



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

SIMONE ÂNGELA SOARES DA SILVA

**ESTUDO *IN SILICO*, *IN VITRO* E *IN VIVO* DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE
AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DE DERIVADOS *N*-ACILHIDRAZÔNICOS
SUBSTITUIDOS**

**CAMPINA GRANDE-PB
SETEMBRO/2017**

SIMONE ÂNGELA SOARES DA SILVA

**ESTUDO *IN SILICO*, *IN VITRO* E *IN VIVO* DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE
AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DE DERIVADOS *N*-ACILHIDRAZÔNICOS
SUBSTITUIDOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba como exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de produtos naturais e sintéticos de interesse farmacêutico.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanda Lucia dos Santos

CAMPINA GRANDE
2017

E expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da Dissertação.

S586e Silva, Simone Ângela Soares da.
Estudo *in silico*, *in vitro* e *in vivo* dos possíveis mecanismos de ação anti-inflamatória de derivados N-acilhidrazônicos substituídos [manuscrito] / Simone Angela Soares da Silva. - 2017

95 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2017.

"Orientação : Profa. Dra. Vanda Lúcia dos Santos, Departamento de Farmácia - CCBS."

1. Processo inflamatório. 2. Citocininas. 3. Óxido nítrico. 4. Cianoacetohidrazídicos.

21. ed. CDD 615.1

SIMONE ÂNGELA SOARES DA SILVA

**ESTUDO *IN SILICO*, *IN VITRO* E *IN VIVO* DOS POSSÍVEIS MECANISMOS DE
AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA DE DERIVADOS N-ACILHIDRAZÔNICOS
SUBSTITUIDOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba como exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: _04/09/17

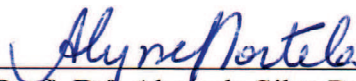
Banca Examinadora



Prof.^a Dr.^a Vanda Lucia dos Santos
Orientadora/DF/CCBS/UEPB



Prof.^o Dr.^o Ricardo Olimpio de Moura
Examinador Interno/DF/CCBS/UEPB



Prof.^a Dr.^a Alyne da Silva Portela
Examinadora Externa – FACISA/CG

Dedicatória

Aos meus pais e irmã por todo o apoio, carinho, paciência e amor que fizeram com que todas as dificuldades e contrariedades ficassem para trás, DEDICO.

Agradecimentos

Ao meus pais *Ademar e Maria das Graças* por sempre investirem no meu potencial e me apoiarem incessantemente, sobretudo durante o período do mestrado que se mostrou árduo por diversas vezes. Vocês são exemplos de perseverança, coragem e força.

À minha irmã *Valéria*, pelo carinho e companheirismo e apoio que tornam os nossos laços fraternos inquebráveis.

À minha orientadora, professora *Dr^a. Vanda Lucia dos Santos*, por me receber como sua aluna e confiar no meu empenho. Obrigada pela orientações indispensáveis e imenso apoio recebidos ao longo deste estudo, pela dedicação e pela amizade.

Ao professor *Dr^o. Ricardo Olimpio de Moura*, que proporcionou a oportunidade de terminar esta dissertação. Obrigada por gentilmente ceder as moléculas utilizadas neste trabalho por sua prestatividade e apoio.

À, professora *Dr^a Ana Cláudia*, pela ajuda e apoio em momentos decisivos desta jornada. Obrigada por suas instruções que certamente contribuiram para a minha formação acadêmica e profissional.

À *Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)* e ao *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas*, pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao *Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA/CESED)*, pela avaliação e aprovação do meu projeto de pesquisa.

À equipe de laboratório, pelo grande apoio: *Elaine, Nadjaele Jhonatta, Cris, Pablo, Raiff, Renaly e Ítala*. Obrigada por dedicaram seu tempo para aprendermos juntos e por terem tornado esta dissertação possível.

A secretária *Dilma de Alcântara* pelo carinho e palavras de apoio.

Aos funcionários da UEPB, *Josué, Katarina, Pierre e Mayara*, pela presteza e atendimento quando necessário.

Aos colegas do mestrado *Isabelly, Fernanda Ílary e Helimarcos* pela amizade, companheirismo e apoio.

À banca examinadora por aceitar o convite e pela disponibilidade em contribuir para a melhoria deste trabalho.

À todos que contribuíram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho.

E por fim, mais não menos importante a todos os animais (camundongos) que tiveram de ser sacrificados em prol dessa pesquisa.

Muito obrigada!

"É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota."

Theodore Roosevelt

RESUMO

Silva, S. A. **Estudo *in silico*, *in vitro* e *in vivo* dos possíveis mecanismos de ação anti-inflamatória de derivados N-acilhidrazônicos substituídos.** Dissertação de mestrado. Campina Grande: UEPB, 2017.

O processo inflamatório é uma reação do organismo a uma infecção ou lesão dos tecidos. As enzimas NOS e COX-2 são enzimas chaves na resposta inflamatória quando estimuladas principalmente por citocinas pró-inflamatórias. Compostos que atuem modulando a atividade dessas enzimas são promissores no combate a inflamação, a exemplo dos derivados N-acilhidrazônicos que mostram ser eficazes em modelos clássicos de inflamação *in vivo* e *in vitro*. Este trabalho teve como objetivo avaliar *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, os possíveis mecanismos de ação anti-inflamatória das moléculas derivadas 2-cianoacetohidrazida da série JR (04, 09 e 19). Inicialmente foi realizado o estudo *in silico* dos três compostos e *in vitro* (de JR04, JR09 e JR19) frente às isoformas de ciclooxigenase (COXs). Em seguida foi avaliada a toxicidade gástrica em camundongo e a citotoxicidade em eritrócitos humanos com os compostos JR09 e 19. Para investigar a participação da via óxido nítrico/guanilato ciclase do composto JR19 foi realizado o ensaio de peritonite induzida por carragenina em animais pré-tratados com L-NAME (bloqueador inespecífico da óxido nítrico sintase) ou azul de metileno (bloqueador inespecífico da guanilato ciclase). Neste mesmo modelo foi realizada a dosagem de citocinas. Os resultados *in silico* mostraram que JR04, JR09 e JR19 interagem de forma específica com o sítio catalítico das COXs, e o composto JR04 teve melhor afinidade pela COX-1. O teste *in vitro* para as moléculas JR04 e JR09 e JR19 corroborou com o ensaio *in silico*, onde o JR04 mostrou-se mais seletivo para COX-1 com um índice de seletividade (IS) de 2,22 para COX-2, enquanto que as moléculas JR09 e 19 apresentaram um IS de 1,67 e IS de 1,51, respectivamente com uma porcentagem de inibição de 100% de COX-2 na concentração de 25mM. No ensaio de toxicidade gástrica os dois compostos (100 mg/kg via oral e subcutânea) não induziram lesões ulcerativas, mesmo sendo capazes de interagir com a COX-1. No ensaio de citotoxicidade em eritrócitos os compostos JR09 e JR19 apresentaram baixa atividade hemolítica, apresentando ainda um IC₅₀ de 51,42 e 85,02 mg/mL, respectivamente. Na peritonite induzida por carragenina o composto JR19 foi capaz de reduzir significativamente a contagem de leucócitos do exsudato peritoneal em 48,3% em relação ao grupo controle, porém este efeito foi revertido nos animais pré-tratados com L-NAME ou azul de metileno, mostrando ser este efeito dependente da via NO/GCs. Os níveis das citocinas pró- inflamatórias TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-17 também foram significativamente reduzidas com administração do composto JR19 e foi revertido nos animais pré-tratados com L-NAME, corroborando com a provável participação da via do NO no efeito anti-inflamatório deste composto. As concentrações das citocinas IL-2 e IL-4 não foram alteradas. Dessa forma, os compostos JR04, JR09 e JR19 provavelmente atuam por interação com as COXs, com os compostos JR09 e 19 atuando de forma seletiva sobre a COX-2, sem efeitos tóxicos gástricos. Além disso, o composto JR19 tem sua ação anti-inflamatória provavelmente ligada a manutenção dos níveis de NO e reduzindo citocinas pró-inflamatórias.

Palavras-Chaves: Derivados 2-cianoacetohidrazidicos; ciclooxigenases; óxido nítrico; citocinas.

ABSTRACT

Silva, S. A. **In silico, in vitro and in vivo study of possible mechanisms of anti-inflammatory action of substituted N-acylhydrazone derivatives.**

The inflammatory process is a reaction of the body to an infection or tissue injury. NOS and COX-2 enzymes are key enzymes in the inflammatory response when stimulated primarily by pro-inflammatory cytokines. Compounds that act to modulate the activity of these enzymes are promising in the fight against inflammation, for example the N-acylhydrazonic derivatives that prove to be effective in classic models of inflammation in vivo and in vitro. This work aimed to evaluate in vitro, in vitro and in vivo, the possible mechanisms of anti-inflammatory action of the derivatives 2-cyanoacetohydrazide of the JR series (04, 09 and 19). Initially, the in silico study of the three compounds and in vitro (from JR04, JR09 and JR19) against cyclooxygenase isoforms (COXs) was performed. Next, gastric toxicity in mice and cytotoxicity in human erythrocytes were evaluated with compounds JR09 and 19. To investigate the participation of the nitric oxide / guanylate cyclase pathway of compound JR19, the carrageenan-induced peritonitis assay was performed in pre-treatment animals with L-NAME (non-specific nitric oxide synthase blocker) or methylene blue (non-specific guanylate cyclase blocker). In the same model the cytokine dosage was performed. The in silico results showed that JR04, JR09 and JR9 interacted specifically with the catalytic site of the COXs, and the compound JR04 had better affinity for COX-1. The in vitro test for the molecules JR04 and JR09 and JR19 corroborated with the in silico assay, where JR04 was shown to be more selective for COX-1 with a selectivity index (IS) of 2.22 for COX-2, whereas the molecules JR09 and 19 showed an IS of 1.67 and IS of 1.51, respectively with a percentage of inhibition of 100% of COX-2 in concentration of 25mM. In the gastric toxicity test the two compounds (100 mg / kg oral and subcutaneous) did not induce ulcerative lesions, even though they were able to interact with COX-1. In the erythrocyte cytotoxicity assay the compounds JR09 and JR19 showed low haemolytic activity, with an IC 50 of 51.42 and 85.02 mg / mL, respectively. In carrageenan-induced peritonitis, the compound JR19 was able to significantly reduce leukocyte counts of the peritoneal exudate by 48.3% compared to the control group, but this effect was reversed in animals pretreated with L-NAME or methylene blue, showing that this effect is dependent on the NO / GCs pathway. The levels of proinflammatory cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-6 and IL-17 were also significantly reduced with administration of compound JR19 and reversed in animals pretreated with L-NAME, corroborating the probable participation of anti-inflammatory effect of this compound. The concentrations of IL-2 and IL-4 cytokines were not altered. Thus, the compounds JR04, JR09 and JR19 probably act in interaction with the COXs, compounds JR09 and 19 acting selectively on COX-2, without gastric toxic effects. In addition, compound JR19 has its anti-inflammatory action likely linked to maintenance of NO levels and reducing proinflammatory cytokines.

Key words: 2-cyanoacetohydrazide derivatives; Cyclooxygenases; nitric oxide; Cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mediadores químicos da inflamação.....	21
Figura 2 - Representação esquemática da biossíntese de eicosanoides das principais vias que fazem parte do metabolismo do ácido araquidônico.....	27
Figura 3 - Estrutura básica da função <i>N</i> -acilhidrazona.....	35
Figura 4- Derivado acilhidrazônico (E) -N '- (Piridin-4-ilmetileno) ciclohexanocarbohidrazida.....	36
Figura 5- Derivado acilhidrazônico tetra-hidronaftil- <i>n</i> -acil-hidrazona.....	36
Figura 6- Derivado acilhidrazônico (E) - N '- (4- (1H-pirrolo [2,3- <i>b</i>] piridin-4-il) benzilideno) -2-nafto-hidrazida.....	37
Figura 7- Derivado acilhidrazônico N- (3,4-dimetoxibenzilideno) - 2- (4-cloro-2- (2-clorofenoxi) fenil) acetohidrazida.....	37
Figura 8- Derivados N'-benzilideno-2-cianoacetohidrazida (JR04, JR09 e JR19).....	39
Figura 9- Esquema dos compostos JR04, JR09 e JR19 e suas interações com o sítio ativo da COX-1.....	50
Figura 10- Esquema dos fármacos ácido meclofenâmico, diclofenaco e celecoxibe e suas interações com o sítio ativo da COX-1.....	51
Figura 11- Esquema dos complexos para COX-2 com os compostos JR04, JR09 e JR19 suas interações com o sítio ativo da COX-2.....	52
Figura 12- Esquema dos fármacos ácido meclofenâmico, nemisulida e celecoxibe e suas interações com o sítio ativo da COX-1.....	53
Figura 13- Efeito dos compostos JR09 e JR19 administrado por via oral e subcutânea sobre a mucosa gástrica íntegra.....	59
Figura 14- Influência do tratamento com os compostos JR19 e da L-NAME sob a contagem total de leucócitos, para o modelo da peritonite induzida por carragenina (1%).....	64
Figura 15 - Influência do tratamento com os compostos JR19 e Azul de Metileno sob a contagem total de leucócitos, para o modelo da peritonite induzida por carragenina (1%).....	66
Figura 16- Efeito do pré-tratamento com L-NAME ou Azul de metileno (i.p.) administrado 30 min antes do composto JR19 (v.o.) sobre as concentrações das citocinas (TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-17 e IL-4) no exsudato peritoneal de camundongos.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela-1 Energia de ligação do complexo ligante-receptor.....	48
Tabela 2 - Concentração do composto necessária para produzir 50% de inibição de COX-1 ou COX-2.....	56
Tabela 3 Potencial Hemolisante de cada concentração testada dos compostos JR09 e JR19.....	62

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1- Reação geral de formação de uma hidrazona	35
Esquema 2- Reação geral de formação de uma <i>N</i> -acilhidrazona.....	35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

5-HT - 5-hidroxitriptamina
5 – HPETE - 5- hidroperoxieicosatetraenóico
AINEs - Anti-inflamatórios não esteroides
aa- aminoácido
AA- Ácido araquidônico
ALA – Alanina
ARG - Argenina
AIEs - Anti-inflamatórios esteroides
COXs - Ciclooxygenases
CINC-1 - Quimiocina quimio-atraente de neutrófilos 1
DM - *Docking* molecular
EROs - Espécies reativas de oxigênio
ERNs – Espécies reativas do nitrogênio
FTC β - Fator transformador de crescimento β
GMPc – Guanosina -3' -5' - monofosfato cíclico
GCs - Guanilato ciclase solúvel
GR - Receptores glicocorticoides
GLY – Glicina
GLN - Glutamina
HIS - Histidina
ILs - Interleucinas
IL 1 - Interleucina
IL - 1 β - Interleucina-1 β
IFNs - Interferons
IS – Índice de Seletividade
ILU - Índice de Lesão Ulcerativa
KC - Queratinócitos
LTs - Leucotrienos
Liso – PAF - lisogliceril-fosforilcolina
LEU - Leucina
LSVM - Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular
LIKA - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

L – NAME - N^G-Nitro-L-argenina Metil Ester
LXs - Lipoxinas
LOXs – Lipoxigenases
NF – kB - Fator nuclear kappa B
NAH - N-acilhidrazônicos
NO - Óxido Nítrico
NOS - Óxido Nítrico sintase
NK - *Natural Killer*
PGs - Prostaglandinas
PGE₂ – Prostaglandinas – E₂
PLA₂ - Fosfolipase A₂
PAF - Fator de agregação plaquetária
PGHS - Endoperoxido H sintase
PGIs – Prostaciclina
PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas
PMN – Polimorfonuclear
PHE - Fenilalanina
SNC - Sistema Nervoso Central
s.c. – Via subcutânea
SER – Serina
TYR - Tirosina
TGF-β - Fator de transformação do crescimento
TFN-α - Fator de necrose tumoral-α
TGI - Trato gastrointestinal
TXs - Tranboxanos
VEGF - Fator de crescimento de vasos endoteliais
v.o.- Via oral
VAL - Valina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1 Processo Inflamatório	18
2.2 Mediadores do Processo Inflamatório	19
2.2.1 Aminas Vasoativas (Histamina e Serotonina).....	21
2.2.2 Cininas.....	22
2.2.3 Citocinas e Quimiocinas.....	23
2.2.4 Óxido Nítrico.....	24
2.2.5 Mediadores Inflamatórios Derivados do Ácido Araquidônico (AA).....	26
2.3 Mecanismo de Ação dos Fármacos Anti-inflamatórios	30
2.4 Compostos Químicos Sintéticos como Fonte de Novos Fármacos	33
2.5 Derivados N- acilhidrazônicos	34
2.5.1 Derivados acilhidrazônicos com Propriedades Anti-inflamatória...35	
2.6 Derivados N-acilhidrazônicos substituídos - N'-benzilideno-2-cianoacetohidrazida (série JR)	38
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo Geral.....	40
3.2 Objetivos específicos.....	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Obtenção dos compostos N'-2-ciano-(4-(metilsulfonil-benzilideno)-acetohidrazida (JR04), N'-benzylidene-2-cyanoacetohydrazide (JR09) e N' - (1 <i>H</i> -indol-3yl) metileno) – 2 - cianoacetohidrazida (JR19).....	41
4.2 Substâncias Utilizadas.....	41
4.3 Animais.....	41
4.4 Procedimentos Éticos.....	42
4.5 Local da Pesquisa.....	42
4.6 Testes farmacológicos	42
4.6.1 Docking Molecular (DM) <i>in silico</i>	42
4.6.2 Ensaio <i>in vitro</i> de Inibição das COXs.....	43
4.6.3 Toxicidade Gástrica.....	44
4.6.4 Citotoxicidade em Eritrócitos.....	44

4.6.5 Avaliação da participação do NO e Guanilato Ciclase Solúvel.....	45
4.6.5.1 Dosagem de Citocinas.....	46
4.7 Análises Estatísticas.....	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1 <i>Docking</i> Molecular (DM) <i>in silico</i>	47
5.2 Ensaio <i>in vitro</i> de Inibição das COXs.....	55
5.3 Toxicidade Gástrica.....	58
5.4 Citotoxicidade em Eritrócitos.....	61
5.5 Avaliação da participação do NO e Guanilato Ciclase Solúvel.....	63
5.5.1 Dosagem de Citocinas.....	67
6 CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO.....	95
ANEXO Documento emitido pelo CEUA/CESED aprovando os métodos utilizados na pesquisa.....	95

1 INTRODUÇÃO

O processo inflamatório é definido como a resposta a um estímulo prejudicial provocado por uma variedade de agentes nocivos, infecções, anticorpos e ferimentos físicos. Sendo uma resposta complexa que envolve fatores bioquímicos e imunológicos. Uma característica importante no processo inflamatório é migração de leucócitos do sangue para os tecidos inflamados. Mediadores inflamatórios são produzidos ativando as células endoteliais vasculares e as moléculas de adesão reguladoras superiores que medeiam o rolamento, adesão celular e extravasamento de leucócitos para o local da inflamação (SERHAN, 2017).

Outro evento importante envolvido na fisiopatologia da inflamação é a biossíntese e liberação de prostaglandinas. A atividade farmacológica dos anti-inflamatórios não esteroides clássicos (AINEs) está relacionada à supressão da biossíntese de prostaglandinas a partir de ácido araquidônico pela inibição das enzimas ciclooxigenases (COXs) (BUCKLEY; GILROY; SERHAN, 2014).

Entretanto, a inibição não seletiva das ciclooxigenases COX-1 e COX-2 responde pelos efeitos adversos indesejáveis sobre o trato gastrointestinal (TGI), sistemas renal e hepático. Diante disso, propôs-se que o desenvolvimento de fármacos com inibição seletiva para a COX-2, que apresentariam mais vantagens terapêuticas, uma vez que a COX-2 é predominante nos tecidos inflamados enquanto a COX-1 está expressa constitutivamente sendo fonte de prostaglandinas (PGs) citoprotetoras do TGI, no entanto esses fármacos podem apresentar efeitos adversos cardiovasculares graves devido a supressão das PGs cardioprotetoras derivadas da COX-2 (KOWALSKI; MAKOWSKA, 2015).

Outro importante mediador envolvido na gênese da inflamação é o Óxido Nítrico (NO), uma pequena molécula de sinalização que pode difundir-se para o interior da célula após ser sintetizada pela conversão de L-arginina em L-citrulina por três isoformas distintas de óxido nítrico sintase (NOS) que são: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzíveis (iNOS). O papel do NO na inflamação permanece ambíguo porque ele é relatado com propriedades anti e pro-inflamatórias. O que se sabe e que expressão da iNOS é o resultado de

uma resposta inflamatória localizada ou difusa resultante de uma infecção ou dano tecidual, ou seja, onde a resposta inflamatória é parte de uma resposta adaptativa no caso de infecção ou sepse, onde a expressão de iNOS é benéfica, enquanto que na inflamação não adaptativa a expressão de iNOS pode ser nociva. Do lado benéfico, a expressão da iNOS resulta em inibição do crescimento de patógenos microbianos, bem como inibição da aderência e agregação plaquetária e migração leucocitária. (SANSBURY et al., 2012).

Nesse contexto as enzimas NOS e COX-2 estão envolvidas na inflamação, tendo papel importante na resposta dos tecidos ao dano e a agentes infecciosos. Sendo assim, compostos que apresentem atividade anti-inflamatória modulando a atividade dessas enzimas com menos efeitos adversos e baixa toxicidade são alvos de extensos estudos (VECHIA; GNOATTO; GOSMANN, 2009).

Em virtude da necessidade de novas terapias anti-inflamatórias com menos efeitos colaterais, os derivados N-acilhidrazônicos surgem como prováveis moléculas para o desenvolvimento de novos e eficientes fármacos com propriedades anti-inflamatórias já relatada para diversos compostos dessa natureza (NAKHOSTIN et al., 2016). Nesse contexto, este estudo propôs-se a avaliar o envolvimento da via das COXs em modelos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, bem como a participação do NO, na atividade anti-inflamatória de dois derivados 2-cianoacetohidrazídicos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Processo Inflamatório

A inflamação caracteriza-se como um fenômeno complexo e dinâmico, ocorrendo como resposta do tecido à injúria celular desencadeada por diversos estímulos. Entre eles estão as infecções, exposição à alérgenos, radiação, produtos químicos tóxicos, entre outros. Envolve uma complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares, que incluem extravasamento de fluídos, ativação enzimática, migração celular, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores. Esses eventos são responsáveis pelo aparecimento dos cinco sinais cardinais da inflamação (edema, rubor, calor, dor e perda de função) e, de acordo com a persistência da lesão, os sintomas clínicos e a natureza da resposta imune, esse processo costuma ser dividido em inflamação de fase aguda, e inflamação de fase crônica (JONES; SIES, 2015).

A inflamação aguda refere-se à resposta inicial à lesão tecidual. É mediada pela liberação de autacóides e, em geral pode durar minutos, horas ou dias, independente da natureza do agente agressor, apresentando resposta semelhante a estímulos distintos. Caracteriza-se pela ocorrência de eventos vasculares, com alteração do calibre dos vasos, aumento do fluxo sanguíneo, aumento de permeabilidade vascular e celular, promovendo o processo de marginação e adesão de leucócitos na parede do vaso e posterior passagem para o tecido extravascular. Esse acúmulo de células inflamatórias no local da lesão leva a formação de exsudato (SERHAN, 2017).

