



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO COMPOSTO  
LQFM 147, UM CANDIDATO A PROTÓTIPO DE FÁRMACO.**

**PATRICIA ANTÔNIA VASCONCELOS**

**GOIÂNIA-GO  
2016**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       **Dissertação**       **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Autor (a):	Patricia Antônia Vasconcelos		
E-mail:	patriciaantoniavasconcelos@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior	Sigla:	CAPES
País:	Brasil	UF:	Brasília DF CNPJ: 00.889.834/0001-08
Título:	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO COMPOSTO LQFM 147, UM CANDIDATO A PROTÓTIPO DE FÁRMACO		
Palavras-chave:	Efeito anti-inflamatório, efeito antinociceptivo, LQFM 147, TNF- $\alpha$		
Título em outra língua:	ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY EVALUATION OF COMPOUND LQFM 147, A CANDIDATE A PROTOTYPE OF DRUG		
Palavras-chave em outra língua:	anti-inflammatory effect, antinociceptive, LQFM 147, TNF- $\alpha$		
Área de concentração:	Farmacologia e Fisiologia		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	10/09/2016		
Programa de Pós-Graduação:	Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas		
Orientador (a):	Elson Alves Costa		
E-mail:	xico@ufg.br		

\*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Patricia Antônia Vasconcelos  
Assinatura do (a) autor (a)

Data: 27 / 09 / 2016

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

**PATRICIA ANTÔNIA VASCONCELOS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO COMPOSTO  
LQFM 147, UM CANDIDATO A PROTÓTIPO DE FÁRMACO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia e Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Elson Alves Costa

**GOIÂNIA-GO**

**2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Antônia Vasconcelos, Patricia

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO COMPOSTO LQFM 147, UM CANDIDATO A PROTÓTIPO DE FÁRMACO [manuscrito] / Patricia Antônia Vasconcelos. - 2016.

XIII, 55 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Elson Alves Costa.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia, Goiânia, 2016.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, lista de figuras.

1. Efeito anti-inflamatório.
2. Efeito anti-nociceptivo.
3. LQFM 147.
4. TNF-?. I. Alves Costa, Elson , orient. II. Título.

CDU 615



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

1        **ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 450**

2        Aos dez dias do mês de setembro do ano de dois mil e dezesseis, às nove  
3        horas, no Anfiteatro do Instituto de Ciências Biológicas II da Universidade  
4        Federal de Goiás, reuniram-se os componentes da banca examinadora: Prof.  
5        Dr. Elson Alves Costa, Prof. Dr. José Luís Rodrigues Martins e Prof. Dr. Ricardo  
6        Menegatti para, em sessão pública presidida pelo primeiro examinador citado,  
7        procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada "**Avaliação da**  
8        **Atividade anti-inflamatória do Composto LQFM 147, um Candidato a**  
9        **Protótipo de Fármaco**", em nível de mestrado, área de concentração em  
10       Farmacologia e Fisiologia, de autoria de **Patricia Antônia Vasconcelos**,  
11       discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da  
12       Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente, que fez a  
13       apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida  
14       à autora da dissertação que em cerca de trinta minutos procedeu à  
15       apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da  
16       banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial.  
17       Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da dissertação. Tendo-  
18       se em vista o que consta na Resolução nº1340 de 2015 do Conselho de  
19       Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa  
20       de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, a dissertação foi aprovada,  
21       considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção  
22       do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Goiás.  
23       A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da  
24       dissertação na Secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas  
25       pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da defesa.  
26       Cumpridas as formalidades de pauta, às dez horas e cinquenta minutos,  
27       encerrou-se a sessão de defesa de dissertação e, para constar, eu, Renato  
28       César Rodrigues, Assistente em Administração da Secretaria de Pós-graduação



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

29 do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, lavrei a  
30 presente ata que, após lida e aprovada, será assinada pelos membros da  
31 banca examinadora em três vias de igual teor.

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

Assinatura manuscrita em azul de Elson Alves Costa.

**Prof. Dr. Elson Alves Costa**

**Presidente da Banca**

**Universidade Federal de Goiás**

Assinatura manuscrita em azul de José Luís Rodrigues Martins.

**Prof. Dr. José Luís Rodrigues Martins**

**UniEvangélica – Centro Universitário de Anápolis**

Assinatura manuscrita em azul de Ricardo Menegatti.

**Prof. Dr. Ricardo Menegatti**

**Universidade Federal de Goiás**

## Dedicatória

*À Deus, pois Ele é tudo em minha vida e está sempre comigo me dando força e fé para conseguir passar por todas as aprovações da vida e seguir em frente.*

*Aos meus pais, Davi Ribeiro de Vasconcelos e Regina Ramalho Silva, pelo amor, carinho, confiança, apoio, incentivo e pela minha formação pessoal.*

*À meu esposo André Augusto Corrêa, por seu companheirismo, amor, amizade, paciência, incentivo, por acreditar em mim e me apoiar em todos os momentos.*

*Aos meus sogros, Carlos Antônio Corrêa e Maria Cândida de Sousa Corrêa, pelo carinho, amizade, confiança, apoio e incentivo.*

*Obrigada a todos por tudo!*

## Agradecimentos

*A Deus por estar sempre comigo guiando meu caminho e por todas as bênçãos a mim concedidas.*

*Ao meu orientador, Professor Dr. Elson Alves Costa, pela oportunidade de ingressar no mestrado, por sua orientação e ensinamentos, pelo trabalho abordado nesta dissertação que me possibilitou grande conhecimento, pela paciência e por sua amizade.*

*Ao professor Dr. Ricardo Menegatti por sintetizar e fornecer o composto LQFM 147.*

*A minha amiga Prof.a Dr.a Aline Mendonça Pascoal, por sua amizade, apoio, confiança e por compartilhar seus conhecimentos com muita paciência e dedicação.*

*A Doutoranda Iziara Ferreira Florentino, por ter me guiado nesta jornada, pela amizade e por compartilhar seus conhecimentos com muito carinho e dedicação.*

*A mestre Lanussy Porfiro de Oliveira pela amizade e pelos conselhos e conhecimentos compartilhados.*

*A Doutoranda Daiany Priscilla Bueno da Silva por sua amizade, conselhos e por compartilhar seus conhecimentos.*

*Aos demais amigos do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais e Sintéticos (LFPNS), pelos ensinamentos, pela companhia e momentos de descontração: Pablinny Moreira Galdino, José Luís Rodrigues Martins, James O. Fajemiroye, Oscar Romero, Roberta Campos, Danillo Oliveira, Dayane Moreira e Carina Cardoso.*

*Aos colegas do Laboratório de Farmacologia Bioquímica e Molecular (LFBM), em especial ao Thiago e Rodrigo pelo apoio, amizade e pelos momentos de descontração.*

*Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, e a todos os professores pelos conhecimentos compartilhados, contribuindo na minha formação.*

*Aos membros da banca examinadora, pelo tempo dedicado na leitura e pelos ensinamentos, críticas e sugestões feitas para enriquecer este trabalho.*

*A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro a mim concedido.*

*Aos animais do laboratório, pois sem eles não seria possível desenvolver este trabalho.*

*Obrigada a todos aqueles que sempre acreditaram em mim.*

**Sou apenas um caminhante à procura de si mesmo.**

**(Augusto Cury)**

## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas.....	VII
Lista de Figuras.....	XI
Resumo.....	XII
Abstract .....	XIII
1 Introdução.....	1
2 Justificativa.....	18
3 Objetivos.....	22
3.1 Objetivos Gerais.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4 Material e métodos.....	24
4.1 Planejamento de LQFM 147.....	25
4.2 Animais.....	25
4.3 Fármacos e reagentes.....	26
4.4 Testes para avaliação da atividade antinociceptiva e/ou anti-inflamatória.....	26
4.4.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético (1,2%).....	26
4.4.2 Teste da dor Induzida pela Formalina (3%).....	26
4.4.3 Teste do edema de pata induzido por carragenina (1%).....	27
4.4.4 Teste de pleurisia induzida por carragenina (1%).....	27
4.4.5 Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	28
4.4.6 Quantificação dos níveis de TNF- $\alpha$ .....	28
4.5 Análise estatística.....	28
5 Resultados.....	29
5.1 Efeito antinociceptivo e/ou anti-inflamatório de LQFM 147.....	30
5.1.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético 1,2%.....	30
5.1.2 Dor Induzida pela Formalina 3%.....	30
5.1.3 Edema de pata induzido por carragenina 1%.....	31
5.1.4 Pleurisia induzida por carragenina 1%.....	32
5.1.5 Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	33
5.1.6 Quantificação dos níveis de TNF- $\alpha$ .....	34
6 Discussão.....	35
7 Conclusão.....	41
8 Referências Bibliográficas.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	5-hidroxitriptamina (Serotonina)
5-HPETE	5-Hidroperoxieicosatetraenóico
5-LOX	5-Lipoxigenase
12-LOX	12-Lipoxigenase
15-LOX	15-Lipoxigenase
AA	Ácido Araquidônico
aC	Antes de Cristo
ADH	Ácido docosahexaenóico
AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
ASICs	Canais de íons sensíveis a ácidos
ASIC1a	Canais de íons sensíveis a ácidos 1a
ASIC1b	Canais de íons sensíveis a ácidos 1b
ASIC2	Canais de íons sensíveis a ácidos 2
ASIC3	Canais de íons sensíveis a ácidos 3
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propiónico (Receptor glutamatérgico)
ATP	Adenosina-trifosfato
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	Cicloxigenase
COX-1	Cicloxigenase - 1
COX-2	Cicloxigenase - 2
COX-3	Cicloxigenase – 3
dC	Depois de Cristo
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAP	Fator de agregação plaquetária
FLAP	Five-lipoxygenase activating protein / Enzima de ativação 5-LOX
GLU	Glutamato
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
H <sub>1</sub>	Receptor de histamina 1
H <sub>2</sub>	Receptor de histamina 2

H <sub>3</sub>	Receptor de histamina 3
H <sub>4</sub>	Receptor de histamina 4
ICAM-1	Molécula de adesão da célula intercelular-1
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina-1
IL-1ra	Antagonista do receptor de Interleucina-1
IL-1β	interleucina-1 beta
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
IL-14	Interleucina-14
INF	Interferons
INF-γ	Interferon-gama
IgE	Imunoglobulina E
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IASP	International Association for the Study of Pain / Associação Internacional para o Estudo da Dor
IGluR	Receptores de glutamato ionotrópicos
K <sub>ATP</sub>	canais de potássio sensíveis ao ATP
LC	locus coeruleus
LOX	Lipoxigenase
LTA <sub>4</sub>	Leucotrieno A <sub>4</sub>
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub>	Leucotrieno C <sub>4</sub>
LTD <sub>4</sub>	Leucotrieno D <sub>4</sub>
LTE <sub>4</sub>	Leucotrieno E <sub>4</sub>
LXs	Lipoxinas
LXA <sub>4</sub>	Lipoxinas A <sub>4</sub>
LXB <sub>4</sub>	Lipoxinas B <sub>4</sub>
mGluR	Receptores de glutamato metabotrópicos
NK1	Receptores de neurocininas 1

NK2	Receptores de neurocininas 2
NMDA	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	ânion superóxido
ONOO <sup>-</sup>	ânion peroxinitrito
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PDEs	Fosfodiesterases
PDE-3	Fosfodiesterase-3
PDs	Protectinas
PMN	Polimorfonucleares
PG	Prostaglandina
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandina D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGF <sub>2</sub>	Prostaglandina F <sub>2</sub>
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandina G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandina H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
p/v	Peso por volume
RVs	Resolvinas
r.p.m	Rotações por minuto
SP	Substância P
TGF-β	Transforming growth factor beta 1 / Fator de transformação do crescimento beta 1
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
TNFR1	Receptor de fator de necrose tumoral 1
TNFR2	Receptor de fator de necrose tumoral 2
TRP	Receptor de potencial transitório
TRPA	Receptor de potencial transitório relacionado à proteína anquirina-1
TRPC	Receptor de potencial transitório clássicos
TRPM	Receptor de potencial transitório melastatina
TRPML	Receptor de potencial transitório mucolipinas

TRPP	Receptor de potencial transitório policistinas
TRPV	Receptor de potencial transitório vanilóides
TX	Tromboxano
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1
VR-1	Receptor vanilóide-1
VRL-1	Receptor similar ao vanilóide-1
v/v	Volume por volume

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Mecanismos de migração dos leucócitos para o sítio inflamatório.....	4
Figura 2. Via ciclooxigenase e prostanóides.....	7
Figura 3. Lesão tissular e ação de mediadores pré-formados.....	10
Figura 4. Fibras aferentes primárias.....	13
Figura 5. Via descendente inibitória.....	17
Figura 6. Planejamento estrutural do composto LQFM 147 a partir do composto LQFM 021 e do pró-fármaco Sulindaco Sulfona.....	25
Figura 7. Efeito de LQFM 147 sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	30
Figura 8. Efeito de LQFM 147 no teste da dor induzida pela formalina, primeira fase (0-5 min) e segunda fase (15-30 min).....	31
Figura 9. Efeito de LQFM 147 no edema de pata induzido por carragenina.....	32
Figura 10 Efeito de LQFM 147 na migração leucocitária avaliada no método de pleurisia induzida por carragenina em camundongos.....	33
Figura 11. Efeito de LQFM 147 na contagem diferencial de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares.....	33
Figura 12. Efeito de LQFM 147 na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) avaliada no método de pleurisia induzida por carragenina em camundongos.....	34
Figura 13. Efeito de LQFM 147 na dosagem de TNF- $\alpha$ em exsudato pleural de camundongos com pleurisia induzida por carragenina.....	34

## RESUMO

A inflamação é um processo de defesa do organismo em resposta a lesões teciduais com o objetivo de eliminar o agente agressor e promover o reparo tecidual. É caracterizada pelo aparecimento dos sinais clássicos como dor, calor, rubor e edema, podendo ocorrer a perda da função em consequência da má resolução do processo inflamatório. O uso de fármacos anti-inflamatórios para o controle da inflamação é bastante utilizado, porém possuem muitos efeitos adversos, fazendo necessária à busca por novos fármacos com menos efeitos adversos e mais eficazes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-inflamatória e/ou antinociceptiva do composto LQFM 147 utilizando testes agudos de nocicepção e inflamação, visando caracterizar os mecanismos de ação envolvidos em tais efeitos. Para este estudo, foram utilizados camundongos machos, pesando entre 30 e 35 g. O tratamento com LQFM 147 nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg v.o. reduziram o número de contorções abdominais de maneira dose dependente em 16,79; 32,97 e 46,04%, respectivamente. No teste da formalina, o tratamento com LQFM 147 na dose de 50 mg/Kg v.o. reduziu o tempo de reatividade à dor somente na fase inflamatória do teste em 43,38%. A atividade anti-inflamatória foi confirmada, uma vez que o tratamento com LQFM 147 na dose de 50 mg/Kg v.o. reduziu a formação do edema de pata induzido por carragenina em todas as horas deste teste, reduziu a migração de leucócitos polimorfonucleares em 40,82% no teste de pleurisia. O tratamento com LQFM 147 foi capaz de reduzir a atividade da enzima mieloperoxidase em 31,54% e os níveis de TNF- $\alpha$  em 65,51%. Para obtenção dos resultados o grupo tratado com LQFM 147 foi comparado com o grupo controle tratado com Veículo 10 mL/kg v.o.. Os dados obtidos demonstram que LQFM 147 possui atividade anti-inflamatória e antinociceptiva envolvendo a redução da migração de leucócitos polimorfonucleares e redução dos níveis de TNF- $\alpha$ .

