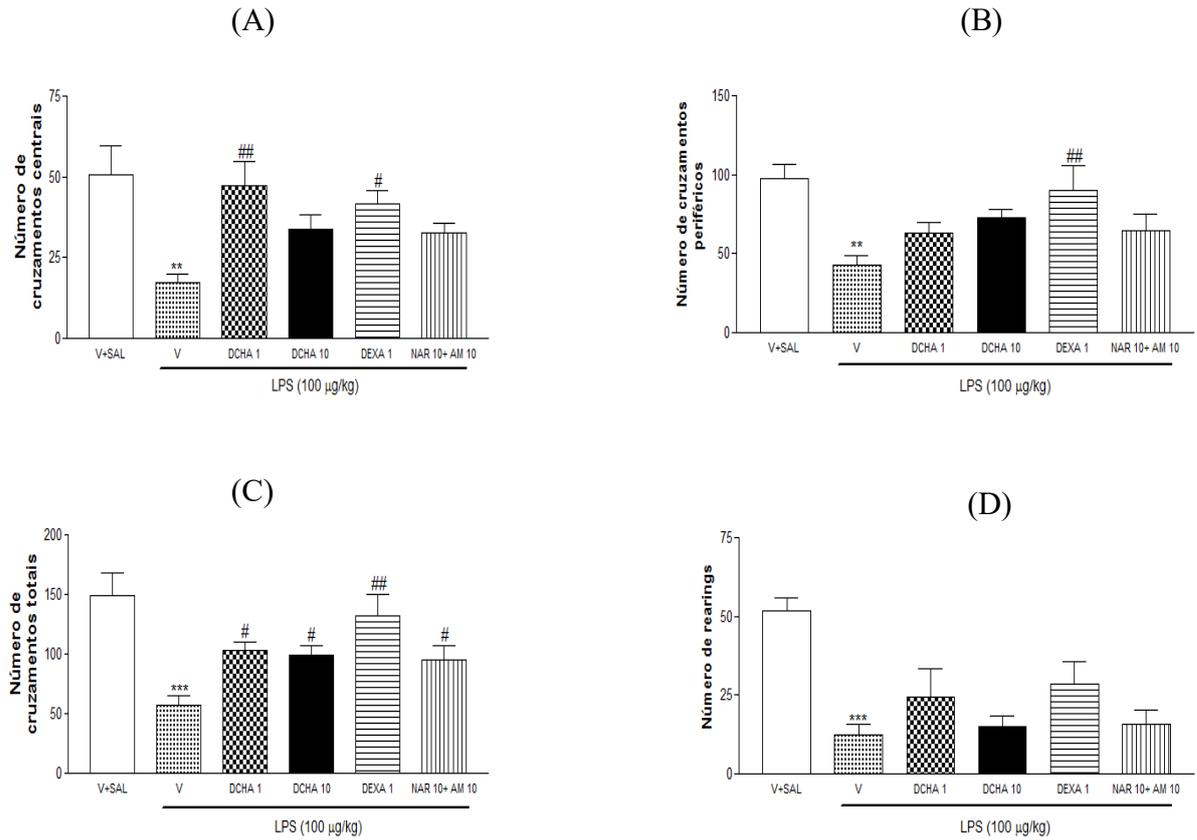


Figura 8 – Efeito da substância DCHA e da associação de naringenina + aminoguanidina no número de cruzamentos de linhas centrais (A), periféricos (B), totais (C) e *rearings* (D) no aparato de campo aberto em camundongos. Os animais foram pré-tratados com veículo (V, 10 ml/kg, via oral) nos grupos 1 e 2, DCHA (DCHA 1, 10 mg/kg, via oral) no grupo 3 e 4 respectivamente, dexametasona (DEXA, 1 mg/kg, via oral) no grupo 5 e Naringenina + Aminoguanidina (NAR 10 mg/kg + AM 10 mg/kg, via oral) no grupo 6. Trinta minutos após os pré-tratamentos dos grupos, foi realizada a administração intraperitoneal de solução salina (10ml/kg) no grupo 1 e lipopolissacarídeo (LPS 100 µg/kg) nos demais grupos, e 2 horas após as aplicações das injeções, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto. Em seguida, quantificou-se a frequência de locomoção por 5 minutos. Cada coluna representa a média \pm DPM. Os símbolos denotam os níveis de significância: #p < 0,05 e ## p < 0,01, quando comparados com o grupo controle (veículo salina, v.o. e LPS, i.p.) e ** p < 0,01 e *** p < 0,001, quando comparado com o grupo controle (veículo, v.o. e veículo, i.p.).

5.5.2 Teste de nado forçado

Os animais do grupo 2, tratados oralmente com veículo (salina, no volume de 10 ml/kg) e administrados com LPS (dose de 100µg/kg) na cavidade peritoneal, obtiveram um aumento do período de imobilidade, com $p < 0,01$, quando comparados com o controle normal, grupo 1, tratados oralmente com veículo (salina, no volume de 10 ml/kg) e administrados intraperitonealmente, com o veículo do LPS (salina, volume de 10ml/kg), demonstrando dessa forma, a indução ao comportamento doentio.