A inflamação crônica envolve a liberação de diversos mediadores que não são proeminentes na resposta aguda, podendo ocorrer destruição tecidual e fibrose. É caracterizada por inflamação ativa (infiltrado de células mononucleares), com destruição tecidual e tentativa de reparar os danos (cicatrização). Contudo, esse resultado pode ser deletério, se não houver resolução do processo subjacente, prolongando-se em um mecanismo de retroalimentação extremamente danoso ao organismo que pode perdurar por um período indeterminado (SCARPELLI; SASSO; PIOMELLI, 2016).

A resposta inflamatória envolve a participação de diferentes tipos celulares, tais como neutrófilos, macrófagos, mastócitos, linfócitos, plaquetas,

células dendríticas, células endoteliais e fibroblastos, entre outras, Nesse processo, a quimiotaxia é responsável pelo recrutamento de células para o sítio de inflamação. As primeiras células a chegarem ao tecido lesionado são os neutrófilos e, em seguida, os macrófagos teciduais (FURLLETON; GILROY, 2016).

Além disso, os macrófagos e neutrófilos, bem como as células teciduais lesionadas, liberam uma variedade de substâncias oxidantes e enzimas. Espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) são produzidas em abundância, promovendo a indução de fatores transcricionais relacionados com a expressão de enzimas como a catalase (participa da eliminação de radicais livres) e a colagenase (degradação das redes de elastina). Ainda ocorre o rompimento de mitocôndrias com liberação de enzimas líticas, peroxidação e destruição de membranas e dano no DNA (BHATTACHARYA, 2015).

Outros mecanismos efetores que contribuem para o processo inflamatório incluem a produção e liberação de mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico, como os leucotrienos (LTs) e as prostaglandinas (PGE₂), prostaciclina (PGI₂) e tranboxanos (TXs). Além de enzimas como a elastase e fator de transformação do crescimento como (TGF-β), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento de vasos endoteliais (VEGF), que também contribuem para instalação do processo inflamatório (BUCKLEY; GILROY; SERHAN, 2014).

Após a injúria, os mediadores do processo inflamatório são produzidos e liberados no local onde se deflagrou o processo. Os macrófagos realizam a sinalização do local onde há material estranho ou lesão através destes mediadores, que irão atrair as células circulantes (leucócitos PMN, macrófagos, eosinófilos, linfócitos) as quais apresentam um papel amplificador no processo inflamatório (CRUVINEL et al., 2010).

2.2 Mediadores do Processo Inflamatório

Os mediadores químicos podem ser de origem celular ou derivados do plasma sanguíneo. Os de origem celular a exemplo das aminas vasoativas, os metabólitos do ácido araquidônico, as citocinas, as EROs, o NO, enzimas lisossômicas dos leucócitos e os neuropeptídeos (substância P) são

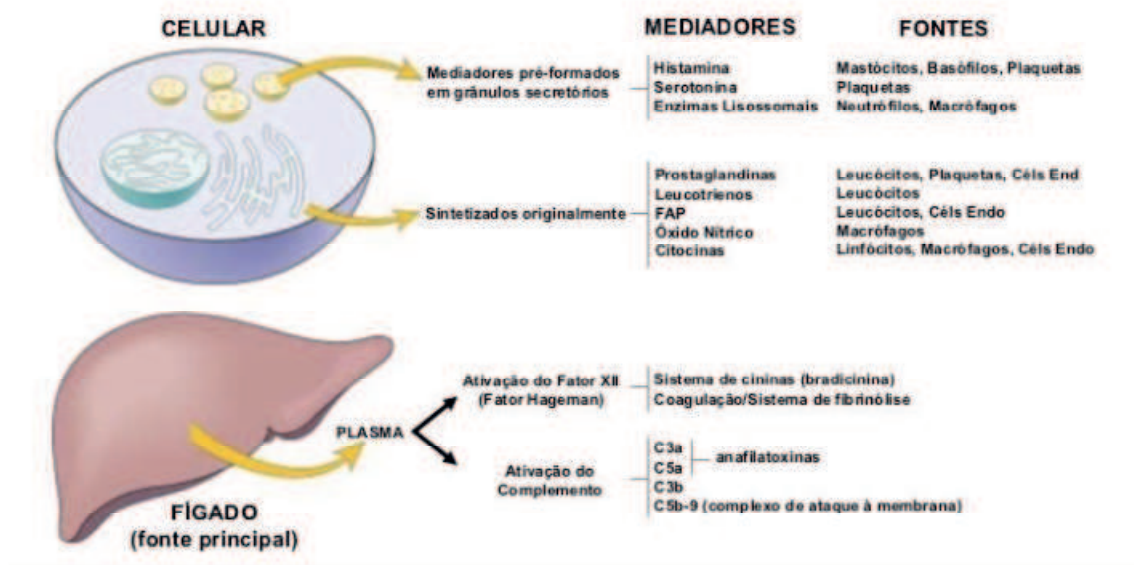
encontrados em grânulos intracelulares e liberados após ativação através do estímulo inflamatório, ou podem ser sintetizados em resposta ao estímulo. Os mediadores químicos derivados do plasma sanguíneo, como proteínas do sistema complemento, as cininas e fatores de coagulação, na maioria dos casos são sintetizados pelo fígado e estão relacionados a vários aspectos da resposta inflamatória (CRUVINEL et al.,2010; KUMAR; JÚNIOR et al., 2011; KUMMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Os mediadores químicos da inflamação consistem em moléculas responsáveis por modular os eventos vasculares e celulares ocorridos durante o processo inflamatório (BUCKLEY; GILROY; SERHAN, 2014).

A maior parte dos mediadores induz efeitos através da ligação a receptores específicos nas células-alvo, ou seja, podem atuar somente em um ou em alguns alvos ou ainda apresentar ações mais abrangentes, com efeitos distintos, variando de acordo com o tipo celular que afetam. Alguns mediadores apresentam atividades tóxicas e/ou enzimáticas diretas (HEADLAND; NORLING, 2015).

Esses mediadores também agem estimulando a liberação de moléculas efetoras secundárias pelas células-alvo. Mediadores químicos distintos podem apresentar ações semelhantes, amplificando a resposta ou podem apresentar efeitos opostos, atuando, desta forma, no controle da resposta inflamatória com ações estreitamente reguladas. Após ativados e liberados das células, os mediadores decompõem-se rapidamente ou são inativados por enzimas. Caso isso não ocorra tem-se início a processos danosos ao organismo (WU; CHEN, 2014) (Figura 1).

Figura 1 – Mediadores químicos da inflamação



Fonte: Kumar; Abbas; Fausto (2010)

Dentre os mediadores químicos envolvidos no processo inflamatório destacamos alguns relevantes nesse processo.

2.2.1 Aminas Vasoativas (Histamina e Serotonina)

As aminas vasoativas, histamina e serotonina, estão entre os primeiros mediadores a serem liberados durante a inflamação e promovem efeitos importantes nos vasos sanguíneos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2010).

A histamina é formada a partir da descarboxilação do aminoácido L-histidina pela ação da enzima histidina-descarboxilase. É sintetizada e liberada por diferentes células humanas, especialmente basófilos, mastócitos, plaquetas, neurônios histaminérgicos, linfócitos e células enterocromafínicas, sendo estocada em vesículas ou grânulos liberados sob estimulação. Uma vez liberada, ativa receptores histaminérgicos (RH₁, RH₂, RH₃ e RH₄) pertencentes à superfamília de receptores acoplados a proteína G (OLIVEIRA JÚNIOR; PORTELLA JUNIOR; COHEN, 2016).

A liberação localizada de histamina ocorre após um estímulo inflamatório por uma elevação de íons Ca⁺⁺ e sua ação principalmente nos receptores H₁ na

microcirculação promove vasodilatação das arteríolas e aumento da permeabilidade vascular. O aumento da permeabilidade vascular ocorre por meio da contração das células endoteliais e subsequente formação de abertura das junções celulares endoteliais, resultando no extravasamento plasmático, promovendo aumento da permeabilidade ao Ca^{++} em neurônios sensoriais com conseqüente liberação de neuropeptídeos que promovem à hiperalgesia. Também está envolvida na proliferação e diferenciação celular, regeneração e cicatrização de feridas e na regulação do sistema imune. Promove ainda a síntese de PGs e PGI_2 e induz a liberação de NO pelo endotélio (SANNA et al. 2015).

A serotonina, 5-hidroxitriptamina ou 5-HT é formada a partir do triptofano adquirido na dieta, que é convertido a 5- hidroxitriptofano pela triptofano hidroxilase e, posteriormente em 5-HT, pela ação da enzima L-aromático descarboxilase. Encontra-se na parede do intestino, produzida nas células enterocromafins do epitélio do trato gastrointestinal e uma vez secretada é absorvida e retida no interior das plaquetas. Também pode ser encontrada no sistema nervoso central (SNC) e em roedores (ratos e camundongos) é armazenada nos mastócitos. Durante processo inflamatório é ativada pelo PAF, e possui ações semelhante a histamina (PASTORINO, 2010).

2.2.2 Cininas

A bradicinina é um peptídeo vasoativo derivado do cininogênio (precursor inativo). No sistema enzimático das cininas, a calicreína sintetiza a bradicinina por clivagem proteolítica do seu precursor, o cininogenio. A bradicinina possui dois tipos de receptores acoplados à proteína G (B_1 e B_2) são responsáveis por mediar os efeitos biológicos. O receptor B_1 , não é encontrado em tecidos normais, sua formação ocorre no momento em que instala-se o processo inflamatório, media a maior parte das respostas agudas induzidas pelas cininas. Já o receptor B_2 , é expresso constitutivamente em células do músculo liso, sendo responsável pelo efeito vasodilatador (DAWES et al., 2013).

A bradicinina produz os sinais característicos do processo inflamatório como o calor, o rubor, o edema e a dor. Apresenta ação direta sobre as fibras

nervosas que se dá através de receptores B_1 , principalmente por ação da interleucina (IL-1), sendo responsável por uma série de eventos biológicos, incluindo vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, modulação da dor, contração/relaxamento da musculatura lisa e efeitos na proliferação celular e também induz a liberação de NO das células endoteliais e de PGIs (MASEDA; JOHNSON; CROFFORD, 2016).

2.2.3 Citocinas e Quimiocinas

As citocinas são polipeptídeos produzidos por diferentes tipos celulares, principalmente linfócitos e macrófagos ativados, células do endotélio, epitélio e tecido conjuntivo, em resposta a estímulos inflamatórios e imunes ou em resposta a outras citocinas, através da ativação de proteinoquinases ativadas por mitógenos. Possuem papel essencial na formação dos sinais locais ou sistêmicos de inflamação, modulando funções celulares tais como, o crescimento, a ativação celular, a quimiotaxia, a imunidade, o reparo tecidual, a fibrose e a morfogênese, sendo sua secreção transitória e estreitamente regulada (HEADLAND; NORLING, 2015).

São superfamílias que compreendem mais de 100 citocinas que incluem as interleucinas (IL), quimiocinas, interferons (IFN), fatores estimulantes de colônias, fatores do crescimento e fator de necrose tumoral (TNF). As ILs são citocinas classificadas como pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-7, IL-17 e o TNF) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13 e o fator transformador de crescimento β (FTC β)) (WITTMANN; MCGONAGLE; WERFEL, 2014).

As ILs anti- inflamatórias inibem a liberação de citocinas pró-inflamatórias e reduzem a expressão da COX-2, ao passo que as ILs pró-inflamatórias migram e atuam na região lesionada, sinalizando a inflamação. As primeiras citocinas descritas na fisiopatologia do processo inflamatório foram: IL-1 β , TNF- α , IL-6 e as quimiocinas, IL-8, quimiocina quimio-atraente de neutrófilos 1 (CINC-1) e quimiocina derivada dos queratinócitos (KC). A IL-1 β e o TNF- α participam das reações pró-inflamatórias agudas e crônicas, assim como dos processos de reparo e de resolução. São principalmente produzidas por macrófagos ativados e podem estimular, secundariamente, a liberação de mais citocinas (STENKEN; POSCHENRIEDER, 2015).

O TNF α e β são citocinas cruciais no processo inflamatório caracterizadas por sua capacidade de induzir a necrose em células tumorais, de onde advém o nome fator de necrose tumoral (VITALE; RIBEIRO, 2007). Estão envolvidas tanto em condições fisiológicas quanto patológicas, sendo responsáveis pela regulação da imunidade, diferenciação e morte celular. Além dos macrófagos podem ser produzidas por neutrófilos, linfócitos T, células Natural Killer (NK) e monócitos. Estas citocinas induzem a ativação dos neutrófilos, estimulam a produção da COX-2 e de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6), também aumentam a permeabilidade da camada endotelial e a migração de leucócitos, bem como estimula da proliferação de fibroblastos e a reabsorção óssea, além de produzir degradação da cartilagem (HAN et al., 2012).

As quimiocinas formam uma grande família de pequenas citocinas, são proteínas responsáveis por coordenarem tanto o tráfego de leucócitos quanto a diferenciação de células imunológicas. Sua importância fisiológica deve-se a sua especificidade. Os membros da família das quimiocinas induzem ao recrutamento de subtipos bem definidos de leucócitos. Há duas famílias dessas citocinas; a primeira chamada quimiocinas CC, também conhecidas como β -quimiocinas. Essas quimiocinas estimulam principalmente os monócitos, mas também os basófilos, eosinófilos, linfócitos-T e as células NK. A outra família é a das quimiocinas CXC, conhecidas como as α -quimiocinas que estimulam principalmente a quimiotaxia de neutrófilos (FULLERTON; GILROY, 2016).

2.2.4 Óxido Nítrico

O NO é sintetizado a partir do metabolismo do aminoácido L-arginina mediado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). A oxidação da porção N-terminal do aminoácido libera NO e L-citrulina. Existem pelo menos três isoformas de NOS, duas delas consideradas isoformas constitutivas e uma isoforma induzível. A óxido nítrico-sintase neuronal (n-NOS), é encontrada em altos níveis em neurônios, e em tecidos não neuronais (músculo esquelético). E a óxido nítrico-sintase endotelial (e-NOS), responsável pela produção do fator relaxante derivado do endotélio. Tanto a n-NOS, como a e-NOS são ativadas

pela elevação dos níveis de cálcio (Ca^{2+}) e sua ligação com a calmodulina (BOGDAN, 2015).

Já a isoforma óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) está associada a condições patológicas e a injúria e tem sua expressão induzida em processos inflamatórios, por bactérias, lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e citocinas pró-inflamatórias que estimulam sua produção por vários tipos de células, tais como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células endoteliais e células epiteliais (SANSBURY et al., 2012).

Outra diferença entre as isoformas NOS, além das concentrações de cálcio requeridas pelas enzimas, está relacionada com a sua atividade catalítica (produção de NO). As isoformas n-NOS e e-NOS produzem e liberam NO em quantidade nanomolar por curto período de tempo (segundos a minutos), em resposta à interação de agonistas, tais como a acetilcolina, bradicinina e histamina, via receptores acoplados à proteína G, e ainda por estímulos físicos, como o estresse de cisalhamento causado pela circulação sanguínea. Enquanto que a isoforma iNOS produz e libera grandes quantidades de NO, na ordem de micromolar, durante longos períodos, chegando a ser ativada por aproximadamente 20h e geralmente estão associadas aos efeitos citotóxicos e às ações que promovem as patologias vasculares (BRADLEY; STEINERT, 2016).

A molécula do NO tem um elétron desemparelhado e reage facilmente com oxigênio, radical superóxido (O_2^-), ou metais de transição, como ferro, cobalto, manganês ou cobre. Tem alta afinidade com o grupo heme, encontrado em proteínas intracelulares (NOS, COX e guanilato ciclase solúvel (GCs) e também liga-se a grupos sulfidrila -SH, formando tiol, agindo como um oxidante ou um redutor dependendo do meio, sendo rapidamente oxidado pelo oxigênio, produzindo nitrito e nitrato (PREDONZANI et al., 2015).

O NO é citotóxico, vasodilatador e modula reações inflamatórias ou antiinflamatórias, dependendo do tipo celular e do estímulo, além de inibir a agregação e aderência plaquetárias, bem como a migração leucocitária. Depois de sintetizado, o NO ativa a enzima GCs, seu receptor fisiológico, convertendo a guanosina-5'-trifosfato em guanosina-3'-5'-monofosfato cíclico (GMPc). O GMPc, como segundo mensageiro, pode ativar proteínas quinases, canais

iônicos e fosfodiesterases, regulando a atividade de células por um mecanismo dependente da GMPc (KOSSMANN et al., 2014).

A GCs ou sensível ao NO é um heterodímero, composto por duas subunidades diferentes α e β que são constituídas de um domínio catalítico ciclase C-terminal, uma região de dimerização central e um segmento N-terminal, onde se encontra o grupamento heme. A porção N-terminal de cada subunidade constitui o domínio de ligação do grupamento heme. A presença desse grupamento é responsável pela sensibilidade da GCs ao NO. Este, por sua vez, reagindo com o grupamento heme da enzima forma um complexo nitrosil-heme penta-coordenado que é responsável pela indução ao estado ativado da enzima, aumentando sua atividade catalítica (conversão de GTP em GMPc) (KOSSMANN et al., 2014).

Agentes oxidantes, como o azul de metileno, inibem a ativação da enzima por oxidarem o grupamento heme para o estado férrico, impedindo sua ligação ao NO. Assim como, agentes redutores como tióis ou ascorbatos levam ao aumento a atividade da enzima, provavelmente por manterem o ferro no estado reduzido facilitando a ligação do NO ao grupamento heme (BARRAUD et al., 2014).

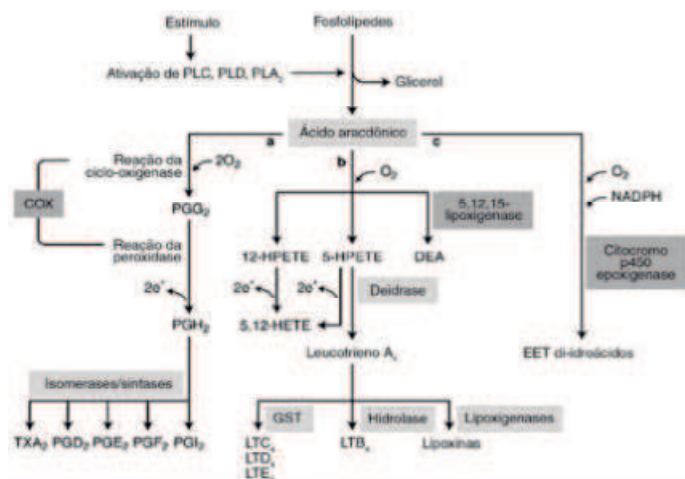
2.2.5 Mediadores Inflamatórios Derivados do Ácido Araquidônico (AA)

O AA é um ácido graxo insaturado de vinte carbonos com quatro duplas ligações, que se apresenta esterificado nos fosfolipídios e é liberado através da ação da fosfolipase A₂ (PLA₂) na membrana celular através de estímulos químicos, inflamatórios, traumáticos ou mitogênicos. As enzimas da família das PLA₂ estão envolvidas em vários processos fisiopatológicos como a inflamação, além da manutenção da função celular normal, pelo fornecimento do AA. A PLA₂ através da hidrólise das ligações sn-2 de fosfolipídeos liberam o AA e também os lisogliceril-fosforilcolina (liso-PAF) da membrana celular que contém glicero-fosfolipídeos que pode ser convertido em eicosanoides e fator de agregação plaquetária (PAF). O liso-PAF precursor do PAF é sintetizado pela ação da PLA₂ quando os produtos dos lisofosfolipídeos contêm um radical colina e um grupo acil ligado na posição sn-1 (DELLINGER et al., 2015).

A PLA₂ está amplamente distribuída na natureza, sendo encontrada no meio intra e extra celular. A PLA₂ intracelular, encontra-se no citosol, sua catalise não depende do Ca²⁺ são associadas as membranas e estão envolvidas no metabolismo fosfolipídico, na transdução de sinal e outras funções celulares essenciais. A PLA₂ extracelular de origem secretória, tem catalise dependente do Ca²⁺ e são abundante em sucos pancreáticos de mamíferos e venenos de cobras e insetos, estão envolvidas em diversos processos como: na digestão, liberação de mediadores lipídicos, proliferação celular, exocitose, doenças inflamatórias, entre outras (MURAKAMI; TAKETOMI, 2015).

O AA pode ser metabolizado pela prostaglandina endoperoxido H sintase (PGHS) ou COX pela adição de O₂ molecular, formando a prostaglandina G₂ (PGG₂). Esta mesma enzima também catalisa a redução da prostaglandina G₂ para formar a PGH₂. A PGG₂ e a PGH₂, são substratos que darão origem a diferentes PGs e TXs ativos, como PGD₂, PGE₂, PGF₂α, PGI₂ e TXA₂, conforme a presença de sintases específicas, pelas lipoxigenases (5-LOX e 12-LOX), dando origem aos leucotrienos (LTs), lipoxinas (LXs), entre outros produtos e pela citocromo P₄₅₀, obtêndo-se produtos da via da epoxigenases. As PGs, TXs e LXs são ligadas a receptores acoplados a proteína G para a formação de segundos mensageiros (Figura 2) (BUCKLEY; GILROY; SERHAN, 2014).

Figura 2 – Representação esquemática da biossíntese de eicosanoides das principais vias que fazem parte do metabolismo do ácido araquidônico



Fonte: Belton; Fitzgerald (2003)

Em 1991, descobriu-se a existência de duas isoformas da enzima ciclo-oxigenase, designadas COX-1 e COX-2, e posteriormente a COX-3. Essas enzimas são codificadas por diferentes genes, com estruturas químicas similares com 60% de homologia na sequência de aminoácidos e padrões singulares de expressão. A isoforma COX-1 é expressa de forma constitutiva (constante) na maioria dos tecidos; enquanto a COX-2 é induzida nos processos patológicos e a COX-3 é considerada uma variante da COX-1 (DE PAULA ROGERIO et al.; 2015).

A COX-1 é essencial para a manutenção do estado fisiológico normal de muitos tecidos, incluindo a proteção da mucosa gastrointestinal; controle do fluxo sanguíneo renal; homeostasia; respostas autoimunes; funções pulmonares e do sistema nervoso central; cardiovasculares e reprodutivas. A COX-2, induzida pela ação de citocinas (TNF- α e IL-1 β , IL-2) endotoxinas e fatores de crescimento, origina PGs indutoras, sendo expressas em resposta ao estímulo inflamatório e contribuem no desenvolvimento do edema, rubor, febre e hiperalgesia. Essa isoforma também está expressa nas células vasculares endoteliais normais, que secretam PGs em resposta ao estresse de cisalhamento promovendo a vasodilatação e evitando a agregação plaquetária (IOANNIDOU, A.; GOULIELMAKI; GARINIS, 2016).

A COX-2 também está presente no útero, cartilagens, ossos, rins, ovário no SNC auxiliando na neurotransmissão e na consolidação da memória. Já no tecido renal participa na manutenção dos níveis de reabsorção de sódio e de água (GOODMAN; GILMAN, 2015).