**Palavras-Chave:** Efeito anti-inflamatório, efeito antinociceptivo, LQFM 147, TNF- $\alpha$ .

## ABSTRACT

Inflammation is a body protection process in response to tissue damage in order to eliminate the offending agent and promote tissue repair. It is characterized by the appearance of the classic signs such as pain, heat, redness and edema, which may occur due to loss as a result of poor resolution of the inflammatory process. The use of anti-inflammatory drugs to control inflammation is widely used, but have many side effects, making necessary the search for new drugs with fewer side effects and more effective. The objective of this study was to evaluate the anti-inflammatory activity and / or antinociceptive the LQFM 147 compound using acute tests of nociception and inflammation, to characterize the mechanisms involved in such effects. For this study, male mice were used, weighing between 30 and 35g. Treatment with LQFM 147 at doses of 25, 50 and 100 mg / kg V.O. reduced the number of writhes in a dose-dependent in 16.79; 32.97 and 46.04%, respectively. In the formalin test, treatment with LQFM 147 at a dose of 50 mg / kg V.O. It reduced the time of reactivity to pain testing only the inflammatory phase 43.38%. The anti-inflammatory activity was confirmed, since the treatment with LQFM 147 at a dose of 50 mg / kg V.O. reduced formation of paw edema induced by carrageenan at all hours of the test, reduced migration of polymorphonuclear leukocytes 40.82% in pleurisy test. Treatment with LQFM 147 was able to reduce the activity of myeloperoxidase in 31.54% and TNF- $\alpha$  levels of 65.51%. To obtain the results the group treated with LQFM 147 was compared to the control group treated with vehicle 10 ml / kg v.o .. The data obtained demonstrate that LQFM 147 has anti-inflammatory and antinociceptive activity involving the reduction of migration of polymorphonuclear leukocytes and reduction in TNF- $\alpha$  levels.

**Keywords:** anti-inflammatory effect, antinociceptive, LQFM 147, TNF- $\alpha$ .

# ***Introdução***

## 1. Introdução

O organismo vivo em resposta a diferentes estímulos agressivos, que podem ser físico (queimadura, radiação, trauma), biológico (micro-organismo, reações imunológicas) ou químico (substância cáustica), desenvolve um processo complexo envolvendo vários mediadores e células. Este processo, chamado inflamação, envolve uma complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares, que incluem extravasamento de fluídos, ativação enzimática, migrações celulares, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores, lise e reparo tecidual. A inflamação é caracterizada pelo aparecimento dos sinais clássicos como dor, rubor, calor, edema e até perda de função da área afetada (1, 2).

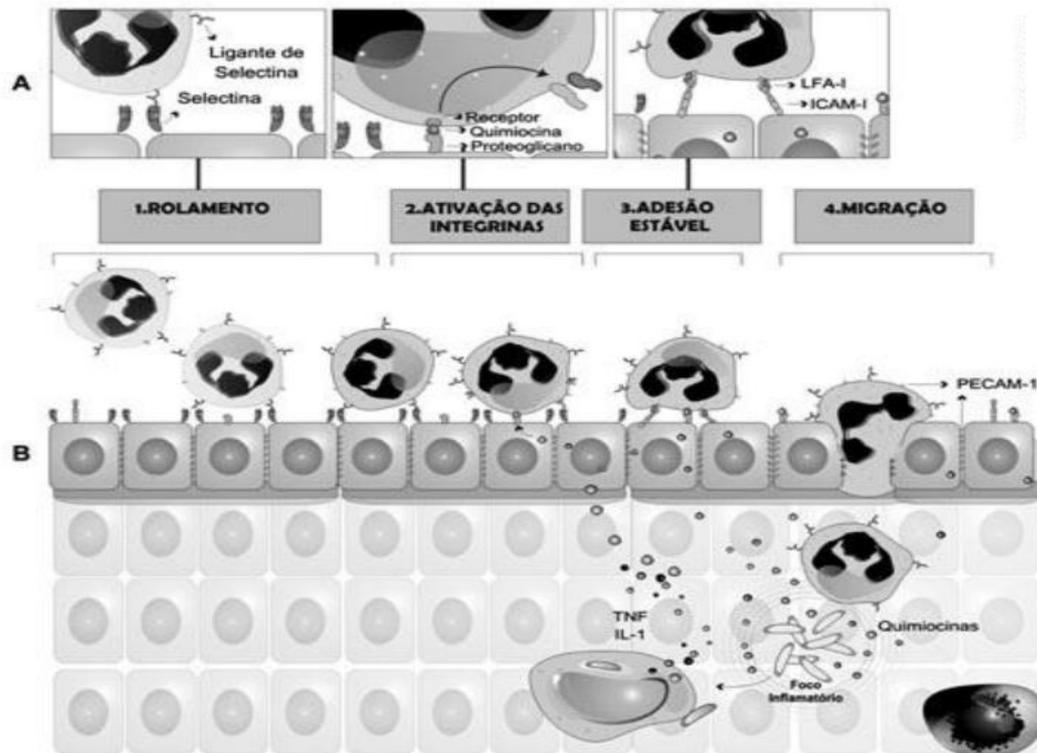
Existem papiros egípcios descrevendo as características da inflamação com datas de 3000 aC, porém apenas no primeiro século dC que Cornelius Celsus, um escritor romano, listou pela primeira vez, os quatros sinais clássicos da inflamação: Rubor (vermelhidão), tumor (inchaço), calor e dor. No século 19, Rudolf Virchow, um dos mais importantes líderes na medicina e na patologia, também conhecido pela Tríade de Virchow, adicionou à lista, o quinto sinal clássico da inflamação, a perda da função (*functio laesa*) que é devido a não resolução adequada do processo inflamatório (3, 4, 5).

A inflamação pode ser dividida de acordo com tempo de duração, em inflamação aguda ou crônica. A inflamação aguda é vista como um processo inicial, benéfico e auto limitado, caracterizada pelo acúmulo extravascular de neutrófilos e formação de edema no início da resposta. Durante a resposta as células mononucleares como macrófagos se acumulam e auxiliam a recuperação tecidual do local agredido. A inflamação quando persistente resulta em inflamação crônica (6, 7), a qual é proveniente de um desequilíbrio entre os mecanismos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, podendo desencadear várias doenças como: câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, artrite, doença de Alzheimer, doenças pulmonares e doenças autoimunes. A inflamação crônica é caracterizada pela presença de células mononucleares como monócitos, macrófagos e linfócitos (8, 9, 10).

A etapa inicial da inflamação é caracterizada pela liberação sequencial de mediadores, incluindo histamina, bradicinina e serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5HT), resultando no influxo imediato de leucócitos polimorfonucleares (PMN). Os leucócitos posteriormente são fagocitados por monócitos-macrófagos, contribuindo

para a resolução do processo inflamatório (11). As aminas vasoativas, como histamina e serotonina, por serem mediadores pré-formados armazenados nas células, são os primeiros mediadores a serem liberados, principalmente através dos mastócitos e monócitos, promovendo vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar. Estas alterações levam ao aparecimento de sinais clássicos rubor, calor e edema. Além disso, são ativados componentes do sistema de cininas, do sistema complemento e do sistema de coagulação, sendo juntamente liberadas citocinas e quimiocinas (12, 13, 14).

A migração de leucócitos dos vasos sanguíneos para o endotélio é feita através de uma cascata de eventos clássicos de rolamento, quimiotaxia, adesão firme e diapedese, dependente de uma classe de moléculas da superfície celular conhecida como moléculas de adesão. As principais famílias de moléculas de adesão celular incluem as selectinas, a superfamília das imunoglobulinas e as integrinas. As três importantes selectinas na adesão célula-a-célula são: a L-selectina, constitutivamente expressa em leucócitos; a P-selectina, pré-formada e armazenada nas plaquetas ou em células endoteliais; e a E-selectina, que apresenta exclusivamente em células endoteliais. A superfamília de imunoglobulina inclui a molécula de adesão da célula intercelular-1 (ICAM-1) e a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1). As integrinas são uma grande família de proteínas que medeiam à adesão, migração e ativação celular. As moléculas de adesão são expressas após estimulação por citocinas, como interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) (Figura 1) (15, 16, 17, 18).



**Figura 1:** Mecanismos de migração dos leucócitos para o sítio inflamatório. (A) detalhe e (B) visão geral das etapas da migração (18).

A histamina é um importante mediador da resposta inflamatória aguda e das reações alérgicas, sendo sintetizada e armazenada nos basófilos e mastócitos. Sua liberação, através destas células, ocorre quando os receptores para imunoglobulina E (IgE) são ativados ou pela ação de componentes do complemento e citocinas. A histamina exerce suas funções através de quatro receptores:  $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$  e  $H_4$ . As atividades pró-inflamatórias da histamina são mediadas pelo receptor  $H_1$ , enquanto que o receptor  $H_2$  media as atividades anti-inflamatórias e imunossupressoras e o receptor  $H_3$  regula a liberação de citocinas em macrófagos e mastócitos (19, 20). O receptor  $H_4$ , expresso amplamente na medula óssea e nos leucócitos, regula a liberação de neutrófilos da medula óssea, além disso,  $H_4$  e L-selectina em sinergismo pode desencadear a migração de neutrófilos para o local inflamado (21).

O sistema complemento, formado por mais de trinta proteínas séricas e celulares que, ao ser ativado, forma um complexo que estimula a lise de antígenos e de células infectadas. Os componentes C3a, C4a e C5a são anafilatoxinas que promovem contração da musculatura lisa, alterações na permeabilidade vascular,

liberação de histamina por mastócitos, quimiotaxia de leucócitos, ativação e agregação plaquetária e regulação da expressão de moléculas de adesão (20, 22).

A ativação do sistema de cininas leva à formação final de bradicinina que, por sua vez, induz a vasodilatação, contração da musculatura lisa e também produz dor. As ações da bradicinina são curtas, pois são rapidamente degradadas pela cininases que estão presentes no plasma e nos tecidos (23). Além da bradicinina e da histamina, a vasodilatação é produzida por vários outros mediadores, incluindo o óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) e prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), que são produzidos por meio da interação do agente agressor com o tecido. Já o aumento da permeabilidade vascular, além da histamina e da bradicinina, há também a participação dos leucotrienos, fator de agregação plaquetária (FAP) e substância P (24, 25, 26).

O óxido nítrico (NO) é gerado pela enzima NOS, uma enzima que existe em três isoformas, a forma induzível (iNOS), forma neuronal (nNOS) e a forma endotelial (eNOS). A forma induzível (iNOS) esta envolvida nas reações inflamatórias, é expressa em macrófagos, neutrófilos, células musculares lisas de vasos e células endoteliais em resposta a estímulos patológicos como microrganismos invasores e também por citocinas e mediadores lipídicos liberados envolvidos nesse processo; e as outras duas enzimas NOS neuronal (nNOS) e NOS endotelial (eNOS) são constitutivas (13, 27).

O NO gerado no endotélio ativa guanilil-ciclase que aumenta os níveis de GMPc e assim promovendo a vasodilatação, além disso aumenta a permeabilidade vascular e a produção de prostaglandina, contribuindo para o processo inflamatório. Em contrapartida o NO também possui efeito anti-inflamatório visto que inibe a adesão e a agregação plaquetária e a adesão de neutrófilos. Além disso, o NO pode reagir com o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e produzir o ânion peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) que é responsável pelo seu efeito tóxico. (26, 27).

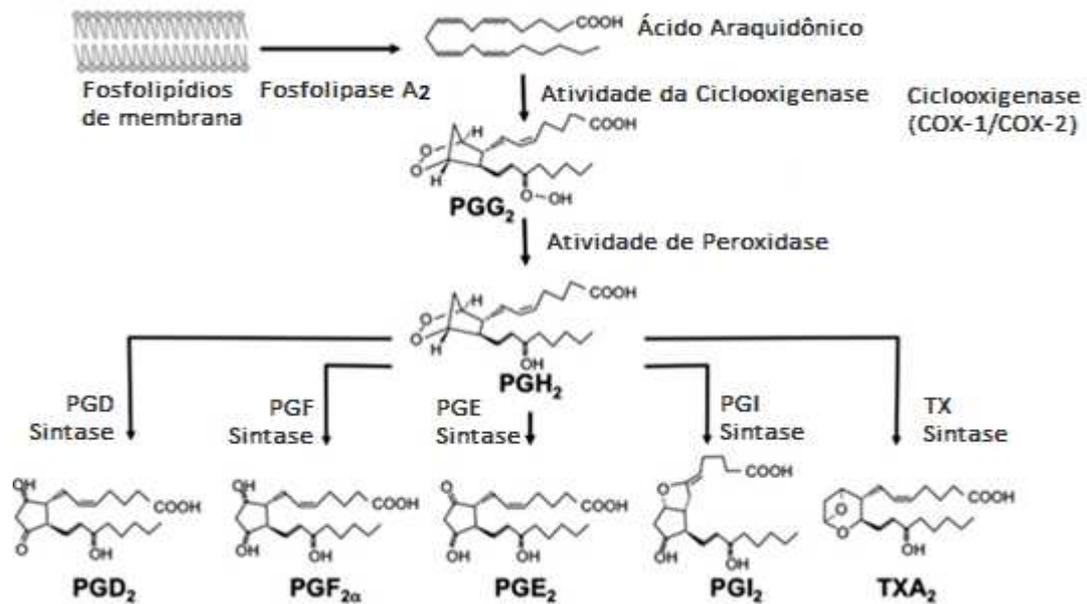
Quando os agentes agressores interagem com o tecido, são gerados os metabólitos do ácido araquidônico (AA), através da ação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) sobre os fosfolípidos da membrana celular. Os eicosanoides fazem parte de uma ampla família de mediadores lipídicos derivados de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) que contêm em sua estrutura química 20 carbonos na cadeia principal chamados de ácidos eicosatetraenoicos (C20:4). A PLA<sub>2</sub> produz também a

lisogliceril-fosforilcolina, o precursor do fator de agregação plaquetária (FAP), outro mediador inflamatório (23, 28, 29).

A metabolização do AA pode ocorrer pela via da cicloxigenase (COX) que leva à formação de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano e pela via da lipoxigenase (LOX) que leva à produção de leucotrienos e lipoxinas (23, 24). Os eicosanoides podem amplificar ou reduzir a inflamação, através da modulação da produção de citocinas, formação de anticorpos, apresentação de antígeno, proliferação e migração celular além de controlar o processo de resolução da inflamação e o processo de reparo tecidual (30).

As duas principais isoformas da COX são a COX-1 e a COX-2 sendo que a primeira apresenta-se de forma constitutiva na maioria dos tecidos corpóreos, atuando em atividades fisiológicas ou de manutenção como, por exemplo, na homeostasia vascular, função plaquetária e antitrombogênese; a segunda isoforma é a COX-2 denominada como induzida pois é produzida em maior quantidade em estados patológicos como inflamação e dor, embora se manifeste constitutivamente em alguns tecidos. A COX-2 é induzida pela interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) além de outros mediadores presentes no local de inflamação. Por outro lado, sua expressão pode ser inibida por glicocorticóides, IL-4, IL-10 e IL-14 (31). Alguns estudos sugerem a existência de uma terceira isoforma, a COX-3, que pode ser produto do mesmo gene da COX-1, porém com algumas características proteicas diferentes, sendo expressa principalmente no sistema nervoso central (32, 33).

Os prostanóides produzidos pela ação da COX são constituídos por prostaglandinas (PGs): PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, prostaciclina PGI<sub>2</sub> e tromboxano TXA<sub>2</sub> (Figura 2) (14). Em reações catalisadas por COX-1, as PG produzidas exercem funções como citoproteção epitelial gástrica e homeostasia, já a COX-2, que é induzida por estímulo inflamatório, hormônios, fatores de crescimento e lipopolissacarídeos de bactérias; é a maior fonte de PG em doenças inflamatórias e doenças proliferativas como o câncer, no entanto, ambas as enzimas contribuem para a produção de PG durante a inflamação. (Figura 2) (34).



**Figura 2:** Via ciclooxigenase e prostanoídeos. Ácido araquidônico, liberado através da ação da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) a partir de fosfolípidios de membrana, é convertido em PGG<sub>2</sub> e, em seguida, para PGH<sub>2</sub> por ação da ciclo-oxigenase (COX), e, em seguida, cada prostanoídeo é produzido pela ação de sua sintase específica. Modificado de Kawahara et al., 2015. (14).