De fato, a dexametasona (dose de 1mg/kg, via oral), administrada nos animais do grupo 5, reverteu significativamente o comportamento de doença induzida por LPS, e uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no tempo de flutuação foi observada quando comparada com o grupo tratado com LPS (grupo 2).

Os camundongos dos grupos 3 e 6 tratados com DCHA (dose de 1 mg/kg, via oral) e Naringenina (10mg/kg) + Aminoguanidina (dose de 10mg/kg, via oral), respectivamente, reverteram a ação induzida por LPS, diminuindo significativamente o tempo de flutuação com $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente, quando comparado com o grupo 2 (controle positivo).

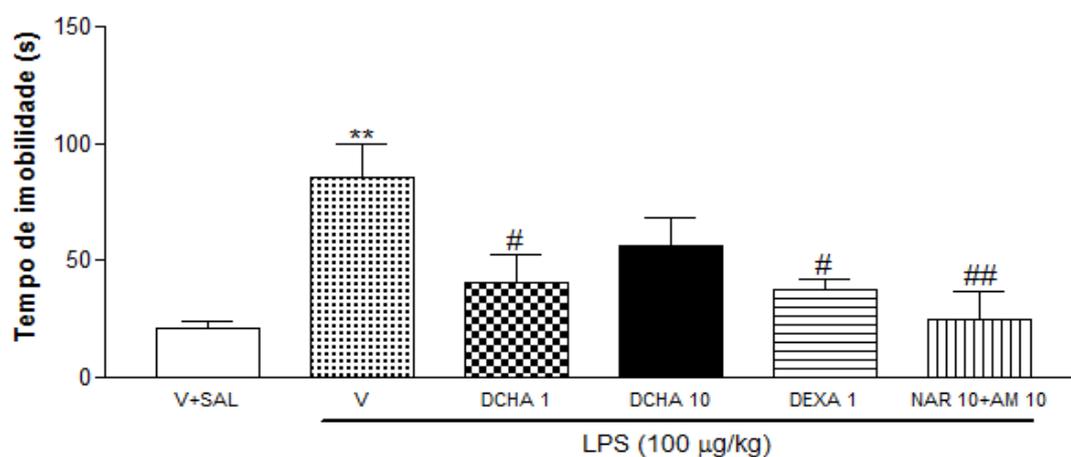


Figura 9 - Efeito da substância DCHA e da associação de naringenina + aminoguanidina no tempo gasto flutuando no teste de nado forçado em camundongos. Os animais foram pré-tratados com veículo (V, 10 ml/kg, via oral) nos grupos 1 e 2, DCHA (DCHA 1, 10 mg/kg, via oral) no grupo 3 e 4 respectivamente, dexametasona (DEXA, 1 mg/kg, via oral) no grupo 5 e naringenina + aminoguanidina (NAR 10 mg/kg + AM 10 mg/kg, via oral) no grupo 6. Trinta minutos após os pré-tratamentos dos grupos, foi realizada a administração intraperitoneal de solução salina (10ml/kg) no grupo 1 e lipopolissacarídeo (LPS 100 µg/kg) nos demais grupos, e 2 horas após as aplicações das injeções, foram os animais submetidos ao teste de nado forçado. Cada coluna representa a média ± DPM. Os símbolos denotam os níveis de significância: # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ quando comparados com o grupo controle (veículo salina, v.o. e LPS, i.p.); ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo controle (veículo, v.o. e veículo, i.p.).

5.5.3 RT-PCR quantitativo em tempo real

O pré-tratamento com DCHA na concentração de 10mg/kg foi eficaz em reduzir significativamente todas as expressões de RNAm de iNOS e das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) no sangue, fígado e rim dos camundongos, induzidos por LPS.

A administração da naringenina + aminoguanidina reduziu, significativamente, de forma semelhante, a DCHA de 10mg/kg, todas as expressões de RNAm de iNOS e das citocinas no sangue, fígado e rim desses animais, exceto a expressão de IL-1 β no rim. Essa associação, porém, não apresentou atividade sinérgica positiva.

A ação da DCHA na expressão de RNAm de iNOS e das respectivas citocinas é a seguinte para cada amostra biológica:

No sangue:

A DCHA na concentração de 1mg/kg foi eficaz em reduzir significativamente a expressão de RNAm de iNOS e IL-1 β de forma semelhante ao medicamento de referência (dexametasona). Quanto a expressão de RNAm de TNF- α e IL-6 demonstrou, apenas, uma tendência a redução.

Já na concentração de 10mg/kg, a DCHA reduziu significativamente todas as expressões de RNAm de iNOS e das citocinas. Maior eficácia, porém, demonstrou em reduzir a expressão de RNAm de iNOS.