A COX-3 está expressa no córtex cerebral, no coração, no endotélio vascular, nos rins e nos tecidos neuronais. Sendo mais sensível ao acetaminofeno (paracetamol) do que a COX-1 e COX-2. Postulou-se que a inibição da COX-3 poderia representar o mecanismo central primário pelo qual as drogas analgésicas e antipiréticas do tipo AINEs desenvolveriam suas atividades de redução da dor e da febre. Entretanto, sua função é pouco conhecida, mas, acredita-se que esteja envolvida na produção de substâncias anti-inflamatórias, o que poderia explicar os períodos de remissão visto em casos de doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatóide (KLOPCIC, et al, 2015).

Outros eicosanóides importantes no processo inflamatório são os leucotrienos, sintetizados a partir AA pelas lipoxigenases. Essas enzimas estão presentes nos pulmões, plaquetas, mastócitos e leucócitos, especialmente no citosol, principalmente a 5-lipoxigenase (5-LOX) que age sobre o AA produzindo o ácido 5- hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE), um composto quimiotático para leucócitos, que é convertido em leucotrieno A₄ (LTA₄) que dão origem aos LTs. O principal LT envolvido na resposta inflamatória aguda é o leucotrieno B₄ (LTB₄), agente quimiotático de neutrófilos é produzido principalmente por neutrófilos e macrófago (MOTA, 2013).

Também, pela via das lipoxigenases temos LXs, especificamente a lipoxina A₄ (LXA₄), e B₄ (LXB₄) sintetizadas a partir da ação enzimática da 5-lipoxigenase. As lipoxinas agem interferindo com ações na microvasculatura, com propriedades vasorreguladoras, antagonizando o efeito do LTB₄. Além desses efeitos, possuem ações específicas de limitar o recrutamento de leucócitos PMNs, quimiotaxia e aderência ao local da inflamação (SERHAN, 2008; LEO, 2015).

Os prostanóides estão intimamente relacionados com eventos vasculares e celulares que ocorre no processo inflamatório contribuindo para o surgimento dos sinais clássicos da inflamação. A fase vascular caracteriza se, inicialmente, por dilatação arteriolar desencadeada pelas PGI, PGD₂, PGE₂ e LTB₄ proporcionando o aumento no fluxo sanguíneo, aumento na permeabilidade vascular e, por último, exsudação plasmática, carreando para os tecidos componentes dos sistemas complemento, da coagulação, fibrinolítico e das cininas. Simultaneamente, ocorre a ativação dos eventos celulares que promovem e a aderência e a quimiotaxia de células PMN, mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos) e mastócitos. (RIBEIRO et al., 2015; WANG, 2016).

Na dor inflamatória, as PGI₂, PGE₁ e PGE₂ sensibilizam os nociceptores, tornando-os mais responsivos aos agentes álgicos endógenos, como bradicinina e histamina. Nesse sentido, tem sido referido que a PGI₂ relaciona-se com a hiperalgesia imediata e de curta duração, enquanto a PGE₂ com a dor de ação prolongada, que pode persistir por um período de até seis horas (JOSÉ, 2014).

No decorrer do processo inflamatório, certos agentes deletérios, como as endotoxinas bacterianas, fazem com que os macrófagos liberem o pirógeno endógeno, IL-1 que, por sua vez, é capaz de estimular a síntese de PGE₂, que causa a elevação do ponto de ajuste da temperatura corpórea estimulando os centros hipotalâmicos de termorregulação (TARNAWSKI et al., 2013).

Assim a PLA₂, a COX e a LOX são enzimas chave na cascata inflamatória e a interferência nessa via, através da inibição da atividade dessas enzimas, é o principal mecanismo de ação da maioria das drogas anti-inflamatórias atualmente em uso (MURAKAMI et al., 2014).

2.3 Mecanismo de Ação dos Fármacos Anti-inflamatórios

As principais classes de fármacos anti-inflamatórios são os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) que possuem propriedade anti-inflamatória, analgésica, antitérmica e antitrombótica e os anti-inflamatórios esteroides (AIEs) que exibem atividade anti-inflamatória e imunossupressora (UNGPRASERT; SRIVALI; THONGPRAYOON, 2016).

Os AINEs encontram-se, entre os medicamentos mais prescritos em todo o mundo. Sendo utilizados principalmente no tratamento da inflamação, dor e edema, bem como nas osteoartrites, artrite reumatoide e distúrbios músculo-esqueléticos. Essa classe inclui a aspirina e vários outros agentes inibidores da COX, seletivos ou não, fazendo com que ocorra uma diminuição na conversão do AA em PGs, TXs e outros prostanoides (JUNG et al., 2015).

Os AINEs não seletivos são os mais antigos, designados tradicionais ou convencionais. Seus efeitos são inespecíficos, sintomáticos e não interfere na história natural do processo inflamatório. O problema de sua utilização reside no fato de que o uso destes medicamentos, principalmente se for de forma crônica, pode provocar sérios efeitos colaterais. Seu efeito na produção de prostaglandinas é também a principal causa da sua toxicidade, promovendo a alteração da função renal, risco de doenças cardiovasculares e problemas gastrointestinais (CHANG et al., 2015).

As enzimas COX desempenham um importante papel na homeostasia cardiovascular. As plaquetas contêm apenas a COX-1. O TXA₂, sintetizado primariamente nas plaquetas pela atividade da COX-1, causa agregação

plaquetária, vasoconstrição e proliferação de células musculares lisas. Em contra partida, a síntese de PGI_2 , amplamente mediada pela atividade da COX-2 nas células endoteliais macrovasculares, contrapõe-se a esses efeitos (BRUNE; PATRIGNANI, 2015).

A PGI_2 e a PGE_2 , são fundamentais para proteção da mucosa gástrica por impedir os efeitos corrosivos do ácido estomacal, bem como para manter a condição naturalmente saudável da mucosa. Essas prostaglandinas são produzidas por ação da COX-1 e, as consequências do seu bloqueio pelos AINES não seletivos no trato gastrointestinal são a inibição da proteção de sua mucosa e o aumento da secreção ácida, podendo levar à erosão, ulceração, perfuração e hemorragia (DWIVEDI; GURJAR; KUMAR, 2015).

A PGI_2 , PGE_2 e PGD_2 , geradas também por ação da COX-1 em distintas regiões dos rins, dilatam a vasculatura, diminuem a resistência vascular renal e aumentam a perfusão do órgão. A inibição desses mecanismos pelos AINES não seletivos tende a diminuir a perfusão renal total e redistribuir o fluxo sanguíneo para o córtex, o que pode provocar uma vasoconstrição renal aguda, isquemia medular e, em certas condições, insuficiência renal aguda (NISSEN et al., 2016).

Além disso, PGE_2 e $\text{PGF}_2\alpha$ medeiam efeitos diuréticos e natriuréticos, enquanto PGE_2 e PGI_2 antagonizam a ação da vasopressina constituindo um mecanismo autorregulador em presença da diminuição da perfusão renal, como na insuficiência cardíaca e em condições de hipovolemia (GUNTER et al., 2017).

Essas prostaglandinas promovem dilatação compensatória da vasculatura renal para assegurar um fluxo sanguíneo normal e prevenir a deterioração funcional aguda do rim. Também reduzem a liberação de noradrenalina, favorecendo a vasodilatação. É devido, à atenuação desses mecanismos contrarregulatórios mediados pelas prostaglandinas através do bloqueio da COX-1 que os AINES não seletivos comprometem a função renal, especialmente em pacientes de alto risco, que já apresentam redução da perfusão renal (GUNTER et al., 2017). Convém salientar que tanto a aspirina quanto os outros AINES não bloqueiam a via da LOXs; não inibindo, desta forma, a produção de LTs. Portanto, os AINES reduzem, mas não eliminam

completamente os sinais e sintomas inflamatórios (AHMETAJ-SHALA et al, 2015).

O bloqueio seletivo para COX-2 acarreta um desequilíbrio entre os fatores anti- e pró-trombóticos, com predomínio de TXA₂ em detrimento da PGI₂, o que desencadeia uma série de complicações cardiovasculares. Em virtude da gravidade dessas complicações provocadas pelos inibidores seletivos da COX-2, sua comercialização foi restringida em seu uso ou retirados do mercado. No Brasil, ainda são comercializados o celecoxibe e o etoricoxibe, ambos com retenção de receita médica e com clara indicação dos riscos de complicações cardiovasculares (KOWALSKI; MAKOWSKA, 2015).

Além dos AINEs, os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) denominados glicocorticóides atuam em vários tipos celulares e tecidos. Sendo utilizados no tratamento de uma variedade de doenças inflamatórias e imunológicas, incluindo asma, dermatites, artrite reumatoide a alguns casos de câncer (GOES; JACOBS; BIJLSMA, 2014).

Seu mecanismo de ação envolve interações com receptores intracelulares pertencentes à superfamília dos receptores glicocorticóides (GR) que controlam a transcrição gênica. Ao serem ativados, regulam a expressão de genes-alvo, modificando, assim, os níveis e o conjunto de proteínas sintetizadas, de maneira positiva (transativação) ou negativa (transrepressão) (DEJEAN; RICHARD, 2013).

No mecanismo de transativação, após a formação do complexo GR-hormônio, este se liga à certas regiões dos genes sensíveis aos esteróides, denominada elementos de resposta aos receptores GR, levando a uma lenta indução (24-48 horas) da síntese de lipocortina e p11/calpactina, que inibem a enzima PLA₂ do metabolismo do ácido araquidônico, impedindo a formação das PGs e dos LTs; inibidor de protease secretora de leucócitos. Também inibem a expressão de genes da colagenase, elastase, ativador de plasminogênio, NOS (HARRIS et al, 2015).

No mecanismo de transrepressão, o complexo GR se liga a moléculas coativadoras com atividade de histona acetiltransferase (HAT) levando à inativação de fatores de transcrição nuclear pró-inflamatórios como fator nuclear kappa B (NF-κB). Não havendo a expressão de determinados genes

como, por exemplo, os que controlam a síntese da COX-2, citocinas e moléculas de adesão (ERRANTE et al., 2014).

Apesar dos AIEs serem considerados os fármacos mais potentes utilizados no tratamento da inflamação e de possuírem ações mais amplas que os AINEs, apresentam efeitos adversos severos associados principalmente a suas ações sobre o metabolismo, frente ao uso crônico ou em altas doses. Além disso, indivíduos que fazem uso crônico deste tipo de anti-inflamatório ficam predispostos a infecções por seus efeitos imunossupressores (MOTA, 2013).

Apesar do avanço nas terapias para o controle da inflamação, e da existência de medicamentos eficazes, atualmente não há medicamentos que sejam, ao mesmo tempo eficazes e apresentem mínimos efeitos colaterais. Encontrar substâncias com maior eficácia e com baixa toxicidade tem levado os pesquisadores à uma busca frequente por novos fármacos. Entre os métodos de pesquisa, os processos de modificação molecular são os mais promissores (NAVIDPOUR et al., 2014).

2.4 Compostos Químicos Sintéticos como Fonte de Novos Fármacos

Os avanços expressivos da química e biologia e a melhor compreensão de vias bioquímicas, alvos moleculares e de mecanismos farmacológicos, tornaram possível a descoberta de inovações terapêuticas notáveis. A química medicinal, tem papel central nesse processo, sendo responsável pelo desenvolvimento de novas substâncias químicas bioativas; através da síntese ou modificação molecular; extração, isolamento, identificação e elucidação estrutural de princípios ativos oriundos de plantas, animais ou minerais; compreensão, a nível molecular, de processos bioquímicos, toxicológicos e farmacocinéticos e a criação de relações entre estrutura química e atividade farmacológica (COSTA, 2015).

A busca por novos fármacos que possam ser empregados como alternativos aqueles já consolidados no mercado, com maior eficácia, menos efeitos colaterais e com baixa toxicidade tornou-se uma procura frequente dos pesquisadores. Entre os métodos de pesquisa, os processos de modificação molecular mostram-se bastante promissores, consistindo na realização de

pequenas modificações na estrutura químicas na molécula de um composto protótipo matriz, mantendo constante seu grupo farmacofórico e obtendo-se novos compostos análogos ou homólogos, sem perda das principais propriedades do composto matriz (ASIF; HUSAIN, 2013).

Nesse contexto, os derivados N-acilhidrazônicos sintéticos tem despertado o interesse de pesquisadores por apresentarem diversas propriedades farmacológicas com toxicidade mínima e efeitos promissores (SINGH; RAGHAV, 2011, GUEDES, et al., 2016). Esses achados forneceram uma via terapêutica para desenvolvimento de derivados biologicamente ativos candidatos a novos fármacos. Substâncias que contêm em suas estruturas uma porção hidrazona têm sido relatadas na literatura como inibidoras da COX e 5-LOX, apresentando, portanto, pronunciadas atividades analgésica e anti-inflamatória (REIS, 2011).

2.5 Derivados N-acilhidrazônicos

A fração N-acilhidrazona (NAH) é considerada uma estrutura privilegiada, estando presente na estrutura química de muitos compostos com diversas atividades farmacológicas. Os relatos na literatura sobre sua excelente resposta anti-inflamatória com efeitos colaterais mínimos são recorrentes (DO AMARAL et al., 2014).

As hidrazonas são compostos orgânicos obtidos através de reação de condensação entre aldeídos ou cetonas com hidrazina (Esquema 1). São bases de Schiff pertencentes a uma classe de compostos caracterizada por conter o esqueleto $R_1R_2C=N-NR_3R_4$. Os centros ativos das hidrazonas são os átomos de carbono (C) e nitrogênio (N), onde os átomos de N da hidrazona são nucleofílicos, mas o N do tipo amino é o mais reativo, enquanto o átomo de C é tanto nucleofílico como eletrofílico, conferindo características que são responsáveis pelas propriedades físicas e químicas das hidrazonas, sendo utilizadas para a síntese de compostos orgânicos, como compostos heterocíclicos (KAJAL et al., 2014).

Quando essa hidrazina é uma N-acilidrazina (ou hidrazida), o produto é considerado uma N-acilhidrazona, de acordo com o esquema 2. (KAJAL et al.,

2014). A função básica da função N-acilhidrazona está representada na Figura 3.

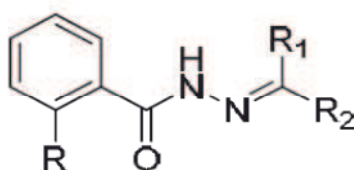
Esquema 1. Reação geral de formação de uma hidrazona.



Esquema 2. Reação geral de formação de uma N-acilhidrazona.



Figura 3 – Estrutura básica da função N-acilhidrazona.



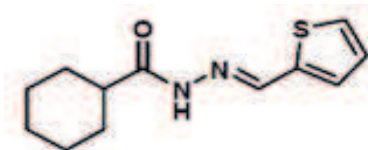
Fonte: Mota (2013)

2.5.1 Derivados acilhidrazônicos com Propriedades Anti-inflamatória

Vários estudos que comprovam a ação anti-inflamatória de derivados NAH foram descritos na literatura (BEZERRA NETTO, 2004; DUARTE, 2006; UNSAL-TAN, et al., 2010; BISPO JÚNIOR et al., 2011; KAJAL et al., 2014). Silva et al. (2014) demonstraram o potencial anti-inflamatório de uma série de N-acilhidrazonas. Os compostos não demonstraram toxicidade renal ou hepática nem atividade imunossupressora. Os mecanismos de ação destes compostos podem envolver a inibição de enzimas como as COX e a 5-LOX (FIORUCCI et al, 2001; REIS et al., 2011).

Em estudos recentes Silva et al. (2015) comprovaram as atividades analgésicas e anti-inflamatória de seus derivados ciclohexil-N-acilhidrazonas na dose de 100 mmol/Kg (v.o.) frente aos modelos de inflamação aguda *in vivo*: peritonite induzida por carragenina, contorções abdominais por ácido acético, o composto 13 (Figura 4) apresentou os melhores resultados nesses testes com uma diminuição significativa no número de leucócitos (81,9%) e de contorções abdominais (65,7%), respectivamente.

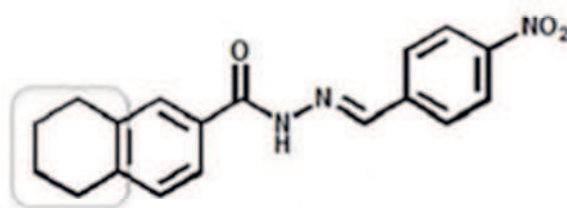
Figura 4 Derivado acilhidrazônico (E) -N '- (Piridin-4-ilmetileno) ciclohexanocarbohidrazida



Fonte: Silva et al., 2015

Cordeiro et al. (2016) testaram a atividade anti-inflamatória de uma série de derivados N-acilhidrazônicos e o composto tetra-hidronaftil-N-acil-hidrazona (Figura 5) obteve os melhores resultados. No modelo de inflamação aguda de bolsão de ar subcutâneo nas doses de 0,3 a 30 mg / kg v.o. esse derivado foi capaz de reduzir significativamente a migração de leucócito para o bolsão em 98% na dose máxima testada. Também diminuindo a biossíntese de NO, TNF- α e EROs, componentes chave na progressão do processo inflamatório. Além disso, todos os derivados testados não apresentaram mielotoxicidade ou citotoxicidade *in vitro*.

Figura 5 – Derivado acilhidrazônico tetra-hidronaftil-n-acil-hidrazona

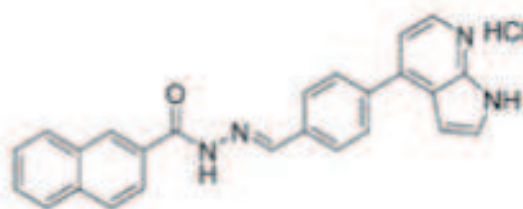


Fonte: Cordeiro et al. (2016)

Em estudo semelhante Guedes et al. (2016) comprovaram a atividade anti-inflamatória de seus derivados, principalmente o derivado (E) - N '- (4- (1H-pirrolo [2,3-b] piridin-4-il) benzilideno) -2-nafto-hidrazida cloridrato (derivado N-acilhidrazônico 7 azaindolico) (Figura 6). Nas doses administradas v.o. de 30 e 100 mmol/kg o composto foi capaz de diminuir a migração leucocitária em 29 e 35%, respectivamente. Também reduziu os níveis de NO, na dose de 10mmol/Kg; EROs e TNF α . No edema de pata induzido por formalina o

composto mostrou-se eficaz na fase inflamatória com a dose de 30 mmol/kg. Essa atividade se deve a inibição do complexo enzimático IKK β . Este complexo é responsável pela ativação do Fator Nuclear kappa B (NF-kB) um regulador do processo inflamatório responsável pela ativação de mediadores pró-inflamatórios.

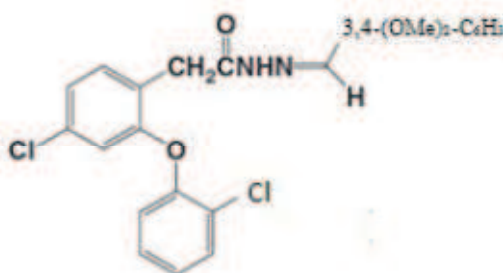
Figura 6 Derivado acilhidrazônico (E) - N' - (4- (1H-pirrólo [2,3-b] piridin-4-il) benzilideno) -2-nafto-hidrazida



Fonte: Guedes et al. (2016)

A atividade anti-inflamatória também foi testada por Nakhostin et al. (2016) no modelo de edema de pata por carragenina, onde foi constatado que o composto N- (3,4-dimetoxibenzilideno) - 2- (4-cloro-2- (2-clorofenoxi) fenil) aceto hidrazida (Figura 7) na dose de 10 mg/Kg, v.o. exibiu uma redução de 86% do edema na fase inflamatória em comparação com o controle (diclofenaco sódico) que exibiu uma redução de 61%. Um possível mecanismo proposto foi que esse derivado atue inibindo a COX-1.

Figura 7 Derivado acilhidrazônico N- (3,4-dimetoxibenzilideno) - 2- (4-cloro-2- (2-clorofenoxi) fenil) acetohidrazida



Fonte: Nakhostin et al. (2016)

O processo inflamatório é um evento importante para a defesa do organismo, porém pode gerar danos. O entendimento dos mecanismos efetores desse processo tem fornecido dados para intervenção terapêutica anti-inflamatória que apesar de eficaz gera inúmeros efeitos indesejados com o uso crônico. Esse fato tem levado a busca de novos agentes com potencial atividade anti-inflamatória por isso, entender e elucidar os mecanismos pelos quais essas moléculas atuam pode trazer informações valiosas na busca de novos fármacos.

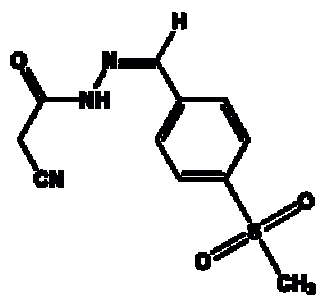
2.6 Derivados N-acilhidrazônicos substituídos - N'-benzilideno-2-cianoacetohidrazida (série JR)

Em pesquisa anterior realizada por nossa equipe Apolinário (2016) caracterizou três compostos derivados N-acilhidrazônicos substituídos representantes da série (JR04, JR09 e JR19). Indicando que as características físico-químicas dos compostos sintetizados mostraram-se favoráveis para realização de testes farmacológicos *in vivo*. O que nos levou a dar continuidade nos testes com esses compostos.

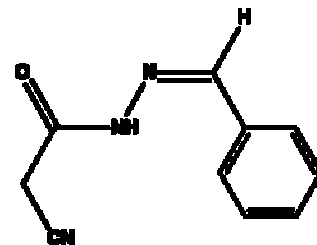
O composto JR04 possui o grupamento metilssulnonil ($\text{CH}_3\text{O}_2\text{S}$) como grupo substituinte no anel benzilideno. O composto JR 19 possui o NH- indólico em sua estrutura. Já composto JR09 é o protótipo da série por não apresentar grupo substituinte.

Nesse mesmo estudo as três moléculas da série JR foram testadas frente aos principais modelos de inflamação e nocicepção em modelos animais obtendo-se bons resultados na dose de 10 mg/Kg para atividade anti-inflamatória, principalmente dos compostos JR04, JR09 e JR19. Foi observado em modelos animais uma redução significativa da migração leucocitária na peritonite induzida por carragenina (48, 61 e 52%), bolsão de ar subcutâneo (55, 52 e 66%), respectivamente; uma redução significativa do edema no modelo de edema de pata induzido por carragenina (96, 92 e 75%) na quarta hora; e redução da nocicepção na segunda fase no modelo de nocicepção por formalina (0, 45 e 39%), respectivamente. Por esse motivo foi dada continuidade no estudo com esses compostos para elucidar os possíveis mecanismos de ação envolvidos.

