

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA - UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SINTÉTICOS BIOATIVOS**

ANA KARINA HOLANDA LEITE MAIA

**ESTUDOS PSICOFARMACOLÓGICOS PRÉ – CLÍNICOS DO 3-FENIL-
5-(4-METILFENIL)-IMIDAZOLIDIN-2,4-DIONA (HPA-05) EM
CAMUNDONGOS**

**JOÃO PESSOA-PB
2013**

ANA KARINA HOLANDA LEITE MAIA

**ESTUDOS PSICOFARMACOLÓGICOS PRÉ – CLÍNICOS DO 3-FENIL-
5-(4-METILFENIL)-IMIDAZOLIDIN-2,4-DIONA (HPA-05) EM
CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do grau de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS. Área de concentração: FARMACOLOGIA.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Liana Clébia Soares Lima de Moraes

JOÃO PESSOA-PB

2013

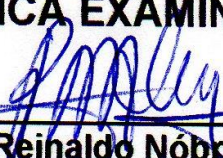
ANA KARINA HOLANDA LEITE MAIA

ESTUDOS PSICOFARMACOLÓGICOS PRÉ – CLÍNICOS DO 3-FENIL-5-(4-METILFENIL)-IMIDAZOLIDIN-2,4-DIONA (HPA-05) EM CAMUNDONGOS


Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do grau de DOUTOR EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS.
Área de concentração: FARMACOLOGIA

Aprovado em 13/09/2013

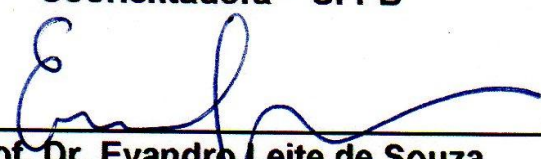
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Orientador – UFPB




Profª. Drª. Liana Clébia Soares Lima de Moraes
Coorientadora – UFPB



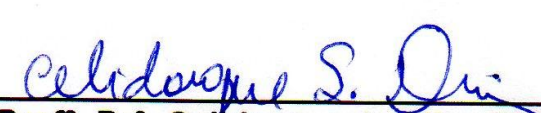
Prof. Dr. Evandro Leite de Souza
Examinador Externo – UFPB



Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley
Examinador Externo – UFPE



Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga
Examinador Interno – UFPB



Profª. Drª. Celidarque da Silva Dias
Examinadora Interna – UFPB

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Carlos e a minha mãe, Fátima,
por ter me guiado no caminho da vida e por
ter me presenteado com o maior bem que
alguém pode transmitir: o amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar sempre os meus caminhos e pela força para ultrapassar barreiras ou optar por novos caminhos.

Aos meus pais, Carlos e Fátima, pelo exemplo de vida, priorizando a honestidade e a união familiar.

Aos meus irmãos Ana Livia e Rodolfo que contribuíram para mim de forma especial durante essa caminhada.

À Adriana, cuja dedicação, cuidado e amor, propiciaram-me a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida que, mesmo com a correria do seu dia-a-dia, aceitou-me como orientanda, ajudou-me e guiou-me, possibilitando-me realizar esse importante e valioso trabalho. Meu muito obrigada.

À Prof^a. Dr^a. Liana Clébia Soares Lima de Moraes, pelo apoio incondicional, pelos conhecimentos, amizade, companheirismo, disponibilidade e estímulo com que me conduziu nesta caminhada. Amo muito você!

Ao Professor Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde Filho e ao seu orientando Ms Severino Araújo de Souza pelo fornecimento da substância teste, a base da realização deste trabalho.

Aos Professores, Dr^a. Edeltrudes de Oliveira Lima, Dr^a. Maria de Fátima Vanderlei, Dr. Evandro Leite de Souza, Prof. Dr. Almir Goncalves Wanderley, Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga, Prof^a. Dr^a. Ana Tereza Cavalcanti da Silva, Prof^a Dr^a. Celidarque da Silva Dias, pela contribuição para o enriquecimento da minha tese.

A minha amiga, Clélia Mota, pela amizade, por juntas termos superados desafios, e pelos bons e difíceis momentos compartilhados.

Aos colegas do laboratório da psicofarmacologia, Diogo, Mirian, Franklin, Paula Salgado, Aline, Fabíola, enfim todos que contribuíram direta e indiretamente na realização desse trabalho.

As minhas amigas, Adriana Fernandes, Anamyriam Rabelo, Mariana Fernandes, Caliandra Maria, Carla Forte, Ludmila Carvalho, Larissa Vitorino, Milena Vitorino, Lígia Maia, Patrícia Marques, Hiana Andrade, Thais Gaudêncio, Vinícius Guerra, pelos bons momentos, excelente combustível durante este percurso.

A José Crispim Duarte, técnico do Biotério, pelo apoio imprescindível, pela dedicação e presteza nos vários momentos desta pesquisa.

Aos funcionários da Pós – Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - UFPB, em especial, Tânia Alves e Caroline Manguiera, que sempre me receberam com tanta presteza, simpatia e cordialidade.

Ao meu mestre Professor Dr. Adalberto Coelho da Costa, pelos seus ensinamentos, a quem me inspirou ser não somente uma professora, mas também uma educadora.

“Quem nada conhece, nada ama. Quem nada pode fazer, nada compreende. Quem nada compreende nada vale. Mas Quem compreende também ama, observa, vê... Quanto mais conhecimento houver inerente numa coisa, tanto maior o amor...”

Paracelsus

RESUMO

MAIA, A. K. H. L. **Estudos Psicofarmacológicos pré - clínicos do 3-fenil-5-(4-metilfenil)-imidazolidin-2,4-diona (HPA-05) em camundongos.** 2013. 111p. Tese (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

Os compostos heterocíclicos são encontrados em muitos medicamentos com finalidades terapêuticas diversas, tendo destaque os derivados da hidantoína. Estes derivados, tais como os fármacos imidazolidínicos, são empregados como anticonvulsivantes, cicatrizantes, miorrelaxantes, antimicrobianos e antitumorais. Estudos anteriores, realizados por SALGADO, 2011, utilizando metodologias comportamentais, demonstraram que a HPA-05 (3-fenil-5-(4-metilfenil)-imidazolidin - 2,4 - diona) apresenta ações depressoras sobre o SNC (Sistema Nervoso Central) com indicações antinociceptivas. Estes resultados revelaram a necessidade de aprofundar o trabalho no sentido de que a atividade terapêutica para o alívio da dor da HPA - 05 fosse melhor estudada, além de complementar o estudo psicofarmacológico da mesma. A dose de 200 mg/Kg da HPA-05, via i.p., não envolve a participação dos receptores K^+_{ATP} no seu mecanismo de ação, nem receptores $GABA_A$, não é exercida pela via colinérgica e também não envolve a via glutamatérgica, visto que o tratamento com a substância em estudo não reduz o tempo de lambida da pata em nenhuma das fases no teste da formalina. O pré-tratamento dos animais com L-arginina foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo da HPA - 05 na primeira fase do teste da formalina, o qual envolve os receptores D_2 da dopamina na segunda fase e a interação da cafeína com a HPA - 05, mostrando uma reversão do efeito antinociceptivo da HPA - 05, na primeira fase do teste da formalina. Os resultados com a HPA-05 se mostraram efetivos em inibir a latência das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol e pelo eletrochoque auricular, o que indica apresentar perfil de drogas anticonvulsivantes. No teste do Labirinto em Cruz Elevado, não foi observado nenhuma modificação comportamental indicativa de um possível efeito ansiolítico. Na peritonite induzida pela carragenina, houve redução na quantidade de leucócitos e neutrófilos na cavidade intraperitoneal dos animais tratados, revelando a atividade anti-inflamatória da HPA - 05. Os resultados apresentados neste estudo evidenciaram um efeito promissor da HPA - 05 como substância analgésica, anti-inflamatória e anticonvulsivante.

Palavras-chave: Imidazolidínicos. Psicofármacos. Anticonvulsivante. Antinociceptivo. Anti-inflamatório.

ABSTRACT

MAIA, A. K. H. L. **Preclinical Psychopharmacological studies of 3-phenyl-5-(4-methylphenyl) imidazolidine-2,4-dione (HPA-05) in mice.** 2013. 111p. Tese (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

Heterocyclic compounds are found in many drugs with several therapeutic purposes, particularly in hydantoin derivatives. These derivatives, such as imidazolidine pharmaceuticals are employed as: anticonvulsants, cicatrizants, muscle relaxants, antimicrobials and antitumorals. Previous studies, using behavioral methodologies, have demonstrated that HPA-05 (3-phenyl-5-(4-methylphenyl) imidazolidine-2,4-dione) presented depressant actions on the CNS (Central Nervous System) with indications such as antinociceptives. These results have guided this work to a better study of the therapeutic activity of HPA-05 in pain relief. The dose of 200 mg/Kg of HPA-05, through i.p., does not involve the participation of K^+_{ATP} receptors in its mechanisms of action, neither $GABA_A$ receptors, it is not exerted by the cholinergic pathway and also does not involve the glutamatergic pathway, since the treatment with the substance under study does not reduce the duration of paw licking at any phases in the formalin test. The pretreatment of the animals with L-arginine was capable of reversing the antinociceptive effect of HPA-05 in the first phase of the formalin test, which involves the dopamine D_2 receptors in the second phase and the interaction of caffeine with HPA-05, showing a reversion of the antinociceptive effect of HPA-05 in the first phase of the formalin test. The results with HPA-05 were effective in inhibiting the latency of convulsions induced by pentylenetetrazol and by auricular electroshock, what indicates to show profile of anticonvulsant drugs in these tests. In the Elevated Plus Maze test, it has not been observed any behavioral modification indicating a possible anxiolytic effect. In the peritonitis induced by carrageenan, there was a reduction in the levels of leukocytes and neutrophils in the intraperitoneal cavity of the treated animals, demonstrating the anti-inflammatory activity of HPA-05. The results shown in this study have evidenced a promising effect of HPA-05 as an analgesic, anti-inflammatory and anticonvulsant agent.