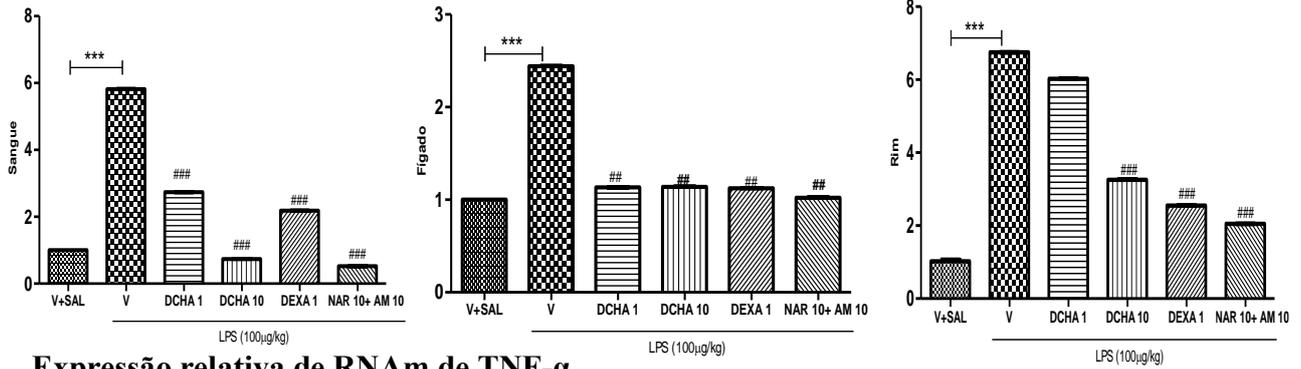
No fígado:

A DCHA, nas concentrações de 1 e 10mg/kg, mostrou semelhança na diminuição de todas as expressões de RNAm de iNOS e das citocinas. Nessas concentrações, a DCHA, apesar de reduzir significativamente a expressão de TNF- α , o fármaco de referência (dexametasona), demonstrou maior eficácia na redução dessa citocina. Essa substância (DCHA), porém, na concentração de 1mg/kg, apenas não reduziu significativamente as expressões de RNAm de IL-6.

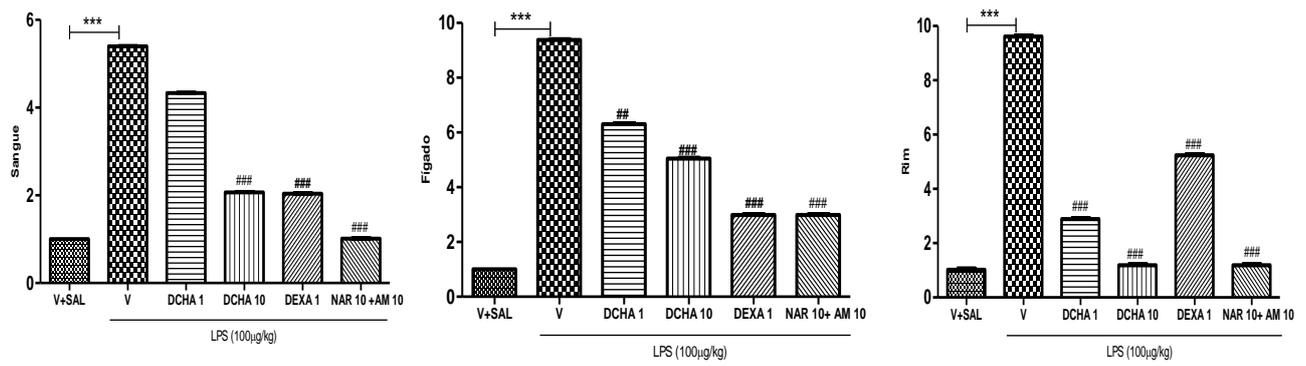
No rim:

Diferentemente do que ocorreu no sangue, a DCHA, na concentração de 1mg/kg, não reduziu de forma significativa as expressões de RNAm de iNOS e IL-1 β . Sua concentração de 10mg/kg foi, no entanto, significativa na redução de todas as expressões, demonstrando, inclusive, melhor eficácia na redução das expressões de RNAm de TNF- α e IL-6.