Figura 8– Derivados N'-benzilideno-2-cianoacetohidrazida (JR04, JR09 e JR19)



JR04



JR09

JR19

Fonte: Apolinário (2016)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os possíveis mecanismos de ação anti-inflamatória dos derivados 2-cianoacetohidrazida da série JR (JR04, JR09 e JR19)

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar *Docking* Molecular e verificar uma possível interação dos compostos JR04, JR09 e JR19 com o sítio catalítico das COX-1 e COX-2;
- Avaliar a inibição *in vitro* de COX-1 e COX-2 dos compostos JR 04 e JR09;
- Verificar a toxicidade gástrica das moléculas JR09 e JR19;
- Verificar a citotoxicidade em eritrócitos humanos dos derivados JR09 e JR19;
- Estudar *in vivo* a participação de óxido nítrico no efeito anti-inflamatório do composto JR19 através do uso de inibidor da síntese de NO;
- Verificar a participação *in vivo* da GCs na atividade anti-inflamatória do composto JR19, utilizando inibidores desta enzima.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos compostos N'-2-ciano-(4-(metilsulfonil-benzilideno)-acetohidrazida (JR04), N'-benzilideno-2-cianoacetohidrazida (JR09) e N' - (1H-indol-3il) metileno) – 2 - cianoacetohidrazida (JR19)

Os derivados N-acilhidrazônicos N'-2-ciano-(4-(metilsulfonil-benzilideno)-acetohidrazida (JR04), N'-benzilideno-2-cianoacetohidrazida (JR09) e N' - (1H-indol-3il) benzilideno) – 2 – cianoacetohidrazida (JR19) foram sintetizado e cedido pelo Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular (LSVM) ligado à Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura, de acordo com as técnicas desenvolvidas e padronizadas por este laboratório. A metodologias referentes à obtenção dos compostos encontram-se descrita no Trabalho de Conclusão de Curso de Moura (2016). A caracterização físico-química, elucidação estrutural e atividade farmacológica preliminar *in vivo* estão descritas na dissertação de Apolinário (2016).

4.2 Substancias Utilizadas

Água destilada; Solução salina estéril (NaCl 0,9%); Indometacina e celecoxib (Sigma Aldrich®, USA); Carragenina (Sigma Aldrich®, USA); Formalina; Heparina sódica 5.000 UI/ml (Cristália®); Cloridrato de quetamina (Vetbrands®); Cloridrato de xilazina (Vetbrands®); Solução de Turk; Tampão fosfato salino (PBS); NG-Nitro-L-argenina Metil Ester (L-NAME) (Sigma Aldrich®, USA); COX-1 e COX-2 (Sigma Aldrich®, USA); hematina (Sigma Aldrich®, USA); tampão Tris-HCl; ácido araquidônico (Sigma Aldrich®, USA); metanol e o N,N,N',N'-Tetrametil-p-fenilenediamina diidrocloridro (TMPD).

4.3 Animais

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* albinos machos e fêmeas, linhagem Swiss pesando entre 25 a 35g todos provenientes do Biotério do

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram aclimatados às condições do laboratório, por cerca de sete dias, antes dos ensaios experimentais. Sob temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro-escuro controlado de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração Presence® tipo pellets e água *ad libitum*, sendo distribuídos nos diferentes grupos experimentais, ao acaso.

4.4 Procedimentos Éticos

Essa pesquisa consiste em uma continuação do trabalho de Apolinário (2016), portanto os protocolos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento (CESED), sob o nº 5905022016 (Anexo 1) são os mesmos, sendo conduzido de acordo com as diretrizes éticas propostas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.5 Local da Pesquisa

Os testes *in silico* e *in vitro* foram realizados no Laboratório de Química e Inovação Terapêutica da UFPE. Os testes farmacológicos *in vivo* foram realizados no Laboratório de Ensaios Farmacológicos da UEPB, em Campina Grande – PB.

4.6 Testes Farmacológicos

4.6.1 Ensaio de Docking Molecular (DM) *in silico*

Os compostos JR04, JR09 e JR19 tiveram suas estruturas bidimensionais modeladas e convertidas para estruturas tridimensionais. Em seguida a energia foi minimizada por mecânica molecular e métodos semi-empíricos, MM+ e AM1 utilizando o software Hyperchem.

A estrutura tridimensional da COX-1 e COX-2 foram obtidas diretamente do banco de dados do Protein Data Bank (PDB), registradas com o código PDB 3N8X e 5IKV respectivamente. Essas macromoléculas estavam cristalizadas e

complexadas juntamente com Ácido Flufenamico e Nimesulida em seu sítio ativo, fármacos comerciais usados como inibidores da COX-1 e 2 respectivamente, sendo, por esse motivo usadas como referência para criação do GRID bem como controle dos resultados. Antes de executar o DM, as proteínas foram tratadas isolando apenas uma cadeia e removendo moléculas de água, outros ligantes e corrigindo possíveis falhas estruturais. Para validação dos dados obtidos no DM utilizou-se ainda os fármacos diclofenaco e ácido meclofemânico inibidores de COX-1 e celecoxib inibidor de COX-2, como fármacos referência.

4.6.2 Ensaio *in vitro* de Inibição das COXs

O screening para atividade inibitória COX-1 e COX-2 foi realizado segundo Dawood et al., (2015), com modificações. Previamente, os compostos e fármacos referência (indometacina e celocoxibe) foram solubilizados em DMSO e testados em triplicata na concentração de 25 mM. Ambas COX-1 e COX-2 foram adicionadas em 180 mL do tampão de ensaio contendo 5 mM de hematina, tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. Depois da adição do composto teste (10 mL) ou controle positivo a mistura reacional foi incubada por 5 min à temperatura ambiente. A reação foi iniciada pela adição de 5 mL de solução de ácido araquidônico (Sigma-Aldrich®) dissolvido em metanol e o N, N, N',N' - Tetrametil-p - fenilenediamina diidrocloridro (TMPD), controle positivo. Depois de incubação por 1 hora, a mistura reacional mediu-se a absorbância em 610 nm. A porcentagem de inibição foi calculada conforme a equação:

$$PI = \frac{Ac - Ab}{At} \times 100$$

PI=Porcentagem de inibição (%)

Ac=Absorbância dos compostos

Ab=Branco da amostra testada

At=Absorbância do controle positivo

Para o cálculo do IC₅₀ foi gerada uma curva padrão a partir de quatro diluições seriadas 1:1 partindo-se da concentração de 12,5mM.

4.6.3 Toxicidade Gástrica

Após 12 horas de jejum os animais foram divididos em 4 grupos (n=5), dois grupos controle (salina), em um grupo foi administrado salina (v.o.) e no outro salina (s.c.). Os outros dois grupos foram administrados uma dose do composto 10x maior (100mg/Kg) do que a dose utilizada nos testes farmacológicos pelas mesmas vias dos controles (APOLINÁRIO, 2016). Após 4 horas os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico (xilazina 20 mg/Kg e ketamina 150mg/Kg i.p.) seguido de deslocamento cervical. Os estômagos foram retirados e abertos ao longo da curvatura maior, as lesões ulcerativas foram quantificadas macroscopicamente através da utilização de uma lupa OLYMPUS® SZ2-LGB para determinação do índice de lesão ulcerativa (ILU), conforme o número e severidade das lesões:

$$ILU = \sum (\text{lesões de nível 1} \times 1) + (\text{lesões de nível 2} \times 2) + (\text{lesões de nível 3} \times 3)$$

Nível 1 = pontos hemorrágicos e ulcerações até 1 mm

Nível 2 = ulcerações até 2 mm

Nível 3 = ulcerações a partir de 3 mm

4.6.4 Citotoxicidade em Eritrócitos

A preparação das hemácias para o teste de citotoxicidade seguiu a metodologia descrita por Cruz-Silva et al (2000), com algumas modificações. O sangue (doador pelo pesquisador) foi coletado pelo laboratório de Análises Clínicas da UEPB e acondicionado em tubo com heparina. O plasma foi retirado após centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos. Posteriormente, a suspensão de hemácias foi lavada com solução salina 1% três vezes. As hemácias foram ressuspensas com a mesma solução e o volume foi ajustado para 5%. Então, colocou-se 1mL da suspensão de hemácias a 5% juntamente com 1mL das soluções dos compostos JR09 e JR19 nas concentrações de 1,0, 2,5, 5,0, 10,0 e 15,0 mg/mL em tubos de ensaio, os quais foram deixados em repouso durante 1 hora a temperatura ambiente para que acontecesse a hemólise. Após esse período, cada tubo foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante retirado para leitura em espectrofotômetro em

um comprimento de onda de 540 nm (CRUZ-SILVA et al., 2001). O controle positivo utilizado foi a solução de Turk 1% e o negativo a solução salina 1%. A análise foi feita em triplicata. O potencial hemolisante do composto em cada concentração foi calculado conforme a equação abaixo:

$$Ph = \frac{Ae - Ab}{At} \times 100$$

Onde:

Ph=Potencial hemolisante (%)

Ae=Absorbância da amostra

Ab=Branco da amostra testada

At=Absorbância do controle positivo

A partir da curva de linearidade gerada com os dados da amostra, foi possível determinar a concentração necessária do composto para causar hemólise de 50% das hemácias (IC₅₀).

4.6.5 Avaliação da participação do NO e Guanilato Ciclase Solúvel

Os animais foram divididos em 6 grupos (n=6) após um jejum de 12h. O grupo 1 recebeu salina v.o, grupo 2 recebeu o composto JR19 v.o. na dose de 10 mg/kg, grupo 3 e 4, receberam respectivamente por via i.p. os compostos L-NAME bloqueador inespecífico da NOS na dose de 20 mg/Kg e Azul de metileno, bloqueador da GCs na dose de 1 mg/Kg, grupos 5 e 6 foram primeiramente pré-tratados com os respectivos bloqueadores e após 30 mim receberam por v.o o composto JR19. Após 30 minutos depois de cada tratamento foi injetada 0,25mL de carragenina a 1% na cavidade intraperitoneal. Quatro horas após a indução da inflamação, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e injetou-se 2 mL de solução tampão fosfato (PBS pH 7.2) na cavidade peritoneal. O abdomen do animal foi levemente massageado e, através de incisão foram coletados os fluidos peritoneais para realizar a contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica. Foram expressos como resultados, as

médias dos números de leucócitos totais/mm³ de cada grupo experimental e a percentagem de inibição da migração de leucócitos comparativamente ao grupo experimental controle.

4.6.5.1 Dosagem de Citocinas

O exsudato do peritônio foi coletado e centrifugado a 7000 rpm a 4°C durante 5 minutos. O sobrenadante foi retirado para a realização dos experimentos das citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-17). Para a dosagem das citocinas foram utilizadas tubos para citometria de fluxo, micropipetador multicanal e de 1 mL, PBS tween 20% e kit referente a cada citocina para modelos em camundongos (BD™) Cytometric Bead Array (CBA) mouse Th1/ Th2/ Th17 CBA Kit. Seguiu-se o protocolo de procedimento padrão para dosagens de citocinas fornecidas pelo fabricante.

4.7 Análises Estatísticas

Os resultados farmacológicos *in vivo* foram avaliados utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do pós-teste de Dunnett. Para a análise das citocinas seguiu-se o pós-teste de Bonferroni. Todos os resultados foram expressos como média desvio padrão (d.p.) e o nível de significância mínimo foi de $p < 0,05$ analisados pelo software GraphPad Prisma 5.0. (San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio de *Docking* Molecular (DM) *in silico*

A supressão da síntese de PGs pela inibição das COXs explica todas as ações dos AINES. Esses fármacos competem com o AA pelo sítio de ligação das COXs. Apesar da eficácia desses fármacos na terapêutica anti-inflamatória, é estabelecido que o seu uso crônico está associado a muitos efeitos colaterais principalmente devido a uma ação não seletiva para COX-2. Sendo assim, muitos estudos passaram a ser realizados com o objetivo de obter compostos que atuem de forma seletiva e segura na inibição da COX-2 (PATRIGNANI; PATRONO, 2014).

Uma das ferramenta úteis nos estudos de correlação molecular e possível atividade de um composto são os estudos de *Docking* molecular ou ancoragem molecular que envolvem representações estruturais mais próximas possíveis do real, através de um conjunto de cálculos, utilizando a química teórica como instrumento matemático e a computação gráfica para manusear os modelos obtidos e predizer a melhor orientação de ajuste de um ligante (composto) em uma proteína (MENG et al., 2011).

O *docking* permite caracterizar o comportamento de moléculas no sítio de ligação das proteínas alvo, bem como, elucidar as interações moleculares, permitindo a predição da conformação, posição, orientação do ligante dentro dos sítios e avaliação da afinidade de ligação. Esses cálculos podem auxiliar a encontrar novos inibidores de proteínas-chave, ao prever quão bem um composto pode ligar-se ao alvo, onde ele pode ligar-se, e que tipos de interações poderá formar no local de ligação (RODRIGUES et al., 2012; HASSAN et al., 2015).

A afinidade de um ligante pelo seu sitio ativo está representada pela energia de ligação do complexo ligante-receptor, quanto menor a energia, maior será a afinidade com o alvo (BALI; OHRI; DEB, 2012).

Com o objetivo de averiguar uma possível interação molecular dos compostos da série JR sobre as enzimas COX-1 e COX-2 foi realizado o ensaio de ancoragem molecular que nos permitiu avaliar a relação estrutura-

atividade e o comportamento desses compostos quando ligados as enzimas COXs.

Nossos resultados mostram (Tabela 1) uma maior afinidade do composto JR04 pela isoforma COX-1 em comparação com o JR09 e o JR19. Mostrando ligeiramente uma maior afinidade em comparação com o fármaco Diclofenaco. O composto JR04 apresenta uma estrutura diferenciada em relação as demais moléculas da série, apresentando um grupamento metilssulfonil ligado ao anel benzilidênico. Tal substituinte é encontrado nos inibidores seletivos da COX-2, sugerindo uma possível ação seletiva para esta isoforma. No entanto, esse composto apresentou baixa variação de energia em comparação com os outros compostos da série. Em comparação com o composto protótipo da série (JR09), por não apresentar substituinte no anel benzilidênico, a adição do grupo metilssulfonil na molécula do JR04 não promoveu melhora na afinidade para isoforma COX-2 em comparação com o celecoxibe. Já o composto JR19 mostrou melhor afinidade para COX-1 em comparação com o JR09. Com relação a COX-2 apesar de não haver grandes variações de energia no três compostos da série, o composto JR09 mostrou uma melhor afinidade pela COX-2. O composto JR04 mostrou-se ligeiramente melhor que o fármaco Nimesulida. O fármaco celecoxibe mostrou melhor afinidade tanto para COX-1 como para COX-2.

Tabela-1 Energia de ligação do complexo ligante-receptor

Compostos	Score	Compostos	Score
COX-1		COX-2	
JR04	-8.3800	JR04	-7.8700
JR09	-6.6800	JR09	-7.0300
JR19	-7.9300	JR19	-7.6600
Ác. Meclofemanico	-8.4800	Ác. Meclofenâmico	-8.0500
Diclofenaco	-8.2600	Nimesulida	-7.8600
Celecoxibe	-11.1400	Celecoxibe	-10.8600

AS COxs são proteínas integrais que se localizam dentro do folheto interno da bicamada lipídica da membrana. O número de aminoácidos (aa) que compõem as duas isoformas COX-1 e COX-2 é bem semelhante e possuem a mesma afinidade pelo AA, diferindo no sítio de ligação das COxs na posição 523, onde na COX-1 observa-se a presença de um resíduo de Ile 523 e na COX-2 um resíduo de Val. A presença do resíduo de Val na estrutura da COX-2 confere a enzima uma maior acessibilidade de um possível ligante de maior massa molecular uma vez que a cadeia lateral desse aa é menor do que a Ile, aumentando em muitas vezes o volume do sítio ativo ligante da COX-2 (EL-SAYED, et al., 2011).

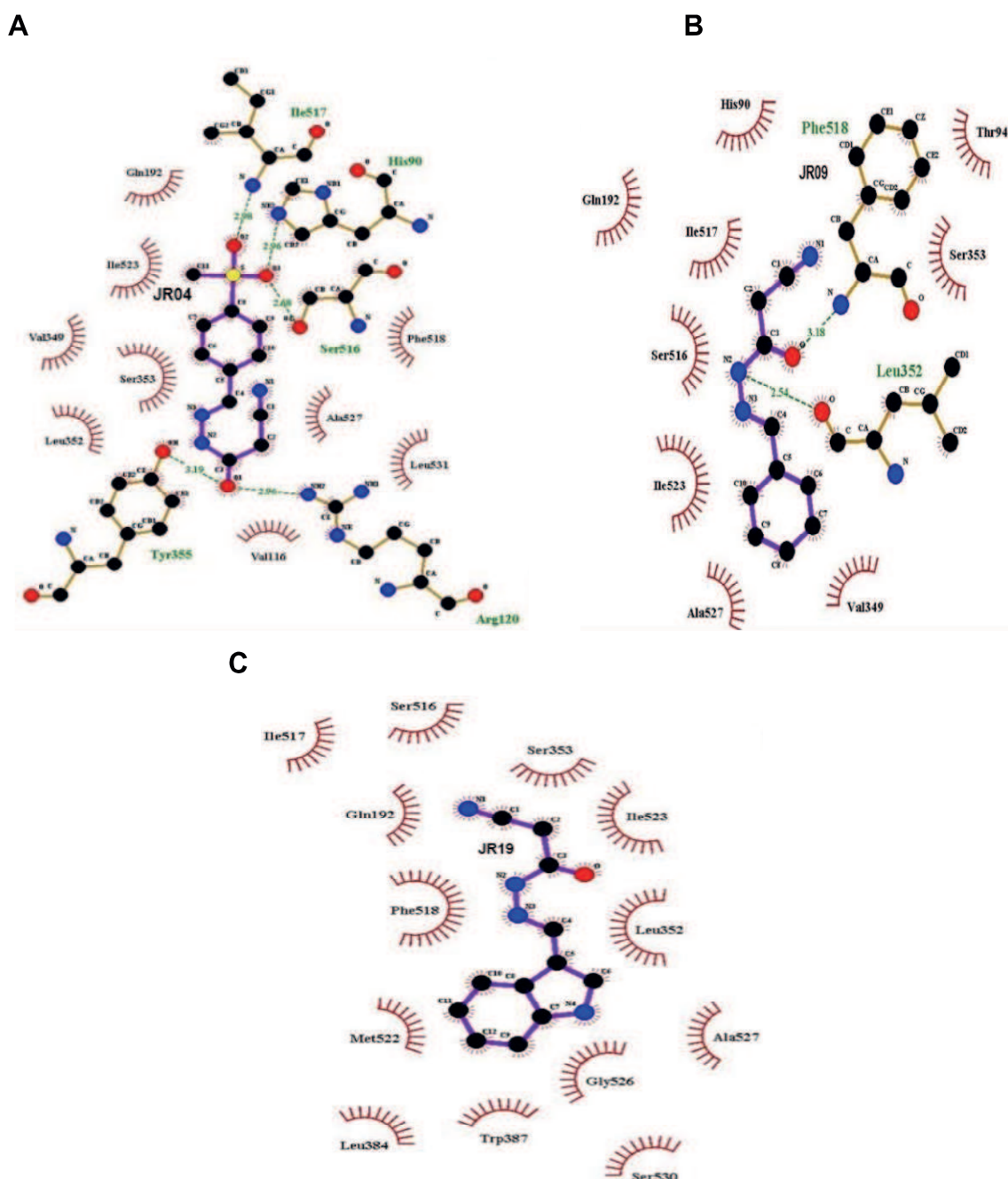
O sítio ativo das COxs é formado por um longo canal hidrofóbico. O sítio de ligação ao AA está localizado na metade superior do canal onde a molécula do AA faz interações com os aa Gly 533, Ser 530, Tyr 385, Phe 518 e ligações de Hidrogênio com Tyr 355 e Arg 120 no sítio ativo da COX-1. No sítio ativo da COX-2 além dessas o AA faz mais três interações com os aa Val 228, Gly 526 e Ala 527 (ARMELIM, 2010). Segundo Hassanein et al. (2017) composto que interagem através de ligações de Hidrogênio com os resíduos de aa His 90 e Arg 513 do bolso lateral da COX-2 formado pela troca da Ile 523 por Val 523 apresentam padrão de seletividade.

Compreendendo isso analisamos qualitativamente a formação do complexo a partir do posicionamento e poses dos compostos no sítio ativo e as interações formadas em comparação com AINES não seletivos e seletivos para COX-2.

Nossos resultados mostram que composto JR04 apresentou maior interação com os aminoácidos (aa) presentes no sítio ativo da COX-1 do que os compostos JR09 e JR19 (Figura 9 A). Essas interações ocorreram através de ligações de Hidrogênio com os aa Ile 517, His 90, Ser 516 na porção metilssulfonil da molécula e Arg 120 e Tyr 355 na carbonila da hidrazida, apresentando um perfil de semelhança com o fármaco Celecoxibe (Figura 10 C) nas interações com os aa Ile 517, His 90 e Ser 516. Porém, no celecoxibe todas as interações ocorreram na porção sulfonamida da molécula. Comparando o composto JR04 com o fármaco diclofenaco (Figura 10 B), podemos observar que ambos fazem ligações de Hidrogênio com os mesmos resíduos de aa (Arg 120 e Tyr 355), no entanto sua afinidade com o sítio

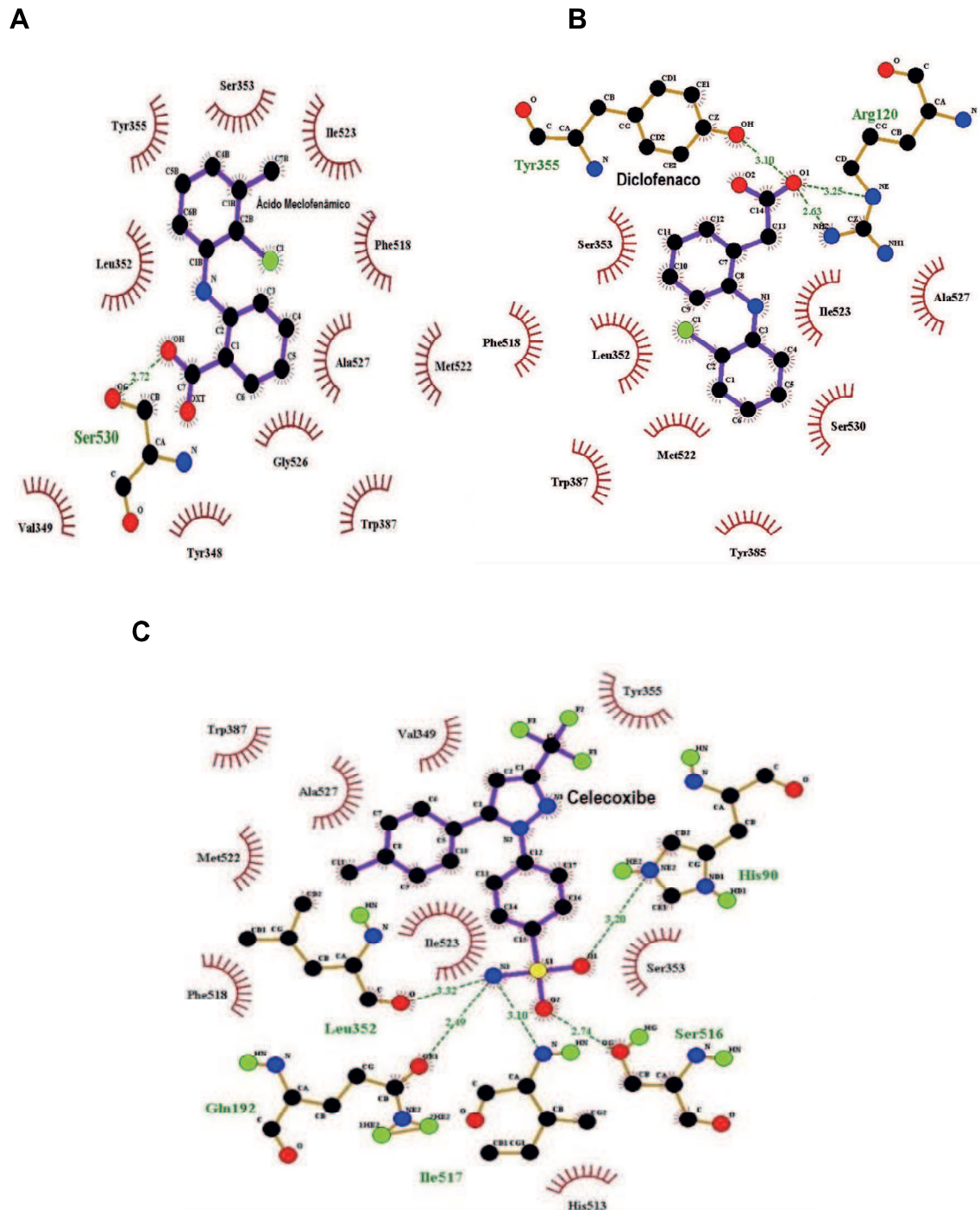
mostrou-se ligeiramente maior (-8.3800 e 8.2600 para JR04 e diclofenaco, respectivamente), na tabela 1. O composto JR09 apresentou ligações de Hidrogênio com os aa Phe 518 e Leu 352 (Figura 9 B) e o composto JR19 apresentou apenas interações hidrofóbicas (Figura 9 C)

Figura 9 Esquema dos compostos JR04, JR09 e JR19 e suas interações com o sítio ativo da COX-1.