Keywords: Imidazolidines. Psychopharmaceuticals. Anticonvulsant. Antinociceptive. Anti-inflammatory

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fibras nervosas mielínicas e amielínicas.....	27
Figura 2: A complexidade molecular dos nociceptores aferentes primários.....	28
Figura 3: Teoria da comporta proposta por Melzack e Wall em 1965.....	30
Figura 4: Estrutura da Fenitoína (5,5 - difenil - imidazolidina - 2,4-diona).....	38
Figura 5: estrutura química da nitrofurantoína (1-[(5-nitrofurano-2-il)metilideneamino]imidazolidine-2,4-diona).....	39
Figura 6: fluxograma dos procedimentos para avaliação dos efeitos psicofarmacológicos da HPA-05 em camundongos via intraperitoneal.....	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Efeito da HPA - 05 na latência para a primeira convulsão durante o teste das convulsões induzidas pelo PTZ.....	57
Gráfico 2: Efeito da HPA - 05 sobre as convulsões induzidas pelo eletrochoque auricular máximo.....	58
Gráfico 3: Efeito da HPA - 05 sobre o número de entradas nos braços abertos no teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	59
Gráfico 4: Efeito da HPA - 05 sobre o tempo de permanência nos braços abertos no teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	60
Gráfico 5: Efeito do pré-tratamento com glibenclamida (10 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p), na primeira fase do teste da formalina.....	61
Gráfico 6: Efeito do pré-tratamento com glibenclamida (10 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p), na segunda fase do teste da formalina.	61
Gráfico 7: Efeito do pré-tratamento com a bicuculina (1 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p), na primeira fase do teste da formalina.....	62
Gráfico 8: Efeito do pré-tratamento com a bicuculina (1 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p), na segunda fase do teste da formalina.....	63
Gráfico 9: Efeito do pré-tratamento com a ioimbina (1 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p), na primeira fase do teste da formalina.....	64
Gráfico 10: Efeito do pré-tratamento com a ioimbina (1 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p), na segunda fase do teste da formalina.....	64
Gráfico 11: Efeito do pré-tratamento com a atropina (0,1 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p), na primeira fase do teste da formalina.....	65
Gráfico 12: Efeito do pré-tratamento com a atropina (0,1 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p), na segunda fase do teste da formalina.....	66
Gráfico 13: Efeito do pré-tratamento com a HPA - 05 (50, 100 e 200 mg/Kg, i.p), no teste do Glutamato.....	66

Gráfico 14: Efeito do pré-tratamento com a L- arginina (100 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p), na primeira fase do teste da formalina.....	67
Gráfico 15: Efeito do pré-tratamento com a L- arginina (100 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p), na segunda fase do teste da formalina.....	68
Gráfico 16: Efeito do pré-tratamento com a Sulpirida (20 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p), na primeira fase do teste da formalina.....	68
Gráfico 17: Efeito do pré-tratamento com a Sulpirida (20 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p), na segunda fase do teste da formalina.....	69
Gráfico 18: Efeito do pré-tratamento com a Cafeína (10 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p), na primeira da fase do teste da formalina.....	70
Gráfico 19: Efeito do pré-tratamento com a Cafeína (10 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p), na segunda da fase do teste da formalina.....	70
Gráfico 20: Efeito da administração da HPA - 05 e da dexametasona (2mg/kg, s.c) sobre a migração de leucócitos totais (A) e neutrófilos (B), peritonite induzida por carragenina.....	72

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Tabela 1: Efeito da HPA - 05 sobre o tipo de convulsão no teste das quimioconvulsões induzidas pelo Pentilenotetrazol em camundongos.....	56
Tabela 2: Efeito da HPA -05 sobre o tipo de convulsão e mortalidade no teste das convulsões induzidas pelo Eletrochoque Auricular.....	58
Quadro 1: Representação das estruturas químicas das substâncias utilizadas no estudo.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

μL	Microlitros
μm	Micrômetro
AINE	Antiinflamatório não-esteroidal
AMPA	Receptor ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	Análise de variância
COX	Ciclooxigenase
COX-2	Ciclooxigenase-2
DEXA	Dexametasona
DL₅₀	Dose letal que mata 50% dos animais
DRG	Gânglio da Raiz dorsal
E.P.M.	Erro padrão da média
ERK	Proteína quinase regulada por estímulos extracelular
Fe²⁺	Íons ferro
GABA	Ácido γ-amino-butírico
GABA_A	Receptor de ácido gama amino butírico tipo A
GP	Glutaciona peroxidase
HPA - 05	3-fenil-5-(4-metilfenil)-imidazolidin-2,4-diona
IF-γ	Interferon-gama
IL-1β	Interleucina 1β
i.p.	Intraperitoneal
K⁺_{2P}	Canal de potássio de dois poros
K⁺_{ATP}	Canal de potássio ativado por ATP
K⁺_{Ca}	Canal de potássio ativado por cálcio
K⁺_V	Canal de potássio dependente de voltagem
M	Concentração molar
mM	Milimolar
MOR	Morfina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
ng/mL	Nanogramas por mililitros
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido Nítrico
PBS	Tampão fosfato de sódio
PGE₂	Prostaglandina E2
PGF_{2α}	Prostaglandina F2-alfa
PLC	Fosfolipase C
pH	Potencial hidrogeniônico
r.p.m.	Rotações por minuto
SG	Substância gelatinosa

s.c.	Subcutânea
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
Tween 80	Polioxetileno Sorbitano Monoleato
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
v. o	Via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Fármacos que atuam no Sistema Nervoso Central.....	20
1.2 Fármacos Anticonvulsivantes.....	22
1.3 Considerações Gerais sobre Dor.....	24
1.4 Tipos de Dor.....	25
1.5 Percepção da Dor.....	26
1.5.1 Transdução, Transmissão e Modulação.....	26
1.6 Aspectos gerais da resposta inflamatória.....	30
1.6.1 Mediadores químicos envolvidos na dor e inflamação.....	33
1.7 Tratamento Farmacológico da Dor.....	34
1.8 Hidantoínas (Imidazolidina - 2,4 - Diona).....	37
 2 OBJETIVOS.....	 42
2.1 Objetivo Geral.....	42
2.2 Objetivos Específicos.....	42
 3 MATERIAL E MÉTODOS.....	 44
3.1 Material.....	44
3.1.1 Substância teste (HPA-05).....	44
3.1.2 Animais.....	44
3.1.3 Condições experimentais.....	44
3.1.4 Fármacos e substâncias utilizadas.....	45
3.2 Métodos.....	48
3.2.1 Investigação da atividade anticonvulsivante.....	48
3.2.1.1 Teste das convulsões induzidas pelo Pentilenotetrazol.....	48
3.2.1.2 Teste das convulsões induzidas pelo eletrochoque auricular.....	48
3.2.2 Investigação da atividade ansiolítica.....	49
3.2.2.1 Teste do labirinto em cruz elevado.....	49
3.2.3 Avaliação da atividade antinociceptiva.....	49
3.2.3.1 Teste da formalina.....	49
3.2.4 Avaliação dos mecanismos de ação.....	50
3.2.4.1 Participação dos canais de K^{+}_{ATP}	50

3.2.4.2 Participação do sistema GABAérgico.....	50
3.2.4.3 Participação do sistema noradrenérgico.....	50
3.2.4.4 Participação do sistema Colinérgico – muscarínico.....	51
3.2.4.5 Participação do sistema Glutamatérgico.....	51
3.2.4.6 Participação do sistema L-arginina/óxido nítrico.....	51
3.2.4.7 Participação do sistema Dopaminérgico.....	51
3.2.4.8 Participação do sistema Adenosínico.....	52
3.3 Estudo da Atividade Anti-inflamatória.....	52
3.3.1 Peritonite induzida por carragenina (Cg).....	52
3.4 Análise Estatística.....	53
4 RESULTADOS.....	56
4.1 Investigação da Atividade Anticonvulsivante.....	56
4.1.1 Teste das convulsões induzidas pelo Pentilenotetrazol.....	56
4.1.2 Teste das convulsões induzidas pelo eletrochoque auricular.....	57
4.2 Investigação da Atividade Ansiolítica.....	59
4.2.1 Teste do labirinto em cruz elevado.....	59
4.3 Mecanismos de Ação da Atividade Antinociceptiva.....	60
4.3.1 Participação dos canais de K^{+}_{ATP}	60
4.3.2 Participação do sistema GABAérgico.....	61
4.3.3 Participação do sistema noradrenérgico.....	63
4.3.4 Participação do sistema Colinérgico – muscarínico.....	65
4.3.5 Participação do sistema Glutamatérgico.....	66
4.3.6 Participação do sistema L-arginina/óxido nítrico.....	67
4.3.7 Participação do sistema Dopaminérgico.....	68
4.3.8 Participação do sistema Adenosínico.....	69
4.4 Estudo da Atividade Anti-inflamatória.....	71
4.4.1 Peritonite induzida por carragenina (Cg).....	71
5 DISCUSSÃO.....	74
6 CONCLUSÕES.....	86
7 PERSPECTIVAS.....	88
REFERÊNCIAS.....	90

ANEXOS

Anexo I - Certidão da comissão de ética no uso de animais..... 110

Anexo II - Resumos publicados em anais de eventos científicos

durante o curso do doutorado..... 111

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Pesquisas por novos fármacos se tornam crescentes, já que os avanços tecnológicos não trouxeram somente progressos, mas também mudanças de hábitos, alterações nos ecossistemas e, conseqüentemente, novas doenças. Nos primórdios da humanidade as fontes naturais eram as únicas alternativas para a cura e alívio das enfermidades, entretanto, devido aos avanços da Química Orgânica, a síntese tornou-se uma ferramenta que tem contribuído, cada vez mais, na descoberta de novos fármacos, já que a maioria das moléculas utilizadas na terapêutica é de origem sintética. Esse crescimento também é corroborado pela aplicação de conhecimentos de outras áreas à síntese orgânica, que dispõe de métodos analíticos mais eficientes e rápidos. Desta forma é de grande relevância a realização de estudos com ênfase na síntese e planejamento de novas moléculas com perspectivas farmacológicas (THOMAS, 2003).

Os compostos heterocíclicos, por sua vez, são as maiores fontes de fármacos sintéticos, os quais aumentam em número, apresentando importantes aplicações na indústria farmacêutica. A título de interesse, 85% dos fármacos disponíveis na terapêutica moderna são de origem sintética, e, destes, 62% são heterocíclicos (KATRITZKY, 2001). A importância desses compostos está relacionada à possibilidade da introdução de heteroátomos no anel e novos grupos substituintes, o que lhes confere diferentes propriedades químicas e biológicas.