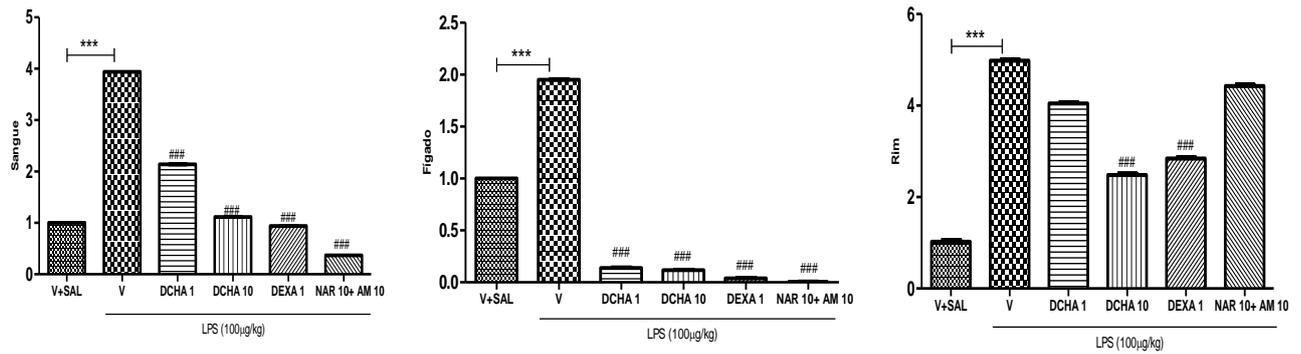
Expressão relativa de RNAm de iNOS



Expressão relativa de RNAm de TNF- α



Expressão relativa de RNAm de IL-1 β



Expressão relativa de RNAm de IL-6

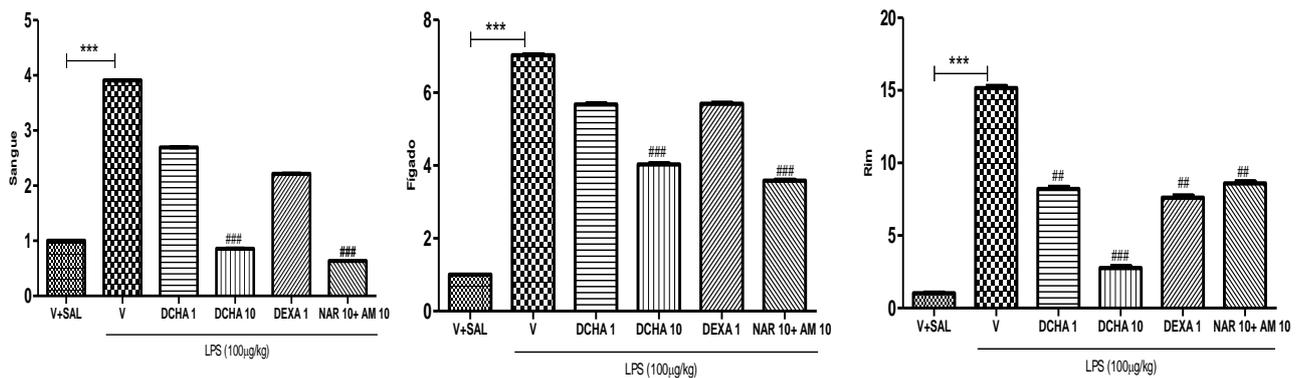


Figura 10 - A expressão de iNOS, TNF- α , IL-1 β e IL-6 foi avaliada por PCR quantitativo em tempo real em RNAm isolado do sangue, fígado e rim de camundongos que receberam os seguintes tratamentos: Veículo (V, 10 ml/kg, via oral) nos grupos 1 e 2, DCHA (DCHA 1, 10 mg/kg, via oral) no grupo 3 e 4 respectivamente, dexametasona (DEXA, 1 mg/kg, via oral) no grupo 5 e naringenina + aminoguanidina (NAR 10 mg/kg + AM 10 mg/kg, via oral) no grupo 6. Trinta minutos após os pré-tratamentos dos grupos, foi realizada a administração intraperitoneal de solução salina (10ml/kg) no grupo 1 e lipopolissacarídeo (LPS 100 μ g/kg) nos demais grupos. Os resultados são apresentados como média \pm DPM de 4 camundongos por grupo. Os símbolos denotam os níveis de significância: ##p <0,01 e ### p <0,001, quando comparados com o grupo controle (veículo salina, v.o. e LPS, i.p.) e *** p <0,001, quando comparado com o grupo controle (veículo salina, v.o. e veículo salina, i.p.).

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Considerada uma resposta imune complexa do organismo, a inflamação protege o corpo de infecções e lesão tecidual. Daí ser de suma importância que ela seja regulada, impedindo, assim, sua progressão para doenças graves ou crônicas, estas últimas intimamente associadas à patogênese de diversas doenças humanas, tais como: artrite reumatóide, sepse, doenças cardiovasculares e câncer. Dentre os sinais clínicos da inflamação, está a dor, o mais desagradável, por comprometer a qualidade de vida de muitas pessoas. Para combater a dor e a inflamação, os tratamentos atuais são insuficientes, por apresentarem efeitos colaterais graves e eficácia limitada, sendo necessária a busca contínua por novas moléculas mais eficazes com efeitos adversos mínimos (PINHO-RIBEIRO et al., 2016; NIINO et al., 2018; OLIVEIRA-MACÊDO et al., 2019).

Nessa busca por novos fármacos, nossa pesquisa concentrou-se na DCHA, substância inédita, para verificar a existência de atividade antinociceptiva e anti-inflamatória dessa substância em modelos animais.

Para triagem farmacológica preliminar, as atividades antinociceptivas da substância foram avaliadas utilizando estímulos químicos (ácido acético e formalina) e térmicos (teste de placa quente). Para ampliar os estudos sobre os efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios, utilizou-se o modelo de comportamento doentio induzido por lipopolissacarídeo em camundongos.

Como uma ferramenta de triagem, o teste de contorção vem sendo utilizado, há muito tempo, para avaliar as propriedades analgésicas de novas substâncias, o qual consiste na administração intraperitoneal de ácido acético, induzindo a dor e a inflamação aguda, e a liberação de mediadores químicos, como bradicinina, substância P, prostaglandinas, serotonina, histamina, TNF- α , IL-1 β e outras citocinas. O ácido acético provoca, quando administrado, um comportamento estereotipado nos animais, consistente em contrações abdominais, seguidas de

alongamento de uma ou ambas as patas traseiras (SILVA et al., 2018a; OLIVEIRA-MACÊDO et al., 2019).