Legenda: Em roxo: Compostos; Laranja: Resíduos que formaram ligações de hidrogênio; Linhas pontilhadas em verde: Ligação de hidrogênio; Em vermelho: interações hidrofóbicas.

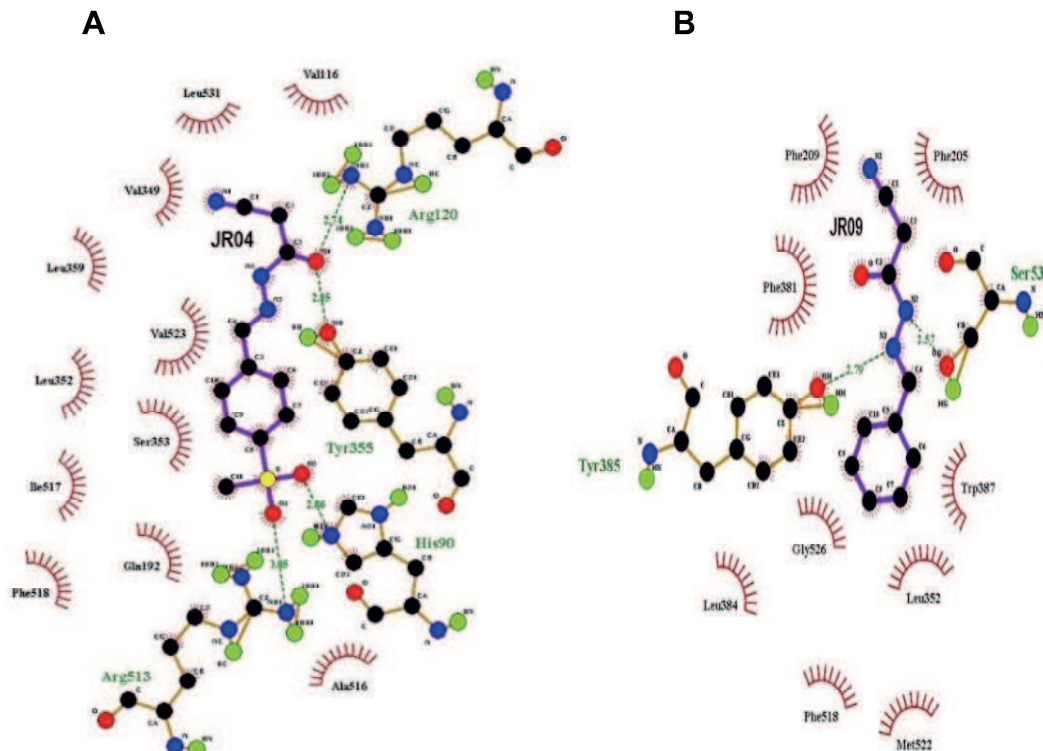
Figura 10 Esquema dos fármacos ácido meclofenâmico, diclofenaco e celecoxibe e suas interações com o sítio ativo da COX-1.



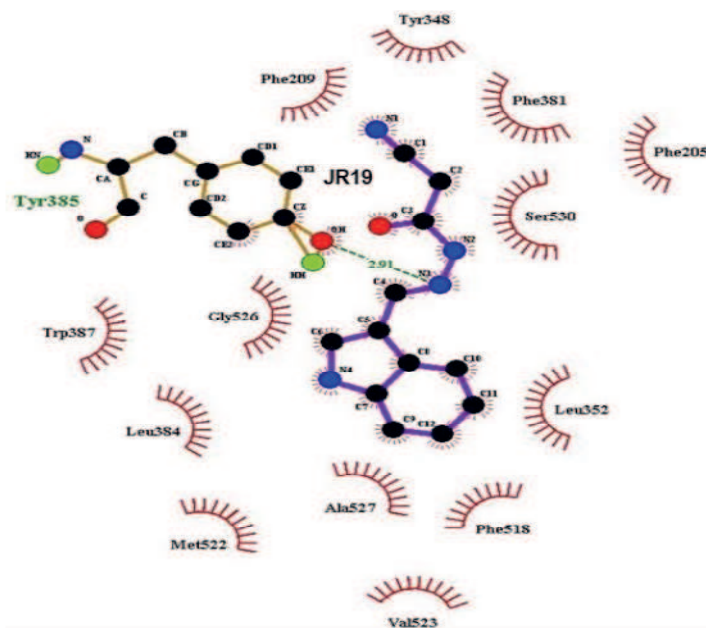
Legenda: Em roxo: Fármacos; Laranja: Resíduos que formaram ligações de hidrogênio; Linhas pontilhadas em verde: Ligação de hidrogênio; Em vermelho: interações hidrofóbicas.

Com relação as interações dos compostos da série JR com o sítio ativo da COX-2 os resultados também mostraram uma maior interação do composto JR04 em relação aos demais compostos da série (Figura 11 A), onde podemos observar que o JR04 interage com os resíduo de Arg 120, Tyr 355, His 90 e Arg 513, mostrando padrões de semelhança com os fármacos Celecoxibe (Figura 12 C) por também interagir através de ligações de Hidrogênio com os aa His 90 e Arg 513 e com a Nimesulida (Figura 12 B) com os aa Arg 120 e Tyr 355. O composto JR09 fez ligações de Hidrogênio com os resíduos dos aa Ser 530 e Tyr 385 (Figura 11 B), os mesmos resíduos de ligação do Ácido meclofenâmico (Figura 12 A), e com o resíduo de Ser 530 se assemelhando ao fármaco Nimesulida. O composto JR19 apresentou apenas semelhança na ligação com o resíduo de Tyr 385 (Figura 11 C) em comparação com o Ácido meclofenâmico.

Figura 11 Esquema dos complexos para COX-2 com os compostos JR04, JR09 e JR19 suas interações com o sítio ativo da COX-2.



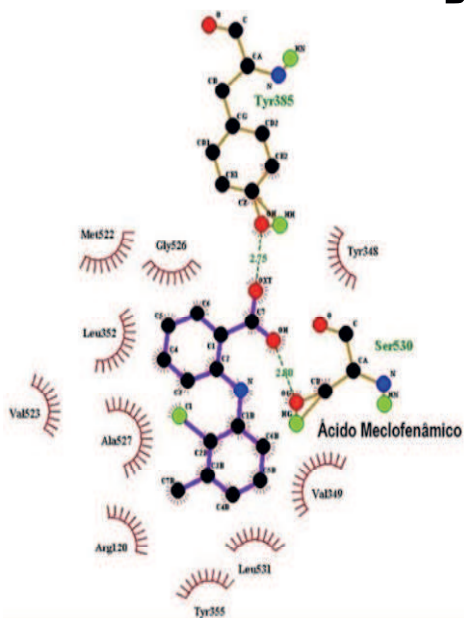
C



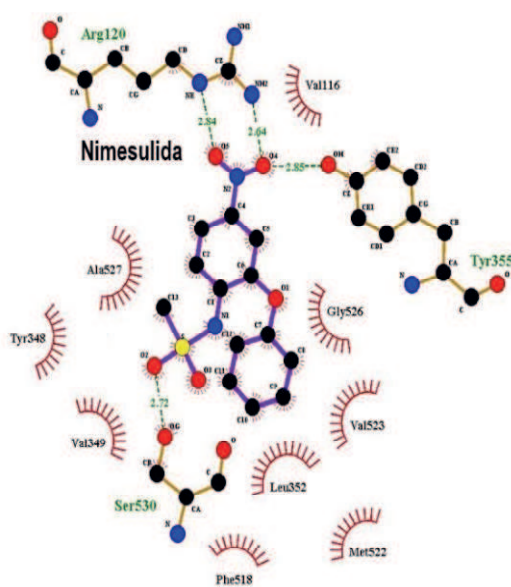
Legenda: Em roxo: Compostos; Laranja: Resíduos que formaram ligações de hidrogênio; Linhas pontilhadas em verde: Ligação de hidrogênio; Em vermelho: interações hidrofóbicas.

Figura 12 Esquema dos fármacos ácido meclofenâmico, nimesulida e celecoxibe e suas interações com o sítio ativo da COX-2.

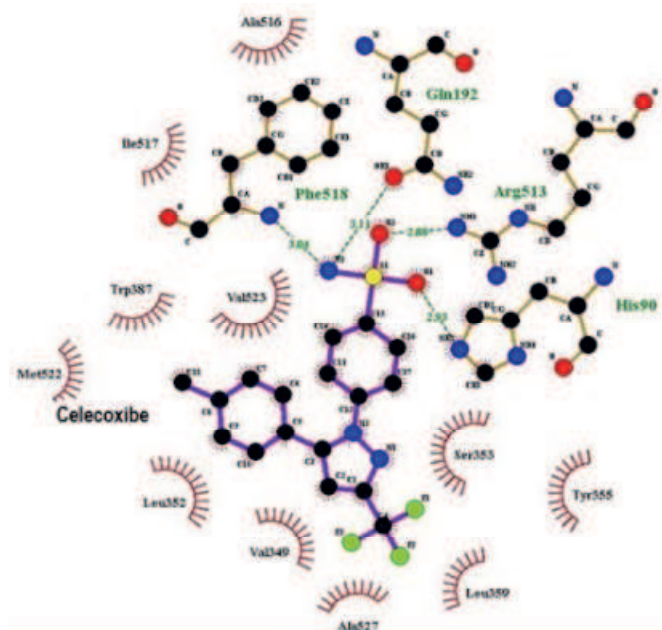
A



B



C



Legenda: Em roxo: Fármacos; Laranja: Resíduos que formaram ligações de hidrogênio; Linhas pontilhadas em verde: Ligação de hidrogênio; Em vermelho: interações hidrofóbicas.

O grau de afinidade e a especificidade da ligação composto-sítio-receptor são determinados por forças intermoleculares eletrostáticas, de dispersão, hidrofóbicas sendo as mais importantes as ligações de hidrogênio e ligações covalentes (KHATRI et al., 2017).

As interações hidrofóbicas ocorrem em um grande número de subunidades hidrofóbicas em peptídeos e fármacos essas interações tornam-se importantes para o reconhecimento do ligante pelo receptor. As ligações iônicas e de hidrogênio são as mais importantes, depois das ligações do tipo covalentes, existentes nos sistemas biológicos, sendo responsáveis pela manutenção das conformações bioativas das moléculas. São formadas entre heteroátomos eletronegativos como oxigênio, nitrogênio, enxofre e o átomo de hidrogênio de ligações O-H, N-H e CF_2 -H. A conformação assumida pelos compostos em meio biológico dependem, entre outros, desses tipos de interações (FERNANDEZ et al., 2011).

Sendo assim, as posições assumidas pelos compostos no sítio ativo da enzima permitem interações com os aa presentes. Cada posição assumida pode levar a associações com aa locais diferentes. Dentre as posições

assumidas as melhores energias de ligação, provavelmente também serão as posições assumidas no meio biológico (MADHAVA et al., 2017).

Contudo, apesar de modelos computacionais serem úteis na compreensão dos eventos envolvidos no reconhecimento molecular ligante-receptor esses modelos representam uma visão parcial da realidade, uma vez que as interações ligante-receptor apresentam características tridimensionais dinâmicas. Dessa forma, o volume molecular do ligante, as distâncias interatômicas e o arranjo espacial entre os grupamentos farmacofóricos são aspectos fundamentais na compreensão das diferenças nas interações (MORTAZAVI et al., 2017).

Os estudos de *Docking* indicam a participação dos compostos JR04, JR09 e JR19 no mecanismo de inibição enzimática das COXs semelhantes aos AINES não seletivos, nesse contexto é relevante o complemento desse estudo com ensaio *in vitro* e/ou *in vivo* que teste a capacidade desses compostos em inibir essas enzimas.

5.2 Ensaio *in vitro* de Inibição das COXs

A COX é a enzima limitante da síntese de prostaglandinas que são mediadores importantes nos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da inflamação. Os níveis de PGs, especialmente a PGG₂, são muitas vezes utilizadas na avaliação da atividade da enzima COX, isso devido a atividade enzimática ser calculada a partir da conversão percentual de ácido araquidônico em PGG₂ e seus produtos de decomposição (BASILE et al, 2012). As COXs estão relacionadas com a clivagem do ácido araquidônico em prostanóides, os compostos candidatos a anti-inflamatórios são testados quanto a sua capacidade de inibir as enzimas COX-1 e COX-2 *in vitro* (LUPESA et al, 2015).

A atividade das moléculas derivadas N-acilhidrazônicas JR04, JR09, JR19 e dos controles (indometacina e celecoxibe) foi realizada utilizando o teste *in vitro* e os resultados estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 Percentual de inibição a 25mM, valores de IC₅₀ e IS para COX de JR04, JR09, indometacina e celecoxibe.

Compostos	% Inibição		IC ₅₀ (µM)		IS (COX-2)	IS= IC5 0 CO X- 2/I C5
	COX-1	COX-2	COX-1	COX-2		
JR04	100	61,61	0.81	1.8	2.22	
JR09	28.10	100	1.38	2.31	1,67	
JR19	2.67	100	1,54	1.02	1,51	
Indometacina	100	86.43	2.16	0.84	0,38	
Celecoxibe	100	100	3.09	0.26	0,08	

0 COX-1

Esses resultados mostram que apesar do composto JR09 não apresentar grupo substituinte sua seletividade para COX-2 (IS de 1,67) mostrou-se melhor em comparação com o composto JR04 (IS de 2,22). Contudo, o composto JR19 portador do grupamento indol foi o que obteve melhor seletividade para COX-2 (IS de 1,51). Na concentração de 25 mM os compostos JR09, JR19 e JR04 promoveram inibição de 100%, 100% e 61,61%, respectivamente, para COX-2. Os controles mostram-se mais seletivos para COX-2 em comparação com os compostos testados.

Os resultados sugerem que os composto JR09 e JR19 atuam de forma seletiva corroborando com o estudo *in silico*, ou seja, possuem uma melhor afinidade pela isoforma 2 da ciclooxigenase.

Em geral, os AINES inibem, de forma variável, ambas as isoformas COXs em suas dosagens terapêuticas, sendo caracterizados de acordo com sua capacidade ou seletividade na inibição de COX-1 e COX-2. Tal característica é expressa em termos de IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50% da atividade COX) usando sistemas de testes *in vitro*. Razões de IC₅₀ para COX-1 e 2 têm sido calculadas para avaliar a capacidade de inibição de cada isoforma; uma baixa relação COX-2/COX-1 implica em ser o agente relativamente seletivo para COX-2. Essa relação pode ser usada como guia para a possível seletividade *in vivo* de um determinado composto (BARREIRO, 2002; REGO, 2012).

Sendo assim, é possível classificar os AINES em três grupos distintos relativo a sua seletividade enzimática. Os que inibem de igual modo as duas isoformas, designam-se por inibidores sem seletividade (de que são exemplos o ibuprofeno, o piroxicam, o naproxeno e o ácido acetilsalicílico), os inibidores seletivos, que são os que têm preferência por uma das isoformas, majoritariamente a COX-2, (como a nimesulida, o etodolac e o meloxicam) e os inibidores específicos, que inibem de forma quase exclusiva a COX-2 (como o rofecoxibe e etorocoxibe) (RAO; KNAUS, 2008).

Nesse contexto podemos inferir que o mecanismo de ação anti-inflamatória dos compostos da série JR ocorre pelo menos em parte, por inibição das COXs e podemos atribuir ainda que essa inibição se dá de forma seletiva para COX-2, principalmente pela ação dos compostos JR09 e JR19.

Contudo testes *in vitro* são apenas sugestivos não necessariamente refletem a complexidade da interação droga-enzima-espécie e a quantidade real de inibição *in vivo*. Um exemplo disso são os fármacos meloxicam e nimesulida considerados inibidores seletivos para COX-2. Baseando-se em estudos *in vitro*, inicialmente sugeriu-se que o meloxicam inibia especificamente a COX-2. No entanto, quando testado *in vivo* em seres humanos, sua especificidade para a COX-2 foi somente cerca de dez vezes maior do que aquela para a COX-1, apresentando ainda inibição plaquetária. Já o nimesulida é considerado com boa potência *in vivo* em modelos inflamatórios, mas com fraca inibição *in vitro* de preparações da COX (BROOKS et al., 1999; PANARA et al., 1999).

Para estes fármacos ainda tem sido difícil atribuir relação de segurança gastrointestinal quando comparados com os demais AINES convencionais, já que apesar de inibir preferencialmente a COX-2, mesmo em doses terapêuticas também causam uma redução significativa na atividade da COX-1 (CASTELLSAGUE et al, 2013).

Como nossos resultados sugerem uma ação seletiva para COX-2 dos compostos JR09 e JR19 e como o composto JR04 mostrou-se mais seletivo para COX-1 resolvemos não utilizá-lo nos demais testes. Nos propomos então a avaliar a atuação dos compostos JR09 e JR19 sobre a mucosa gástrica uma vez que tem sido atribuído a fármacos seletivos para COX-2 uma diminuição da toxicidade gástrica.

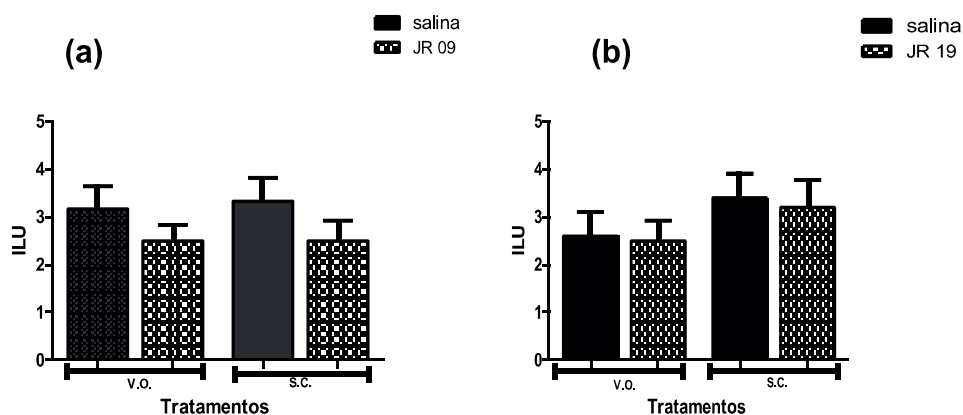
5.3 Toxicidade Gástrica

A determinação da toxicidade gástrica (potencial ulcerogênico) avalia a possibilidade deste compostos provocarem lesões ulcerativas gástricas, sabendo ser este um efeito colateral potencial dos fármacos AINEs tradicionais (GRASSI; ARAÚJO, 2012). São esses eventos gástricos adversos que comprometem o tratamento com os AINEs, o que justifica o desenvolvimento de fármacos mais específicos para a COX-2.

Para avaliar o potencial ulcerogênico dos derivados JR09 e JR19 foi realizada a análise macroscópica da mucosa do estômago de camundongos após exposição a uma dose dez vezes maior que a utilizada nos ensaios farmacológicos, quando administrados tanto por via oral como subcutânea, após 4 horas de exposição a estes compostos. Uma maneira de observar se os compostos eram capazes de provocar danos a mucosa gástrica por contato direto (tópica) bem como a nível sistêmico (inibição de prostaglandinas citoprotetoras).

Nossos resultados mostraram que os compostos JR09 e JR19 na dose de 100mg/Kg não induziram a formação de lesões pontuais ou hemorrágicas como aquelas provocadas pelos AINEs nos modelos animais de úlcera gástrica. Os resultados mostram Índice de Lesão Ulcerativa (ILU) de $2,50 \pm 0,83$ e $2,20 \pm 1,92$ para JR09 e JR19 via oral, respectivamente, e ILU de $2,50 \pm 1,04$ e $5,20 \pm 2,58$ para JR09 e JR19 via s.c., respectivamente, que são semelhantes aos dos grupos tratados com salina (Figura 13), e não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, mesmo quando os compostos foram administrados por v.o. ou por via s.c.

Figura 13 Efeito dos compostos JR09 (a) e JR19 (b) administrado por via oral e subcutânea sobre a mucosa gástrica íntegra.



Valores estão expressos como médias \pm DP. Análise de variância seguida por teste de Dunnet.

Os AINEs têm um amplo uso clínico para o tratamento de inflamação, dor, e febre. Muitos destes fármacos são derivados do ácido carboxílico, encontrando-se na forma não ionizada no lúmen gástrico e, dessa maneira, podem ser absorvidos pela mucosa gástrica modificando o pH ácido para neutro e no interior da mucosa, a droga ionizada é armazenada temporariamente dentro das células epiteliais, o que pode causar danos às mesmas. Porém, esse efeito não parece ser de fundamental importância para a agressão a integridade da mucosa gástrica e sim principalmente pela inibição sistêmica da atividade da COX-1 da mucosa gastrointestinal (GI) (YANDRAPRU; SAROSICK 2015).

Nossos resultados corroboram com os achados de Dos Santos (2009) que testou o potencial ulcerogênico de derivados N-cilhidrazônicos indólicos em ratos 7h após a administração oral nas doses de 100 e 300 $\mu\text{mol/Kg}$, seus resultados mostraram que nenhum dos derivados induziu a formação de lesões pontuais ou hemorrágicas como aquelas provocadas pela indometacina nas mesmas doses.

Outros estudos também comprovam a baixa toxicidade gástrica de derivados N-acilhidrazônicos. Hamdy et al. (2013) testaram a toxicidade gástrica de seus derivados em uma dose 100mg/Kg, v.o. por três dias consecutivos e observaram que todos os compostos testados possuem menos

ulcerogenicidade (índice de úlcera de 12,23-16,74) comparado com o fármaco padrão de cetoprofeno com uma dose de 10 mg/Kg (índice de úlcera de 19,30).