Entre os compostos heterocíclicos, destacamos a classes dos derivados da hidantoína, a qual desperta grande interesse por apresentar ações farmacológicas importantes. Também denominada de 2,4-dicetotetrahidroimidazol, 2,4-dioxoimidazolidina ou imidazolidina-2,4-diona, a hidantoína foi sintetizada, pela primeira vez, por Baeyer, em 1861, durante seus estudos sobre o ácido úrico. Dentre as hidantoínas utilizadas no Brasil, estão a fenitoína, fármaco de escolha no tratamento de convulsões e a nitrofurantoína, fármaco de escolha no tratamento de infecções do trato urinário, ambas presentes na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (BRASIL, 2010) e na Lista de Medicamentos Essenciais da OMS (WHO, 2010).

Diversos estudos os estudos na área da Psicofarmacologia, foram realizados, por exemplo, Henze e Smith, em 1943, descobriram que àquela apresentada pela

2,4-ditio-5,5-dimetil-hidantoína possuía ação hipnótica. Essa substância revelou também atividade anticonvulsivante superior à 5,5- dimetil-hidantoína. Alguns trabalhos também demonstraram que derivados 2-tioxo-imidazolidina-4,5-dionas possuíam atividade anticonvulsivante (SINGH, 1974). Novas hidantoínas substituídas, como 4-hidróxi- 2-imidazolidinonas; 2-imidazolonas; 2-imidazolidinonas, diaminasvicinais e derivados de aminoácidos, foram sintetizadas e avaliadas quanto à atividade anticonvulsivante, diante desses estudos nós direcionamos a tese para avaliar a HPA-05 em diversas ações no sistema nervoso central (CORTES et. al.,1985; CARVALHO, 2011).

Com relação às propriedades analgésicas, a família de compostos imidazolidínicos ou hidantoínicos são largamente utilizados pela indústria, devido à sua fácil absorção pelo organismo e pelo grande potencial analgésico de alguns de seus derivados. Logo, são requeridas menores doses do fármaco para obtenção da resposta biológica durante o tratamento, sugerindo, conseqüentemente, menores riscos em relação ao seu uso. Há relatos evidenciando que esses compostos, quando administrados com outras drogas, atenuam o desenvolvimento de tolerância e dependência aos efeitos analgésicos de substâncias como a morfina, revelando, pois, a relevância da continuidade das pesquisas com os mesmos (DURÁNTEZ, 2003).

1.1 Fármacos que atuam no Sistema Nervoso Central

A história da psicofarmacologia moderna inicia-se no final da década de 40, quando foram introduzidos os primeiros fármacos com a finalidade específica de tratar os transtornos psiquiátricos. O primeiro relato de tratamento de mania com lítio, realizado por Cade, data de 1949, seguido pela descrição dos efeitos antipsicóticos da clorpromazina em 1952, por Delay e Deniker. Os primeiros ansiolíticos foram o meprobamato (1954) e o clordiazepóxido (1957), seguido por uma ampla gama de benzodiazepínicos.

Segundo Almeida (2006), as substâncias químicas que exercem seus efeitos no SNC são denominadas drogas psicoativas ou psicotrópicas, empregadas para tratar ou aliviar doenças psíquicas desde meados de 1940.

As principais e mais estudadas classes dos psicotrópicos são os neurolépticos, os antidepressivos, anticonvulsivantes, ansiolíticos, hipnóticos,

relaxantes musculares e os analgésicos (CALIXTO et al., 2000; LIRA, 2001; POLATIN; DERSH, 2004).

Os neurolépticos são também chamados de tranqüilizantes maiores ou ainda de agentes antipsicóticos. Caracterizam-se como antagonistas dos receptores da dopamina, embora muitas drogas atuem sobre outros alvos, particularmente os receptores da 5-HT, o que pode contribuir para sua eficácia clínica. As principais indicações para essas drogas são as psicoses e sintomas associados com transtorno afetivo (bipolar) e transtornos severos de personalidade. Neles estão inclusos os neurolépticos típicos ou clássicos (clopromazina e haloperidol) e os que têm menor tendência de causar efeitos colaterais motores indesejáveis, chamados de atípicos ou de segunda geração (clozapina, risperidona e sulpirida) (LIM et al., 2001; BALDESSARINI; TARAZI, 2006).

Os antidepressivos são usados no tratamento da depressão e na elevação do humor – que é um dos vários sintomas desse distúrbio. Os medicamentos de uso clínico podem ser divididos da seguinte forma: tricíclicos (imipramina e amitriptilina), tetracíclicos (metralindol, mianserina), agentes heterocíclicos (amoxapina e bupropiona), inibidores seletivos da recaptação de neurotransmissores (por exemplo, a fluoxetina, paroxetina e sertralina, as quais inibem seletivamente a recaptura de serotonina) e inibidores da monoamina oxidase (maclobemida, fenelzina e tranilcipromina). Todos exercem seus efeitos terapêuticos aumentando seletivamente as aminas biogênicas neurotransmissoras em múltiplas vias no SNC (SAWYNOK; ESSER; REID, 2001; ALMEIDA, 2006; MOTA, 2008).

Na classe dos anticonvulsivantes (ou antiepilépticos), o fenobarbital foi o primeiro agente orgânico sintetizado que se reconheceu como dotado de atividade anticonvulsivante. Os medicamentos antiepilépticos podem ser divididos em duas categorias, quais sejam, os clássicos (como a fenitoína, fenobarbital, carbamazepina, clonazepam e nitrazepam) e a nova geração (em que estão inseridas a progabida, gabapentina e lamotigina, entre outros). Os principais mecanismos de ação das drogas anticonvulsivantes são a potencialização da ação do ácido gama-aminobutírico (GABA) e a inibição dos canais para sódio dependentes de voltagem (ATTAL, 2000; CLUFF, 2002; ALMEIDA, 2006).

Os ansiolíticos e hipnóticos são drogas utilizadas no tratamento dos sintomas da ansiedade e no tratamento da insônia, respectivamente. Apesar dos objetivos clínicos serem diferentes, as mesmas drogas são, freqüentemente, usadas para

ambas as finalidades. Os principais grupos de drogas utilizadas com esta finalidade são os benzodiazepínicos (diazepam e clordiazepóxido), barbitúricos (zolpidem, fenobarbital e pentobarbital), antagonistas dos receptores beta-adrenérgicos (propranolol) e outras drogas (hidrato de cloral e meprobamato) (SCHATZBERG, 2003; RANG et al., 2012).

Os relaxantes musculares incluem as drogas que não possuem efeitos periféricos no tônus muscular, mas sim efeitos no SNC, as quais causam relaxamento muscular, incluindo-se, nesse grupo o baclofeno, mefenesina e alguns benzodiazepínicos (SCHOFFERMAN, 2003).

Os analgésicos de ação central ou simplesmente opióides têm como característica principal aumentar o limiar neuronal ao estímulo nocivo ou até mesmo erradicar a sensação dolorosa. O termo “opióide” é habitualmente empregado para substâncias de natureza sintética ou peptídica com ação semelhante à morfina, enquanto que “opiáceo” representa uma terminologia mais antiga, sendo aplicada a substâncias naturais ou semissintéticas isoladas do ópio, como a morfina e codeína, respectivamente (ALMEIDA, 2006).

1.2 Fármacos Anticonvulsivantes

Dentre a variedade de patologias que afetam o SNC, a epilepsia é tida como uma das mais sérias, tendo em vista os graves incômodos que proporciona ao seu portador. O quadro caracteriza-se por alterações crônicas, recorrentes e paroxísticas na função neuronal, decorrentes de anormalidade na atividade elétrica cerebral (ALMEIDA, 2006).

A crise epiléptica caracteriza-se pela disfunção neurológica na sua fase aguda, a qual, dependendo da área cerebral envolvida, pode manifestar-se através de distúrbios de cognição ou consciência, movimentos involuntários, automatismos de comportamento ou manifestações autonômicas, sensoriais e psíquicas (CHAUDHARY; DUNCAN; LEMIEUX, 2011).

O evento mais dramático de alguns quadros de epilepsia é a convulsão, caracterizada pela atividade hipsíncrona e repetitiva de um grupamento neuronal do córtex cerebral, cuja distribuição anatômica e duração de sua atividade determinam a natureza da crise (STEFAN et al., 2009).

Apesar do importante progresso na compreensão das crises convulsivas nas últimas décadas, as bases celulares da epilepsia no homem permanecem ainda desconhecidas. O tratamento convencional das crises convulsivas é realizado, principalmente, pelo uso clínico de drogas anticonvulsivantes. Uma droga anticonvulsivante pode ser definida como uma substância que, quando administrada, pode, por um determinado período, diminuir a incidência ou severidade das convulsões que acomete pacientes epiléticos (LÖSCHER; SCHMIDT, 2002).

Embora os mecanismos de ação das drogas anticonvulsivantes comercializadas atualmente ainda não sejam completamente entendidos, de modo geral, aqueles envolvem alteração no balanço entre excitação e inibição neuronais (WHITING, 1999). Nesse diapasão, são conhecidos três mecanismos básicos, quais sejam: modulação de canais iônicos dependentes de voltagem (Na^+ , Ca^{++} , K^+), aumento da neurotransmissão inibitória mediada pelo GABA; e atenuação de neurotransmissão excitatória, particularmente a mediada pelo glutamato (OLIVEIRA, 2010).

As drogas anticonvulsivantes de primeira geração apresentam, em geral, um significativo número de efeitos adversos, tais como sedação, retenção hídrica, hepatotoxicidade, depressão, bradicardia, acidose respiratória, anemia megaloblástica e tolerância (ALMEIDA, 2006; HUNG; SHIH, 2011).

Com o surgimento das drogas anticonvulsivantes de segunda geração (lamotrigina, vigabatrina, tiagabina, topiramato, gabapentina e leviracetam) e de terceira geração (remacemida, fosfenitoína e dezinamida), o tratamento da epilepsia apresenta muitos avanços, e, a cada dia, várias outras substâncias são propostas como novos agentes anticonvulsivantes. As novas drogas anticonvulsivantes, em geral, causam menos efeitos adversos e possuem um menor potencial para o desenvolvimento de toxicidade. Apesar disso, o percentual de pacientes que não tem um controle apropriado continua sem modificações significativas (OLIVEIRA, 2010).

Inúmeras pesquisas visam descobrir novas estratégias farmacológicas anticonvulsivantes por meio de novos compostos eficazes para epilepsia de difícil controle ou de compostos com menor toxicidade para aquelas já tratadas pelo arsenal terapêutico atualmente disponível (FAGGION et al., 2011).