Nesse teste, a DCHA diminuiu, estatisticamente, o número de incidentes de contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos, sugerindo atividade antinociceptiva para a substância.

Já o teste de formalina pode ser usado para esclarecer o mecanismo de ação de um analgésico proposto. Esse teste compreende duas fases distintas: uma fase inicial (dor neurogênica) e uma fase tardia (dor inflamatória) (HUNSKAAR; FASMER; HOLE, 1985).

A fase inicial é devida a um estímulo direto nos nociceptores periféricos, resultando na despolarização deles e na propagação do sinal para o SNC, a qual ocorre logo após a ação da formalina, com duração de cinco minutos, podendo ser suprimida por analgésicos de ação central (por exemplo, morfina). Cinco minutos após a fase neurogênica, sobrevém uma resposta nociceptiva mínima ou ausente, com duração de dez minutos, na qual não se avalia o parâmetro de resposta nociceptiva. Os quinze minutos seguintes são determinados como a fase tardia (inflamatória), em que os mediadores inflamatórios são liberados, como: prostaglandinas, leucotrienos, histamina, bradicinina, entre outros, capazes de reduzir o limiar de excitabilidade dos nociceptores, estimulando um aumento da resposta nociceptiva. A dor inflamatória é muito susceptível à ação de AINEs e corticosteroides. Por isso, os agentes de ação central inibem ambas as fases do teste da formalina, enquanto os medicamentos de ação periférica (por exemplo, aspirina, indometacina) inibem apenas a fase tardia (OLONODE; ADERIBIGBE; BAKRE, 2015; SILVA et al., 2018b; OLIVEIRA-MACÊDO et al., 2019).

A DCHA foi considerada eficaz em ambas as fases da resposta da formalina, mas o efeito dela foi mais significativo na segunda fase.

Nesse contexto, os resultados demonstraram que a DCHA reduziu o tempo de lambida da pata na segunda fase do teste da formalina de modo semelhante à

indometacina, fármaco utilizado como controle positivo da fase inflamatória. Assim, sugere-se que o efeito inibitório da DCHA na resposta nociceptiva nessa fase, caracterizado por dor inflamatória, possa ser devido à sua ação periférica.

Considerando a propriedade inibidora da DCHA na primeira fase da formalina, presume-se que sua possível atividade antinociceptiva se deva a uma possível ação central, pois seu efeito pode ser comparado ao causado pela morfina. Além disso, o efeito antinociceptivo da DCHA na segunda fase deve-se à sua possível ação anti-inflamatória, por inibir a liberação de mediadores inflamatórios.

Este trabalho mostra que a DCHA, de acordo com a avaliação das contorções abdominais provocadas pelo ácido acético e pelo teste da formalina em camundongos, produziu antinocicepção significativa.

Para confirmar a atividade antinociceptiva e investigar o envolvimento dos mecanismos centrais dos efeitos da substância, foi utilizado o teste da placa quente. Esse teste é comumente usado para identificar analgésicos de ação central e narcóticos. O evento nociceptivo gerado pelo calor nocivo é mediado centralmente por estímulo direto das fibras aferentes dos nociceptores (OLONODE; ADERIBIGBE; BAKRE, 2015). O tratamento com a DCHA aumentou o tempo de latência no teste de placa quente após 120 minutos.

Combinando os resultados de modelos químicos e térmicos de nocicepção, pode-se concluir que a substância apresenta efeito analgésico mediado periféricamente e centralmente.

Para verificar se o efeito analgésico não era resultado de possível ação relaxante muscular ou sedativa, os camundongos foram submetidos ao teste de campo aberto após a administração oral de DCHA. Os resultados mostraram que o tratamento com DCHA não causou alterações nos parâmetros de campo aberto, confirmando, assim, que o efeito antinociceptivo da DCHA, observado no teste, não é resultado de alterações na atividade locomotora.

Para avaliar o efeito anti-inflamatório da DCHA, foi utilizado o modelo de comportamento doentio induzido por lipopolissacarídeo em camundongos. Esse comportamento é desencadeado pela ativação do sistema imunológico com a liberação de citocinas pró-inflamatórias e prostaglandinas, em resposta a administração do LPS e se caracteriza por um conjunto de sintomas, a saber: redução da atividade locomotora e do comportamento exploratório, além de febre, anedonia, dentre outros (ZHANG et al., 2016; LIMA et al., 2018).

O LPS é uma endotoxina de bactérias Gram-negativas que provoca respostas inflamatórias, ativando o fator de transcrição, fator nuclear kappaB (NF- κ B), por meio de uma série de moléculas de sinalização, induzindo a expressão de NO sintase induzível (iNOS) e inúmeras citocinas e quimiocinas, como o fator de necrose tumoral α (TNF α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 (IL-1 β) por intermédio da ativação de NF- κ B (SHAIKH et al., 2016; NIINO et al., 2018).