Melo et al (2014) avaliaram a toxicidade gástrica de 5 derivados N-acilhidrazônicos em ratos com uma dose de 300 $\mu\text{mol/kg}$ por v.o., por peso corporal, por um tempo de 17h usando como controle negativo o celecoxib (inibidor seletivo de COX-2) e comparando com os AINEs tradicionais (diclofenaco, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, naproxeno e cetoprofeno), como controle positivo, na mesma dose. Nesse estudo todos os derivados apresentaram baixa gastrotoxicidade apresentando o número médio de lesões ulcerosas entre 8 a 27 em comparação com os AINEs tradicionais testados com número médio de lesões entre 69 a 72 e, até mesmo o celecoxib inibidor seletivo de COX-2 foi capaz de produzir danos a mucosa gástrica nesse ensaio com uma média de 11 lesões. Sabe-se que os inibidores seletivos da COX-2 em altas doses podem perder sua especificidade e também bloquear a COX-1 no estômago e duodeno causando danos (ARDOIN; SUNDY, 2006). Contudo, apenas os animais que foram tratados com AINEs tradicionais foram capazes de apresentar lesões gástricas graves > 2mm.

As prostaglandinas (PGI_2 e PGE_2), oriundas COX-1, isoforma constitutiva existente no trato gastrointestinal e em diversos tecidos, desempenham um papel citoprotetor por aumentar a secreção de muco, bicarbonato, fluxo sanguíneo e motilidade, bem como protege as células epiteliais contra quaisquer danos causados por citocinas. Sendo também responsáveis pela cura de qualquer lesão gástrica por exsudação de plasma e recrutamento de leucócitos. O uso contínuo de AINEs afeta esses fatores essenciais para a manutenção da integridade da mucosa gástrica. Assim, a inibição de sua síntese acarreta ao estômago uma maior suscetibilidade ao ácido clorídrico (TARNAWSKI et al., 2013).

Fármacos anti-inflamatórios como a indometacina, o sulindac e o meclofenamato sódico apresentam acentuada recirculação entero-hepática, o que aumenta os efeitos tóxicos destes fármacos. Vale salientar também que mesmo a administração parenteral (s.c.) de forma aguda de aspirina ou outros AINEs como indometacina e piroxicam podem causar danos a mucosa gástrica em modelos animais (MATEUS, 2014). Também, nossos resultados mostraram que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as

vias. É importante destacar que o composto JR19 mesmo possuindo semelhança estrutural com o fármaco indometacina, não apresentou este efeito ulcerogênico.

Portanto, compostos com atividade anti-inflamatória que apresente baixa toxicidade gástrica são altamente desejáveis para o tratamento de condições inflamatórias crônicas. Com isso, nossos achados mostram-se bastante interessantes.

Como os compostos não apresentaram toxicidade gástrica foi considerado avaliar seu potencial citotóxico frente aos eritrócitos, uma vez que o processo de distribuição sistêmica de qualquer molécula envolve contato direto com essas células.

5.4 Citotoxicidade em Eritrócitos

De acordo com Costa-Lotuf et al. (2005) a atividade hemolítica é empregada para avaliar o potencial do composto em causar lesões na membrana plasmática das hemácias, seja pela formação de poros ou pela ruptura total, através da leitura da hemoglobina liberada. Sendo a realização desse teste de suma importância na busca por novas substâncias bioativas.

De acordo com Ilker et al. (2004) e Ochoa et al. (2012), a interação de derivados químicos com eritrócitos pode acelerar o envelhecimento ou levar a um processo prematuro de destruição dessas células com liberação de hemoglobina. A importância deste teste está na investigação da ação de compostos em sangue humano, sendo um indicador de citotoxicidade e bioatividade (OLIVEIRA et al., 2009).

No que se refere a atividade citotóxica de derivados NAH há poucos relatos na literatura o que nos motivou a realizar este teste com os derivados JR09 e JR19. Nossos resultados demonstram baixa atividade hemolítica destes compostos nas concentrações analisadas, após 1h de incubação, ficando menores que 15% de hemólise, não apresentado diferença significativa entre os valores nos percentuais de hemólise (Tabela 3).

Tabela 3 Potencial Hemolisante de cada concentração testada dos compostos JR09 e JR19

Concentração (mg/mL)	Percentual de Hemólise (%)	
	JR09	JR19
1,0	2,43	7,83
2,5	3,91	8,24
5,0	5,88	9,20
10,0	10,52	12,77
15,0	15,80	14,42

Sathler et al. (2014) testou a capacidade hemolítica de uma série de derivados fenilamino-5-metil-1H-1,2,3-triazol-4-carbohidrazidas em eritrócitos humanos *in vitro* e constatou que seus derivados, principalmente os compostos 2c (5-Metil-N'-(fenilmetileno)-1-(fenilamino)-1H-1,2,3-triazol-4-carbohidrazida) e 2g (N-[(Fur-2''-il)metileno]-5-metil-1-(fenilamino)-1H-[1,2,3]-triazol-4-carbohidrazida) após três horas de incubação na concentração de 100µg/ml não promoveram hemólise significativa estando na faixa de 7% de hemólise provocadas. Valores abaixo de 10% foram considerados não hemolíticos.

Serafim (2014) também observou que os percentuais de hemólise de derivados N-acilhidrazônicos acridínicos das séries AMTAC (3-acridin-9-il-2-ciano-acrilato - benzilideno - hidrazida) e AMAC (3-acridin-9-il-2-ciano-acrilato-acridin-9-il-metileno-hidrazida) em uma concentração 50 µg/mL com 1h de incubação, não mostram ser significativos, estando abaixo de 30%. Almeida Andrade (2017) em ensaio semelhante também comprovou a baixa toxicidade em eritrócitos de um derivado N-acilhidrazônico, o composto testado apresentou 1,18% de hemólise na concentração de 512 µg/mL.

Nossos resultados também mostraram um IC₅₀ de 51,42 mg/mL para o composto JR09 e 85,02 mg/mL para o composto JR19, valores 5 e 8 vezes maiores do que a dose utilizada nos testes de atividade farmacológica *in vivo*, sendo esse um resultado bastante promissor, pois é um indicativo que a dose de 10mg/Kg mostra-se segura para a membrana plasmática dos eritrócitos, corroborando com a baixa toxicidade dos compostos observada nos estudos de

Apolinário (2016) nos ensaios de toxicidade não clínica e reforçando o grau de segurança desses derivados N-acilhidrazônicos.

Atualmente, as pesquisas com produtos naturais e/ou sintéticos têm sido concentradas na busca não apenas de compostos com atividade farmacológica. Arelada a essa, busca-se uma menor toxicidade e menos efeitos colaterais. Contudo esses resultados são preliminares, estudos mais aprofundados precisam ser realizados para que se investigue outros tipos celulares.

Para os demais testes *in vivo* de mecanismos de ação, resolvemos adotar apenas o composto JR19 por ter se mostrado como composto mais promissor em pesquisa anterior (APOLINÁRIO, 2016). E também para reduzir o número de animais utilizados em observância a Resolução Normativa nº 23, de 23 de Julho de 2015 do CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA).

5.5 Avaliação da participação do NO e Guanilato Ciclase Solúvel

Com o objetivo avaliar a participação do NO no mecanismo da atividade anti-inflamatória do composto JR19 foi realizado o experimento da peritonite induzida por carragenina utilizando um inibidor da iNOS. O modelo de peritonite em camundongos induz uma inflamação aguda e em resposta a lesão o organismo mobiliza as células do sistema imunológico, principalmente neutrófilo, para o local da lesão. Uma etapa fundamental para essa resposta é a adesão de leucócitos circulantes às células endoteliais dos vasos sanguíneos, permitindo a sua subsequente migração através da barreira dessas células para acessar o foco da inflamação.

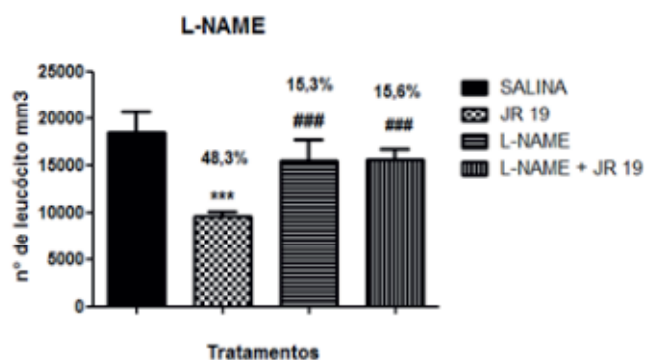
A migração leucocitária da circulação para o tecido lesionado é um evento crucial no desenvolvimento do processo inflamatório. Os leucócitos, ao migrarem para o tecido, liberam uma série de mediadores químicos capazes de amplificar e prolongar o processo inflamatório. Sendo assim, compostos capazes de impedir a ativação dessas células são capazes de reduzir o processo inflamatório (DOMÍGUEZ-LUIS et al., 2013).

A presença de NO em sistemas biológicos é frequentemente determinada com base no efeito fisiológico, como relaxamento dos vasos

sanguíneos, ativação da CGs, aumento na concentração de GMPc, produção de citrulina ou inibição da agregação plaquetária. Também pode ser avaliada usando-se inibidores da síntese de NO, como análogos da L-arginina ou hemoglobina, bem como pelas concentrações de nitrito e nitrato. Todos esses métodos têm diferentes graus de especificidade e fornecem informações indiretas sobre a produção de NO (BIAVA et al., 2011).

Os nossos resultados mostraram que o pré-tratamento dos animais com L-NAME reverteu o efeito anti-inflamatório do composto JR 19 sobre a migração leucocitária (15,6%), ou seja, os animais tratados com L-NAME e o composto não apresentaram uma diminuição do número de leucócitos semelhante ao grupo tratado com o composto isoladamente (48,3%) (Figura 14), demonstrando dessa forma que a manutenção da síntese de NO é um fator preponderante na atividade anti-inflamatória do composto JR19. Já o tratamento dos animais com L-NAME isoladamente não apresentou diferença estatisticamente significativa com o grupo controle nesse experimento. Estes resultados indicam que o NO produzido através da ativação da iNOS está associado com a supressão da migração leucocitária causada pelo composto.

Figura 14 – Influência do tratamento com os compostos JR19 e da L-NAME sob a contagem total de leucócitos, para o modelo da peritonite induzida por carragenina (1%).



Valores são expressos em média \pm desvio padrão da média, n = 6. *** p < 0,001 significativamente diferente do grupo controle, ### p < 0,001 JR19 versus o JR19 + L-NAME (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

Nossos resultados sugerem que possivelmente o composto JR19 tenha sua ação anti-inflamatória modulando os níveis de NO.

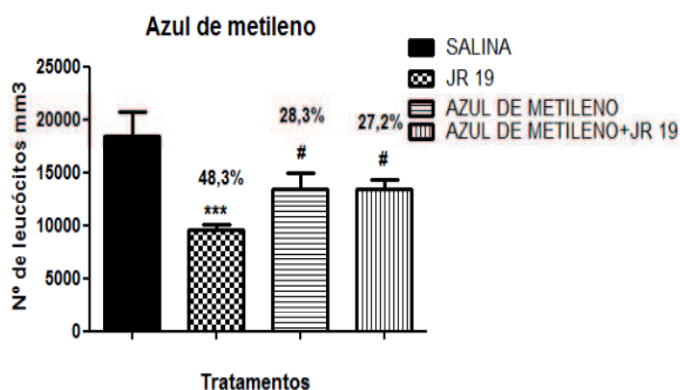
O NO exerce importante papel em vários aspectos da resposta inflamatória. Porém seu papel na migração leucocitária mostra-se controverso na literatura apresentando evidências tanto de ações anti-inflamatórias como pró-inflamatórias (JANAKIRAM; RAO, 2012). Estudos sugerem que o NO exerça ação anti-inflamatória interferindo na migração leucocitária.

Uma evidência importante dos efeitos anti-inflamatórios do NO está relacionada a ativação do segundo mensageiro GMPc. O NO promove a modulação da expressão de P-selectina (proteína de adesão), *in vitro*, induzida por IL-1 β produzida no endotélio, por meio da ativação da enzima GC, reduzindo, dessa maneira, a adesão de leucócitos à parede vascular, bem como promove a diminuição da agregação de neutrófilos e de sua secreção. Níveis elevados de cGMP também estão associados com a redução da expressão da glicoproteína IIb/IIIa, outra importante molécula de adesão leucocitária (AHLUWALIA et al., 2004; FLORENTINO et al., 2015).

Assim, nosso trabalho também investigou se a atividade anti-inflamatória representada pela diminuição leucocitária exercida pelo composto JR19 teria envolvimento com ativação da via GC-cGMP, através do bloqueio da enzima GC pelo azul de metileno, um bloqueador inespecífico desta enzima.

Nossos resultados mostram que o pré-tratamento experimental com o inibidor inespecífico da guanilato ciclase solúvel azul de metileno (1 mg/kg, i.p.) reverteu a inibição da migração leucocitária promovida pelo composto JR19 (10 mg/kg, v.o.) de maneira significativa (Figura 15). Além disso, o tratamento com o inibidor isolado não alterou de maneira significativa a resposta à carragenina em comparação ao grupo controle, demonstrando que esse agente, quando isolado, não é capaz de promover alterações na resposta basal dos animais à inflamatória da carragenina. Estes dados corroboram com o envolvimento do NO na atividade apresentada pelo composto JR19, indicando que o mecanismo de ação do composto JR19 possivelmente envolve a manutenção dos níveis de NO, no modelo de inflamação aguda ensaiado nesse estudo.

Figura 15 - Influência do tratamento com os compostos JR19 e Azul de Metileno sob a contagem total de leucócitos, para o modelo da peritonite induzida por carragenina (1%).



Valores são expressos em média \pm desvio padrão da média, $n = 5-6$. *** $p < 0,001$ significativamente diferente do grupo controle, # $p < 0,05$ JR19 versus JR19 + Azul de Metileno (ANOVA seguido pelo teste de Dunnett).

Iwata et al. (2011) e Florentino et al. (2017) mostraram no modelo de pleurisia induzida por carragenina, que a administração de um doador de NO (L-arginina) reduziu a migração de células inflamatórias e formação de edema. Esse modelo assim como o nosso também mimetiza um processo inflamatório agudo.

A ação anti-inflamatória exercida pelo NO tem sido atribuída ao bloqueio da ligação de fatores de transcrição ao DNA nuclear (NF-kBr), impedindo a síntese da quimiocina IL-8 (um fator quimiotático secretado por monócitos ativos e macrófagos, que promovem a migração coordenada e direcional de células do sistema imunitário como neutrófilos, basófilos e linfócitos T), comprometendo assim o processo de quimiotaxia (ROSSI; ZLOTNIK, 2000; CARREAU; KIEDA; GRILLON, 2011).

Há também uma importante relação entre os níveis de NO e O_2^- associada a migração leucocitária, que diz respeito ao sistema enzimático responsável pela síntese de O_2^- que possui um grupo heme prostético ao qual o NO pode se ligar, inibindo a geração dessa espécie reativa de oxigênio. A diminuição da biodisponibilidade do O_2^- impede que este sofra dismutação a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esta espécie química é responsável por induzir

a adesão leucocitária através da geração de PAF e aumentar a expressão de outras moléculas envolvidas nesse processo (DAL SECCO et al., 2003; MATSUI et al., 2015).

Além disso, níveis elevados de O_2^- são capazes de ativar o NF- κ B, provocando um aumento na produção de citocinas e quimiocinas e de estimular mastócitos a liberarem agentes pró-adesivos como citocinas (SUK, K; YEOU KIM; KIM, 2001; SANTOS et al., 2014).

Sendo assim, inferimos que ação anti-inflamatória apresentada pelo composto JR19 observada na redução no número de leucócitos na cavidade peritoneal reside entre outros, na manutenção dos níveis de NO de forma aguda. Contudo, se faz necessário outros experimentos como a dosagem desses níveis para maiores esclarecimentos.

5.5.1 Dosagem de Citocinas

As citocinas são mediadores necessários para conduzir a resposta inflamatória aos locais de infecção e lesão. Em concentrações elevadas as citocinas levam a ativação da transcrição de fatores nucleares como o NF- κ B que está associado à inflamação e a progressão do processo (CHUNG, 2015).

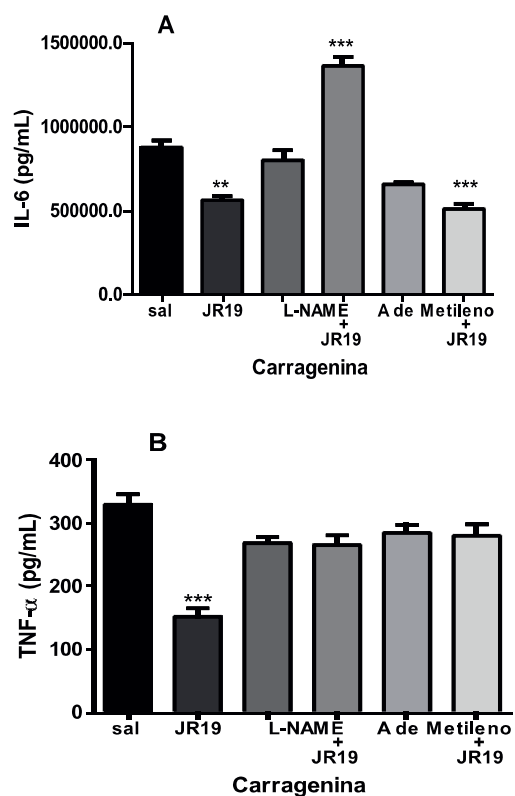
Por isso avaliamos os efeitos do composto JR19 na produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-6 e IL-17) que desempenham papéis importantes no recrutamento de leucócitos, e na citocina anti-inflamatória (IL-4), no modelo de peritonite induzida por carragenina na presença ou ausência de L-NAME e azul de metileno.

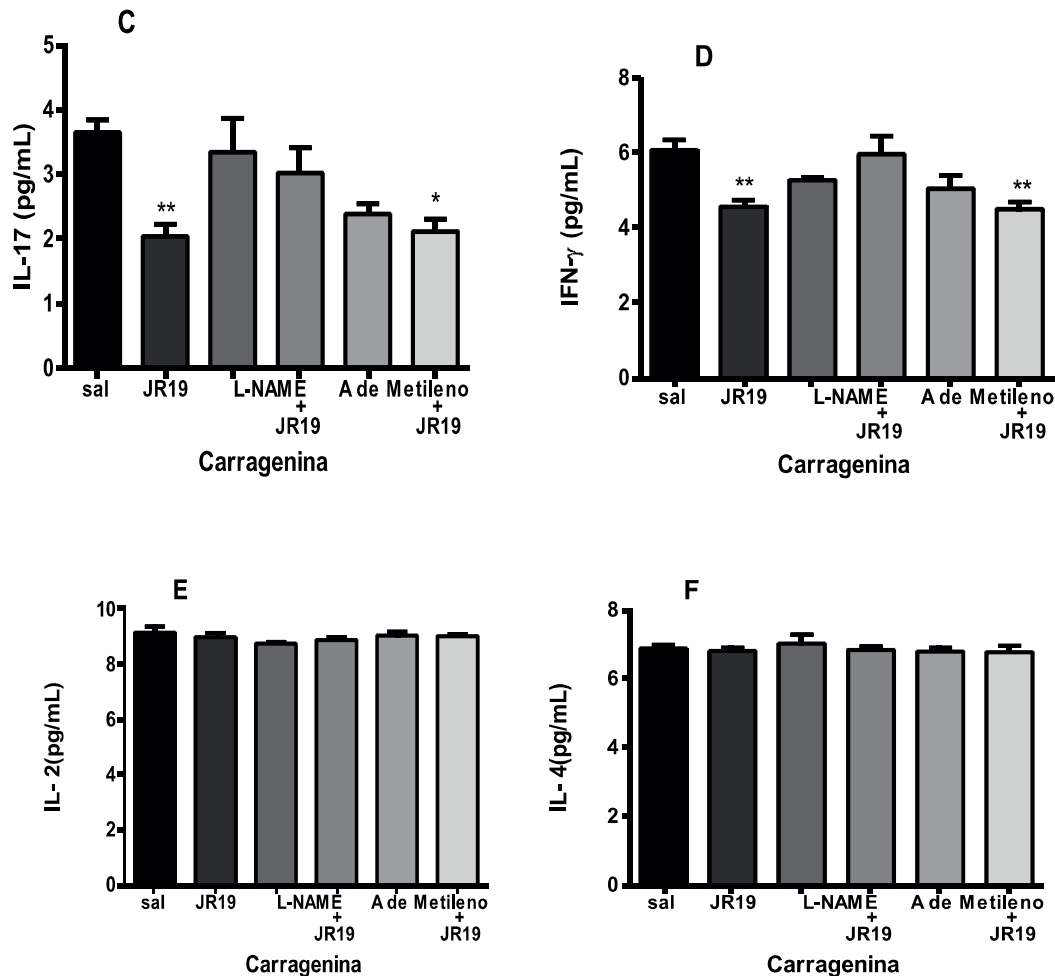
O composto JR19 (10 mg/kg) foi efetivo em diminuir significativamente os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-6 (Figura 16A), TNF- α (Figura 16B), IL-17 (Figura 16C) e IFN- γ (Figura 16D) e este efeito foi revertido nos grupos de animais pré-tratados com L-NAME, corroborando com efeito anti-inflamatório dependente de NO, o que reflete pelo menos em parte na diminuição do número de leucócitos. Já nos grupos pré-tratados com azul de metileno foi observado uma reversão da redução nos níveis apenas do TNF- α (Figura 16B). O composto não foi capaz de interferir nos níveis de IL-2 (Figura 16E) e IL-4 (Figura 16F). Observamos também que o L-NAME ou azul de

metileno administrado isoladamente, não causam alterações significativas nos níveis de nenhuma das citocinas investigadas.

Estes dados indicam que possivelmente a atividade do JR19 sobre a redução dos níveis dessas citocinas reside na manutenção dos níveis de NO, porém podendo ser independente da ativação da enzima CGs.

Figura 16 – Efeito do composto JR19 e do pré-tratamento com L-NAME ou Azul de metileno (i.p.) administrado 30 mim antes do composto JR19 (v.o.) sobre as concentrações das citocinas (IL-6, TNF- α , IL-17, IFN- γ , IL-2 e IL-4) no exsudato peritoneal de camundongos.





Os valores são expressos como médias \pm DP e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas em relação ao controle negativo (Salina) *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. Análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Bonferroni.

A IL-6 é secretada por muitos tipos de células, como macrófagos, monócitos, eosinófilos e hepatócitos sendo o TNF- α um potente indutor. É uma citocina pró- inflamatória que promove maturação e ativação de neutrófilos, macrófagos, diferenciação/manutenção de linfócitos T citotóxicos e células NK. Esta IL é um dos mais precoces e importantes mediadores de indução e controle da síntese e liberação de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos durante estímulos dolorosos como infecção (OLIVEIRA et al., 2011) e atua na regulação metabólica da Proteína C-Reativa (PCR) uma proteína de fase aguda que eleva-se rapidamente em processos inflamatórios (TEXEIRA et al, 2014). O aumento dos níveis séricos de IL-6 e PCR pode causar um down

regulation na produção de NO, por inibição da enzima óxido nítrico sintase (RAMOS et al, 2009; LIBBY; RIDKER; MASERI, 2002).