1.3 Considerações Gerais sobre Dor

A dor é gerada dentro de estruturas encefálicas semelhantemente ao prazer, ao calor e a outras experiências sentidas frente a estímulos ambientais (TRACEY, 2007). Isso é importante, porque as sensações possuem vias neuroanatômicas, com receptores específicos que permitem a detecção e medida de um estímulo. Já as experiências incorporam componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais importantes (MILLAN, 1999). Dessa forma, a dor possui uma conotação individual e sofre influência de experiências prévias (MERSKEY; BOGDUK, 1994). Então, pela diversidade de experiências dolorosa, explica-se porque tem sido muito difícil, encontrar um conceito definitivo e satisfatório para a dor (LOESER; MELZACK, 1999; RAINVILLE, 2002).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, do inglês *International Association for the Study of Pain*), em 1994, conceituou a mesma como sendo uma experiência sensorial e emocional desagradável, a qual está associada a lesões teciduais reais ou potenciais ou descrita em termos de tais danos. A manifestação da sensação dolorosa, em diversos níveis e origens, é um dos principais motivos de busca por assistência médica em todo o mundo (MERSKEY, BOGDUK, 1994; MILLAN, 1999).

Os receptores da dor na pele e em outros tecidos estão presentes em terminações nervosas livres sensíveis a estímulos dolorosos. A atividade no nociceptor e a via nociceptiva e outros processos neurofisiológicos induzidos pelo estímulo doloroso são chamados nocicepção (DICKENSON, 1997). Assim, a percepção de estímulos lesivos, denominada por Sherrington (1906) de nocicepção, não significa o mesmo que a sensação de dor. Esta representa uma experiência complexa e, muitas vezes, subjetiva, incluindo componentes afetivos, culturais e psicológicos, enquanto nocicepção é a detecção da lesão tecidual por transdutores especializados ligados às fibras A δ e C, as quais transmitem sinais ao sistema nervoso central, influenciados por inflamações e por estímulos ambientais físicos ou químicos (DUBNER; BENNET, 1983; JESSEL; KELLY, 1992; MEYER et al., 1994 LOESER; MELZACK, 1999).

A partir dessas definições, podemos observar que existe a participação de um componente fisiológico e outro psicológico ou emocional, motivo por que a junção de ambos é o que os humanos entendem por dor. Sendo assim, uma vez que os

animais não são capazes de verbalizar os componentes subjetivos da dor, neles não se avalia dor, mas nocicepção. Portanto, os termos dor e analgesia são mais apropriadamente utilizados para o ser humano, enquanto nocicepção e antinocicepção são mais adequados para os animais (JONES, 1992; TJØLSEN; HOLE, 1997; WALL, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001; WATKINS; MAIER, 2003).

1.4 Tipos de Dor

A dor pode ser classificada sob vários aspectos, um deles leva em consideração sua distribuição temporal, em transitória, aguda e crônica. Quanto aos mecanismos fisiológicos (dor nociceptiva, somática, neurogênica, neuropática, referida, visceral e inflamatória) (RENTON, 2008).

A dor transitória caracteriza-se pela ativação dos nociceptores, sem qualquer dano tecidual (RENTON, 2008). A dor aguda caracteriza-se por uma resposta orgânica protetora, pois alerta um indivíduo para uma lesão iminente ou real dos tecidos, induzindo ao surgimento de respostas reflexas e comportamentais coordenadas com o intuito de manter o dano tecidual o mais controlado possível (WOOLF et al., 1999). Já a dor crônica persiste além do período esperado de cura por causa da incapacidade do corpo em restaurar-se ao estado normal (GRICHNIK; FERRANTE, 1991).

A dor nociceptiva pode ser classificada de acordo com a modalidade do estímulo nocivo, como a dor térmica (calor ou frio), mecânica (por exemplo, deformação no tecido) e química (por exemplo, o iodo em um corte), ou pode ser dividida em visceral (órgãos), somática, que se origina na periferia do organismo (pele, músculos, articulações, ligamentos e ossos), sendo uma dor bem localizada e caracterizada por sensações claras e precisas (BRAUN-FILHO; BRAUN, 2004) e superficial (de nociceptores na pele ou em tecidos superficiais) (SPANSWICK; MAIN, 2000).

A dor visceral é a forma de dor que surge com mais frequência como consequência de enfermidades. É o sintoma comum na maioria das síndromes dolorosas agudas e crônicas de interesse clínico. É vaga, mal localizada e se estende além do órgão lesado. Pode ser referida em regiões distantes da víscera que a originou (BRAUN-FILHO; BRAUN, 2004). Não é raro uma pessoa sentir dor em uma parte do corpo consideravelmente distante dos tecidos que a causaram.

Esse tipo de dor visceral é chamada de referida, sendo iniciada em um dos órgãos viscerais e referida a uma área na superfície corporal. A dor pode ainda ser referida a uma área do corpo não exatamente coincidente com a localização da víscera que a produziu (GUYTON; HALL, 2002).

Por fim, a dor inflamatória aparece devido aos efeitos diretos de mediadores resultantes tanto do dano inicial quanto da resposta inflamatória em si, como pela compressão dos nervos sensoriais ocasionada pelo edema local (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1996; ROSENBERG; GALLIN, 1999; ROBERTS II; MORROW, 2003).

1.5 Percepção da Dor

1.5.1 Transdução, Transmissão e Modulação

O reconhecimento da dor como reação sensitiva envolve uma sequência de eventos cujo primeiro passo é a **transdução**, ou seja, a transformação dos estímulos agressivos em potenciais de ação que, das fibras nervosas periféricas, são transmitidos para o SNC (BESSON; PERL, 1969; JULIUS; BASBAUM, 2001). No processo de transdução de uma sensação dolorosa, ocorre uma amplificação dos eventos pela liberação local de uma grande variedade de substâncias químicas (denominadas genericamente de substâncias algogênicas) que surgem em grande quantidade nos tecidos em decorrência de processos inflamatórios, traumáticos ou isquêmicos. Essas substâncias incluem bradicinina, noradrenalina, serotonina, histamina, citocinas, leucotrienos, prostaglandinas e substância P (MARQUEZ, 2004).

Os nociceptores apresentam corpos celulares localizados nos gânglios da raiz dorsal e nos gânglios trigeminal, possuindo ramificações axonais que inervam órgãos e a medula espinhal (BASBAUM et al., 2009). São terminações nervosas livres das fibras mielínicas A δ e das fibras amielínicas C (Figura 1) localizadas na pele, músculos, articulações, tecido conjuntivo e vísceras. Alguns tecidos possuem nociceptores que podem ser classificados como nociceptores térmicos (ativados por estímulos de frio e calor), nociceptores mecânicos (ativados por intensa pressão) e os polimodais, ativados por estímulos químicos, térmicos ou mecânicos de elevada intensidade (PINTO, 2000).

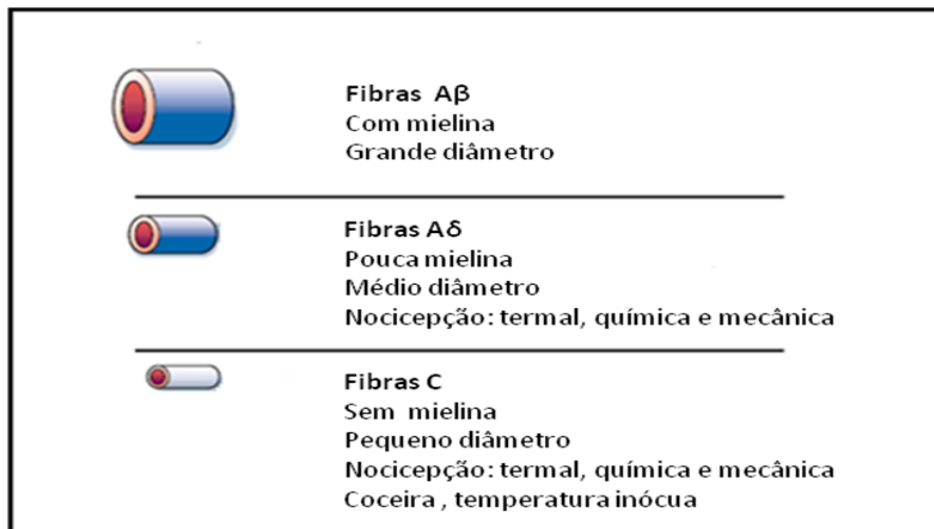


Figura 1: Fibras nervosas mielínicas e amielínicas

Fonte: Adaptado de (JULIUS; BASBAUM, 2001).

A condução dos impulsos nociceptivos da periferia à medula espinhal é realizada pelas fibras sensoriais (aférentes) do tipo C, Aδ, e também por fibras Aβ relacionadas à sensação de tato, envolvidas na modulação do sinal nódico e, em algumas situações, participando de forma absolutamente normal no processo doloroso (Figura 2) (FURST, 1999; MARQUEZ, 2004).

As Fibras Aβ possuem diâmetro largo, são mielinizadas e de rápida condução. A maioria das fibras Aβ detectam estímulos inócuos aplicados à pele, músculos e articulações e, conseqüentemente, não contribuem para a dor.

Fibras Aδ são mielinizadas e produzem uma dor aguda bem definida, chamada de “dor rápida” ou “primeira dor” (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008), possuem diâmetro médio, são finamente mielinizadas e possui velocidade de condução intermediária. Estas fibras transmitem a dor bem localizada ou “primária”. Os nociceptores Aδ são divididos em dois tipos. Os chamados tipo I, que correspondem aos mecanoreceptores de alto limiar, respondem tanto a estímulos térmicos (> 50° C) quanto químicos, porém são insensíveis à capsaicina. Já os nociceptores Aδ II são sensíveis à temperatura em torno de 43° C, isto é, possuem um limiar para estímulo térmico menor que o tipo I (MILLAN, 1999).

As Fibras C são corpos celulares de pequeno diâmetro, não mielinizadas e de lenta condução. Após a “primeira dor”, as fibras C transmitem lentamente a sensação de queimação conhecida como “segunda dor”. Essa condução da dor

ocorre vagarosamente devido ao fato dessas fibras possuírem um diâmetro pequeno e serem amielinizadas. Há também as fibras polimodais C que respondem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos (HELMS; BARONE, 2008). Estudos neuroanatômicos e molecular mostram a existência de uma população de nociceptores C “peptidérgico”, a qual libera neuropeptídios, substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (BASBAUM et al., 2009).