O ácido araquidônico também pode ser metabolizado pela enzima Lipoxigenase (LOX), podendo ser a 5-Lipoxigenase (5-LOX), 12-Lipoxigenase (12-LOX) e 15-Lipoxigenase (15-LOX). Estas enzimas estão presentes em órgãos (pulmão), células (plaquetas e leucócitos) e principalmente no citosol. A principal LOX é a 5-lipoxigenase (5-LOX), encontrada predominantemente nos neutrófilos, e requer translocação até a membrana nuclear para a sua atividade, que é feita através da proteína de ativação da 5-lipoxigenase (FLAP), resultando em um complexo enzimático ativo. O produto formado pela enzima ativa a partir do ácido araquidônico é o ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE), um composto quimiotático para leucócitos que posteriormente é transformado em um componente instável e intermediário, o leucotrieno A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>), que através da conversão enzimática forma leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) e os leucotrienos C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> e E<sub>4</sub> (35).

O LTB<sub>4</sub> é um potente agente quimiotático e ativador das respostas funcionais dos neutrófilos, como agregação e aderência de leucócitos ao endotélio venular, geração de espécies reativas de oxigênio e liberação de enzimas lisossômicas. Os leucotrienos C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> e E<sub>4</sub> causam vasoconstrição intensa, broncoespasmo, aumento da permeabilidade vascular e extravasamento vascular restrito às vênulas (35). As lipoxinas (LXs): LXA<sub>4</sub> e LXB<sub>4</sub> também são formadas através da via da 15-LOX, as

quais são mediadores lipídicos que atuam limitando a quimiotaxia, adesão e transmigração de neutrófilos. Além disso, são potentes quimioatraentes de monócitos, promovendo a captação dos corpos apoptóticos de neutrófilos por macrófagos, assim, mediando a resolução da resposta inflamatória (36, 37, 38).

As citocinas são polipeptídios produzidos por diversos tipos de células no local da lesão como células do sistema imunológico (linfócitos e macrófagos), células do endotélio, epitélio e tecido conjuntivo, bem como em resposta a uma variedade de estímulos desencadeados por vírus, parasitas, bactérias e seus produtos ou em resposta a outras citocinas. Elas podem ser divididas em interleucinas (IL), quimiocinas, interferons (INF), fatores do crescimento e fatores de necrose tumoral (TNF) (26, 39, 40).

As interleucinas, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) são citocinas pró-inflamatórias que, ao serem liberadas, promovem efeitos locais como expressão de moléculas de adesão e expressão de quimiocinas, facilitando a migração de leucócitos, e efeitos sistêmicos, como a indução de proteínas de fase aguda que podem causar febre. A interleucina-2 (IL-2) e o interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) também são citocinas pró-inflamatórias que estão relacionados com a ativação e proliferação celular (41, 42, 43).

A IL-1 $\beta$ , produzida principalmente por macrófagos e monócitos, produz inflamação sistêmica através da indução da COX-2, desencadeia febre com a formação de PGE<sub>2</sub> no hipotálamo. Também induz a formação de moléculas de adesão endoteliais, substância P e ativa a enzima NOS levando à formação de NO. Um ponto chave na expressão das citocinas pró-inflamatórias é a ativação celular do fator de transcrição nuclear Kappa B (NF-  $\kappa$ B) responsável pela transcrição de diversos outros mediadores envolvidos no processo inflamatório. O estímulo promovido por IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  induz ativação do fator de transcrição, bem como um *up regulation* da própria expressão dessas citocinas, pelo mesmo mecanismo (40, 44, 45).

A IL-6 é uma citocina produzida por monócitos, células endoteliais e fibroblastos, podendo ser estimulada pela presença de microrganismos e de diversas outras citocinas, tais como IL-1 e TNF- $\alpha$ . A presença desta interleucina induz a expressão da ICAM-1, além disso, promove ativação do complemento, induz a produção de citocinas pró-inflamatórias e também a quimiotaxia de neutrófilos. A IL-6 contribui para a regeneração de lesão neuronal através da regulação da

expressão de neuropeptídios e também possui efeitos anti-inflamatórios por inibir IL-1 e TNF- $\alpha$  e por estimular a síntese de IL-1ra que apresenta efeitos anti-inflamatórios. A IL-8/CXCL8 pertence à subfamília de quimiocinas CXC e exerce predominantemente efeito quimioatraente para neutrófilos (46, 47, 48).

As quimiocinas constituem a maior família de citocinas, são capazes de estimular o movimento leucocitário e a quimiotaxia, direcionando células de defesa para o local da inflamação. São classificadas em grupos de polipeptídeos identificados pela localização dos resíduos de cisteína nas proximidades dos seus terminais amino, podendo ser C, CC, CXC e CX3C, onde C representa cisteína e X ou X3 representa um ou três aminoácidos (49, 50, 51).

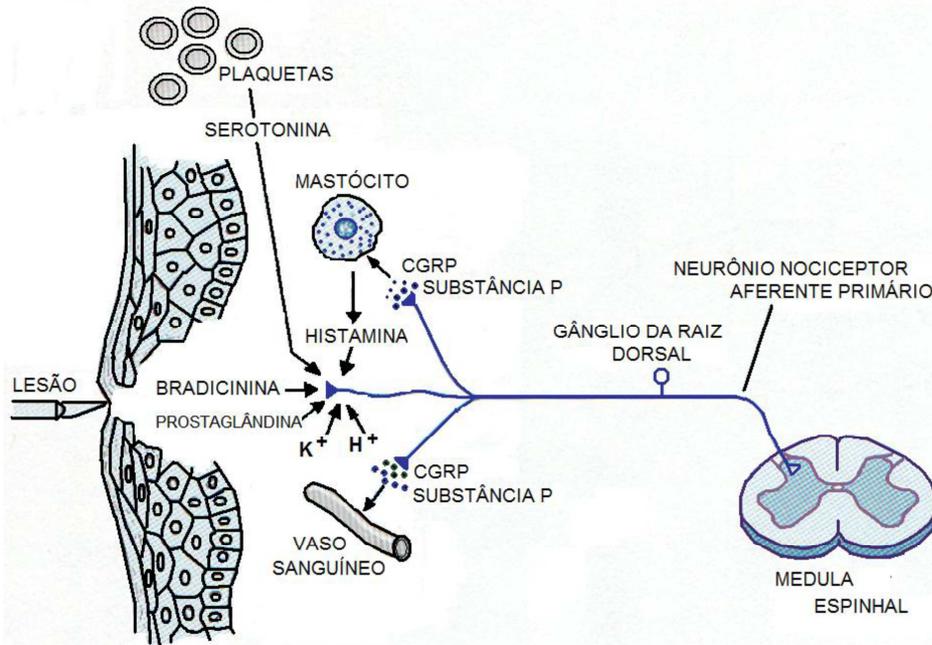
O TNF- $\alpha$  é produzido em grande quantidade principalmente por macrófagos em resposta a estímulos inflamatórios, sua interação com a célula alvo é mediada por uma ligação de alta afinidade com seus respectivos receptores, TNF tipo 1 (TNFR1) e TNF tipo 2 (TNFR2). A ligação de TNF- $\alpha$  com cada receptor desencadeia respostas diferentes: quando ligado ao receptor TNFR1 que garante a migração de neutrófilos, choque induzido por endotoxinas e dor neuropática após lesão do nervo e quando ligado ao receptor TNFR2 medeia a apoptose e necrose celular (52).

Citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10, IL-13, fator transformador de crescimento (TGF)- $\beta$  e o antagonista de receptor IL-1 (IL-1ra) são liberadas, durante o processo inflamatório, para modular eventos inflamatórios inibindo a produção e a ação de citocinas pró-inflamatórias já acima citadas (40, 44).

Há outros fatores que também medeiam a resolução do processo inflamatório, dentre eles, as resolvinas (RVs), protectinas (PDs) e maresinas. Elas interrompem a infiltração de polimorfonucleares (PMN), reduzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias, atraem os monócitos, induzem a apoptose dos PMNs ativados e o efluxo dos macrófagos que fagocitaram os PMNs apoptóticos e facilitam a remoção do exsudado do tecido inflamado e, conseqüentemente, promovendo a homeostase. As resolvinas são compostos endógenos sintetizados a partir do ácido eicosapentaenóico (EPA) formando resolvinas de série E, e sintetizados a partir do ácido docosahexaenóico (ADH) formando resolvinas de série D. As protectinas e maresinas também são formadas a partir do precursor de ADH (4, 53).

A produção de mediadores desencadeada por uma lesão tecidual, além de promover o processo inflamatório, podem também promover sensibilização de terminações nervosas, liberação de neurotransmissores excitatórios como a

substância P, que ativam os mecanismos nociceptivos e assim promovendo a dor. Mediadores como histamina, serotonina, eicosanoides, bradicinina, substância P, fatores de crescimento, óxido nítrico (NO), citocinas, quimiocinas, podem ser chamados de substâncias algogênicas, pois elas são capazes de promover a dor. (Figura 3) (54, 55, 56).



**Figura 3:** Lesão tecidual e liberação de mediadores pré-formados que estimulam os neurônios nociceptores aferentes primários. Modificado de Nestler et al., 2001 (54).

Dor é uma sensação desagradável, entretanto muito importante posto que alerta o indivíduo que sua integridade está sendo ameaçada ou que ocorre alguma alteração no organismo. Entretanto, a dor pode ter consequências desagradáveis como sofrimento, estresse, comprometimento nas relações sociais, profissionais ou em outras áreas importantes da vida do indivíduo. Por essas e outras razões, a dor deve ser rápida, controlada e se insistente, deve ser tratada (57, 58).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor IASP (International Association for the Study of Pain) definiu dor como sendo “uma experiência sensorial e/ou emocional desagradável, associada a dano tecidual real ou potencial”. Deste modo, a dor abrange dois componentes: a nocicepção, proveniente da lesão tecidual e que desencadeia a liberação de mediadores inflamatórios e ativação do sistema nervoso periférico e central, além da percepção que está relacionada aos aspectos subjetivos a qual é modulada pela emoção, motivação, condição psicológica e história de vida de cada indivíduo (52, 59).

A dor pode ser classificada de acordo com alguns parâmetros como duração, localização e intensidade. Sobre a duração, a dor pode ser transitória, aguda ou crônica. Do ponto de vista fisiológico a dor pode ser classificada em nociceptiva, inflamatória ou neuropática (60).

A dor transitória é gerada sem lesão tecidual pela ativação dos nociceptores, com intuito de proteger o organismo contra lesões físicas futuras que possam ser provocadas por estímulos do meio ambiente ou informar alterações no tecido corporal que poderiam desencadear uma lesão. A dor aguda é gerada por estimulação dos nociceptores a partir de uma lesão tecidual e, quando persiste, por um longo período de tempo e mesmo com a resolução da lesão, a dor passa a ser classificada como dor crônica (57, 61).

A dor nociceptiva está relacionada à ativação dos receptores nociceptivos devido a danos teciduais. Sua finalidade é alertar este organismo de que está sofrendo algum trauma, portanto, esse tipo de dor cessa juntamente com a cura da lesão. A dor neuropática é proveniente de lesão ou doença que afeta o sistema somatossensorial, podendo ser subdividida em dor neuropática periférica, quando afeta o sistema nervoso periférico, ou dor neuropática central quando afeta o sistema nervoso central (62).

Devido à possível ocorrência de ambos os tipos de dor, e das dificuldades diagnósticas, alguns autores recomendam usar o termo “dor predominantemente neuropática” ou “dor predominantemente nociceptiva”, dependendo do padrão clínico de apresentação (63).

As causas mais comuns de dor neuropática periférica são:

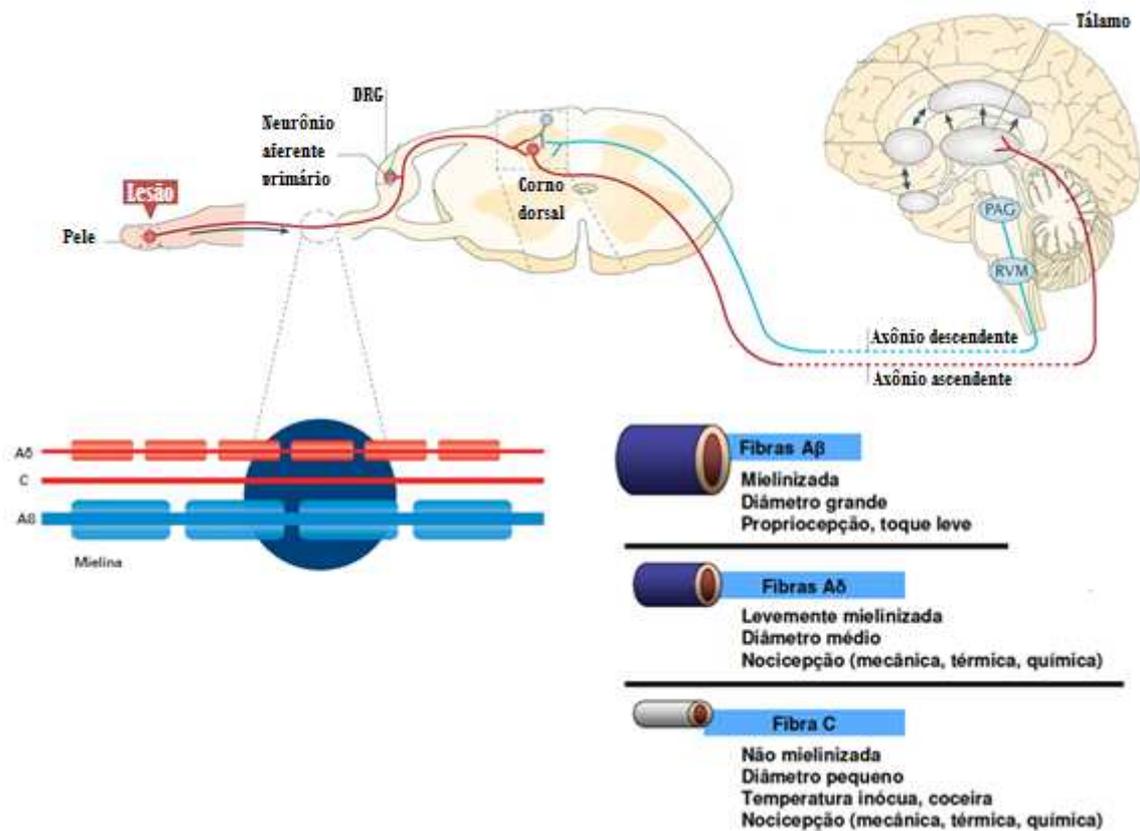
- No nervo - Neuropatia diabética, neuralgia do trigêmeo, síndrome da dor regional complexa tipos I e II (Antigamente conhecidas como distrofia simpático-reflexa (tipo I) e causalgia (tipo II)), neuropatia induzida por infiltração tumoral, neuropatia por compressão nervosa crônica (p. ex. STC- síndrome do túnel do carpo).
- Na raiz dorsal - Neuralgia pós-herpética e avulsão traumática de plexo braquial.

E as causas mais comuns de dor neuropática central são:

- No cérebro- Pós – AVC (acidente vascular cerebral) e Esclerose múltipla.
- Na medula espinhal- Trauma medular e Isquemia medular (63).

A dor inflamatória é proveniente da interação, tanto da lesão tecidual quanto dos mediadores liberados no processo inflamatório com os neurônios sensoriais nociceptivos. Alguns mediadores desse processo, apenas sensibilizam essas fibras sensoriais, diminuindo seu limiar de ativação, e assim, facilitando sua ativação (56, 64).

Os nociceptores são terminações nervosas livres de neurônios aferentes primários, que podem ser ativados por estímulos térmicos, mecânicos e químicos. Os neurônios aferentes primários podem ser diferenciados de acordo com sua estrutura, grau de mielinização e velocidade de condução em três grupos (fibras A $\beta$ , A $\delta$  e C). As fibras A $\beta$  são mielinizadas, com grande diâmetro, maior que 10  $\mu\text{m}$  e com velocidade de condução rápida de 30-100 m/s, responsáveis por detectar estímulos inócuos, como toque leve, vibração ou movimento de pelos, no entanto, durante um processo inflamatório, há uma redução do seu limiar de ativação e conseqüentemente respondem a estímulos térmicos e mecânicos; as fibras aferentes A $\delta$ , ativadas por estímulos térmicos e mecânicos de alta intensidade, são pouco mielinizadas, diâmetro intermediário, variando entre 2,0-6,0  $\mu\text{m}$ , velocidade de transmissão intermediária de 12-30 m/s, responsáveis pela fase aguda da dor, e as fibras C, são polimodais, por serem sensibilizadas por estímulos térmicos, mecânicos e químicos, são fibras não mielinizadas de diâmetro pequeno de 0,4-1,2  $\mu\text{m}$ , velocidade de condução lenta de 0,5-2,0 m/s, responsáveis pela dor de longa duração e difusa. (Figura 4) (65, 66).