Considera-se como uma das respostas inflamatórias das células expostas a endotoxemia por LPS, a produção de óxido nítrico. O óxido nítrico, produzido pelo metabolismo da L – arginina, por meio das atividades das sintases do óxido nítrico (NOS), sendo já descritos três diferentes isoformas de NOS, codificadas por genes distintos: as isoformas neuronal (Nos1, NosI, nNOS), endotelial (Nos3, NosIII, eNOS) e a NOS induzida (Nos2, NosII, iNos), sendo que as atividades da eNOS e da nNOS resultam em baixos níveis de NO, envolvidos principalmente em processos fisiológicos. A terceira isoforma iNOS gera elevados níveis de NO em resposta a mediadores inflamatórios. A expressão de iNOS é induzida por inflamação. Por conseguinte, podem ser benéficos para o tratamento de processo inflamatório, agentes que bloqueiam a produção de NO, induzida por toxinas de bactérias (AKIHISA et al., 2017; SPILLER et al., 2019).

A liberação de citocinas pró-inflamatórias nos picos sanguíneos ocorre aproximadamente 2 h após a administração do LPS, ficando os sintomas do comportamento doentio evidentes até 6 h. Para avaliar a atividade exploratória e locomotora do comportamento doentio, são geralmente usados os testes de campo aberto e nado forçado (ZHANG et al., 2016; ZHAO et al., 2019). Conforme previsto, os animais tratados com LPS exibiram numerosos sinais de doença. Os sintomas incluíram letargia, redução da capacidade exploratória, locomotora e mobilidade. No presente estudo, a administração de LPS aumentou o tempo gasto flutuando no teste de nado forçado e diminuiu a atividade locomotora no teste de campo aberto. Esses efeitos são característicos de desordens decorrentes de processo inflamatório. Nosso estudo mostrou que a DCHA atenuou as alterações comportamentais induzidas pelo LPS em ambos os testes.

Esses resultados foram análogos aos efeitos do tratamento prévio com dexametasona. A dexametasona (glicocorticóide), anti-inflamatório e imunossupressor que interfere nas citocinas inflamatórias e TNF- α , foi usada como referência padrão para avaliar o efeito da DCHA contra o comportamento doentio induzido por LPS (SHAIKH et al., 2016).

Por fim, investigou-se, no presente estudo, as atividades anti-inflamatórias da DCHA, por meio do RT-PCR quantitativo em tempo real, avaliando seus efeitos na expressão de RNAm de iNOS e das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6), induzidos por LPS em camundongos.

Esses mediadores inflamatórios liberados amplificam a resposta inflamatória e suas manifestações clínicas, representando eles importantes alvos terapêuticos no contexto de inflamação (ZUCOLOTO et al., 2017b).

A DCHA, na concentração de 10mg/kg, inibiu significativamente todas as expressões de RNAm de iNOS e das citocinas no sangue, fígado e rim dos camundongos estimulados por LPS. Nessa mesma concentração de 10 mg/kg, a DCHA demonstrou maior eficácia em reduzir

a expressão de RNAm de iNOS no sangue; a expressão de RNAm de TNF- α e IL-6, no rim, e as expressões de RNAm de IL-1 β , no fígado.

Os mecanismos subjacentes à doença sugerem o envolvimento de citocinas, que são secretadas em resposta a infecções e endotoxemia, e indicam que a atividade inibitória da substância seja devida à redução da expressão de iNos e citocinas.

Finalmente, os resultados obtidos nesse estudo apontam o potencial da DCHA no controle farmacológico da dor e dos processos inflamatórios, mostrando que a substância apresentou efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios significativos *in vivo* e demonstrando vantagem potencial da substância na terapia de doenças com base em produção de citocinas.

7. CONCLUSÃO

A nova carboximidamina, DCHA, demonstrou atividade antinociceptiva, ao reduzir o número de contorções induzidas por ácido acético e o tempo de lambidas da pata em ambas as fases do teste da formalina, assim como aumentou o tempo de latência dos animais no teste da placa quente. Nesse contexto, sugere-se o envolvimento de um mecanismo de ação, periférico e central de efeito antinociceptivo.

A DCHA apresentou atividade anti-inflamatória, ao reverter as alterações comportamentais induzidas por LPS em camundongos, com o aumento da mobilidade e do comportamento exploratório nos testes de nado forçado e campo aberto, respectivamente. Ela foi ainda eficaz em reduzir nesses animais a expressão de RNAm de iNOS e citocinas pró-inflamatórias, sustentando a hipótese de ter potencial no tratamento de distúrbios decorrentes de processo infeccioso. Essas ações anti-inflamatórias obtidas sugerem ser devido à redução de expressões de iNOS e das citocinas.

Em resumo, as descobertas mostraram que a DCHA exibiu ação antinociceptiva e anti-inflamatória em modelos animais, apontando, desse modo, para o seu potencial no controle farmacológico da dor e dos processos inflamatórios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIHISA, T. et al. Nitric oxide production-inhibitory activity of limonoids from *Azadirachta indica* and *Melia azedarach*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, p. 1–10, 2017.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice. **Animal Behaviour**, v. 21, p. 205–235, 1973.

BATISTA, D. C. et al. Anti-inflammatory effect of a new piperazine derivative: (4-methylpiperazin-1-yl)(1-phenyl-1 H -pyrazol-4-yl) methanone. **Inflammopharmacology**, v. 26, p. 217–226, 2018.