Existem ainda os chamados nociceptores silenciosos (“*silent*” ou “*sleeping*”), que são uma pequena proporção das fibras aferentes, os quais normalmente não são responsivos a estímulos. Quando influenciados por mediadores inflamatórios, ou após a administração de agentes flogísticos, entretanto, apresentam atividade espontânea ou se tornam sensibilizados e respondem a estímulos sensoriais. Estima-se que 40% das fibras C e 20% das fibras A δ atuem como receptores silenciosos (JULIUS; BASBAUM, 2001).

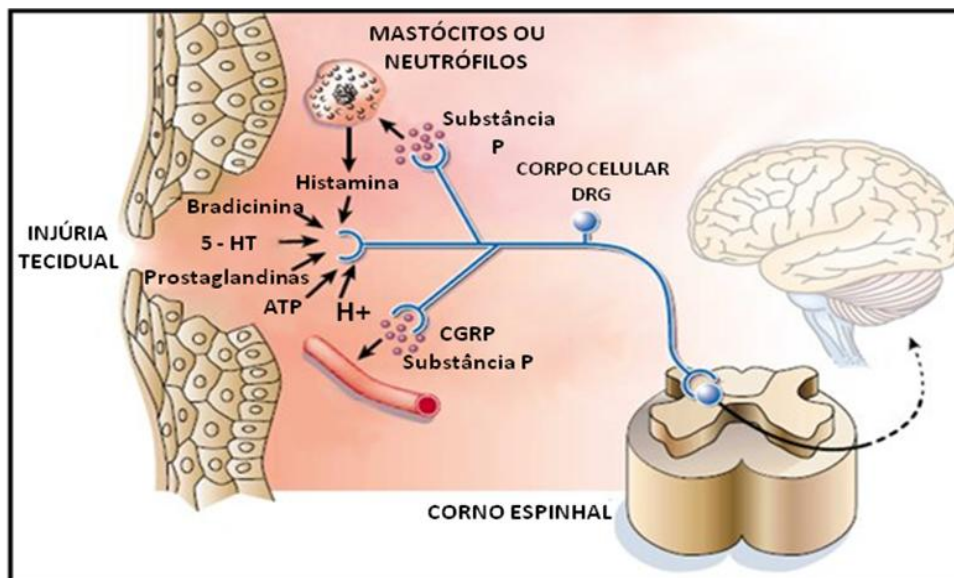


Figura 2: A complexidade molecular dos nociceptores aferentes primários
Fonte: Adaptado de (JULIUS; BASBAUM, 2001).

O sistema de modulação mais conhecido e o mais aceito para explicar a regulação da dor é o da Teoria da Comporta ou “Mecanismo de Controle do Portão Medular” ou “Gate-Control”, desde o início deste século, apresentada por MELZACK & WALL, em 1965, (Figura 3). A supressão da dor decorreria da inibição pré-sináptica na medula espinhal, resultante da colisão entre potenciais dos aferentes primários e os antidrômicos originados na substância gelatinosa do CPME (corno

posterior da medula espinal), que os sistemas modulatórios da dor passaram a ser reconhecidos. Os interneurônios ativados pelos aferentes de grosso calibre gerariam potenciais negativos nas raízes sensitivas e reduziriam a amplitude dos potenciais nociceptivos; a atividade das fibras discriminativas do SNP de grosso calibre bloquearia a transferência das informações nociceptivas para os neurônios do CPME e as influências hiperpolarizantes dos aferentes de calibre fino. A ausência de correspondência anatômica, eletrofisiológica, neuroquímica e de achados clínicos que sustentassem a teoria de comports, como originalmente idealizada, foram razões para que ela não mais fosse aceita como apresentada. Entretanto, teve o mérito de inaugurar um conceito apropriado para justificar a sensibilidade, que é o da interação sensorial, segundo o qual as diferentes modalidades e qualidades sensoriais interagem entre si, modificando-se quanto à sua expressão (WAISBROD, 1984; TEIXEIRA, 2001).

De acordo com Wall e Melzack (1999), a nocicepção trata-se de um processo bi-direcional de vias neuronais ascendentes e descendentes, sendo estes circuitos nociceptivos modulados principalmente pela serotonina e noradrenalina. As vias descendentes originadas de estruturas cerebrais têm um importante papel na modulação e integração das mensagens nociceptivas no corno dorsal da medula espinal.

A via descendente de controle da dor é um mecanismo endógeno que o organismo possui, englobando estruturas encefálicas como o hipotálamo, amígdala, córtex cerebral, *locus coeruleus* (LC), substância cinzenta periaquedutal (PAG), entre outros. Além disso, sistemas de neurotransmissores também participam da modulação descendente da dor, como sistemas opióide, serotoninérgico, noradrenérgico, GABAérgico, adenosinérgico, canabinóides entre outras substâncias (MILLAN, 2002; YOSHIMURA; FURUE, 2006). Vale salientar que um mesmo neurotransmissor, dependendo de onde é liberado, pode exercer tanto ações inibitórias quanto facilitatórias, o que torna essa via descendente da dor bastante complexa (MILLAN, 2002).

Sabe-se também que existem vias descendentes moduladoras da dor que se originam no córtex somestésico e no hipotálamo, projetando-se no mesencéfalo, mais precisamente na substância cinzenta periaquedutal; e daí para os núcleos da rafe, que se interligam ao corno dorsal da medula espinal (VENÂNCIO, 2006). A

estimulação elétrica ou farmacológica desses núcleos tem ação inibitória nociceptiva na medula, provocando o bloqueio da dor (VALE, 2000).

Os mecanismos inibitórios também podem ser segmentares, como ocorre no corno dorsal da medula espinhal. Neste nível, a estimulação das terminações aferentes primárias provoca a inibição da liberação dos neurotransmissores, principalmente da substância P (neurotransmissor nociceptivo) (VALE, 2000).

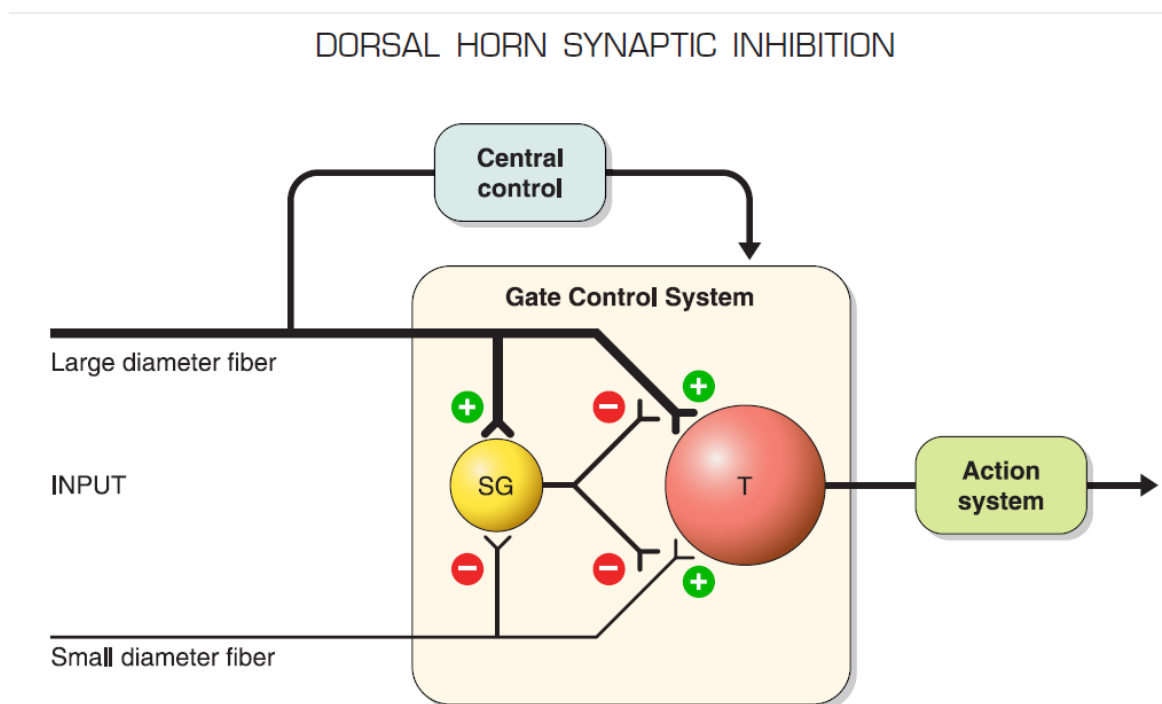


Figura 3: Teoria da comporta proposta por Melzack e Wall em 1965.
Fonte: (ZEILHOFER; WILDNER; YÉVENES, 2012).

1.6 Aspectos Gerais da Resposta Inflamatória

O sistema imunológico é reconhecido como de importância vital para o desencadeamento e controle de vários processos fisiológicos e patológicos. Ele apresenta uma íntima inter-relação com os sistemas nervoso e endócrino, havendo, entre eles, vários receptores e ligantes em comum. Assim, substâncias características de cada um destes sistemas, como citocinas, neuropeptídeos, neurotransmissores e hormônios, podem ser sintetizadas por todos esses sistemas e modificar determinadas funções e atividades representativas de cada um deles (SOUZA; VOLTARELLI; FERRIANI, 1997).

O estudo da inflamação tem história rica e antiga. O termo inflamação ou flogose (do latim, inflamares e do grego pegar fogo) retratam como os povos mais primitivos comparavam uma região inflamada como algo relativo a chamas, quente ou ardido. Celsus (30 a.C. - 38 d.C) descreveu os quatro sinais cardeais da inflamação: rubor, tumor, calor e dor. John Hunter (1728 - 1793) compreendia a inflamação como um processo benéfico e de proteção, sem o qual animais e seres humanos não poderiam sobreviver aos seus inimigos. Uma das primeiras descrições microscópicas da inflamação foi realizada por Julius Cohnheim (1839 - 1884), o primeiro pesquisador a descrever a sequência dos eventos vasculares, que são dilatação, estase do sangue, marginalização e emigração dos leucócitos (MOVAT, 1985). Somente em 1858, contudo, com o patologista alemão Rudolf Virchow, teve início os estudos sobre os mecanismos patológicos e celulares da inflamação, descobrindo, portanto, o quinto sinal da inflamação, qual seja: a perda da função (MELO, 2006).