**Figura 4:** Fibras aferentes primárias. Modificado de Parsadaniantz et al., 2015 (67).

Em condições normais, ou seja, sem lesão tecidual ou nervosa, somente as fibras C e A $\delta$  transmitem informações exclusivamente nociceptivas, as fibras A $\beta$  respondem somente ao toque, vibração, pressão e outros tipos de estimulação sensorial que não sejam nociceptivos, como estímulos mecânicos de baixa intensidade. Os neurônios nociceptores quando são ativados, sofrem despolarização e, conseqüentemente, desencadeia potenciais de ação que se propagam para os neurônios no corno dorsal da medula espinhal e, em seguida, para o cérebro. Os nociceptores também podem ser sensibilizados, essa ação diminui seu limiar de ativação, facilitando sua ativação (65, 68, 69). Estes estímulos nociceptivos são reconhecidos por canais específicos que convertem os estímulos em impulsos elétricos que são transmitidos ao longo de toda fibra nociceptiva.

O Receptor de potencial transitório (TRP) é um grupo de canais iônicos de uma classe formada por mais de 20 membros que são divididos em seis subclasses de TRP's: TRPC (clássicos), TRPV (vanilóides), TRPM (melastatina), TRPP (policistinas), TRPML (mucopolinas) e os TRPA (TRP relacionado à proteína anquirina-1) (70, 71). Os canais de TRP respondem a alterações no ambiente

celular, pressão e alteração no pH, estes canais também podem ser ativados por estímulos como mudanças de temperatura, frio nocivo e calor nocivo, produtos químicos e ação mecânica (72, 73). O TRPV1 é ativado por múltiplos estímulos dolorosos, incluindo calor nocivo, acima de 43° C, produtos químicos pungentes como a capsaicina, um composto pungente das pimentas vermelhas e veneno de medusa, diferentemente o TRPM8 é ativado por mentol e por frio. Os canais mais estudados e conhecidos no processo doloroso são o TRPV1 ou receptor vanilóide-1 (VR1) e o TRPV2 ou receptor similar ao vanilóide-1 (VRL-1) para o calor e o TRPM8 e TRPA1 para o frio (74, 75, 76).

Alterações no pH celular devido a condições patológicas como inflamação, isquemia, hematomas, fraturas e lesões promovem nocicepção por ativar os canais de íons sensíveis a ácidos (ASICs). Estes canais são expressos no sistema nervoso periférico e central. Os canais ASIC1b e ASIC3 são restritos aos neurônios sensoriais periféricos e os canais ASIC1a e ASIC2 estão presentes tanto nos neurônios sensoriais periféricos quanto nos neurônios sensoriais centrais (77).

As fibras aferentes primárias chegam de maneira altamente organizada ao corno dorsal da medula espinal, onde fazem sinapses com os neurônios secundários. O corno dorsal da medula espinal é subdividido em lâminas de I a X. As lâminas superficiais I e II são os principais alvos dos neurônios aferentes primários. A maioria dos neurônios da lâmina I respondem exclusivamente a estímulos nociceptivos e a lâmina II é formada majoritariamente por interneurônios excitatórios e inibitórios. As lâminas de V a X são mais profundas. As fibras A $\delta$  terminam nas lâminas I, II e V, as fibras C terminam principalmente nas lâminas II e as fibras A $\beta$  terminam nas lâminas III, IV e V (66, 68, 78).

Após uma agressão tecidual, essas fibras liberam várias substâncias que estão relacionadas com a transmissão central e com a modulação da nocicepção, dentre elas, a substância P, adenosina-trifosfato (ATP), óxido nítrico (NO), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), glutamato (GLU) e aspartato (68).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório envolvido na sinalização da transmissão nociceptiva no corno dorsal da medula espinal e na formação e manutenção da resposta nociceptiva. Estas ações são provenientes da ativação de receptores de glutamato metabotrópicos (mGluR) ou ionotrópicos (iGluR). Os receptores ionotrópicos são *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA), cainato e  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA) (79, 80, 81).

A substância P (SP) é uma taquicinina encontrada em altas concentrações nas terminações aferentes primárias, está envolvida na transmissão nociceptiva das fibras aferentes do tipo C interagindo com receptores de neurocininas (NK1 e NK2) das fibras aferentes secundárias (82). Sua interação com o receptor NMDA libera mediadores que levará à hipersensibilidade dos nociceptores além de induzir a produção de prostanóides. A substância P atua como um mediador da primeira sinapse da transmissão dolorosa, desta maneira, controla o fluxo de informações transmitidas pelos neurônios primários. É de grande importância, pois pode reduzir o limiar de excitabilidade da sinapse e aumentar a extensão da dor (83, 84). Enquanto que o glutamato está relacionado com a formação de dor rápida, a substância P está relacionada com a formação de dor mais duradoura (79, 83).

O CGRP liberado na medula espinal atua sobre receptores CGRP1 e CGRP2, o qual, após eventos intracelulares, permite a fosforilação de receptores AMPA, com isso, aumenta a excitação neuronal, contribuindo com a formação da hiperalgisia. Ele facilita a nocicepção por retardar o metabolismo da SP e, também, aumenta a liberação de SP e de glutamato nas terminações centrais das fibras aferentes primárias. Sua liberação após estimulação sensorial promove vasodilatação, além disso, está entre os principais mediadores da inflamação neurogênica e também é importante na formação de edema (40,85, 86).

Quando se refere à dor, vários distúrbios podem estar relacionados como neuroplasticidade, alodinia e hiperalgisia. A neuroplasticidade pode ocorrer periféricamente, por redução do limiar de ativação dos nociceptores e centralmente, pela responsividade aumentada da medula espinhal aos estímulos sensoriais. A alodinia é um tipo de dor causada por estímulos que normalmente não provocam dor e a hiperalgisia corresponde a uma resposta aumentada em função de sensibilização primária ou secundária do local da lesão (87, 88).

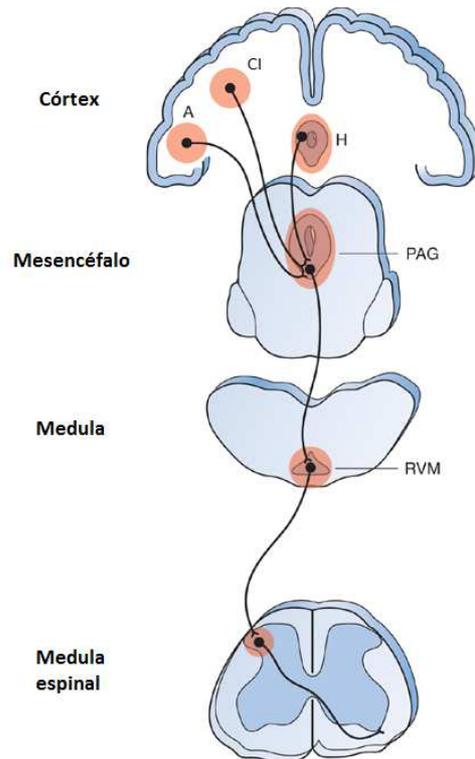
A informação nociceptiva passa dos neurônios primários para os secundários, ascendendo através de diferentes tratos nervosos específicos até o tálamo, onde se dá a percepção de que existe uma sensação dolorosa. Além disso, essa informação neural se projeta do tálamo para áreas sensoriais do córtex cerebral, onde as várias submodalidades, como qualidade, intensidade, localização e o seu aspecto afetivo emocional, são integrados na experiência da percepção (89, 90).

Os tratos nervosos pelos quais os neurônios do corno dorsal ascendem podem ser divididos em duas funções: a via sensorial/discriminativa e a via

emocional/motivacional. Na primeira via citada, os neurônios do corno dorsal ascende pelo trato espinotalâmico, e na sequência, os neurônios talâmicos fazem projeção até o córtex somatossensorial primário. Esta via de dor específica transmite a localização mais precisa do estímulo nociceptivo e sua intensidade. Já a segunda via citada, outros neurônios do corno dorsal fazem projeção para os núcleos do tronco cerebral e daí para regiões límbicas, transmitindo o componente afetivo evocado pelos estímulos nociceptivos. Vale ressaltar que, apenas quando os dois aspectos de discriminação sensorial e emocional se juntam, é criada a percepção subjetiva final da dor e, a partir daí, é que podemos usar o termo “dor” (91).

O trato espinotalâmico é dividido em espinotalâmico lateral ou via neoespinotalâmica e espinotalâmico medial ou via paleoespinotalâmica. A via neoespinotalâmica é uma via específica direta rápida e fidedigna, pois é capaz de discriminar a localização, intensidade e duração da dor. Já a via paleoespinotalâmica é uma via difusa, de condução lenta e que não é capaz de discriminar especificamente o local de origem do estímulo (59, 92, 93).

Para o controle da dor, o organismo possui mecanismos intrínsecos que envolvem a ativação de vias descendentes e a liberação de neurotransmissores que ativam várias vias, como os sistemas: opióide, serotoninérgico, noradrenérgico, gabaérgico, canabinóides e outros. Essas vias descendentes podem inibir a liberação de neurônios nociceptivos, atuando diretamente sobre eles, inibindo interneurônios excitatórios ou estimulando interneurônios inibitórios. São originadas em estruturas encefálicas como o córtex cerebral, hipotálamo, amígdala, locus coeruleus (LC) e substância cinzenta periaquedutal (PAG) e fazem sinapse com terminais de neurônios aferentes primários reduzindo a liberação de glutamato, aspartato, CGRP e a substância P. (Figura 5) (66, 68, 94, 95,96).



**Figura 5:** Via descendente inibitória. Regiões cerebrais como hipotálamo, amígdala e córtex projetam neurônios para substância cinzenta periaquedutal (PAG) onde outros neurônios projetam para medula rostroventroventral (RVM). Os neurônios da RVM projetam para o corno dorsal da medula espinal onde formam conexões sinápticas com interneurônios e fibras nociceptoras, modulando a transmissão do estímulo doloroso. A= Amígdala; IC= Córtex insular; H= Hipotálamo. Modificado de Rang & Dale, 2011 (26).

***Justificativa***

## 2. Justificativa

Medicamentos para o controle do processo inflamatório e da dor são comumente utilizados, incluindo analgésicos opióides e não-opióides, anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais (AINEs) e outras classes de fármacos como, por exemplo, antidepressivos, anticonvulsivantes e anestésicos. Os AINEs são os mais prescritos no mundo todo, apresentam propriedades analgésica, antitérmica, anti-inflamatória e antitrombótica. No entanto, como qualquer medicamento, requerem cuidados na sua prescrição e utilização (97, 98, 99, 100).

O mecanismo de ação dos AINEs se dá através da inibição da enzima COX e, conseqüentemente, a inibição da formação de prostanóides. Porém o uso destes fármacos deve ser limitado por causa dos seus efeitos indesejáveis, principalmente no trato gastrointestinal (97, 99).

Os AINEs que seletivamente inibem a COX-2 sem bloquear a COX-1, promovem analgesia sem os efeitos colaterais atribuídos ao bloqueio da COX-1, em destaque a toxicidade gastrointestinal, renal e a inibição da função trombocítica (101). A toxicidade gastrointestinal é causada pela inibição da síntese de prostaglandinas. As prostaglandinas, sintetizadas principalmente pela COX-1, possuem um efeito citoprotetor da mucosa gástrica por aumentar a secreção de muco e bicarbonato, além disso, reduzem a secreção de ácido clorídrico. Portanto, a inibição desta tem como resultado o aumento da secreção gástrica e a diminuição da produção de fatores protetores na barreira mucosa superficial, gerando o processo de ulceração (102, 103).

O uso de AINEs pode provocar bloqueio da agregação plaquetária por causa da inibição da síntese de tromboxanos, levando a um maior risco de sangramento. Fármacos com ação seletiva sobre a COX-2 apresentam maiores riscos de efeitos adversos cardiovasculares, como a hipertensão arterial, as arritmias cardíacas e a trombose cerebral em decorrência da inibição da PGI<sub>2</sub> (104, 105). A PGI<sub>2</sub> promove efeito antitrombótico, vasodilatação e redução da agregação plaquetária, ao inibir essa enzima através do uso de fármacos inibidores seletivos da COX-2, pode afetar o equilíbrio entre alguns eicosanóides como TXA<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> e assim levando ao aumento de eventos trombóticos e cardiovasculares (105).

O sulindaco é um AINE classificado quimicamente como ácido carboxílico, da classe dos arilalcanóicos. É metabolizado em sulfeto (reversivelmente) e em sulfona

(irreversivelmente) (106, 107). As subunidades sulfona, bem como sulfonamida, se encontram presentes em vários fármacos anti-inflamatórios, sendo denominada de subunidade farmacofórico. Foi demonstrado, em estudos recentes que, o sulindaco sulfona pode impedir a formação de tumores em modelos de carcinogênese química em animais sem inibir a expressão da enzima COX ou reduzir os níveis de prostaglandina (108).

Apesar de relatos de sua toxicidade gastrointestinal e hepática, o sulindaco é utilizado como agente analgésico e anti-inflamatório em tratamentos de sintomas de artrite reumatoide, osteoartrite e também em tratamento de câncer de cólon, no pulmão e de mama, pois o sulindaco pode levar à apoptose das células cancerígenas (109, 110).

Como esses medicamentos causam muitos efeitos colaterais e nem sempre são tão eficazes, faz se necessário à busca por novos agentes anti-inflamatórios e/ou analgésicos que sejam mais eficazes e promovam cada vez menos efeitos colaterais (111).

Alguns AINE possuem mecanismos de ação adicionais como a inibição da quimiotaxia, diminuição na produção de radicais livres e superóxido, bem como interferência nos eventos intravasculares mediados pelo cálcio (105).

Existem compostos que ainda não estão disponíveis no mercado como fármacos, mas, possuem atividade antinociceptiva e anti-inflamatória como o composto pirazólico 5-(1-(3-fluorofenil)-1H-pirazol-4)-2H-tetrazol (LQFM-021) que, em estudos anteriores demonstrou, em testes de nocicepção e inflamação aguda, atividades analgésica e anti-inflamatória envolvendo em parte uma ação opióide e também mostrou uma ação antinociceptiva periférica envolvendo a via NO/GMPc/ $K_{ATP}$  (112, 113). Além disso, LQFM 021 indicou ser possível inibidor de PDEs, principalmente a PDE-3, também foi visto que possui uma ação relaxante no músculo liso vascular tanto na presença quanto na ausência do endotélio. O fluxo de  $K^+$  e  $Ca^{2+}$  através da membrana celular e a absorção de  $Ca^{2+}$  pelo retículo sarcoplasmático também são importantes para o efeito relaxante deste composto (114).

Neste contexto, foi desenvolvido o composto LQFM 147, resultado da hibridação do composto LQFM021 com metabólito Sulindaco Sulfona, neste estudo avaliamos uma possível atividade anti-inflamatória e/ou antinociceptiva e, buscamos a elucidação do mecanismo de ação deste composto a fim de contribuir para o

desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes, com menos efeitos colaterais e mais seguros.