Em estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram que o composto JR19 reduziu significativamente os níveis de PCR (APOLONÁRIO, 2016), fato esse que pode estar associado a redução de IL-6, com consequente aumento do NO, o que foi evidenciado em nossos resultados. Assim há um forte indício que a atividade do JR19 sobre a redução dos níveis dessas citocinas tem relação com a elevação dos níveis de NO.

A produção do TNF- α é feita principalmente pelos macrófagos. O TNF- α age nas células endoteliais promovendo vasodilatação e estimulando as quimiocinas a promoverem quimiotaxia de leucócitos, principalmente neutrófilos e monócitos. Além de estimular sua ativação, também estimula a produção das proteínas da fase aguda do processo inflamatório e de fibrinogênio (BLASER et al., 2016). Mesmo em baixas concentrações, o TNF- α induz a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e estimula macrófagos e outras células a secretarem quimiocinas (ZELOVA; HOSEK, 2013).

O IFN- γ é produzido principalmente por células NK e linfócitos T agindo sinergicamente com o TNF- α estimulando a secreção de quimiocinas (SCHURGERS et al., 2011). Além disso, o IFN- γ tem a função de induzir a expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e a molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) promovendo, no endotélio, uma melhor aderência dos leucócitos para realizarem a diapedese para o local da inflamação (SCHURGERS et al., 2011, LARKIN III et al., 2013). O bloqueio de IFN γ foi relatado em ser eficaz na remissão da progressão na doença de Crohn, associado a diminuição de neutrófilos recrutados para o sítio inflamatório (CUI, 2013). Assim a redução dos níveis de IFN- γ , assim como do TNF- α também contribui para o efeito anti-inflamatório de JR19.

A IL-17 é uma citocina pro-inflamatória produzida por células T e com capacidade de promover a ativação e maturação de neutrófilos. Também estimula a produção de IL-6 e IL-8 (responsável por estímulo migratório para as células do sistema imune, principalmente neutrófilos, determinando ainda um aumento da expressão de moléculas de adesão por células endoteliais) (SCHAPER; ROSE-JOHN, 2015).

É importante destacar que essas citocinas pró- inflamatórias entre outras, estimulam a produção de outras citocinas, bem como outros mediadores inflamatórios como, por exemplo, prostanóides inflamatórios via COX-2 (STENKEN; POSCHENRIEDER, 2015).

Como as citocinas são importantes mediadores da resposta inflamatória produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico durante o processo inflamatório, compostos que atuem diminuindo as concentrações de citocinas pró-inflamatórias podem contribuir para o controle da inflamação. Nesse aspecto o composto JR19 assim, como demonstrado em estudo anterior, bem como no nosso estudo mostra-se bastante promissor no controle da inflamação, atuando sobre as principais vias da inflamação podendo ser candidato a um novo medicamento anti-inflamatório.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que:

- Os derivados N-acilhidrazônicos da série JR tem participação na via das COXs, assim como os AINES já que interagiram com as importantes no sítio catalítico dessas enzimas *in silico*, principalmente o composto JR04 que mostrou interações semelhantes ao fármaco Diclofenaco, Nimesulida e Celecoxibe;
- Os compostos JR09 e JR019 no ensaio *in vitro* frente as cicloxigenases, comportaram-se como fármacos seletivos para COX-2;
- Os compostos JR09 e JR19 não promoveram toxicidade gástrica possivelmente por possuírem prováveis características seletivas para COX-2;
- As moléculas JR09 e JR19 apresentam baixa citotoxicidade para eritrócitos humanos *in vitro*;
- A atividade anti-inflamatória apresentada pelo composto JR19 na peritonite por carragenina parece envolver a participação da via NO/GCs;
- O composto JR19 foi capaz de diminuir as concentrações das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-17, por mecanismos dependentes do NO e independente da ativação da CGs;
- Sugere-se estudos complementares para maiores esclarecimentos das vias analisadas bem como de outras vias que podem estar envolvidas no mecanismo de ação anti-inflamatória dos compostos da série JR. Dentre os quais podemos destacar a dosagem dos níveis de NO e outros mecanismos os quais o NO tenha participação. Assim como, testes *in vivo* que envolvem a análise da participação de prostaglandinas.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA ANDRADE, F. **Atividade de compostos naturais e sintéticos na presença de espécies de *cândida***. 2017. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

AHLUWALIA, A; FOSTER, P; SCOTLAND, R.S.; MCLEAN, P.G.; MATHUR, A., PERRETTI, M.; MONCADA, S.; HOBBS, A.J. Antiinflammatory activity of soluble guanylate cyclase: cGMP-dependent down-regulation of P-selectin expression and leukocyte recruitment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n.5, p. 1386-1391, 2004.

AHMETAJ-SHALA, B.; KIRKBY, N.S.; KNOWLES, R.; AL'YAMANI, M.; MAZI, S.; WANG, Z.; TUCKER, A.T.; MACKENZIE, L.; ARMSTRONG, P.C.; NÜSING, R.M.; TOMLINSON, J.A.; WARNER, T.D.; LEIPER, J.; MITCHELL, J.A. Evidence that links loss of cyclooxygenase-2 with increased asymmetric dimethylarginine: Novel explanation of cardiovascular side effects associated with anti-inflammatory drugs. **Circulation**, v.131, p.633-42. 2015.

ASIF, M.; HUSAIN, A. Analgesic, anti-inflammatory, and antiplatelet profile of hydrazones containing synthetic molecules. **Journal of Applied Chemistry**. v. 2013, p. 1-7, 2013.

ARDOIN, S. P; SUNDY, J.S.; Update on anti-inflammatory drugs. **Current Opinion in Rheumatology**, v.18, p. 221-226, 2006.

ARMELIM, P. R. G. **Modelagem molecular de derivados pirimidínicos e estudos de docking nas enzimas ciclooxigenase 1 e ciclooxigenase 2**. 2010. 124 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

APOLINÁRIO, N. M. **Elucidação estrutural e avaliação do potencial biológico de novos derivados N-acilhidrazônicos**. 2016. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

BALLI, A.; OHRI, R.; DEB, P.K. Synthesis, evaluation and docking studies on 3-alkoxy-4-methanesulfonamidoacetophenone derivatives as non ulcerogenic anti-inflammatory agents. **European Journal Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 397-405, 2012

BASILE, L.; ÁLVAREZ, S.; BLANCO, A.; SANTAGATI, A.; GRANATA, G.; DI PIETRO, P. Sulfonilamidothiopyrimidone and thiopyrimidone derivatives as selective COX-2 inhibitors: Synthesis, biological evaluation, and docking studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p 149-161, 2012.

BARREIRO, Eliezer J. **Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 3° ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

BARRAUD, N.; KELSO, M.J.; RICE, A.S.; KJELLEBERG, S. Nitric oxide: a key mediator of biofilm dispersal with applications in infectious diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, p. 21–42, 2014.

BALLOU, D.P.; ZHAO, Y.; BRANDISH, P.E.; MARLETTA, M.A. Revisiting the kinetics of nitric oxide (NO) binding to soluble guanylate cyclase: the simple NO-binding model is incorrect. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 12097-12101, 2002.

BARNES, P.J.; Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 120, n. 2, p.76-85, 2010.

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

BECKER, C.; OELZE, M.; BAUERSACHS, J.; WIDDER, J.; MÜNDEL, T.; DAIBER, A.; WENZEL, P. Inflammatory monocytes determine endothelial nitric-oxide synthase uncoupling and nitro-oxidative stress induced by angiotensin II. **Journal Of Biological Chemistry Journal**, v. 289, p. 27540–27550, 2014.

BEZERRA NETTO, H.J.C. **Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos derivados 6-nitro-benzodioxola-*n*-acilidrazônicos, desenhados como candidatos a protótipos de fármacos analgésicos e antiinflamatórios, sintetizados a partir do safrol.** 2004. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2004.

BIAVA, M.; PORRETTA, G.C.; POCE, G.; BATTILOCCHIO, C.; ALFONSO, S.; ROVINI, M.; S. VALENTI, S.; GIORGI, G.; CALDERONE, V.; MARTELLI, A.; TESTAI, L.; SAUTEBIN, L.; ROSSI, A.; PAPA, G.; GHELARDINI, C.; DI, L.; MANNELLI, C.; GIORDANI, A.; ANZELLOTTI, P.; BRUNO, A.; PATRIGNANI, P.; ANZINI, M. Novel analgesic/anti-inflammatory agents: diarylpyrrole acetic esters endowed with nitric oxide releasing properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 7759-7771, 2011.

BISPO JÚNIOR, W.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; ALVES, M. A.; PEREZ-REBOLLEDO, A.; PARRILHA, G. L.; CASTELLANO, E. E.; PIRO, O. E.; ELIEZER J. BARREIRO, E.J.; LIMA, L. M.; BERALDO, H. Analgesic and Anti-Inflammatory activities of Salicylaldehyde 2-Chlorobenzoyl Hydrazone (H2LASSBio-466), Salicylaldehyde 4-Chlorobenzoyl Hydrazone (H2LASSBio-1064) and Their Zinc (II) Complexes. **Molecules**. v.16, p. 6902-6915. 2011.

BHATTACHARYA, S. **Reactive oxygen species and cellular defense system.** In: **Free Radicals in Human Health and Disease.** Springer India, 2015. p. 17-29.

BLASER, H.; DOSTERT, C.; MAK, T.W.; BRENNER, D. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 4, p. 249–261, 2016.

BRUNE, K.; PATRIGNANI, P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Journal of Pain Research**, v. 8, p.105–18, 2015.

BRADLEY, S. A; STEINERT, J. R. Nitric oxide-mediated posttranslational modifications: Impacts at the synapse. **Oxidative Medicine Cellular Longevity**, p. 1-9, 2016.

BROOKS, P.; EMERY, P.; EVANS, J.F.; FENNER, H.; HAWKEY, C.J.; PATRONO, C.; SMOLEN, J.; BREEDVELD, F.; DAY, R.; DOUGADOS, M.; EHRICH, E.W.; GIJON-BAÑOS, J.; KVIEN, T.K.; VAN RIJSWIJK, M.H.; WARNER, T. ZEIDLER, H. Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. **Rheumatology**, v.38, p. 779-788, 1999.

BOGDAN, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: An update. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 3, p. 161–178, 2015.

BUCKLEY, C.D.; GILROY, D.W.; SERHAN, C.N. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. **Immunity**, v. 40, n. 3, p. 315-327, 2014.

CASTELLSAGUE, J.; PISA, F.; ROSOLEN, V.; DRIGO, D.; RIERA-GUARDIA, N.; GIANGRECO, M.; CLAGNAN, E.; TOSOLINI, F.; ZANIER, L.; BARBONE, F.; PEREZ-GUTTHANN, S. Risk of upper gastrointestinal complications in a cohort of users of nimesulide and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs in Friuli Venezia Giulia, Italy. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, v.22, n.4, p. 365-75, 2013.

CARREAU, A.; KIEDA, C.; GRILLON, C. Nitric oxide modulates the expression of endothelial cell adhesion molecules involved in angiogenesis and leukocyte recruitment. **Experimental Cell Research**, v.317 p.29-41, 2011.

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

CARY, S.P.; WINGER, J.A.; MARLETTA, M.A. Tonic and acute nitric oxide signaling through soluble guanylate cyclase is mediated by nonheme nitric oxide, ATP, and GTP. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 13064-13069, 2005.

CARVALHO, M. M. C. M. **Úlcera péptica: etiopatogenia, diagnóstico, aspetos clínicos e tratamento**. 2013. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.

CAXEIRO, J.M.R. **Dialquil fosforilidrazonase N, N' bis (diisobutilfosforiltioamida) diaminas: síntese, caracterização, modelagem molecular e estuda da atividade biológica.** 2007. 130 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

CASTRO, R. A. **Avaliação do potencial analgésico e anti-inflamatório do composto pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol (a).** 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA-JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário – Parte I: Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

CHUNG, K. F. Targeting the interleukin pathway in the treatment of asthma. **The Lancet**, v. 386, n. 9998, p. 1086–1096, 2015.

CHOPADE, A. R.; MULLA, W. A. Novel strategies for the treatment of inflammatory hyperalgesia. **European Journal of Clinical Pharmacology**, Edelberga, v. 66, p. 429-444, 2010.

CHANG, Y.K.; LIU, J.S.; HSU, Y.H.; TARNG, D.C.; HSU, C.C. Increased risk of end-stage renal disease (ESRD) requiring chronic dialysis is associated with use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Nationwide case-crossover study. **Medicine**, v. 94, p.1362, 2015.

COSTA-LOTUFO, L.V.; KHAN, M.T.H.; ATHER, A.; WILKE, D.V; JIMENEZ, P.C.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.99, p. 21-30, 2005.

COSTA, M. M. **Síntese de azinas assistida por micro-ondas e avaliação da atividade anticolinesterásica.** 2015. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares). Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2015

CORDEIRO, N. M.; FREITAS, R. H. C. N.; FRAGA, C. A. M.; FERNANDES, P. D. Discovery of novel orally active tetrahydro- naphthyl-n-acylhydrazones with in vivo anti-tnf- α effect and remarkable anti- inflammatory properties. **PLoS ONE**, v. 11, n.5, e0156271, 2016.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA-JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário – Parte I: Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

CUI, D. Efficacy and safety of interferon- γ -targeted therapy in Crohn's disease: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 37, p. 507–513, 2013.

DAL SECCO, D.; PARON, J.A.; DE OLIVEIRA, S.H.; FERREIRA, S.H.; SILVA, J.S.; CUNHA, C.Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide**, v. 9 p. 153-164, 2003

DAWES, J.M.; ANDERSON, D.A.; BENNETT, D.L.; BEVAN, S.; MCMAHON, S.B; Inflammatory mediators and modulators of pain. **Wall and Melzack's Textbook of Pain**, v.6, p.48-67, 2013.

DAWOOD, D. H.; BATRAN, R. B.; FARGHALY, T. A.; KHEDR, M. A.; ABDULLA, M. M. New Coumarin Derivatives as Potent Selective COX-2 Inhibitors: Synthesis, Anti-Inflammatory, QSAR, and Molecular Modeling Studies. **Arch Pharm Chemistry in Life Sciences**, v.348, p. 875–888, 2015.

DENG, M.; LOUGHRAN, P.A.; ZHANG, L.; SCOTT, M. J.; BILLIAR TR3. Shedding of the tumor necrosis factor (TNF) receptor from the surface of hepatocytes during sepsis limits inflammation through cGMP signaling. **Science Signaling**, v. 8, n. 361, 2015.

DEJEAN C, RICHARD D. Mechanisms of action of glucocorticoids. **Revue de Medicine Interne**, v. 34, n. 5, p. 264-268, 2013.

ERRANTE, P. R.; MENEZES-RODRIGUES, F. S.; TAVARES, J. G. P.; REIS, M. C. M.; ICIMOTO, M. Y.; FERRAZ, R. R. N.; CARICATI-NETO, A. Mecanismos de ação e resistência ao uso de glicocorticóides. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 01-11, 2014.

DE PAULA ROGERIO, A.; SORGI, C. A.; SADIKOT, R.; CARLO, T. The role of lipids mediators in inflammation and resolution. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

DELLINGER, R.P.; LEVY, M. M.; RHODES, A.; ANNANE, D.; GERLACH, H; OPAL, S. M.; SEVRANSKY, J. E.; SPRUNG, C. L.; DOUGLAS, I. S.; JAESHKE, R.; OSBORN, T. M.; NUNNALLY, M. E.; TOWNSEND, S. R.; REINHART, K.; DENNIS, A. E.; NORRIS, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. **Nature Reviews immunology**, v.15, n.8, p. 511-523, 2015.

DI CAPUA, A.; STICOZZI, C.; BROGI, S.; BRINDISI, M.; CAPPELLI, A.; SAUTEBIN, L.; ROSSI, A.; PACE, S.; C. GHELARDINI, C.; MANNELLI, L. D. C.; VALACCHI, G.; GIORGI, G.; GIORDANI, A.; POCE, G.; BIAVA, M.; ANZINI, M. Synthesis and biological evaluation of fluorinated 1,5-diarylpyrrole-3-alkoxyethyl ether derivatives as selective COX-2 inhibitors endowed with anti-inflammatory activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.109, p. 99-106, 2016.

DOMÍGUEZ-LUIS, M.; HERRERA-GARCÍA, A.; ARCE-FRANCO, M.; ARMAS-GONZÁLEZ, E.; RODRÍGUEZ-PARDO, M.; LORENZO-DÍAZ, F.; FERIA, M.; CADENAS, S.; SÁNCHEZ-MADRID, F.; DÍAZ-GONZÁLEZ, F. Superoxide anion mediates the L-selectin down-regulation induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs in human neutrophils. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 2, p. 245-56, 2013.

DO AMARAL, D.N.; CAVALCANTI, B.C.; BEZERRA, D.P.; FERREIRA, P.M.P.; CASTRO, R.P.; SABINO, J.R.; MACHADO, C.M.L.; CHAMMAS, R.; PESSOA, C.; SANT'ANNA, C.M.R. Docking, synthesis and antiproliferative activity of *N*-acylhydrazone derivatives designed as combretastatin A4 analogues. **PLoS One**, v. 9, e85380, 2014.

DOS SANTOS, E., A., P. **Estudo do Perfil Antinociceptivo e Anti-inflamatório de Derivados *N*-Acilidrazônicos Indólicos Homólogos do Protótipo LASSBio-651**. 2009. 117 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade

Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Rio de Janeiro, 2009.

DUARTE, C. M. **Novos derivados acilidrazônicos planejados como candidatos a fármacos analgésicos e antiinflamatórios**. 2006. 203 f. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

DWIVEDI, A.K.; GURJAR, V.; KUMAR, S.; SINGH, N. Molecular basis for nonspecificity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). **Drug Discovery Today**, v.7, p.863–73, 2015.

EL-SAYED, A.; NAGLAA, I.; ABDEL-AZIZ, A. A.; ABDEL-AZIZ, M.; EL-AZAB, A. S.; YOUSIF, A; ASIRI, K.; ELTAHIR, E.H. Design, synthesis, and biological evaluation of substituted hydrazone and pyrazole derivatives as selective COX-2 inhibitors: Molecular docking study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 3416-3424, 2011.

FERNANDEZ, M.; CABALLERO, J; FERNANDEZ, L.; SARAI, A. Genetic algorithm optimization in drug design QSAR: Bayesian-regularized genetic neural networks (BRGNN) and genetic algorithm vectors machines (GA-SVM). **Molecular Diversity**, v. 15, p. 269-289, 2011.

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

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

FLORENTINO, I. F.; GALDINO, P. M.; L.P. OLIVEIRA, L. P.; SILVA, D. P. B.; PAZINI, F.; F.A. VANDERLINDE, F. A.; LIÃO, L. M.; MENEGATTI, R.; COSTA, E. A. 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**, v. 47 p. 17-24, 2015.

FREDERICO, M. J. S. CASTRO, A. J. G.; MASCARELLO, A.; MENDES, C. P.; KAPPEL, V. D.; STUMPF, T. R.; LEAL, P. C.; NUNES, R. J.; TUNES, R. A.; SILVA, F. R. M. B. Acylhydrazones contribute to serum glucose homeostasis through dual physiological targets. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 12, p. 2049-2058, 2012.

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

FLORENTINO, I. F.; SILVA, D. P. B. SILVA, D. M.; CARINA SOFIA CARDOSO, C. S. C.; MOREIRA, A. L. E.; BORGES, C. L.; SOARES, C. M. A.; GALDINO, P. M.; LIÃO, L. M.; GHEDINI, P.C.; MENEGATTI, R.; COSTA, E. A. Potential anti-inflammatory effect of LQFM-021 in carrageenan induced inflammation: The role of nitric oxide. **Nitric Oxide**, v. 30, n. 69, p.35-44, 2017.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 8, p. 551-567, 2016.

GRASSI, E. A.; ARAÚJO, M. C. Antiplatelet: growing knowledge. **Disciplinarum Scientia**, v. 13, n. 1, p. 131-143, 2012.

GOES, M. C.; JACOBS, J. W.; BIJLSMA, J. W. The value of glucocorticoid co-therapy in different rheumatic diseases—positive and adverse effects. **Arthritis Research Therapy**, v.16, n. 2, 2014.

GOODMAN, S. L.; GILMAN, G. A. **Manual de farmacologia e terapêutica de Goodman e Gilman**. 2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2015. 1204 p.

GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J. M. As quimiocinas e os seus receptores, **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, n. 4, p. 967-976, 2011.

GUEDES, I. A.; FREITAS, R. H. C. N.; CORDEIRO, N.M.; NASCIMENTO, T. N.; VALERIO, T. S.; FERNANDES, P. D.; LAURENT E. DARDENNE, L. E.;

CARLOS A. M. FRAGA, C. A. M. LASSBio-1829 hydrochloride: development of a new orally active n-Acylhydrazone IKK2 inhibitor with antiinflammatory properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 234 – 244, 2016.

GUNTER, B.R.; BUTLER, K.A.; WALLACE, R.L.; SMITH, S.M.; HARIRFOROOSH, S. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced cardiovascular adverse events: A meta-analysis. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v.42, p.27-38, 2017.

HAN, L.; SONG, J.H.; YOON, J.H.; PARK, Y.G.; LEE, S.W.; CHOI, Y.J.; NAM, S.W.; LEE, J.Y.; PARK, W.S. TNF- α and TNF- β Polymorphisms are Associated with Susceptibility to Osteoarthritis in a Korean Population. **Korean Journal Pathology**, v. 46, p.30-37, 2012.

HASSAN, B.; SHIREEN, A.; MURALEEDHARAN, K.; ABDUL MUJEEB, V. M. Virtual screening of molecular properties of chitosan and derivatives in search for druggable molecules. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 392-396, 2015.

HAMDY, N. A.; ABDEL-AZIZ, H. A.; KAMEL, G. M.; FAKHR, I.M. Convenient synthesis, anti-inflammatory, analgesic and ulcerogenic activities of some new bis-hydrazones and pyrazole derivatives. **Acta Poloniae Pharmaceutica Journals**. v. 70, p. 469–480, 2013.

HARRIS, E.; TIGANESCU, A.; TUBEUF, S.; MACKIE, S. L. The Prediction and Monitoring of Toxicity Associated with Long-Term Systemic Glucocorticoid Therapy. **Current Rheumatology Reports**, v. 17, n. 6, p. 513 – 522, 2015.

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

HEADLAND, E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. **Seminars in Immunology**, v. 27, n.3, p. 149-160, 2015.

IOANNIDOU, A.; GOULIELMAKI, E.; GARINIS, G. A. DNA Damage: From Chronic Inflammation to Age-Related Deterioration. **Frontiers in Genetics**, v. 7, p. 1–8, 2016.

ILKER, M.F.; NÜSSLEIN, K.; TEW, G.N.; COUGHLIN, E. B. Tuning the Hemolytic and Antibacterial Activities of Amphiphilic Polynorbornene Derivatives. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, p.15870–15875, 2004.

IWATA, M.; SUZUKI, S.; ASAI, Y.; INOUE, T.; TAKAGI, K. Involvement of nitric oxide in a rat model of carrageenin-induced pleurisy. **Mediators of inflammation**, p. 1-11, 2010.