O processo inflamatório se caracteriza por extravasamento do exsudato para o compartimento intersticial, resultante da vasodilatação e da retração das células endoteliais, e pela infiltração de células fagocíticas, polimorfonucleares e monocíticas, no tecido injuriado (FANTONE; WARD, 2002). Outra fase da resposta inflamatória, o acúmulo e a subsequente ativação de leucócitos, é um dos eventos centrais na patogênese de todas as formas de inflamação. Os leucócitos migram para o sítio de inflamação em resposta aos estímulos quimiotáticos (FANTONE; WARD, 2002). Esses leucócitos ativados secretam seus conteúdos granulares e radicais livres durante a quimiotaxia e a fagocitose, o que causa dano no tecido adjacente (VIVIER; MALISSEN, 2005).

Após a lesão tecidual, a inflamação é desencadeada pela ativação de receptores Toll-like (TLRs) que se ligam a patógenos invasores ou moléculas endógenas liberadas de células danificadas. TLRs são expressos em células imunes, incluindo monócitos ou macrófagos e células dendríticas como queratinócitos (MEDZHITOV, 2008; REN; DUBNER, 2010).

A ativação de TLRs é seguida pela ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) de sinalização e liberação de citocinas inflamatórias. Vasodilatadores também são liberados, promovendo a adesão e a transmigração de células do sistema imunológico, o que inclui células T, neutrófilos, monócitos e recrutamento de macrófagos. Essas células, uma vez ativadas, liberam uma série de mediadores

inflamatórios que atuam sobre os receptores expressos em terminais nervosos adjacentes, ocasionando a sensibilização dos nociceptores periféricos. Os alvos incluem receptores de citocinas, receptores acoplados a proteína G, ligantes de canais e receptores Tirosina Cinase do tipo 1 (TrkA) (MEDZHITOV, 2008; REN; DUBNER, 2010).

Os macrófagos presentes no local sofrem degranulação pelo contato direto com as terminações nervosas mediadas por N-caderina (N-cad), e a metaloproteinase-24 (MMP-24) impede, em parte, a degranulação dos mesmos pela digestão da N-cad (MEDZHITOV, 2008; REN; DUBNER, 2010).

Por outro lado, a liberação de TNF- α e IL-15 por nervos periféricos e células de Schwann ativa a MMP-9 e facilita o recrutamento de macrófagos. Os terminais nervosos nociceptivos podem ainda segregar substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, através da ativação antidrômica de terminações nervosas vizinhas. Por sua vez, a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina promovem vasodilatação e extravasamento de células imunes, contribuindo para o processo inflamatório (MEDZHITOV, 2008; REN; DUBNER, 2010).

A inflamação pode ser didaticamente dividida em duas fases: aguda e crônica. A inflamação aguda é de duração relativamente curta, podendo durar minutos, horas ou, até mesmo, alguns dias. Durante esse processo, os principais mediadores envolvidos são o (óxido nítrico) NO e prostaglandinas (PGs), como a PGI₂, PGD₂, PGE₂ e a PGF₂ α , responsáveis principalmente pela vasodilatação, um dos sinais clássicos do processo inflamatório agudo, representado pelo calor e rubor característicos da reação inflamatória (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Sua principal característica é a presença do exsudato rico em proteínas plasmáticas (edema) e a migração de leucócitos, principalmente os neutrófilos.

Na fase aguda da resposta inflamatória, ocorre ainda a liberação de vários mediadores em especial componentes do complemento como os fragmentos C3a e C5a, leucotrienos, quimiocinas como a IL-8 e ainda bioprodutos bacterianos como peptídeos N-formilados, que promovem a quimiotaxia de leucócitos e outras células fagocíticas para o sítio da reação inflamatória (ADEREM; SMITH, 2004; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

A inflamação crônica, porém, é de longa duração (semanas a meses) e está relacionada com algumas alterações histológicas, como presença de linfócitos e

macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose do tecido (RANG et al., 2012; GILROY et al., 2004; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Na dor crônica, muitos eventos ocorrem em associação com os eventos básicos da nocicepção, que alteram a relação entre o estímulo e a resposta nociceptiva e afetam a modulação do estado doloroso resultante. Além disso, alterações centrais crônicas na neuroquímica da sinalização da dor produzem hipersensibilidade, aumentando a frequência e duração dos impulsos aferentes. Ademais, mudanças estruturais secundárias à lesão nervosa periférica incluem a perda de interneurônios espinhais, rearranjos não apropriados de processos neurais aferentes na medula espinhal e a proliferação de fibras simpáticas no gânglio sensorial. Essas mudanças não são uniformes e dependem do tipo de lesão tecidual, do envolvimento de tipos específicos de fibras e da participação do sistema imune (DRAY et al., 1995; PERKINS; TRACEY, 2000; WATKINS; MAIER, 2002; DOGRUL et al., 2003).

De modo geral, a transmissão da dor envolve uma interação complexa entre mediadores químicos, estruturas centrais e periféricas desde a pele, vísceras ou outros tecidos até o córtex cerebral. Assim, diversos mediadores do processo inflamatório apresentam atividades diferenciadas e complexas nos nociceptores, o que implica em uma grande interação entre o processo inflamatório e a dor, além de justificar a pesquisa de substâncias anti-inflamatórias em processos algogênicos (FURST, 1999).

1.6.1 Mediadores químicos envolvidos na dor e inflamação

Diversas substâncias participam dos mecanismos de nocicepção, entre elas, ATP, íon K^+ , glutamato, substância P e radicais livres (DRAY; PERKINS, 1993). Além disso, após ocorrer um dano tecidual, fragmentos celulares resultantes do mesmo são capazes de promover uma reação inflamatória local, recrutando células como neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos. Por sua vez, estas células de defesa liberam mediadores inflamatórios para o meio, tais como cininas (bradicinina e calidina); citocinas (interleucinas e fator de necrose tumoral), aminas (serotonina e histamina), prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina) e leucotrienos. O óxido nítrico (NO) também apresenta atividades significantes na nocicepção, porém os dados são contraditórios (MOTA, 2008). A união de todos esses eventos promove a

exposição do nociceptor aferente primário a diversas substâncias capazes de sensibilizá-lo (TAIWO; LEVINE, 1991; GUIEU, 1996; MILLAN, 1997, 1999; CALIXTO, 2000, 2001).

1.7 Tratamento Farmacológico da Dor

Os analgésicos periféricos são representados pelos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), também conhecidos por analgésicos não-opioides, e são úteis no tratamento da dor, febre, inflamação, e para inibição da agregação plaquetária. Embora sejam menos eficazes do que os opioides no alívio da dor, eles não causam tolerância nem dependência. O mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não-esteroidais tradicionais envolve o bloqueio da produção de prostaglandinas pela inibição da enzima ciclooxigenase (COX) no local da lesão, diminuindo, assim, a formação de mediadores da dor no sistema nervoso periférico (WELCH; MARTIN, 2005).

Os analgésicos periféricos são representados pelos AINEs e estão entre os agentes terapêuticos mais largamente utilizados, incluindo uma variedade de drogas, de diferentes classes químicas (ácidos salicílicos, como o AAS; ácidos propiônicos, como o ibuprofeno; ácidos acéticos, como a indometacina; fenamatos, como o ácido mefenâmico; ácidos enólicos, como o piroxicam; derivados pirazolinicos, como a dipirona e o celecoxibe, entre outras (RANG et al., 2012). O principal mecanismo da ação anti-inflamatória, analgésica e antipirética dos AINEs é a inibição da enzima ciclooxigenase (COX), que culmina na diminuição da síntese de prostaglandinas (VANE, 1971; VANE; BOTTING, 1987; VANE, 1994; CHANDRASEKHARAN et al., 2002; WELCH, MARTIN, 2005).

Segundo Griffin e Woolf (2009), os AINES afetam as vias da dor por, pelo menos, três mecanismos diferentes. Em primeiro lugar, as prostaglandinas reduzem o limiar de ativação nas terminações periféricas dos neurônios nociceptores aferentes primários, diminuindo a hiperalgesia inflamatória e anodinia (insensibilidade à dor). Em segundo lugar, os AINEs diminuem o recrutamento de leucócitos e, conseqüentemente, a produção de mediadores inflamatórios derivados dos leucócitos. Por último, os AINEs atravessam a barreira hematoencefálica e impedem a geração de prostaglandinas que atuam como neuromoduladores produtores de dor no corno dorsal da medula espinhal.

Os opioides possuem destacada ação central, desencadeando potente analgesia associada à depressão das funções neurovegetativas e da consciência. Somam-se a essa potente ação analgésica as características sedativa e hipnótica, a tendência a produzir dependência psíquica e física e a produção de tolerância (OLIVEIRA, 2003; GILBERT et al., 2004). Eles estão envolvidos tanto em componentes ascendentes quanto descendentes da modulação da dor (STAMFORD, 1995).

Existem três tipos principais de receptores: opioides μ (mu), κ (kappa) e δ (delta). Eles estão presentes no hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal, no corno dorsal da medula e nos nervos aferentes periféricos (STAMFORD, 1995; HOLDEN et al., 2005). O receptor μ opioide é foco nos estudos de dor, pois sua ativação é necessária para a ação da maioria dos analgésicos potentes (FIELDS, 2007).

Os opioides promovem a analgesia através de diversos mecanismos, dentre eles, a ativação das vias descendentes e a inibição da transmissão no corno dorsal (DELEO, 2006). Tanto os terminais aferentes primários quanto os neurônios de segunda ordem, no corno dorsal da medula, apresentam receptores μ e δ opioides. O mecanismo de ação dessas substâncias no processo nociceptivo ocorre pela interação com receptores opioides, levando ao fechamento dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes nas terminações nervosas pré-sinápticas, o que reduz a liberação de neurotransmissores. Além disso, a ativação desses receptores leva à ativação de canais de K^+ , produzindo hiperpolarização da membrana celular de neurônios pós-sinápticos no corno dorsal e reduzindo a liberação de neurotransmissores, a exemplo da substância P (DICKENSON, 1997; MACHELSKA et al., 2002; GRAEFF; FIELDS, 2001).

Essas ações dos opioides no corno dorsal contribuem para a eficácia clínica de agonistas μ opioide, como a morfina. Há também evidências de que os opioides inibem a descarga de terminações aferentes nociceptivas na periferia, particularmente sob condições de inflamação, e aumenta a expressão dos receptores opioides pelos neurônios sensitivos (OBARA et al., 2007; RANG et al., 2012).