***Objetivos***

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivos gerais**

- O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos anti-inflamatório e/ou antinociceptivo do composto LQFM 147, buscando caracterizar quais os mecanismos de ação estariam envolvidos em tais efeitos.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

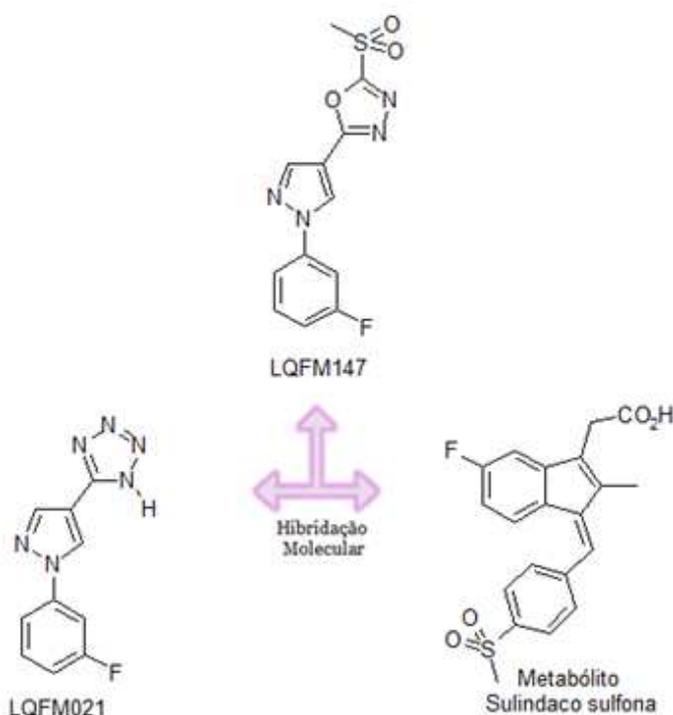
- Investigar o efeito antinociceptivo do composto LQFM 147 por meio de modelos de nocicepção agudo: contorções abdominais induzidas por ácido acético, dor induzida pela formalina;
- Investigar a atividade anti-inflamatória do composto LQFM 147 nos testes de edema de pata induzido por carragenina e pleurisia induzida por carragenina.
- Avaliar o possível mecanismo de ação anti-inflamatório de LQFM 147 através do doseamento da atividade da enzima mieloperoxidase e avaliação dos níveis de TNF- $\alpha$  no exsudato pleural.

## ***Material e métodos***

## 4. Material e métodos

### 4.1. Planejamento do LQFM 147

O composto LQFM 147 foi sintetizado pelo grupo de pesquisadores do Laboratório de Química Farmacêutica Medicinal (LQFM) na Faculdade de Farmácia (FF) da Universidade Federal de Goiás (UFG) coordenado pelo Prof. Dr. Ricardo Menegatti (Figura 6).



**Figura 6:** Planejamento estrutural do composto LQFM 147 a partir do composto LQFM 021 e metabólito Sulindaco Sulfona.

### 4.2. Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos adultos com idade de dois meses, pesando entre 30 a 35g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Goiás (UFG) e mantidos no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais e Sintéticos em condições controladas de temperatura ( $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ), iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas) com água filtrada e ração *ad libitum*. Os experimentos foram executados de acordo com o protocolo aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UFG sob nº 17/13.

### **4.3. Fármacos e reagentes:**

Ácido acético (Merck, EUA); Carragenina (Sigma Chemical, USA); Dimorf®-Morfina (Cristália-Ltda, Brasil); dexametasona (Prodome, Brasil); DMSO (Sigma Chemical, USA); Formaldeído (Synth, Brasil); Indometacina (Sigma Chemical, USA); Veículo (DMSO 10%, p/v em água destilada); solução salina (NaCl 0,9%); LQFM 147 sintetizado no laboratório de Química Farmacêutica Medicinal da Faculdade de Farmácia – UFG, este composto foi dissolvido em DMSO 10% e salina.

### **4.4. Testes para avaliação da atividade antinociceptiva e/ou anti-inflamatória do composto LQFM147**

#### **4.4.1. Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético (1,2%)**

Neste teste empregamos a metodologia descrita por Hendershot & Forsarth 1959 e Koster et al. 1959 (115, 116). Foram utilizados grupos experimentais de camundongos (n = 8) tratados por via oral (v.o.) com veículo (10 mL/kg), LQFM 147 (25, 50 ou 100 mg/kg) ou indometacina (10 mg/kg). Uma hora após os tratamentos, injetou-se ácido acético a 1,2 % v/v (10 mL/kg, i.p) em todos animais. As contorções abdominais seguidas de torções do tronco e extensão de pelo menos um dos membros posteriores, provocadas pela irritação causada pelo ácido acético na cavidade abdominal, foram contadas durante o período de 30 minutos.

#### **4.4.2. Teste da dor Induzida pela Formalina (3%)**

Foram utilizados grupos experimentais de camundongos (n = 8) tratados pela via oral com veículo (10 mL/kg), LQFM 147 (50 mg/kg), indometacina (10 mg/kg) ou pela via subcutânea com morfina (5 mg/kg). Após 60 minutos dos tratamentos por via oral (v.o.) ou 30 minutos após o tratamento pela via subcutânea (s.c.), foi injetado 20 µL de formalina 3% v/v intraplantar na pata posterior direita dos animais. Após a injeção do agente flogístico, os animais foram observados individualmente durante 30 minutos, em uma caixa de acrílico com fundo especular para auxiliar a visão e cronometrado o tempo de lambida da pata lesionada. Este teste permite avaliar dois tipos de dor, a de origem neurogênica (durante os primeiros 5 minutos), que ocorre

devido à estimulação direta das terminações nociceptivas, e a de origem inflamatória (no período de 15 a 30 minutos), produzida pela liberação de mediadores inflamatórios (117).

#### **4.4.3. Teste do edema de pata induzido por carragenina (1%)**

Este método segue a metodologia descrita por Passos et al. 2007 (118). Inicialmente os grupos de camundongos (n=8) foram tratados por via oral com veículo (10 mL/kg), LQFM 147 (50 mg/kg) ou dexametasona (2 mg/kg). Uma hora após o tratamento, os animais receberam uma injeção intraplantar na pata posterior direita contendo 50 µL de carragenina (1%) p/v. A pata posterior esquerda foi utilizada como controle, e recebeu uma injeção contendo o mesmo volume (50 µL) de solução salina (NaCl 0,9 %). O edema foi avaliado nos intervalos de tempo de 0, 1, 2, 3 e 4 horas, após a injeção da carragenina, utilizando um pletismômetro (7141, Ugo Basile, Itália). A formação do edema foi avaliada pela diferença de volume entre as patas de cada animal.

#### **4.4.4. Teste de pleurisia induzida por carragenina (1%)**

Os grupos de animais (n = 9) foram tratados pela via oral com veículo (10 mL/kg), LQFM 147 (50 mg/kg) ou dexametasona (2 mg/kg). Uma hora após o tratamento, os animais receberam uma injeção intrapleural de 0,1 mL de carragenina a 1% p/v, para indução do processo inflamatório, pelo espaço intercostal das costelas inferiores da caixa torácica (119). Quatro horas após a aplicação do agente flogístico os animais foram submetidos à eutanásia, a cavidade torácica foi aberta e um pequeno corte foi feito no diafragma, logo abaixo do apêndice xifóide. Em seguida, a cavidade pleural foi lavada com 1mL de solução de PBS (pH 7,6) heparinizado. Uma alíquota foi usada para fazer a contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer e para confecção de esfregaços em lâminas de vidro, os quais foram corados pelo método May-Grünwald-Giemsa, e analisados em microscópio óptico para contagem diferencial de leucócitos (mononucleares e polimorfonucleares) e outra alíquota foi usada para avaliar a atividade da enzima mieloperoxidase e quantificar os níveis de TNF-  $\alpha$ .

#### **4.4.5. Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)**

Para a dosagem dos níveis de mieloperoxidase, foi utilizado o método de Saleh et al. 1999 (120), com algumas alterações. 20  $\mu\text{L}$  do lavado pleural retirado de cada animal, conforme descrito anteriormente, foram transferidos para poços de microplacas. A reação foi iniciada com a adição de 180  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato pH = 6,0 contendo 0,167 mg/mL de *o*-dianisidina 2HCl e 0.0005%  $\text{H}_2\text{O}_2$  (121) e após 15 minutos, interrompida com a adição de 10  $\mu\text{L}$  de azida sódica a 1%. As amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 1000 r.p.m, e 100  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes foram transferidos para os poços de microplacas. As absorbâncias foram determinadas em leitor de ELISA no comprimento de onda 450 nm. Foi feito uma curva-padrão com peroxidase (0,625 –100 mU/mL) para determinar a concentração de mieloperoxidase presente nas amostras.

#### **4.4.6. Quantificação dos níveis de TNF- $\alpha$ .**

Para determinar a concentração do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) também foi utilizada uma alíquota retirada no Teste de pleurisia induzida por carragenina. O lavado pleural recolhido foi depositado em tubos Eppendorf® imersos em gelo. Parte do líquido recolhido da cavidade pleural foi centrifugado a 3000 rpm, durante cinco minutos a 4°C. A concentração de TNF- $\alpha$  no exsudato pleural foi determinada através de método imunoenzimático (kit de ELISA da eBioscience), de acordo com o protocolo do fabricante.

#### **4.5. Análise estatística**

Os dados foram expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias. As diferenças entre dois grupos foram detectadas pelo teste t de Student e entre três ou mais grupos pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Student-newman-Keuls ou ANOVA de duas vias seguida do pós-teste Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$  (122). A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5.0®

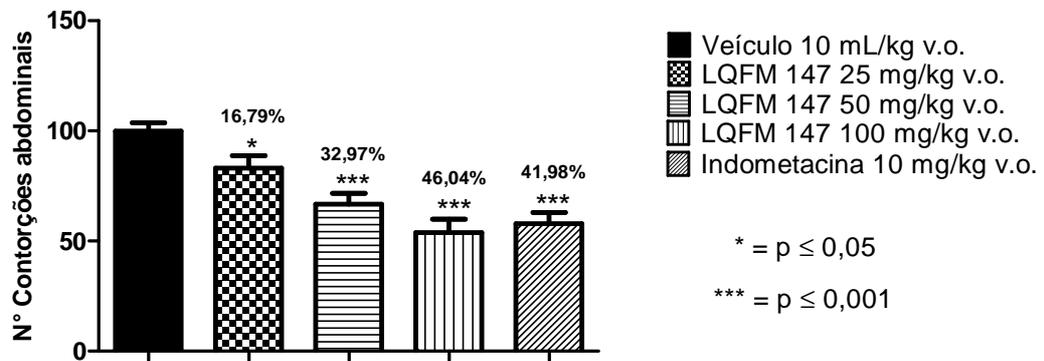
## ***Resultados***

## 5. Resultados

### 5.1. Efeito antinociceptivo e/ou anti-inflamatório de LQFM 147 nos testes:

#### 5.1.1. Contorções abdominais induzidas por ácido acético (1,2%).

Os tratamentos com LQFM 147 (25, 50 e 100 mg/kg v.o.), reduziram significativamente o número de contorções abdominais: do valor controle (veículo 10 mL/kg v.o.) de  $99,75 \pm 3,9$  para  $83 \pm 5,7$ ;  $66,86 \pm 4,8$ ;  $53,83 \pm 5,9$ , respectivamente. A Indometacina (10 mg/kg v.o.) usada como controle positivo reduziu para  $57,88 \pm 5,0$  (Figura 7).

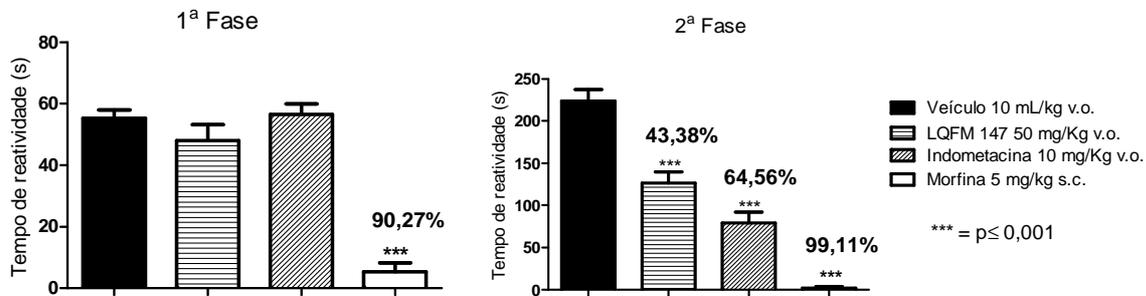


**Figura 7:** Efeito de LQFM 147 (25, 50 e 100 mg/kg), no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético 1,2% v/v. A indometacina (10 mg/kg, v.o.) foi usada como controle positivo. As colunas e barras verticais representam média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$ ) em comparação ao grupo controle (veículo 10 mL/kg, v.o.). \* $p \leq 0,05$  e \*\*\*  $p \leq 0,001$  indicam o nível de significância das diferenças quando comparado com ao grupo controle utilizado.

#### 5.1.2. Dor Induzida pela Formalina (3%).

Na primeira fase (0-5 minutos) do teste de dor induzida pela formalina, os tratamentos com LQFM 147 (50 mg/kg v.o.) ou Indometacina (10 mg/kg v.o.) não reduziram significativamente o tempo de reatividade à dor, a redução foi: do valor controle (veículo 10 mL/kg v.o.) de  $51,3 \pm 2,65s$  para  $48 \pm 5,25s$ ;  $56,6 \pm 3,45s$ , respectivamente. Já o tratamento com a morfina (5 mg/kg s.c.) reduziu significativamente o tempo de reatividade a dor para  $5,37 \pm 2,85s$ . Na segunda fase (15-30 minutos), o tratamento com LQFM 147, Indometacina (10 mg/kg v. o.) ou

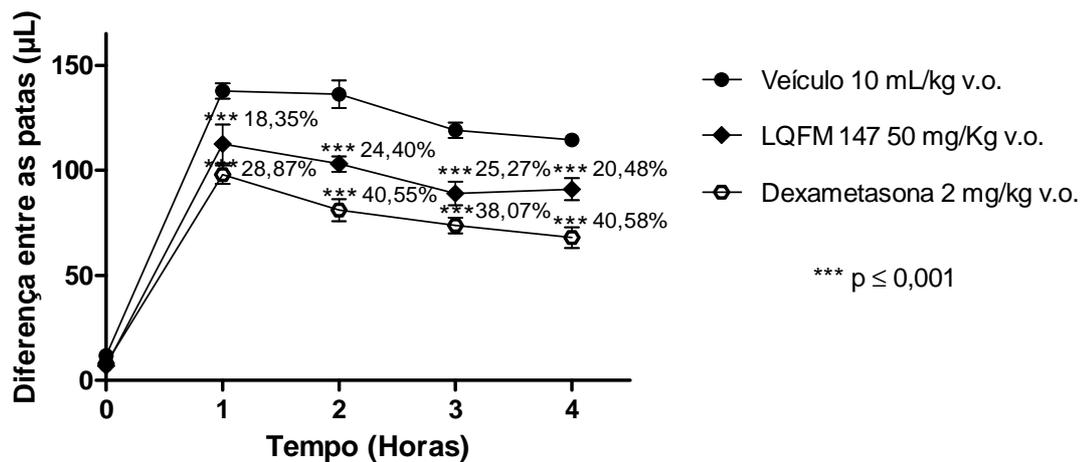
Morfina (5 mg/kg s.c.) reduziram significativamente o tempo de reatividade à dor: do valor controle (veículo 10 mL/kg v.o.) de  $223,6 \pm 13,525$ s para  $126,6 \pm 13,175$ s;  $79,25 \pm 12,715$ s;  $2 \pm 1,75$ s respectivamente (Figura 8).



**Figura 8:** Efeito de LQFM 147 no teste da dor induzida pela formalina, primeira fase (0-5 min) e segunda fase (15-30 min). As colunas e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M, do tempo de reatividade a dor dos animais (n=8) expresso em segundos. Indometacina (10 mg/kg, v.o.) e morfina (5 mg/kg, s.c.) foram utilizadas como controles positivos. \*\*\* =  $p \leq 0,001$  indica o nível de significância das diferenças entre os grupos tratados e o controle (Veículo 10 mL/kg, v.o.).