BIEREN, J. E.-V. Immune-regulation and -functions of eicosanoid lipid mediators. **Biological Chemistry**, v. 398, n. 11, p. 1177–1191, 2017.

BRANCO, A. C. C. et al. Role of histamine in modulating the immune response and inflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, 2018.

CAI, K. C. et al. Age and sex differences in immune response following LPS treatment in mice. **Brain Behavior and Immunity**, v. 58, p. 327–337, 2016.

CHOODEJ, S.; PUDHOM, K.; MITSUNAGA, T. Inhibition of TNF- α -induced inflammation by sesquiterpene lactones from *Saussurea lappa* and semi-synthetic analogues. **Planta Med**, v. 84, p. 329–335, 2018.

CHOUSTERMAN, B. G.; SWIRSKI, F. K.; WEBER, G. F. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. **Seminars in Immunopathology**, v. 39, n. 5, p. 517–528, 2017.

CHUNG, K. W. et al. The critical role played by endotoxin-induced liver autophagy in the maintenance of lipid metabolism during sepsis. **Autophagy**, v. 13, n. 7, p. 1113–1129, 2017.

COUTO, M. C. et al. Antinociceptive effect of extract of *Emilia sonchifolia* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 195, p. 348–353, 2011.

DAI, Y. TRPs and pain. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, n. 3, p. 277–291, 2016.

DOLUNAY, A. et al. Inhibition of NLRP3 inflammasome prevents LPS-induced inflammatory hyperalgesia in mice: Contribution of NF- κ B, Caspase-1/11, ASC, NOX, and NOS isoforms. **Inflammation**, v. 40, n. 2, p. 366–386, 2017.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, p. 161–174, 1977.

DVORAKOVA, M.; LANDA, P. Anti-inflammatory activity of natural stilbenoids: A review. **Pharmacological Research**, v. 124, p. 126–145, 2017.

FILIPPI, M.-D. Mechanism of diapedesis: Importance of the transcellular route. **Advances in Immunology**, v. 129, p. 25–53, 2016.

FISCHER, L. et al. TRPA1, substance P, histamine and 5-hydroxytryptamine interact in an interdependent way to induce nociception. **Inflammation Research**, v. 66, p. 311–322, 2017.

HAMESCH, K. et al. Lipopolysaccharide-induced inflammatory liver injury in mice. **Laboratory Animals**, v. 49, p. 37–46, 2015.

HUFFMAN, W. J. et al. Brain stimulation modulation of neuroinflammation and memory dysfunction using percutaneous vagus nerve stimulation in mice. **Brain Stimulation**, v. 12, p. 19–29, 2019.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 69–76, 1985.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, D. E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 18, p. 412–415, 1959.

KUPRASH, D. V.; NEDOSPASOV, S. A. Molecular and cellular mechanisms of

inflammation. **Biochemistry**, v. 81, n. 11, p. 1237–1239, 2016.

LIMA, S. N. P. et al. Tempol modulates the leukocyte response to inflammatory stimuli and attenuates endotoxin - induced sickness behaviour in mice. **Archives of Physiology and Biochemistry**, p. 1–7, 2018.

LOPES, D. M. et al. Peripheral inflammatory pain sensitisation is independent of mast cell activation in male mice. **Research Paper**, v. 158, p. 1314–1322, 2017.

MALLIK, S. B. et al. Caffeic acid attenuates lipopolysaccharide - induced sickness behaviour and neuroinflammation in mice. **Neuroscience Letters**, v. 632, p. 218–223, 2016.

MANCHOPE, M. F.; CASAGRANDE, R.; VERRI-JR, W. A. Naringenin: an analgesic and anti-inflammatory citrus flavanone. **Oncotarget**. v. 8, n. 3, p. 3766–3767, 2017.

MILLET, P. et al. Cytokine contributions to alterations of the volatile metabolome induced by inflammation. **Brain Behavior and Immunity**, v. 69, p. 312–320, 2018.

MING, Z.; SAWICKI, G.; BEKAR, L. K. Neuroscience letters acute systemic LPS-mediated inflammation induces lasting changes in mouse cortical neuromodulation and behavior. **Neuroscience Letters**, v. 590, p. 96–100, 2015.

NANDEESH, R. et al. Bioactive phenolic fraction of Citrus maxima abate lipopolysaccharide-induced sickness behaviour and anorexia in mice: In-silico molecular docking and dynamic studies of biomarkers against NF- κ B. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 1535–1545, 2018.

NIINO, T. et al. A 5-hydroxyoxindole derivative attenuates LPS-induced inflammatory responses by activating the p38-Nrf2 signaling axis. **Biochemical Pharmacology**, v. 155, p. 182–197, 2018.

OH, Y. S. Bioactive compounds and their neuroprotective effects in diabetic complications. **Nutrients**, v. 8, n. 8, p. 1–20, 2016.

OISHI, Y. et al. Brain, behavior, and immunity the roles of prostaglandin E2 and D2 in lipopolysaccharide-mediated changes in sleep. **Brain Behavior and Immunity**, v. 47, p. 172–177, 2015.

OLIVEIRA-MACÊDO, L. A. R. et al. Fractions of *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae) attenuate the nociceptive behavior events in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 6984, p. 1–9, 2019.