Há também fármacos que atuam como adjuvantes na terapia da dor, ou seja, atuam como analgésicos em determinadas circunstâncias, não possuindo indicação analgésica primária. Os principais grupos dessa classe englobam

antidepressivos, anticonvulsivantes, ansiolíticos e antipsicóticos (REITAN, 1996; BRAINER-LIMA, 1997).

Os antidepressivos exercem dois papéis distintos no tratamento da dor. O primeiro refere-se a situações em que não se obtém o alívio da dor com o uso de analgésicos comuns (ácido acetilsalicílico, paracetamol, morfina), ou quando esse alívio associa-se a graves reações adversas. O segundo papel da farmacoterapia com antidepressivos está na sua utilização para o tratamento da dor crônica, como coadjuvante a analgésicos convencionais. Observa-se isso, particularmente, em pacientes com dor neoplásica multilocalizada, melhorando seu sono (McQUAY, 1997).

Os antidepressivos tricíclicos são analgésicos adjuvantes efetivos em algumas condições dolorosas, tendo papel importante no alívio da dor crônica. O efeito deles é distinto daquele empregado nos distúrbios do humor, sendo indicados principalmente no tratamento da dor neuropática. O mecanismo de ação dos antidepressivos como analgésicos ainda não está bem esclarecido. A explicação padrão é que eles agiriam em áreas cerebrais moduladas pela serotonina e pela noradrenalina, as quais transmitem o estímulo doloroso pela medula espinhal (McQUAY, 1997; MORAES; CAMARGO, 1999).

Outra classe de fármacos analgésicos adjuvantes são os anticonvulsivantes, efetivos no tratamento de dores crônicas, a exemplo da carbamazepina, da gabapentina, do clonazepam e do valproato de sódio, sendo estes dois últimos úteis na profilaxia da enxaqueca (McQUAY, 1995; ROTHROCK, 1997; MORAES; CAMARGO, 1999).

Além dos antidepressivos, os anticonvulsivantes também têm sido utilizados no tratamento da dor neuropática. A carbamazepina é usada para o tratamento de dor neuropática, especialmente neuralgia do trigêmeo, uma doença relativamente comum, que é caracterizada por dor severa e aflição nas lesões orais e maxilo-facial (BACKONJA, 2002; JENSEN, 2002). O uso desse fármaco, todavia, pode frequentemente produzir efeitos adversos, incluindo tonturas, sonolência, anomalias ao andar e alterações hematológicas (BACKONJA, 2002; JENSEN, 2002). Além disso, o uso crônico de carbamazepina induz sistemas enzimáticos microssomais, o que reduz efetivamente sua eficácia analgésica (BENEDETTI et al., 2005). No estudo feito por Aoki et al. (2006), ficaram evidências de que a combinação de

carbamazepina e antidepressivos pode produzir efeitos terapêuticos clinicamente desejáveis no controle da dor.

Os glicocorticoides são potentes inibidores do processo inflamatório, mas também possuem outras ações que os colocam neste grupo de adjuvantes. As ações analgésicas e anti-inflamatórias dos glicocorticoides são atribuídas à ação inibitória da atividade da fosfolipase A_2 (PLA_2). O ácido aracdônico é formado a partir de fosfolipídios de membrana, pela ação dessa enzima, com consequente ativação da produção de prostaglandinas, tromboxano e leucotrienos. Os anti-inflamatórios esteroides inibem a fosfolipase A_2 indiretamente através da indução da liberação de uma proteína inibitória da PLA_2 , identificada como lipocortina 1 (MILLAN, 1999).

Outro mecanismo de ação dos glicocorticoides é através da ligação a receptores citoplasmáticos para glicocorticoides que regulam a transcrição de alguns genes de resposta primária, como os que expressam a COX-2 e a óxido nítrico sintase (BARNES; ADOKC, 1993; VANE; BOTTING, 1995). Esse complexo é também capaz de promover a inibição da transcrição de um grande número de citocinas envolvidas na inflamação crônica, destacando-se principalmente a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (FERREIRA, 1995; FLOWER; ROTHWELL, 1994; ADAMS; NASH, 1996).

Os ansiolíticos são adjuvantes no tratamento da dor, por atuarem reduzindo a ansiedade, a insônia e também promovendo relaxamento muscular. Os antipsicóticos, por sua vez, atuam com funções analgésicas através de mecanismos de modulação da dor que levam à diminuição da excitabilidade neuronal, proporcionando sedação e analgesia (SAKATA; GOZZANI, 1994; TEIXEIRA et al., 1999; LIRA, 2001).

1.8 Hidantoínas (Imidazolidina - 2,4 - Diona)

O anel heterocíclico está presente na estrutura química de aproximadamente 62% dos fármacos de origem sintética (BARREIRO; FRAGA, 2008). Dentre esses, merecem destaque os derivados da hidantoína. Também denominada de 2,4-dicetotetrahidroimidazol, 2,4-dioxoimidazolidina ou imidazolidina-2,4-diona, a hidantoína, foi sintetizada, pela primeira vez, por Baeyer em 1861, durante seus estudos sobre o ácido úrico (*apud* FINKBEINER, 1965). A síntese de novas hidantoínas é amplamente empregada em virtude da reatividade de seu sistema

anelar e por suas propriedades biológicas, quais sejam: anticonvulsivante, cicatrizante, miorrelaxante, antimicrobiana, antitumoral e esquistossomícida (OLIVEIRA, et al., 2008).

Modificações estruturais desse anel, portanto, são de grande interesse em virtude de sua vasta aplicabilidade. Dentre as hidantoínas utilizadas no Brasil, estão a fenitoína e a nitrofurantoína, ambas presentes na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (BRASIL, 2010) e na Lista de Medicamentos Essenciais da OMS (WHO, 2010).

A fenitoína (Hidantal®) (Figura 4) é a hidantoína mais conhecida, sendo empregada como fármaco de primeira escolha no tratamento de crises epilépticas parciais e generalizadas do tipo tônico-clônica, mas contraindicada nas crises de ausência. Seu mecanismo de ação envolve o bloqueio dos canais de Na^+ dependentes de voltagem, com maior afinidade por aqueles que se encontram no estado inativado, impedindo, assim, que esses canais possam retornar ao estado de repouso, necessários para a geração de novos potenciais de ação (RANG et al., 2012).

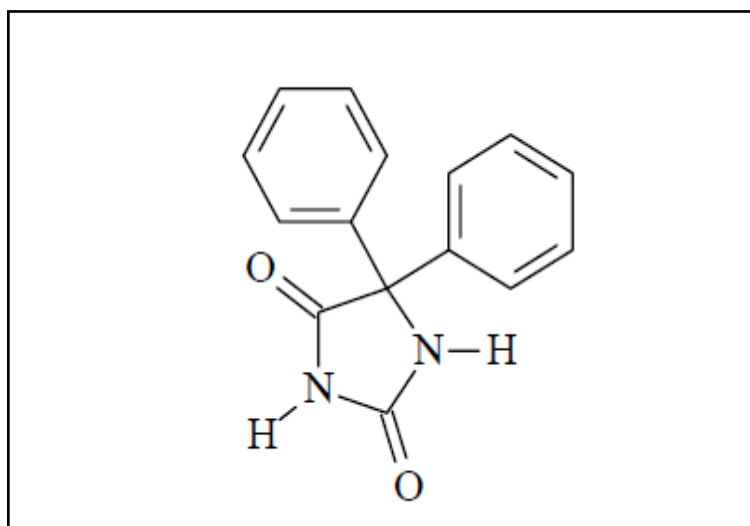


Figura 4: Estrutura da Fenitoína (5,5 - difenil - imidazolidina - 2,4-diona)

A nitrofurantoína (Macrofantina®) (Figura 5) é utilizada como agente antibacteriano no tratamento de infecções do trato urinário, sendo eficaz contra diversas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, raramente causando resistência (RANG et al., 2012).

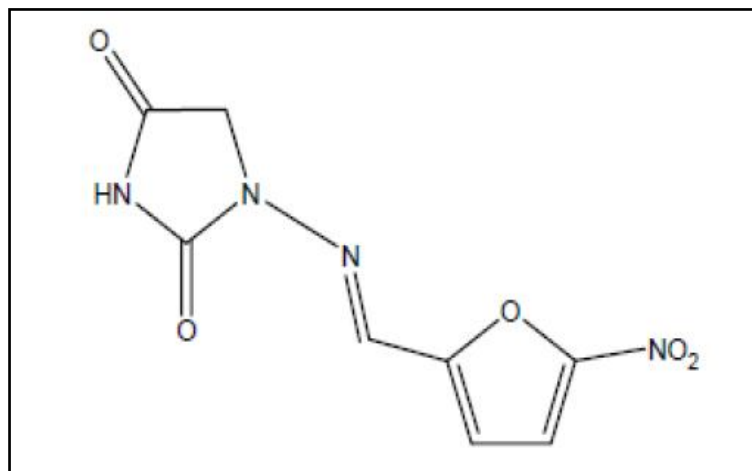


Figura 5: estrutura química da nitrofurantoína (1-[(5-nitrofuranyl)methylideneamino]imidazolidine-2,4-dione)

O dantroleno, uma hidantoína com propriedade relaxante muscular, é o único fármaco eficaz no tratamento da hipertermia maligna, uma desordem hereditária rara e potencialmente fatal, em que a habilidade do retículo sarcoplasmático sequestrar o Ca^{2+} do citoplasma se apresenta prejudicada em virtude de mutações no gene que codifica o receptor rianodina. O mecanismo de ação do dantroleno envolve o bloqueio desses receptores (TAYLOR, 2005; WHITE; KATZUNG, 2006).

Um neurotransmissor encontrado no cérebro de mamíferos (REIS & REGUNATHAN, 1998a,b, 1999, 2000), a agmatina (poliamina catiônica formada pela descarboxilação da L-arginina pela arginina descarboxilase), liga-se a uma série de alvos, como receptores α_2 adrenérgicos e receptores imidazolidínicos 1 e 12 (HALARIS & PLIETZ, 2007; Li et al., 1994; REGUNATHAN & REIS, 1996). A agmatina também bloqueia receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e inibe a enzima óxido nítrico sintase (BERKELS et al., 2004). Devido a sua natureza farmacológica não seletiva, compreende-se que a agmatina exerce uma ampla gama de efeitos biológicos, incluindo a modulação da dor (HEAD & MAYOROV, 2006; REGUNATHAN, 2006; WU et al., 2008).