### 5.1.3. Edema de pata induzido por carragenina (1%).

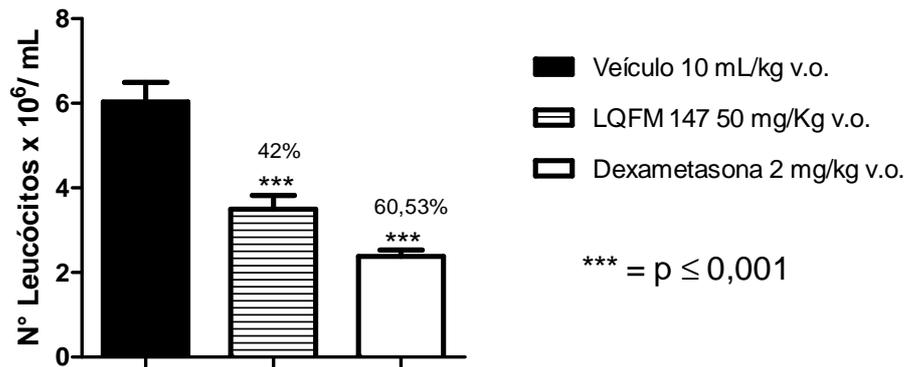
No edema de pata induzido por carragenina, os tratamentos com LQFM 147 (50 mg/kg v.o.) ou dexametasona (2 mg/kg v.o.) reduziram significativamente a formação do edema em todas as horas, comparando com o grupo controle (Veículo 10 mL/kg v.o.). As reduções da primeira hora: do valor controle (Veículo 10 mL/kg v.o.) de  $137,78 \pm 3,6$   $\mu$ L para  $112,5 \pm 9,21$   $\mu$ L;  $98 \pm 4,42$   $\mu$ L, respectivamente. Na segunda hora: do valor controle (Veículo 10 mL/kg v.o.) de  $136,25 \pm 6,5$   $\mu$ L para  $103 \pm 3,67$   $\mu$ L;  $81 \pm 5,26$   $\mu$ L, respectivamente. Na terceira hora: do valor controle (Veículo 10 mL/kg v.o.) de  $119,09 \pm 3,68$   $\mu$ L para  $89 \pm 5,67$   $\mu$ L;  $73,75 \pm 3,75$   $\mu$ L, respectivamente, e na quarta hora: do valor controle (Veículo 10 mL/kg v.o.) de  $114,44 \pm 1,76$   $\mu$ L para  $91 \pm 5,26$   $\mu$ L;  $68 \pm 4,9$   $\mu$ L, respectivamente (Figura 9).



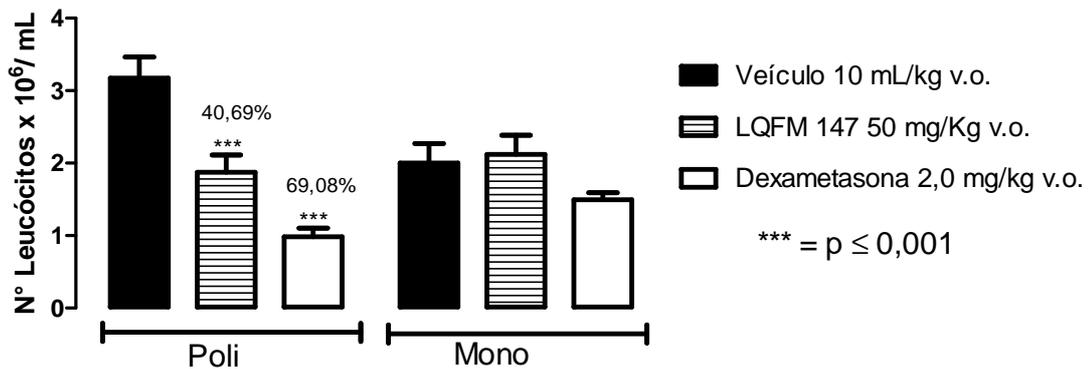
**Figura 9:** Efeito de LQFM 147 (50 mg/kg) no edema de pata induzido por carragenina(1%) p/v. Cada linha representa média ± E.P.M. das diferenças de volume (µL) entre as patas em diferentes tempos após a aplicação da carragenina na pata direita e salina na esquerda (n = 8). A Dexametasona (2 mg/kg, v.o.) foi utilizada como controle positivo. \*\*\* = p ≤ 0,001, indicam o nível de significância das diferenças entre os grupos tratados e o grupo controle (Veículo 10 mL/kg v.o.).

#### 5.1.4. Pleurisia induzida por carragenina (1%).

Na pleurisia induzida por carragenina, os tratamentos prévios com LQFM 147 (50 mg/kg v.o.) ou dexametasona (2 mg/kg v.o.) reduziram significativamente o número de leucócitos totais  $\times 10^6/\text{mL}$  migrados para a cavidade pleural: do valor controle (Veículo 10 mL/kg v.o.) de  $6,029 \pm 0,46$  para  $3,494 \pm 0,33$ ;  $2,375 \pm 0,15$ , respectivamente, (FIGURA 10). Na contagem diferencial de leucócitos, os mesmos tratamentos, reduziram o número de leucócitos polimorfonucleares do valor controle (Veículo 10 mL/kg v.o.) de  $3,170 \pm 0,29$  para  $1,876 \pm 0,24$ ;  $0,9826 \pm 0,12$ , respectivamente e não reduziram o número de leucócitos mononucleares, sendo do valor controle (Veículo 10 mL/kg v.o.) de  $2,004 \pm 0,268$ ;  $2,120 \pm 0,264$ ;  $1,499 \pm 0,097$ , respectivamente (Figura 11).



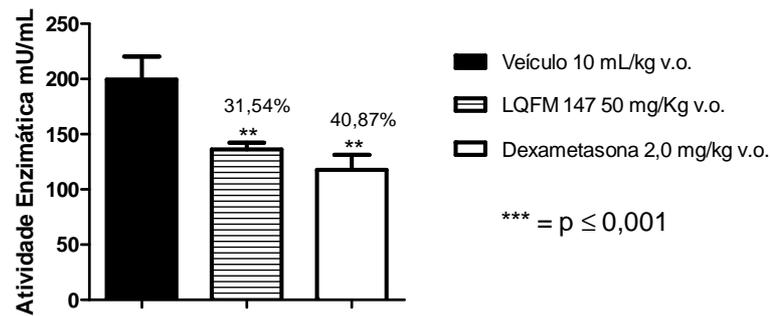
**Figura 10:** Efeito de LQFM 147 (50 mg/kg v.o.) na migração leucocitária avaliada no método de pleurisia induzida por carragenina em camundongos. As colunas e barras representam as médias  $\pm$  E.P.M. ( $n = 9$ ), do número de leucócitos totais migrados  $\times 10^6$  mL. A dexametasona (2 mg/kg v.o.) foi utilizada como controle positivo. \*\*\*  $p \leq 0,001$  indica o nível de significância das diferenças entre os grupos tratados e o grupo controle Veículo (10 mL/kg v.o.).



**Figura 11:** Efeito de LQFM 147 (50 mg/kg v.o.) na contagem diferencial de leucócitos Polimorfonucleares e mononucleares. As colunas e barras representam as médias  $\pm$  E.P.M. ( $n = 8$ ), do número de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares migrados  $\times 10^6$  mL. A dexametasona (2 mg/kg v.o.) foi utilizada como controle positivo. \*\*\*  $p \leq 0,001$  indica o nível de significância das diferenças entre os grupos tratados e o grupo controle Veículo (10 mL/kg v.o.).

### 5.1.5. Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

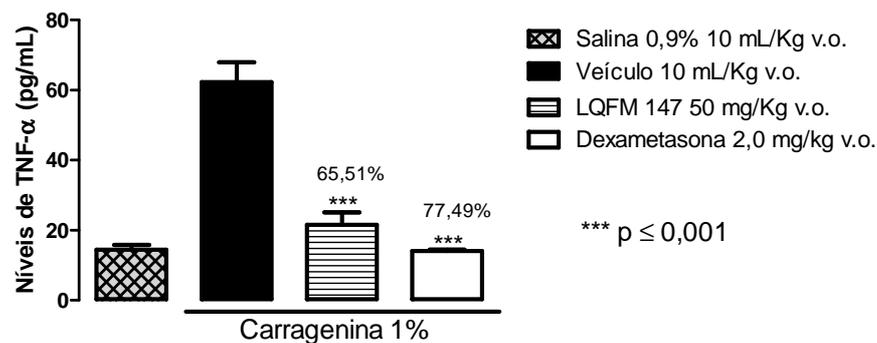
Na avaliação da atividade da enzima MPO no exsudato pleural, os tratamentos com LQFM 147 (50 mg/kg v.o.) ou Dexametasona (2 mg/kg v.o.) reduziram significativamente a atividade da enzima MPO mU/mL: do valor controle (Veículo 10 mL/kg v.o.) de  $194,4 \pm 20,95$  mU/mL para  $136,5 \pm 5,66$ ;  $117,9 \pm 13,48$  mU/mL, respectivamente (Figura 12).



**Figura 12:** Efeito de LQFM 147 (50 mg/kg v.o.) na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) avaliada no método de pleurisia induzida por carragenina em camundongos. As colunas e barras representam as médias  $\pm$  E.P.M.. A dexametasona (2 mg/kg v.o.) foi utilizada como controle positivo. \*\*  $p \leq 0,01$  indica o nível de significância das diferenças entre os grupos tratados e o grupo controle Veículo (10 mL/kg v.o.).

### 5.1.6. Quantificação dos níveis de TNF- $\alpha$ .

O tratamento com LQFM 147 (50 mg/kg v.o.) foi capaz de reduzir significativamente os níveis de TNF- $\alpha$  (pg/mL) no exsudato pleural do valor controle (Veículo 10 mL/kg v.o.) de  $62,28 \pm 5,63$  para  $21,48 \pm 3,62$ . O controle positivo dexametasona (2 mg/kg v.o.) reduziu os níveis de TNF- $\alpha$  para  $14,02 \pm 0,39$  (Figura 13).



**Figura 13:** Efeito de LQFM 147 (50 mg/kg v.o.) na dosagem de TNF- $\alpha$  em exsudato pleural de camundongos com pleurisia induzida por carragenina. As colunas e barras verticais representam as médias  $\pm$  E.P.M., da concentração de TNF- $\alpha$  no exsudato pleural dos animais. Dexametasona (2 mg/kg v.o.) foi utilizada como controle positivo. \*\*\*  $p \leq 0,001$  indica o nível de significância das diferenças quando comparado com o grupo controle Veículo (10 mL/kg v.o.).

***Discussão***

## 6. Discussão

A inflamação e a dor são respostas vitais de proteção do organismo contra diferentes estímulos agressivos. Porém, quando persistentes passam a ser prejudiciais ao organismo. Dessa forma, a inflamação e a dor devem ser controladas, seja com mecanismos intrínsecos ou com medicamentos com ação anti-inflamatória e/ou analgésica. Na perspectiva de desenvolvimento de um novo protótipo de fármaco foi avaliada a atividade antinociceptiva e/ou anti-inflamatória do composto LQFM 147 em modelos agudos de nocicepção e de inflamação em camundongos.

O primeiro teste empregado foi o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Considerado um teste pouco específico, porém, de alta sensibilidade a fármacos antinociceptivos de diferentes classes terapêuticas, é uma excelente ferramenta de triagem para avaliação da atividade analgésica de novos protótipos anti-inflamatórios (123, 124). O ácido acético injetado por via intraperitoneal induz a liberação de mediadores endógenos como histamina, serotonina, bradicinina, citocinas e prostaglandinas, que estimulam os neurônios nociceptivos e dessa forma promovem as contorções abdominais (124, 125). Podemos destacar a liberação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  que além dos mediadores clássicos também são liberados visto que o tratamento com anticorpos contra esses mediadores inibem as contorções abdominais (52).

Os animais previamente tratado com LQFM 147 (25, 50 e 100 mg/kg v.o.), tiveram uma redução no número de contorções induzidas pelo ácido acético em 16,79; 32,97 e 46,04%, respectivamente. Como os intervalos de doses utilizados no composto demonstraram um efeito dose-dependente, foi selecionada a dose intermediária para dar continuidade aos demais testes.

O teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, apesar de ter alta sensibilidade a fármacos com atividade analgésica, pode sofrer influência de fármacos com outras propriedades como depressores do sistema nervoso central, relaxantes musculares, anti-histamínicos, entre outros (116,126). Portanto, devido à baixa especificidade, faz-se necessária a utilização de outros métodos para comprovar a atividade antinociceptiva detectada para descartar falsos positivos e distinguir o tipo de dor que está sendo reduzida.

Dessa forma, foi utilizado o teste de dor induzida pela formalina. Este teste possui duas fases distintas que permitem avaliar dois tipos de dor: a primeira fase ocorre nos primeiros 5 minutos após a aplicação da formalina e corresponde à dor neurogênica. Ela acontece devido à estimulação química direta dos nociceptores pela formalina, além da participação de mediadores como serotonina, substância P, cininas, histamina e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). A segunda fase ocorre entre 15-30 minutos após a aplicação da formalina e corresponde a dor inflamatória que está relacionada com o envolvimento de vários mediadores pró-inflamatórios como histamina, bradicinina, serotonina, prostaglandinas, taquicininas e glutamato, responsáveis pela estimulação de nociceptores (117, 118, 127).

O tratamento dos animais com o composto LQFM 147 reduziu o tempo de reatividade à dor somente na segunda fase em 43,38%. O resultado obtido neste teste sugere que este composto possui ação antinociceptiva dependente de seu efeito anti-inflamatório, visto que há uma redução significativa apenas na segunda fase do teste. Fármacos que atuam no sistema nervoso central como opióides reduzem o tempo de reatividade à dor semelhantemente em ambas as fases, mas, fármacos de ação periférica como indometacina e dexametasona reduzem somente a segunda fase (128).

Para confirmar a atividade anti-inflamatória observada na segunda fase do teste da formalina, foi realizado o teste de edema de pata induzido por carragenina. O desenvolvimento de edema de pata em camundongos após a injeção de carragenina é caracterizada pelo aparecimento de exsudato inflamatório e o envolvimento de múltiplos mediadores inflamatórios. Imediatamente após a aplicação de carragenina são observados os sinais clássicos da inflamação como edema, hiperalgesia e vermelhidão. As primeiras duas horas após a aplicação da formalina é principalmente proveniente da liberação de agentes pró-inflamatórios, incluindo a histamina, serotonina e bradicinina, já nas horas seguintes podem estar relacionado com a liberação de prostaglandinas (129, 130).

A inflamação induzida por carragenina neste teste é amplamente utilizada para avaliar novos compostos com atividade anti-inflamatória. A carragenina é um polissacarídeo extraído de algas, que induz resposta inflamatória local mensurável. A formação do edema é proveniente de uma leve vasoconstrição, seguida de

dilatação, aumento do fluxo local e da permeabilidade vascular, que resulta no extravasamento do conteúdo proteico do plasma para o interstício (131, 132).

Os dados obtidos demonstraram que o tratamento com o composto LQFM 147 foi capaz de reduzir o edema em todas as horas após a aplicação da carragenina. A redução foi de 18,35% na primeira hora, 24,40% na segunda hora, 25,27% na terceira hora e 20,48% na quarta hora, mostrando assim, que este composto possui atividade anti-edematogênica semelhante ao controle positivo dexametasona, e um efeito anti-inflamatório que ratifica a ação antinociceptiva encontrada na segunda fase do teste da formalina.

Outro teste realizado para confirmar o efeito anti-inflamatório do composto foi o teste de pleurisia induzida por carragenina que avalia a migração de leucócitos para o local da inflamação. A carragenina é um polissacarídeo, como já mencionado, que provoca inflamação aguda envolvendo a liberação sequencial de vários mediadores pró-inflamatórios, em especial histamina, serotonina, cininas, prostaglandinas e tromboxanos (133, 134).

O teste de pleurisia induzida por carragenina é caracterizado pelo acúmulo de exsudato na cavidade pleural, bem como o influxo rápido de células polimorfonucleares, seguido de infiltração de células mononucleares. Este teste permite a quantificação de leucócitos que migram para a cavidade pleural que se dá pela ação de agentes quimiotáticos, principalmente os leucotrienos e as interleucinas, além disso, é sensível à ação de fármacos anti-inflamatórios (120, 134, 135).