JOSÉ, F. F. O papel dos anti-inflamatórios não hormonais no tratamento da dor musculoesquelética. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 102, n. 5, p. 24-26, 2014.

JANAKIRAM, N. B.; RAO, C.V. iNOS-selective inhibitors for cancer prevention: promise and progress, **Future Medicinal Chemistry**. v. 4, p. 2193-2204, 2012.

JONES, D.P.; SIES, H. The redox code. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 23, n. 9, p. 734-746, 2015.

JÚNIOR, D.M; ARAÚJO, J.A.P; CATELAN, T.T.T; DE SOUZA, A.W.S; DA SILVA, N.P; ANDRADE, L.E.C; CRUVINEL, W.M. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 1 p: 66-81, 2011.

JUNG, J.H.; KANG, K.P.; KIM, W.; PARK, S.K.; LEE, S. Nonsteroidal antiinflammatory drug induced acute granulomatous interstitial nephritis. **BMC Research Notes**, v.8, p.793-798, 2015.

KAJAL, A.; BALA, S.; SHARMA, N.; KAMBOJ, S.; SAINI, V. Therapeutic potential of hydrazones as anti-inflammatory agentes. **International Journal of Medicinal Chemistry**, v. 2014, ID 761030, 2014.

KAPLANCIKLI, Z. A.; ALTINTOP, M. D.; OZDEMIR, A.; TURAN- ZITOUNI, G.; S. I. KHAN, S.I.; TABANCA, N. "Synthesis and biological evaluation of some hydrazone derivatives as anti-inflammatory agentes, **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 9, n. 3, p. 310–315, 2012.

KAJAL, A.; BALA, S.; SHARMA, N.; KAMBOJ, S.; SAINI, V. Therapeutic potential of hydrazones as anti-inflammatory agentes. **International Journal of Medicinal Chemistry**, v. 2014, 2014.

KOSSMANN, S.; HU, H.; STEVEN, S.; SCHÖNFELDER, T.; FRACCAROLLO, D.; MIKHED, Y.; BRÄHLER, M.; KNORR, M.; BRANDT, M.; KARBACH, S. H.;

PREDONZANI, A.; CALÌ, B.; AGNELLINI, A. H.R.; MOLON, B. Spotlights on immunological effects of reactive nitrogen species: When inflammation says nitric oxide. **World Journal of Experimental Medicine**, v. 5, n. 2, p 64-76, 2015.

KOESLING, D.; RUSSWURM, M.; MERGIA, E.; MULLERSHAUSEN, F.; FRIEBE, A. Nitric oxidesensitive guanylyl cyclase: structure and regulation. **Neurochemistry International**, 45: 813-819, 2004.

KOWALSKI, M.L.; MAKOWSKA, J.S.; Seven steps to the diagnosis of NSAIDs hypersensitivity: how to apply a new classification in real practice? **Allergy, Asthma & Immunology Research**, v.7, p.312–20, 2015.

KOSSMANN, S.; HU, H.; STEVEN, S.; SCHÖNFELDER, T.; FRACCAROLLO, D.; MIKHED, Y.; BRÄHLER, M.; KNORR, M.; BRANDT, M.; KARBACH, S. H.; BECKER, C.; OELZE, M.; BAUERSACHS, J.; WIDDER, J.; MÜNDEL, T.; DAIBER, A.; WENZEL, P. Inflammatory monocytes determine endothelial nitric-oxide synthase uncoupling and nitro-oxidative stress induced by angiotensin II. **Journal Of Biological Chemistry Journal**, v. 289, p. 27540–27550, 2014.

KWIECIEN, S.; MAGIEROWSKA, K.; SLIWOWSKI, Z.; WOJCIK, D.; M. MAGIEROWSKI, M.; BRZOZOWSKI, T. New insight into the mechanisms of gastroduodenal injury induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: practical implications. **Polish Archives of Internal Medicine**, v.125, p. 191-198, 2015.

KLOPCIC, I; POBERZNIK, M.; MAVRI, J.; DOLENC, M. S. A quantum chemical study of the reactivity of acetaminophen (paracetamol) toxic metabolite *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine with deoxyguanosine and glutathione. **Chemico-Biological Interactions**, v. 242, p. 407-414, 2015.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Patologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 928 p.

LANNES, A. C. **Cepas bacterianas: susceptibilidade a derivados da classe acilhidrazona em amostras do Hospital Universitário Antônio Pedro**. 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado em Patologia). Universidade Federal Fluminense, Niterói. 2010.

LARKIN III, J.; AHMED, C. M.; WILSON, T. D.; JOHNSON, H. M. Regulation of interferon gamma signaling by suppressors of cytokine signaling and regulatory T cells. **Frontiers in Immunology**, v. 18, n. 4, p. 1-8, 2013.

LEO, L. M. **Papel da lipoxina A4 na fisiologia do sistema nervoso central e no dano cognitivo associado à neuroinflamação**. 2015. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

LIBBY P, RIDKER PM, MASERI A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, v.105:1135-1143, 2002.

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

LUPEPSA, A.C.; SANCHEZ, P.K.V.; BALLER, E.M.; MORO, M.G.; TOSTES, A.F.; GEVERT, M.V.; BAGLIE, S.; SILVA, M.C.; FRANCO, G.C.N. Importância biológica da ciclooxigenase (COX) e o efeito de anti-inflamatórios na osseointegração. **Revista Brasileira de Periodontia**, v. 24, n. 4, p. 39-43, 2014.

MADHAVA, G.; RAMANA, K.V.; SUDHANA, S.M.; RAO, D.S.; KUMAR, K.H.; LOKANATHA, V.; RANI, A.U.; RAJU, C. N. Aryl/heteroaryl Substituted Celecoxib Derivatives as COX-2 Inhibitors: Synthesis, Anti-inflammatory Activity and Molecular Docking Studies. **Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 5, p.484-497, 2017

MATSUI, T.C.; COURA, G.M.; MELO, I. S.; BATISTA, C.R.; AUGUSTO, P.S.; A. M. GODIN, A.M.; ARAÚJO, D. P.; CESAR, I. C.; RIBEIRO, L.S.; SOUZA, D. G.; KLEIN, A.; DE FÁTIMA, A.; MACHADO, R. R.; COELHO, M.M. Nicorandil inhibits neutrophil recruitment in carrageenan-induced experimental pleurisy in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 769, p. 306-312, 2015.

MAGDA, A.; EL-SAYED, A.; NAGLAA, I.; ABDEL-AZIZ, A. A.; ABDEL-AZIZ, M.; EL-AZAB, A. S.; YOUSIF, A; ASIRI, K.; ELTAHIR, E.H. Design, synthesis, and biological evaluation of substituted hydrazone and pyrazole derivatives as selective COX-2 inhibitors: Molecular docking study. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 3416-3424, 2011.

MATEUS, A. F. G. **O uso clínico dos anti-inflamatórios não esteróides**. 2014. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

MARQUES, E. B.; MOTTA, N. A V.; KUMMERLE, A. E.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J.; BRITO, F. C. F.; SCARAMELLO, C. B. V. In vivo effect of LASSBio -785, a lipid- lowering and anti-inflammatory agent, on cardiac Ca^{2+} -ATPases from hypercholesterolemic rats. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 201, p. 282-284, 2015.

MASEDA, D.; JOHNSON, E.; CROFFORD, L. Production of inflammatory cytokines is regulated by mPGES-1- -Dependent PGE_2 in T cells. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.22, n. 49, 2016.

MENG, X.; ZHANG, H.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug Discovery, **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 7, n.2, p. 146–157, 2011.

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

MELO, T. R. F.; CHELUCCI, R. C.; PIRES, M. E. L.; DUTRA, L. A.; BARBIERI, K. P.; BOSQUESI, P. L.; TROSSINI, G. H. G.; CHUNG, M. C.; SANTOS, J. L. Pharmacological evaluation and preparation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs containing an n-acyl hydrazone subunit. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 5821-5837, 2014.

MOTA, F. V. B. **Estudo das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de novos derivados isoxazolinaacilhidrazonas**. 2013. 98 f. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

MORTAZAVI, M.; SAKHTEMAN, A.; HESSAMI, A.; SADEGHPOUR, H. Molecular Docking and Thermodynamic Studies of the Interactions between Aspirinate Complexes of Transition metals and Cyclooxygenase-2 Enzyme: Quantum Chemical Calculations based on the ONIOM method. **Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n.2, p. 123-134, 2017.

MOURA, W. C. S. **Planejamento, síntese e avaliação preliminar da atividade antibacteriana de derivados N-acilidrazônicos substituídos**. 2016. 64 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

MURAKAMI, M.; TAKETOMI, Y. Secreted phospholipase A and mast cells. **Allergology International**, v.64, n.1, p.4-10, 2015.

MURAKAMI, M.; TAKETOMI, Y.; MIKI, Y.; SATO, H.; YAMAMOTO, K.; LAMBEAU, G. Emerging roles of secreted phospholipase A₂ enzymes: the 3rd edition. **Biochimie**, v, 107, p. 105-113, 2014.

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

NAKHOSTIN, A.; MIRSEYYEDHOSEIN, S.; MAHSA TOOLABI, M.; KHODABAKHSH, P.; HELIA AGHAMIRI, H.; GHAFARI, S.; HAMED SHAFAROODI, H.; SHAYESTEH, A.; MOHSEN AMINI, M.; ABBAS SHAFIEE, A.; NAVIDPOUR, L. Synthesis, conformational assignment, and anti-inflammatory activities of N-arylidene-2-(4-chloro-2-(2-substituted phenoxy)phenyl) acetic acid hydrazides. **Medicinal Chemistry Research**, v. 25, n.10, p. 2220–2236, 2016.

NAVIDPOUR, L.; SHAFAROODI, H.; SAEEDI-MOTAHAR, G.; SHAFIEE, A. Synthesis, anti-inflammatory and analgesic activities of arylidene- 2-(3-chloroanilino) nicotinic acid hydrazides. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, p. 2793–2802, 2014.

NISSEN, S.E.; YEOMANS, N.D.; SOLOMON, D.H.; LÜSCHER, T.F.; LIBBY, P.; HUSNI, M.E.; GRAHAM, D.Y.; BORER, J.S.; WISNIEWSKI, L.M.; WOLSKI, K.E.; WANG, Q.; MENON, V.; RUSCHITZKA, F.; GAFFNEY, M.; BECKERMAN, B.; BERGER, M.F.; BAO, W.; LINCOFF, A.M. Cardiovascular safety of celecoxib, naproxen, or ibuprofen for arthritis. **New England Journal of Medicine**, v.375, p. 2519-2529, 2016.

NUNES, F.B.; CASTRO, M.C.M.; SILVA, T.M.D.; ARAÚJO, R.N.; BECKER, H.M.G.; CROSARA, P.F.T.B.; GUIMARÃES, R.E.S. Perfil de citocinas da polipose nasossinusal na Fibrose Cística comparado com indivíduos sem doenças nasossinusais. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 76, p.25-28, 2010.

OLIVEIRAI, V. M. A.; CARNEIROII, A. L. B.; CAUPERIII, G. S. B.; POHLIT, A. B. In vitro screening of Amazonian plants for hemolytic activity and inhibition of platelet aggregation in human blood. **Acta Amazonica**, v.39, n.4, p. 973-980, 2009.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. O.; PORTELLA JUNIOR, C. S. A.; COHEN, C. P. Mediadores inflamatórios na dor neuropática. **Revista Brasileira para Estudos da Dor**, v. 17, p. 35-42, 2016.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K; ISSY, A. M., LUIS ROBERTO GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia, Rio de Janeiro**, BR, v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

OCHOA, A.L.; TEMPESTI, T.C.; SPESIA, M.B.; MILANESIO, M.E.; DURANTINI, E.N. Synthesis and photodynamic properties of adamantylethoxy Zn(II) phthalocyanine derivatives in different media and in human red blood cells. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50 p. 280–87, 2012.

PASTORINO, A. C. Revisão sobre a eficácia e segurança dos anti-histamínicos de primeira e segunda geração. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 88-92, 2010.

PARRILHA, G.L. **Complexos metálicos de hidrazonas, tiossemicarbazonas e lapachol: atividades farmacológicas e relações de estrutura-atividade**. 2012. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências - Química) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

PATRIGNANI, P.; PATRONO, C. Cyclooxygenase inhibitors: from pharmacology to clinical read-outs. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1851, n. 422-432, 2015.

PANARA, M.R.; RENDA, G.; SCIULLI, M.G.; SANTINI, G.; DI GIAMBERARDINO, M.; ROTONDO, M.T.; TACCONELLI, S.; SETA, F.; PATRONO, C.; PATRIGNANI, P. - Dose-dependent inhibition of platelet cyclooxygenase-1 and monocyte cyclooxygenase-2 by meloxicam in healthy subjects. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.290, p.276-280, 1999.

PINHEIRO, M. M.; MILTOJEVIĆ, A.B.; RADULOVIĆ, N.S.; ABDUL-WAHAB, I.R.; BOYLAN, F.; FERNANDES, P.D. Anti-inflammatory activity of *Choisya ternata* Kunth essential oil, ternanthranin, and its two synthetic analogs (methyl and propyl N-methylantranilates). **PLoS One**, v. 10, n.3 e0121063, 2015.

PREDONZANI, A.; CALÌ, B.; AGNELLINI, A. H.R.; MOLON, B. Spotlights on immunological effects of reactive nitrogen species: When inflammation says nitric oxide. **World Journal of Experimental Medicine**, v. 5, n. 2, p 64-76, 2015.

RAMOS AM, PELLANDA LC, GUS I, Portal VL. Inflammatory markers of cardiovascular disease in the elderly. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v.92, p.227-234, 2009.

RAO, P.N.; KNAUS, E.E. Evolution of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n.2, p. 81-110, 2008.

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

REGO, Elisabete A. **Avaliação da Atividade Anti-inflamatória de Plantas dos Açores**. 2012. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Faculdade de Ciências Tecnológicas e Desenvolvimento, Universidade dos Açores, Ponta Delgada, 2012.

RIBEIRO, D.; FREITAS, M.; LIMA, J.L.F.C.; FERNANDES, E. Proinflammatory Pathways: The Modulation by Flavonoids. **Medicinal Research Reviews**, v. 35, p. 877–936, 2015.

ROSSI, D., ZLOTNIK, A., The biology of chemokines and their receptors. **Annual Review of Immunology**, v.18, p. 217–242, 2000.

RODRIGUES, R. P.; MANTOANI, S. P.; DE ALMEIDA, J. R.; PINSETTA, F. R.; SEMIGHINI, E. P.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. P., Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos, **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p.739-736, 2012.

SATHLER, P. C.; LOURENÇO, A. L.; RODRIGUES, C. R.; DA SILVA, L. C. R. P.; CABRAL, L. M.; JORDÃO, A. K.; CUNHA, A. C.; VIEIRA, M. C. B.; FERREIRA, V. F.; CARVALHO-PINTO, C. E.; KANG, H. C.; CASTRO, H. C. In vitro and in vivo analysis of the antithrombotic and toxicological profile of new antiplatelets *N*-acylhydrazone derivatives and development of nanosystems: determination of novel NAH derivatives antiplatelet and nanotechnological approach. **Thrombosis Research**, v. 134, p. 376-383, 2014.

SANTOS, L.A.; RIBEIRO, E.L.; BARBOSA, K.P.; FRAGOSO, I.T.; F.O. GOMES, F.O.; M. A. DONATO, M. A.; SILVA, B. S.; SILVA, A.K.; S.W.; ROCHA, S. W.; FRANÇA, M.E.; RODRIGUES, G.B.; T.G. SILVA, T. G.; PEIXOTO, C. A. Diethylcarbamazine inhibits NF-κB activation in acute lung injury induced by carrageenan in mice. **International Immunopharmacology**, v. 23, p. 153-162, 2014.

SANSBURY, B. E.; CUMMINS, T. D.; TANG, Y.; HELLMANN, J.; HOLDEN, C. R.; HARBESON, M. A.; CHEN, Y.; PATEL, R. P.; SPITE, M.; BHATNAGAR, A.; HILL, B. G. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase prevents diet - induced obesity and regulates adipocyte phenotype. **Circulation Research**, New York, v. 111, p.1176-1189, 2012.

SANNA, M.D.; STARK, H.; LUCARINI, L.; GHELARDINI, C.; MASINI, E.; GALEOTTI, N. Histamine H4 receptor activation alleviates neuropathic pain through differential regulation of ERK, JNK, and P38 MAPK phosphorylation. **Pain**, v.156, n.12 p.2492-504, 2015.

SCARPELLI, R.; SASSO, O.; PIOMELLI, D. A. A double whammy both fatty acid amide hydrolase (FAAH) and cyclooxygenase (COX) to treat pain and inflammation. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 12, p. 1242-1251, 2016.

SCHURGERS, E.; BILLIAU, A.; MATTHYS; P. Collagen-induced arthritis as an animal model for rheumatoid arthritis: focus on interferon- γ . **Journal of interferon & cytokine research**, v. 31, n. 12, p. 917-926, 2011.

SERHAN, C.N. Treating inflammation and infection in the 21st century: new hints from decoding resolution mediators and mechanisms. **The FASEB Journal**, v. 31, n.4, p.1273-1288, 2017.

SERHAN, C. N.; Systems Approach with Inflammatory Exudates Uncovers Novel Anti-Inflammatory and Pro-Resolving Mediators. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 79, n. 3-5, p. 157–163, 2008.

SERAFIM, L. V. **Síntese, elucidação estrutural e avaliação biológica de potenciais fármacos antitumorais e antimaláricos de derivados n-acilidrazônicos-acridínicos**. 2014. 81 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.

SINGH. M.; RAGHAV, N. “Biological activities of hydrazones: areview,” **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 4, p. 26–32, 2011.

SCHAPER, F.; ROSE-JOHN, S. Interleukin-6: biology, signaling and strategies of blockade. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 26, p. 475–487, 2015.

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

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

SUGIURA, M.; KOBAYASHI, S. *N*-Acylhydrazones as versatile electrophiles for the synthesis of nitrogen-containing compounds. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 44, p. 5176-5186, 2005.

SUK, K.; YEOU KIM, S.; KIM, H. Regulation of IL-18 production by IFN gamma and PGE₂ in mouse microglial cells: involvement of NF-κB pathway in the regulatory processes. **Immunology Letters**, v. 77, n. 2, p. 79-85, 2001.

STENKEN, J. A.; POSCHENRIEDER, A. J. Bioanalytical chemistry of cytokines--a review. **Analytica chimica acta**, v. 853, p. 95–115, 2015.

TARNAWSKI, A.; AHLUWALIA, A.; JONES, M. K. Gastric cytoprotection beyond prostaglandins: cellular and molecular mechanisms of gastroprotective and ulcer healing actions of antacids. **Current Pharmaceutical Design**, v.19, n.1, p.126–32, 2013.

TEIXEIRA, B.C.; LOPES, A.L.; MACEDO, R.C.O; CORREA, C.S.; RAMIS, T.R.; RIBEIRO, J.L.; REISCHAK-OLIVEIRA, A. Marcadores inflamatórios, função endotelial e riscos cardiovasculares. **Jornal Vascular Brasileiro**, v.13, n.2, p. 108-115, 2014.

TIAN, B.; HE, M.; TAN, Z. TANG, S.; HEWLETT, I.; CHEN, S.; JIN, Y.; YANG, M. Synthesis and antiviral evaluation of New *N*-Acylhydrazones Containing Glycine Residue. **Chemical biology & drug design**. v.77, p.189-198. 2011.

UNSAL-TAN, O.; OZDEN, K.; RAUK, A.; BALKAN, A. Synthesis and cyclooxygenase inhibitory activities of some *N*-acylhydrazone derivatives of

isoxazolo [4,5-d] pyridazin-4(5H)-ones. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 45, p. 2345–2352, 2010.

UNGPRASERT, P.; SRIVALI, N.; THONGPRAYOON, C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of incident heart failure: A systematic review and meta-analysis of observational studies. **Clinical Cardiology**, v. 39, p.111-118, 2016.

VECHIA, L.D.; GNOATTO, S.C.B.; GOSMANN, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Química Nova**, v.32 n.5, 2009.

VITALE RF, RIBEIRO FA. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in bone resorption present in middle ear cholesteatoma. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v.73, n.1, p.117-21, 2007.

VONKEMAN, H. E.; LAAR, M.A.F.J. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: adverse effects and their prevention. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, Nova York, v. 39, p. 294-312, 2010.

WANG, Z. Imaging Nanotherapeutics in Inflamed Vasculature by Intravital Microscopy. **Theranostics**, v. 6, n. 13, p. 2431–2438, 2016.

WITTMANN, M.; MCGONAGLE, D.; WERFEL, T. Cytokines as therapeutic targets in skin inflammation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 4, p. 443-451, 2014.

WU, Y. S.; CHEN, S. N. Apoptotic cell: linkage of inflammation and wound healing. **Frontiers in Pharmacology**, v.5, p. 1, 2014

YANDRAPU, H.; SAROSIEK, J. Protective Factors of the Gastric and Duodenal Mucosa: An Overview. **Current Gastroenterology Reports**, v.17, p. 24, 2015.

ZAMPIROLI, L. S. **Dialquilfosforidilidrazonas derivadas de isatinas N-substituídas com potencial atividade biológica.** Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Química), Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

YU, B.; SHAO, Y.; ZHANG, J.; DONG, X. L.; LIU, W. L.; YANG, H.; LIU, L.; LI, M. H.; YUE, C. F.; FANG, Z. Y.; ZHANG, C.; HU, X. P.; CHEN, B. C.; WU, Q.; CHEN, Y.W.; ZHANG, W.; WAN, J. Polymorphisms in human histamine receptor H4 gene are associated with atopic dermatitis. **British Journal of Dermatology**, v. 162, p. 1038 - 1043, 2010.

ZELOVA, H.; HOSEK, J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. **Inflammation Research**, v. 62, p.641–651, 2013.

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

ANEXO

Documento emitido pelo CEUA/CESED aprovando os métodos utilizados na pesquisa



PARECER
NÚMERO DO PROJETO/ PROTOCOLO : 5905022016
CIAEP/CONCEA Nº: 01.001.2012
DATA DO PARECER: 05/02/2016

1. Pesquisador Responsável: Vanda Lúcia dos Santos
 Título do Projeto: **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIMICROBIANA DE DERIVADOS N-ACILIDRAZÔNICOS**
2. Considerações: Este projeto envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CESED, em reunião de 05 / 02 / 2016 . No entanto há uma divergência no número de animais a serem utilizados, na folha de rosto com o número do projeto impresso. Sendo liberado para execução 100 camundongos e não 162.

Vigência do Projeto	01 de março de 2016 à 01 de março de 2017
Espécie / linhagem	Camundongos Swiss
Nº de animais	100
Peso / idade	2 meses / 25 a 35 gramas
Sexo	Feminino e masculino
Origem	Universidade Estadual da Paraíba

Parecer Final: APROVADO

Tharcia Kiara B. de Oliveira
 Tharcia Kiara B. de Oliveira
 Coordenadora do CEUA - CESED



Av. Senador Argemiro de Figueiredo, 1501 - Tamariz
 CEP: 58104-590 - Campina Grande, PB. Fone: 83 2101.8100