OLONODE, E. T.; ADERIBIGBE, A. O.; BAKRE, A. G. Anti-nociceptive activity of the crude extract of *Myrianthus arboreus* P. Beauv (Cecropiaceae) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 171, p. 94–98, 2015.

PATEL, K.; SINGH, G. K.; PATEL, D. K. A review on pharmacological and analytical aspects of naringenin. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 24, n. 7, p. 551–560, 2018.

PINHO-RIBEIRO, F. A. et al. The citrus flavonone naringenin reduces Lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and leukocyte recruitment by inhibiting NF- κ B activation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 2016.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie**, 229, p. 327–336, 1997.

RAJU, R. et al. Anti-inflammatory chemical profiling of the Australian Rainforest Tree *Alphitonia petriei* (Rhamnaceae). **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1–7, 2016.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd edition, **Science Press**, Beijing, p. 461-471, 2002.

SAVIGNAC, H. M. et al. Brain, behavior, and immunity prebiotic administration normalizes lipopolysaccharide (LPS) - induced anxiety and cortical 5-HT_{2A} receptor and IL-1 β levels in male mice. **Brain Behavior and Immunity**, v. 52, p. 120–131, 2016.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C T

method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SHAIKH, A. et al. Effect of embelin against Lipopolysaccharide-induced sickness behaviour in mice. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 5, p. 815–822, maio 2016.

SIL, S. et al. Nitric oxide synthase inhibitor, aminoguanidine reduces intracerebroventricular colchicine induced neurodegeneration, memory impairments and changes of systemic immune responses in rats. **Journal of Neuroimmunology**, v. 303, p. 51–61, 2017.

SILVA, D. P. B. et al. Chemical characterization and pharmacological assessment of polysaccharide free, standardized cashew gum extract (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 213, p. 395–402, 2018a.

SILVA, S. M. A. et al. The antinociceptive effect of the leaves and flowers ethanolic extracts of *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth & Hook. F. ex S. Moore. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, 2018b.

SONG, Y. et al. Inhibition of NF- κ B activity by aminoguanidine alleviates neuroinflammation induced by hyperglycemia. **Metabolic Brain Disease**, v. 32, n. 5, p. 1627–1637, 2017.

SOUZA, Rodrigo Otávio Silva. Obtenção de uma nova carboximidamina com propriedades antidiabéticas e anti-inflamatórias, 2019. 111f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

SPILLER, F. et al. Targeting nitric oxide as a key modulator of sepsis, arthritis and pain. **Nitric Oxide**, v. 89, n. March, p. 32–40, 2019.

TASNEEM, S. et al. Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents. **Pharmacological Research**, v. 139, p. 126–140, 2019.

TOTSCH, S. K.; SORGE, R. E. Immune system involvement in specific pain conditions. **Molecular Pain**, v. 13, p. 1–17, 2017.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 80, n. 3, p. 300 - 307, 1944.

WOLLER, S. A. et al. An overview of pathways encoding nociception. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 35, n. Suppl 107, p. 40–46, 2019.

YI, Y. S. Caspase-11 non-canonical inflammasome: a critical sensor of intracellular lipopolysaccharide in macrophage-mediated inflammatory responses. **Immunology**, v. 152, p. 207–217, 2017.

ZENG, W. et al. Naringenin as a potential immunomodulator in therapeutics. **Pharmacological Research**, v. 135, p. 122–126, 2018.

ZHANG, R. et al. Pifithrin- μ attenuates acute sickness response to Lipopolysaccharide in C57BL / 6J mice. **Pharmacology**, v. 97, p. 245–250, 2016.

ZHAO, X. et al. Behavioral, inflammatory and neurochemical disturbances in LPS and UCMS-induced mouse models of depression. **Behavioural Brain Research**, v. 364, p. 494–502, 2019.

ZUCOLOTO, A. Z. et al. Probucol attenuates overt pain-like behavior and carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia and leukocyte recruitment by inhibiting NF- κ B activation and cytokine production without antioxidant effects. **Inflammation Research**, v. 66, n. 7, p. 591–602, 2017a.

ZUCOLOTO, A. Z. et al. Probucol attenuates lipopolysaccharide-induced leukocyte recruitment and inflammatory hyperalgesia: effect on NF- κ B activation and cytokine production. **European Journal of Pharmacology**, v. 809, n. February, p. 52–63, 2017b.

ANEXO – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA (CEUA)



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação da atividade antinociceptiva de um derivado da naringenina em um modelo de dor neuropática diabética”, sob a responsabilidade dos pesquisadores **Livia Christine Ribeiro Hilgenberh (mestranda do PPGCF/UFAM) e Clarice de Carvalho Veloso Moura (docente/UFAM)**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – e por encontrar-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), após análise pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**, foi aprovada sob o número 037/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	De Novembro/2018 à Setembro/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongos (<i>Mus musculus</i> , Swiss Webster)
N. de animais	225 animais
Peso/idade	18-20 gramas / 21 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFAM

Manaus, 12 de novembro de 2018.

Profa. Dra. Cinthya Iamile Frithz Brandão de Oliveira
Presidente do CEUA-UFAM