O processo de migração leucocitária é constituído por eventos como marginalização, rolamento de leucócitos, aderência e o processo de transmigração para o local lesionado. Fármacos com atividade anti-inflamatória podem reduzir a migração leucocitária através da inibição da síntese e/ou liberação de mediadores quimiotáticos ou do bloqueio de alguma fase da migração leucocitária. As citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 são atuantes na migração celular por promover quimiotaxia dos leucócitos e expressão de moléculas de adesão (136, 137).

O tratamento prévio dos animais com o composto LQFM 147 reduziu o número de leucócitos totais migrados para a cavidade pleural em 42%. Quando avaliado a contagem diferencial de leucócitos o tratamento com o composto LQFM 147 reduziu significativamente o número de leucócitos polimorfonucleares em 40,69% e não

reduziu o número de leucócitos mononucleares, mostrando também nesse modelo, sua propriedade anti-inflamatória e confirmando os efeitos observados na segunda fase da formalina e no teste de edema de pata induzido por carragenina.

Dentre os leucócitos polimorfonucleares os neutrófilos são as células mais abundantes no sangue e estão entre as primeiras a migrarem para o foco inflamatório, onde ocorre degranulação liberando no meio extracelular, mediadores importantes para sua ação bactericida como a mieloperoxidase. Esta enzima é capaz de reagir com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e gerar espécies reativas de oxigênio (radicais livres) tóxicas para o microrganismo, desempenhando um papel importante na resposta imune inata, para a defesa do organismo contra bactérias, parasitas, vírus e outros agentes (9, 138, 139).

No entanto, outros derivados da MPO como o ácido hipocloroso (HClO), desencadeiam danos oxidativos em proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e outros, danificando o tecido do hospedeiro. O ácido hipocloroso (HClO) pode induzir alterações das células endoteliais e afetar a função endotelial, diminuindo a aderência de proteínas da matriz extracelular de células endoteliais. A MPO quando se liga às integrinas CD11b/CD18 nos PMNs, induzem uma cascata de reações intracelulares que levam a um aumento na degranulação de PMNs e na expressão de CD11b de maneira autócrina, levando a um aumento na liberação de MPO (140, 141, 142).

Esta enzima é comumente usada como um marcador de infiltração de granulócitos, sua inibição é indicativo de atividade anti-inflamatória. Além disso, sua quantificação nos permite inferir indiretamente a quantidade de neutrófilos presentes num tecido inflamado (9, 138, 143). Neste sentido, foi avaliada a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) com intuito de investigar o mecanismo de ação envolvido no efeito anti-inflamatório de LQFM 147.

O tratamento com o composto LQFM 147 reduziu a atividade da enzima MPO no exsudato pleural em 31,54%, confirmando o resultado obtido na contagem total e diferencial de leucócitos.

Os macrófagos são células muito importantes na resposta imune e na fisiopatologia ou patofisiologia da inflamação, promovendo fagocitose de microorganismos bem como a liberação de mediadores como  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\beta$ . Estes mediadores podem ativar células endoteliais produzindo selectinas, que iniciam o processo de adesão dos leucócitos ao endotélio (40, 144).

O TNF- $\alpha$  é um dos mais importantes mediadores pró-inflamatórios da classe das citocinas que contribui para o desenvolvimento da dor inflamatória por intermédio de outras citocinas e a partir da sensibilização de nociceptores, estimula a expressão do gene da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em certos tipos de células, também induz a quimiotaxia de neutrófilos e linfócitos T e a expressão de moléculas de adesão, mediando a migração de neutrófilos para tecidos inflamado (4, 145, 146).

Uma forma de elucidar o mecanismo de ação de determinados fármacos capazes de atenuar os sinais inflamatórios é o doseamento de citocinas e enzimas envolvidas no processo inflamatório (147, 148). Neste contexto, além da avaliação atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) foi feito a quantificação dos níveis de TNF- $\alpha$  no exsudato pleural.

O tratamento com LQFM 147 foi capaz de reduzir os níveis de TNF- $\alpha$  no exsudato pleural em 65,51%, confirmando a atividade anti-inflamatória observados nos modelos anteriores. A redução dos níveis de TNF- $\alpha$  pode ser responsável pela redução na migração celular e redução do edema, visto que o TNF- $\alpha$  induz a quimiotaxia de leucócitos e expressão de moléculas de adesão facilitando o influxo de células para o tecido. Essa redução também pode influenciar na redução da dor vista anteriormente, pois TNF- $\alpha$  contribui para a hiperalgesia com a sensibilização das fibras nociceptoras (148).

Os resultados encontrados nos testes realizados com o composto LQFM 147 neste trabalho confirmam a atividade anti-inflamatória, bem como uma ação antinociceptiva dependente deste efeito.

***Conclusão***

## 7. Conclusão

Com base nos resultados obtidos com o composto LQFM 147 neste estudo, conclui-se que:

- O composto LQFM 147 possui atividade antinociceptiva, pois foi capaz de reduzir o número de contorções abdominais induzida por ácido acético e reduzir o tempo de reatividade à dor na segunda fase do teste da dor induzida pela formalina (fase inflamatória), sugerindo que este efeito antinociceptivo depende de um efeito anti-inflamatório.
- A atividade anti-inflamatória do composto LQFM 147, observada na 2ª fase do teste de dor induzida pela formalina (dor inflamatória) foi confirmada nos testes de edema de pata induzida por carragenina e pleurisia induzida por carragenina.
- O efeito anti-inflamatório e antinociceptivo do composto LQFM 147 envolve a redução da migração de leucócitos polimorfonucleares, confirmada pela redução da atividade da enzima mieloperoxidase, bem como a redução nos níveis de TNF- $\alpha$ .

Em resumo:

- O composto LQFM 147, possui efeito anti-inflamatório e antinociceptivo que envolve a redução da migração de leucócitos polimorfonucleares e dos níveis de TNF- $\alpha$ .

## ***Referências Bibliográficas***

## 8. Referências Bibliográficas

1. Carvalho WA, Lemônica L. Mecanismos Celulares e Moleculares da Dor Inflamatória. Modulação Periférica e Avanços Terapêuticos. *Rev Bras Anesthesiol* 1998;48(2):137-58.
2. Bhatia S, Sharma K, Sharma A, Nagpal K, Bera T. Anti-inflammatory, Analgesic and Antiulcer properties of *Porphyra vietnamensis*. *Avicenna J Phytomed*. 2015 Jan-Feb;5(1):69–77.
3. Tedgui A. Focus on inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 May;31(5):958-9.
4. Freire MO, Dyke TEV. Natural resolution of inflammation. *Periodontol* 2000. 2013 Oct;63(1):149-64
5. Schultzautor M. Rudolf Virchow. *Emerg Infect Dis*. 2008 setembro; 14 (9): 1480-1481.
6. Serhan CN. Systems approach with inflammatory exudates uncovers novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2008 Sep-Nov;79(3-5):157-63.
7. Chiu YJ, Huang TH, Chiu CS, Lu TC, Chen YW, Peng WH, Chen CY. Analgesic and Antiinflammatory Activities of the Aqueous Extract from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Both In Vitro and In Vivo. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012;2012:508137.
8. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol* 2006 Nov 30;72(11):1605-21.
9. Cruvinel WM, Júnior MD, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Silva NP, Andrade LEC. Sistema imunitário – parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev. Bras. Reumatol*. 2010 Sept./Oct.;50(4):434-61.
10. Gomes ELFD, Costa D. Evaluation of functional, autonomic and inflammatory outcomes in children with asthma. *World J Clin Cases*. Mar 16, 2015;3(3):301-09.
11. Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity* 2014 Mar 20;40(3):315-27.
12. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran. *Patologia – Bases patológicas das doenças*. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. 49–79.

13. Héliida Maria de Lima Maranhão. Atividades Anti-Inflamatória, Antiulcerogênica, Hepatoprotetora e Segurança De Uso Do Extrato Aquoso da Casca do Caule de Simarouba amara Aublet (Simaroubaceae). Recife. Tese [Doutorado em Ciências Farmacêuticas]. Universidade Federal de Pernambuco; 2014.
14. Kawahara K, Hohjoh H, Inazumi T, Tsuchiya S, Sugimoto Y. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochim Biophys Acta* 2015 Apr;1851(4):414-21.
15. Meager A. Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999 Mar;10(1):27-39.
16. Inwald D, Davies EG, Klein N. Demystified...adhesion molecule deficiencies. *Mol Pathol* 2001 Feb;54(1):1-7.
17. Chang CZ, Wu SC, Lin CL, Kwan AL. Valproic acid attenuates intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin through a chemokine ligand 5 dependent mechanism and subarachnoid hemorrhage induced vasospasm in a rat model. *J Inflamm (Lond)* 2015;12:27.
18. Mesquita JrD, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Silva NP, Andrade LEC, Cruviel WM. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. *Sinopse de Reumatologia*, São Paulo 20 ago. 2008;66 - 81.
19. Idzko M, la Sala A, Ferrari D, Panther E, Herouy Y, Dichmann S, Mockenhaupt M, Di Virgilio F, Girolomoni G, Norgauer J. Expression and function of histamine receptors in human monocyte-derived dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 2002 May;109(5):839-46.
20. Marina Ázer Mazoti. Perfil de Citocinas Inflamatórias em indivíduos submetidos a procedimentos utilizando propofol ou isoflurano. Botucatu. Dissertação [mestrado em Patologia]. Universidade Estadual Paulista "Julio Mesquita Filho";2009.
21. Takeshita K, Bacon KB, Gantner F. Critical role of L-selectin and histamine H4 receptor in zymosan-induced neutrophil recruitment from the bone marrow: comparison with carrageenan. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Jul;310(1):272-80.
22. Makrides SC. Therapeutic inhibition of the complement system. *Pharmacol Rev*. 1998;50:59-87.
23. Montenegro, M. R.; Franco, M. *Patologia: processos gerais*. 4. ed. São Paulo: Ateneu, 2008.

24. Robins SL, Cotran RS. Bases Patológicas das Doenças. Abul K. Abbas, Vinay Kumar, Nelson Fausto. Elsevier Editora Ltda.2005(7). Cap.2:77.
25. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):428-35.
26. Rang HP, Dale MM. *Farmacologia*. 7° ed. Rio de Janeiro 2011.
27. Moraes MS, Costa PE, Batista WL, Paschoalin T, Curcio MF, Borges RE, Taha MO, Fonseca FV, Stern A, Monteiro HP. Endothelium-derived nitric oxide (NO) activates the NO-epidermal growth factor receptor-mediated signaling pathway in bradykinin-stimulated angiogenesis. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Sep 15;558:14-27.
28. Meves H. Arachidonic acid and ion channels: an update. *Br J Pharmacol*. 2008;155(1):4-16.
29. Gao F, Kieseewetter D, Chang L, Rapoport SI, Igarashi M. Quantifying conversion of linoleic to arachidonic and other n-6 polyunsaturated fatty acids in unanesthetized rats. *J Lipid Res*. 2010;51(10):2940-6.
30. Tessaro FH, Ayala TS, Martins JO. Lipid mediators are critical in resolving inflammation: a review of the emerging roles of eicosanoids in diabetes mellitus. *Biomed Res Int*. 2015;2015:568408.
31. Hilário MOE, Terreri MT, Len CA. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. *J. Pediatr*. 2006;82(5).
32. Pereira R, Medeiros YS, Frode TS. Antiinflammatory effects of Tacrolimus in a mouse modelo f pleurisy. *Transpl Immunol*. 2006 Aug;16(2):105-11.
33. Brunton, L.L. Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 12ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.
34. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(5):986-1000.
35. Shureiqi I, Lippman SM. Lipoyxygenase modulation to reverse carcinogenesis. *Cancer Res*. 2001;61(17):6307-12.
36. Godson C, Mitchell S, Harvey K, Petasis NA, Hogg N, Brady HR. Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J Immunol*. 2000;164(4):1663-7.
37. Mitchell S, Thomas G, Harvey K, Cottell D, Reville K, Berlasconi G, et al. Lipoxins, aspirin-triggered epi-lipoxins, lipoxin stable analogues, and the resolution of inflammation: stimulation of macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils in vivo. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(10):2497-507.

38. Ryan A, Godson C. Lipoxins: regulators of resolution. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10(2):166-72.
39. Cotran, R.S.; Kumar, V.; Collins, T. *Patologia Estrutural e Funcional.* 7ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.
40. Oliveira CMB, Sakata RK, TSA, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Citocinas e dor. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 2011;61(2):255-65.
41. Tonet AC, Nóbrega OT. Imunossenescência: a relação entre leucócitos, citocinas e doenças crônicas. *Rev. Bras. Geriatr. Gerontol.* 2008;11:259-73.
42. Kartal ED, Karkac E, Gulbas Z, Alpat SN, Erben N, Colak E. Several Cytokines and Protein C Levels with the Apache II Scoring System for Evaluation of Patients with Sepsis. *Balkan Med J* 2012 Jun;29(2):174-8.
43. Silva AC, Alves RC, Pinheiro L. S.. As Implicações da Caquexia no Câncer. *e-Scientia*, 2012; 5(2)49-56.
44. Verri WAJr, Cunha TM, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ. Cytokine inhibitors and pain control. *Rev. Bras. Reumatol.* 2007;47(5)341-53.
45. Rodolfo Gonzalez Camargo. Papel da via de sinalização do NF-  $\kappa$ B na inflamação do tecido adiposo subcutâneo de pacientes com caquexia associada ao câncer. Dissertação [Mestrado em Biologia Celular e Tecidual]. Universidade de São Paulo; 2012.
46. Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery.* 2000 Feb;127(2):117-26.
47. Gomes MAM, Neto NCM, Bispo IGA. Interleucina-6, Moléculas de Adesão Intercelular-1 e Microalbuminúria na Avaliação da Lesão Endotelial: Revisão de Literatura. *Rev SOCERJ.* 2009;22(6):398-403.
48. Vianna HR, Soares CMBM, Tavares MS, Teixeira MM, Silva AC. Inflammation in chronic kidney disease: the role of cytokines. *J Bras Nefrol.* 2011 Jul-Sep;33(3):351-64.
49. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and câncer. *Nature.* 2002 Dec 19-26;420(6917):860-7.
50. Rollins BJ. Inflammatory chemokines in cancer growth and progression. *Eur J Cancer.* 2006 Apr;42(6):760-7.
51. Guerreiro R, Santos-Costa Q, Azevedo-Pereira JM. As quimiocinas e os seus receptores, *Acta Med Port.* 2011; 24(S4):967-976.

52. Verri WAJr, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther.* 2006 Oct;112(1):116-38.
53. Norling LV, Serhan CN. Profiling in resolving inflammatory exudates identifies novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators and signals for termination. *J Intern Med.* 2010 Jul;268(1):15-24.
54. Nestler, E.J.; Hyman, S.E.; Malenka, R.C. *Molecular neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience.* New York: Macgraw-Hill, 2001.
55. Muri EMF, Sposito MMM, Metsavaht L. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and their local pharmacology. *Acta Fisiatr.* 2009;16(4):186-90.
56. Linley JE, Rose K, Ooi L, Gamper N. Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. *Pflugers Arch.* 2010 Apr;459(5):657-69.
57. Loeser JD, Melzack R. Pain: an overview. *Lancet.* 1999 May 8;353(9164):1607-9.
58. Searle RD, Bennett MI. Pain assessment. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine.* 2008 Jan;9(1):13–15
59. Rocha APC, Kraychete DC, Lemônica L, Carvalho LR, Barros GAM, Garcia JBS, Sakata RK. DOR: Aspecto Atuais da Sensibilização Periférica e Central. *Rev Bras Anesthesiol.* 2007;57(1):94-105.
60. Navas, J. M. P.; González, A. M. M. Bases neuromédicas del dolor. *Clínica y Salud,* 2008;19(3):277-93.
61. Beirith A, Santos AR, Calixto JB. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res.* 2002 Jan 11;924(2):219-28.
62. Nickel FT, Seifert F, Lanz S, Maihöfner C. Mechanisms of neuropathic pain. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2012 Feb;22(2):81-91.
63. Schestatsky P. Definição, Diagnóstico e Tratamento da Dor Neuropática. *Rev HCPA* 2008;28(3):177-87.
64. Cunha MT. Mecanismos moleculares envolvidos no efeito antinociceptivo produzido pela ação periférica dos opióides: ativação da via de sinalização intracelular pi3ky/akt/óxido nítrico. Tese [Doutorado em Farmacologia] Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2008.

65. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001 Sep 13;413(6852):203-10.
66. Klaumann PR, Wouk AFPF, Sillas T. Patofisiologia da Dor. *Archives of Veterinary Science*. 2008;13(1):1-12.
67. Parsadaniantz SM, Rivat C, Rostene W, Goazigo AR-L. Opioid and chemokine receptor crosstalk: a promising target for pain therapy? *Nat Rev Neurosci [Progress]* 2015;16(2):69-78.
68. Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*. 1999 Jan;57(1):1-164.
69. Julius D. TRP channels and pain. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2013; 29:355-84.
70. Wu LJ, Sweet TB, Clapham DE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol Rev*. 2010 Sep;62(3):381-404.
71. Nelson PL, Beck A, Chen H. Transient receptor proteins illuminated: current views on TRPs and disease. *Vet J*. 2011 Feb;187(2):153-64.
72. Moran MM, McAlexander MA, Bíró T, Szallasi A. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2011 Aug 1;10(8):601-20.
73. Nieto-Posadas A, Jara-Oseguera A, Rosenbaum T. TRP channel gating physiology. *Curr Top Med Chem*. 2011;11(17):2131-50.
74. McKemy DD, Neuhausser WM, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*. 2002 Mar 7;416(6876):52-8.
75. Szallasi A, Cortright DN, Blum CA, Eid SR. The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 May;6(5):357-72.
76. Zheng J. Molecular mechanism of TRP channels. *Compr Physiol*. 2013 Jan;3(1):221-42.
77. Deval E, Noël J, Lay N, Alloui A, Diochot S, Friend V, Jodar M, Lazdunski M, Lingueglia E. ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. *EMBO J*. 2008 Nov 19;27(22):3047-55.
78. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009 Oct 16;139(2):267-84.
79. Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*. 1998 Apr;54(5):581-618.

80. Fundytus ME, Yashpal K, Chabot JG, Osborne MG, Lefebvre CD, Dray A, et al. Knockdown of spinal metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR(1)) alleviates pain and restores opioid efficacy after nerve injury in rats. *Br J Pharmacol*. 2001 Jan;132(1):354-67.
81. Pinheiro MM, Radulovic NS, Miltojevic AB, Boylan F, Dias Fernandes P. Antinociceptive esters of N-methylantranilic acid: Mechanism of action in heat-mediated pain. *Eur J Pharmacol*. 2014 Mar 15;727:106-14.
82. Muñoz, M., Coveñas, R. Involvement of substance P and the NK-1 receptor in human pathology. *Amino Acids*. 2014 Jul;46(7):1727-50.
83. Li M, Shang YX, Wei B, Yang YG. The effect of substance P on asthmatic rat airway smooth muscle cell proliferation, migration, and cytoplasmic calcium concentration in vitro. *J Inflamm (Lond)*. 2011;8(1):18.
84. Fantoni D. Tratamento da dor na clínica de pequenos animais. Rio de Janeiro 2012.
85. Oku, R.; Satoh, M.; Fujii, N.; Otaka, A.; Yajima, H.; Takagi, H. Calcitonin gene-related peptide promotes mechanical nociception by potentiating release of substance P from the spinal dorsal horn in rats. *Brain Res*. 1987 Feb 17;403(2):350-4.
86. Bileviciute I, Stenfors C, Theodorsson E, Lundeberg T. Unilateral injection of calcitonin gene-related peptide (CGRP) induces bilateral oedema formation and release of CGRP-like immunoreactivity in the rat hindpaw. *Br J Pharmacol*. 1998 Nov;125(6):1304-12.
87. Schaible HG, Schmelz M, Tegeder I. Pathophysiology and treatment of pain in joint disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006 May 20;58(2):323-42.
88. Farquhar-Smith WP. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 2008 Jan;9(1) 3–7
89. Noback CR, Strominger NL, Dmarest RJ. The human nervous system: structure and function. Pain and temperature, 5a ed. Williams & Wilkins, New York, 1996. p. 123-37.
90. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neurociência – Desvendando o Sistema Nervoso. Porto Alegre: Artmed, 2ª ed., 2002.
91. Stahl, Stephen M. Dor e o Tratamento de Fibromialgia e de síndromes Somáticas Funcionais. In: Psicofarmacologia: bases neurocientíficas e aplicações práticas / Stephen M. Stahl; com ilustrações de Nancy Muntner; assistente editorial

- Meghan M. Grady; supervisão da edição brasileira Irismar Reis de Oliveira e Eduardo Pondé de Sena. –[Reimpr.]. –Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
92. Lüllmann, H.; Mohr, K.; Bieger, D.; Ziegler, A. Color Atlas of Pharmacology. New York: Thieme Stuttgart, 2 ed., p. 196-201, 2000.
93. Loeser, J D.; Butler, S.H; Chapman, C.R.; Turk, D.C (eds). Bonica's Management of Pain. 3ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
94. Millan, M.J. Descending control of pain. Prog Neurobiol. 2002 Apr;66(6):355-474.
95. Yoshimura M.; Furue H. Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. J. Pharmacol. Sci. 2006 Jun;101(2):107-17.
96. Ossipov, M.H., Dussor, G.O., Porreca, F. Central modulation of pain. J Clin Invest. 2010;120(11):3779–3787.
97. Yadav MR1, Nimekar DM, Ananthakrishnan A, Brahmkshatriya PS, Shirude ST, Giridhar R, Parmar A, Balaraman R. Synthesis of new chemical entities from paracetamol and NSAIDs with improved pharmacodynamic profile. Bioorg Med Chem. 2006 Dec 15;14(24):8701-6.
98. Munir MA, Enany N, Zhang JM. Nonopioid analgesics. Anesthesiol Clin. 2007 Dec;25(4):761-74.
99. Nagi R, Yashoda Devi BK, Rakesh N, Reddy SS, Patil DJ. Clinical implications of prescribing nonsteroidal anti-inflammatory drugs in oral health care--a review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2015 Mar;119(3):264-71.
100. Knotkova H1, Pappagallo M. Adjuvant analgesics. Anesthesiol Clin. 2007 Dec;25(4):775-86.
101. Filho MMM, Rahal SC. O uso de antiinflamatórios inibidores COX II seletivos na osteoartrite canina. Vet e Zootec, 2008;15(3)407-15.
102. Perez RG, Guedes PP, Vives R, Canto G. Antinflamatorios inibidores selectivos de la cicloxigenasa-2 (COX-2). Alergol Inmunol Clin 2002; 17: 247-254.
103. Chan FK, Graham DY. Review article: prevention of non-steroidal anti-inflammatory drug gastrointestinal complications--review and recommendations based on risk assessment. Aliment Pharmacol Ther. 2004 May 15;19(10):1051-61.
104. Bertolini A, Ottani A, Sandrini M. Selective COX-2 inhibitors and dual acting anti-inflammatory drugs: critical remarks. Curr Med Chem. 2002 May;9(10):1033-43.

105. Silva JM, Mendonça PP, Partata AK. Anti-Inflamatórios Não-Esteróides e suas Propriedades. *Revista Científica do ITPAC, Araguaína*, Outubro 2014;7(4).
106. Davies NM, Watson MS. Clinical pharmacokinetics of sulindac. A dynamic old drug. *Clin Pharmacokinet*. 1997 Jun;32(6):437-59.
107. Gala, M.; Sun, R.; Yang, V. W. Inhibition of cell transformation by sulindac sulfide of confined to specific oncogenic pathways. *Cancer Lett*. 2002 Jan 10; 175(1): 89–94.
108. Taylor MT, Lawson KR, Ignatenko NA, Marek SE, Stringer DE, Skovan BA, Gerner EW. Sulindac sulfone inhibits K-ras-dependent cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells. *Cancer Res*. 2000 Dec 1;60(23):6607-10.
109. Leite S. Estudo da toxicidade induzida pelo antiinflamatório sulindaco e seus metabólitos sulfona e sulfeto. Tese de Doutorado. Faculdade de ciências farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
110. Liu JF. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and cancer, with an especial focus on esophageal cancer. *Asian Pacific J. Cancer Prev*. 2011;12(12):3159-68.
111. Manjiani D, Paul DB, Kunnumpurath S, Kaye AD, Vadivelu N. Availability and Utilization of Opioids for Pain Management: Global Issues. *Ochsner J*. 2014 Verão; 14 (2): 208-215.
112. Florentino IF, Galdino PM, Oliveira LP, Silva DP, Pazini F, Vanderlinde FA, Lião LM, Menegatti R, Costa EA. Involvement of the NO/cGMP/KATP pathway in the antinociceptive effect of the new pyrazole 5-(1-(3-fluorophenyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2H-tetrazole (LQFM-021). *Nitric Oxide*. 2015 May 1;47:17-24.
113. Florentino IF, Silva DP, Lino RC, Silva TS, Tonussi CR, Menegatti R, Costa EA. Mechanisms involved in the anti-inflammatory activity of the new pyrazole compound 5-(1-(3-fluorophenyl)-1H-pyrazol-4-yl)-2H-tetrazole (LQFM-021). In: *The 12th World Congress on Inflammation. Inflammation Research* 2015 August, 64(2);51-248.
114. Ramos Martins D1, Pazini F, de Medeiros Alves V, Santana de Moura S, Morais Lião L, Torquato Quezado de Magalhães M, Campos Valadares M, Horta Andrade C, Menegatti R, Lavorenti Rocha M. Synthesis, docking studies, pharmacological activity and toxicity of a novel pyrazole derivative (LQFM 021)--possible effects on phosphodiesterase. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2013;61(5):524-31.

115. Hendershot LC, Forsarth J. Antagonism of the frequency of phenylquinone-induced writhing in the mouse by weak analgesics and nonanalgesics. *J Pharmacol Exp Ther.* 1959 Mar;125(3):237-40.
116. Koster R, Andersons M, Debber EJ. Acetic acid analgesic screening. *Faseb. J.* 1959;89:418-420.
117. Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain.* 1987 Jul;30(1):103-14.
118. Passos GF, Fernandes ES, DA Cunha FM, Ferreira J, Pianowski LF, Campos MM, Calixto JB. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *J Ethnopharmacol.* 2007 Mar 21;110(2):323-33.
119. Vinegar R, Truax JF, Selph JL. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*,1973;143( 3):711-4.
120. Saleh TS, Calixto JB, Medeiros YS. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides.* 1999;20(8):949-56.
121. Sedgwick AD. Initiation of inflammatory response and its prevention. In: Bonta IL, Bray MA, editors. *Handbook of inflammation*. New York: Elsevier, 1995:253–61.
122. Sokal R.R.; Rohlf F.J. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, 2nd. WH Freeman & Co: New York, 1981;859.
123. Zakaria ZA, Abdul Ghani ZD, Raden Mohd Nor RN, Gopalan HK, Sulaiman MR, Abdullah FC. Antinociceptive and antiinflammatory activities of *Dicranopteris linearis* leaves chloroform extract in experimental animals. *Yakugaku Zasshi.* 2006 Nov;126(11):1197-203.
124. Fischer LG, Santos D, Serafin C, Malheiros A, Delle Monache F, Delle Monache G, Cechinel Filho V, de Souza MM. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) leaves. *Biol Pharm Bull.* 2008 Feb;31(2):235-9.
125. Parveen Z, Deng Y, Saeed MK, Dai R, Ahamad W, Yu YH. Antiinflammatory and analgesic activities of *Thesium chinese* Turcz extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside. *Yakugaku Zasshi.* 2007 Aug;127(8):1275-9.
126. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.* 2001;53:597-652.

127. Barrot M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*. 2012 Jun 1;211:39-50.
128. Farsam H, Amanlou M, Reza Dehpour A, Jahaniani F. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Biebersteinia multifida* DC. root extract. *J Ethnopharmacol*. 2000 Aug;71(3):443-7.
129. Mujumdar AM, Misar AV. Anti-inflammatory activity of *Jatropha curcas* roots in mice and rats. *J Ethnopharmacol*. 2004 Jan;90(1):11-5.
130. Kale M, Misar AV, Dave V, Joshi M, Mujumdar AM. Anti-inflammatory activity of *Dalbergia lanceolaria* bark ethanol extract in mice and rats. *J Ethnopharmacol*. 2007 Jun 13;112(2):300-4.
131. William Carey M, Rao NV, Kumar BR, Mohan GK. Anti-inflammatory and analgesic activities of methanolic extract of *Kigelia pinnata* DC flower. *J Ethnopharmacol*. 2010 Jul 6;130(1):179-82.
132. Garcia Leme J, Hamamura L, Leite MP, Rocha e Silva M. Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carrageenin and by heating. *Br J Pharmacol*. 1973 May;48(1):88-96.
133. Damas J, Bourdon V, Remacle-Volon G, Adam A. Kinins and peritoneal exudates induced by carrageenin and zymosan in rats. *Br J Pharmacol*. 1990 Oct;101(2): 418–422.
134. Ahmad SF, Zoheir KM, Abdel-Hamied HE, Alrashidi I, Attia SM, Bakheet AS, Ashour AE, Abd-Allah AR. Role of a histamine 4 receptor as an anti-inflammatory target in carrageenan-induced pleurisy in mice. *Immunology*. 2014 Jul;142(3):374-83.
135. Murai N1, Nagai K, Fujisawa H, Hatanaka K, Kawamura M, Harada Y. Concurrent evolution and resolution in an acute inflammatory model of rat carrageenin-induced pleurisy. *J Leukoc Biol*. 2003 Apr;73(4):456-63.
136. Muller, W.A. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab Invest* 2002, 82: 521-533.
137. Pereira R, Medeiros YS, Fröde TS. Antiinflammatory effects of Tacrolimus in a mouse model of pleurisy. *Transpl Immunol*. 2006 Aug;16(2):105-11.
138. Davies, M. J. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. *J Clin Biochem Nutr*. 2011 Jan; 48(1): 8–19.
139. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:181-218.

140. Libetta C., Sepe V., Esposito P., Galli F., Dal Canton A. Oxidative stress and inflammation: implications in uremia and hemodialysis. *Clin Biochem.* 2011 Oct;44(14-15):1189-98.
141. Rees MD, Dang L, Thai T, Owen DM, Malle E, Thomas SR. Targeted subendothelial matrix oxidation by myeloperoxidase triggers myosin II-dependent de-adhesion and alters signaling in endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2012 Dec 15; 53(12): 2344–2356.
142. Lau D, Mollnau H, Eiserich JP, Freeman BA, Daiber A, Gehling UM, Brümmer J, Rudolph V, Münzel T, Heitzer T, Meinertz T, Baldus S. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jan 11;102(2):431-6.
143. Fujii Y, Takeuchi H, Tanaka K, Sakuma S, Ohkubo Y, Mutoh S. Effects of FK – 506 (Tacrolimus Hydrate) on chronic oxazolone induced dermatitis in rats. *Eur J Pharmacol.* 2002 Dec 5;456(1-3):115-21.
144. Bratton DL1, Henson PM. Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends Immunol.* 2011 Aug;32(8):350-7.
145. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 2008 Jan;214(2):149-60.
146. Shin S1, Joo SS, Park D, Jeon JH, Kim TK, Kim JS, Park SK, Hwang BY, Kim YB. Ethanol extract of *Angelica gigas* inhibits croton oil-induced inflammation by suppressing the cyclooxygenase-prostaglandin pathway. *J Vet Sci.* 2010 Mar;11(1):43-50.
147. Rosengren S1, Firestein GS, Boyle DL. Measurement of inflammatory biomarkers in synovial tissue extracts by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Nov;10(6):1002-10.
148. Rocha ACC, Fernandes ES, Quintão NLM, Campos MM, Calixto JB. Relevance of tumour necrosis factor- $\alpha$  for the inflammatory and nociceptive responses evoked by carrageenan in the mouse paw. *Br J Pharmacol.* 2006 Jul; 148(5): 688–695.