Os efeitos analgésicos da agmatina foram observados através de estudos pré-clínicos em diferentes modelos de dor, como na dor aguda física (ARICIOGLU et al., 2003; DOGRUL et al. 2006; BHALLA et al., 2011), na dor aguda tônica (ONAL & SOYKAN, 2001; SANTOS et al., 2005; GADOTTI et al., 2006), na dor inflamatória

(FAIRBANKS et al. 2000; PASZCUK et al., 2007) e na dor neuropática (COURTEIX et al., 2007).

Estudos recentes realizados por Queiroz (2011), por Carvalho (2011) e por Salgado (2011) demonstraram, o efeito antinociceptivo do derivado imidazolidínico IM-3, de nomenclatura química 5-(4-etilfenil)-3-fenil-imidazolidin-2,4-diona. Além disso, o perfil sedativo e antinociceptivo do derivado imidazolidínico IM-7, 5-(4-isopropilfenil)-3-fenil-imidazolidin-2,4-diona por Carvalho (2011) e o perfil antinociceptivo da HPA-05, 3-fenil-5-(4-metilfenil)-imidazolidin-2,4-diona.

Diante das atividades apresentadas desses derivados imidazolidínicos, resolvemos dar continuidade a investigação das possíveis propriedades psicofarmacológicas da HPA-05, sendo um composto bastante promissor para o desenvolvimento de novos fármacos sintéticos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Realizar estudos pré-clínicos para identificação dos efeitos psicofarmacológicos do derivado Imidazolidínico 3-fenil-5-(4-metilfenil)-imidazolidin-2,4-diona (HPA - 05), sobre o SNC em modelos murinos.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar efeitos anticonvulsivantes utilizando métodos químicos e físicos;
- Analisar uma possível ação ansiolítica da HPA-05 realizando metodologias comportamentais clássicas;
- Avaliar a ação antinociceptiva da HPA-05 através da indução da dor por estímulo químico;
- Investigar a participação dos sistemas GABAérgico, noradrenérgico, colinérgico (muscarínico), glutamatérgico, L – arginina/óxido nítrico, dopaminérgico e adenosinérgico, além da participação dos canais para potássio ATP, nos mecanismos de antinocicepção da HPA-05;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória da HPA – 05 na migração de células.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Substância teste (HPA-05)

A substância sintética imidazolidínica HPA-05 (5-(4-metilfenil)-3-fenil-imidazolidin-2,4-diona), foi obtida a partir do aminoácido glicina, utilizada neste estudo, cordialmente cedida pelo Laboratório de Síntese Orgânica/CCEN/UFPB, sob a coordenação do professor Dr. Petrônio Filgueiras de Athayde-Filho.

A HPA-05 apresenta-se sob a forma de cristais amorfos brancos, com ponto de fusão de 198-199°C e solúvel em *Tween* 80.

3.1.2 Animais

Camundongos (*Mus musculus*) Swiss, albinos, adultos, machos, pesando entre 30-40 g, com aproximadamente 3 meses de idade. Os animais foram provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George do Programa de Pós - Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal da Paraíba (PGPNBSB/CCS/UFPB).

No Biotério, os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob condições controladas de temperatura de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sem uso de qualquer medicação, tendo livre acesso à ração (tipo pellets da marca Purina®) e água potável.

3.1.3 Condições experimentais

A parte experimental deste projeto foi desenvolvida no laboratório de Psicofarmacologia Professor Elizaldo A. Carlini e no Biotério Prof. Dr. Thomas George do Programa de Pós - Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal da Paraíba (PGPNBSB/CCS/UFPB).

Em todos os procedimentos experimentais, foram utilizados grupos constituídos de 8 animais e deu-se preferência a procedimentos que não provocavam sofrimento, além disso, estes testes experimentais foram analisados previamente pelo CEUA- Comitê de Ética no Uso de Animais do CBIotec (Centro de Biotecnologia) - UFPB, sob a certidão nº 1105/12.

Os animais foram previamente alojados em outras gaiolas do mesmo material referido, com, pelo menos, 60 min de antecedência à execução dos testes, visando minimizar as possíveis alterações comportamentais do animal, bem como permitir uma adaptação ao novo ambiente. Os animais foram utilizados uma única vez e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical.

3.1.4 Fármacos e substâncias utilizadas

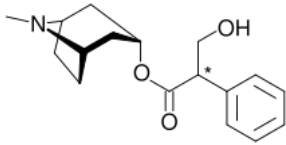
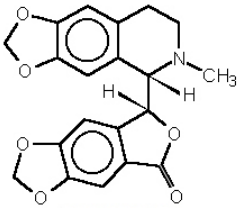
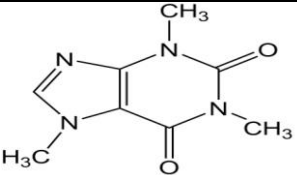
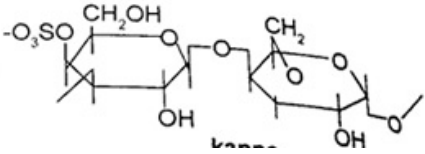
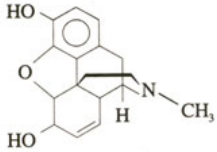
- Água destilada (Laboratório da Psicofarmacologia PPGPNSB/CCS/ UFPB – Brasil);
- Atropina (Sigma – E.U.A);
- Bicuculina (Sigma – E.U.A);
- Cafeína (Sigma – E.U.A);
- Carragenina (Sigma – E.U.A);
- Cloreto de sódio (Merck – E.U.A.);
- Cloridrato de Morfina (Merck – E.U.A.);
- Dexametasona (Sigma – E.U.A)
- Diazepam (Sigma – E.U.A.);
- Etanol (UFPB – Brasil);
- Fenitoína 5% (Sigma – E.U.A.);
- Formaldeído 37% (Vetec – Brasil);
- Formalina 2,5 % (Laboratório da Psicofarmacologia PPGPNSB/CCS/ UFPB – Brasil);
- Glibenclamida (Sigma – E.U.A);
- Glutamato 6,8 μmol (Sigma – E.U.A);
- HPA-05 (Laboratório de Síntese Orgânica / DQ/CCEN/UFPB – Brasil);
- Ioimbina (Sigma – E.U.A);
- MK- 801 0,03 μmol (Sigma – E.U.A);
- Nítrico N^{ω} – nitro-L-arginina (L-NOARG) (Sigma – E.U.A)

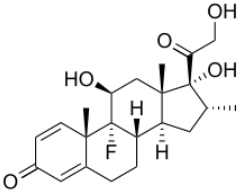
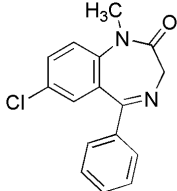
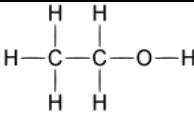
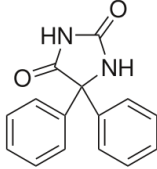
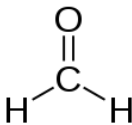
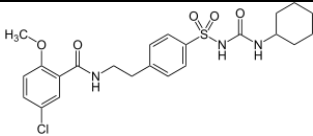
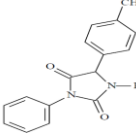
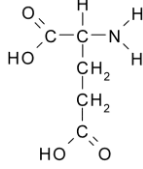
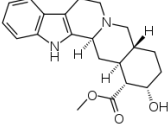
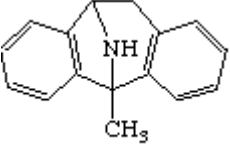
- Pentilenotetrazol (PTZ) (Sigma – E.U.A.);
- Sulpirida (Sigma – E.U.A);
- *Tween* 80 (polioxetileno sorbitano monoleato) (Vetec – Brasil).

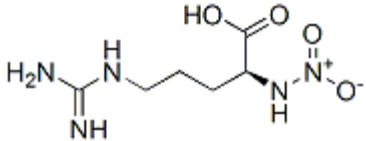
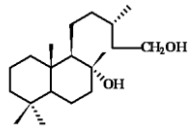
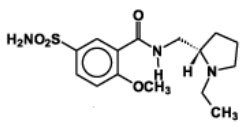
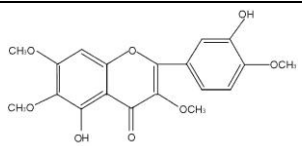
As doses foram estabelecidas através de experimentos “piloto” e de acordo com os protocolos já estabelecidos do Laboratório de Psicofarmacologia Professor Elizaldo A. Carlini.

As substâncias, foram preparadas imediatamente antes de sua utilização, e a HPA-05 foi solubilizada em água destilada adicionada de duas gotas de *Tween* 80. A administração foi realizada via intraperitoneal (i.p.), no volume de 0,1 mL/10 g de peso de camundongo, com exceção da formalina, glutamato e carragenina, os quais foram injetados 20 µl por via intraplantar.

Quadro 1: Representação das estruturas químicas das substâncias utilizadas no estudo

Substância	Estrutura química
Atropina	
Bicuculina	
Cafeína	
Carragenina	
Cloridrato de morfina	

Dexametasona	
Diazepam	
Etanol	
Fenitoína	
Formalina	
Glibenclamida	
HPA - 05	
Glutamato	
Ioimbina	
MK - 801	

L- NOARG	
Pentilenotetrazol	
Sulpirida	
Tween 80	

3.2 Métodos

3.2.1 Investigação da atividade anticonvulsivante

3.2.1.1 Teste das convulsões induzidas pelo Pentilenotetrazol

Para execução desse protocolo, foram utilizados grupos de camundongos ($n=8$), divididos em grupos experimentais (doses 50, 100 e 200 mg/kg da HPA - 05), grupo controle (veículo) e grupo padrão (diazepam, na dose de 2 mg/kg), sendo que todas as administrações aconteceram pela via i.p. Após 60 minutos da administração das substâncias, todos os grupos foram submetidos aos efeitos do PTZ na dose de 60 mg/kg, por via ip. Imediatamente foram observados, durante um período de 20 minutos, os seguintes parâmetros: latência para o animal entrar em convulsão, isto é, o tempo decorrido desde a administração do PTZ até o aparecimento da primeira convulsão, a duração das crises e o número de mortes (VELISEK et al., 1991).

3.2.1.2 Teste das convulsões induzidas pelo Eletrochoque Auricular Máximo

Nesse experimento foram utilizados grupos de 08 camundongos: Os grupos experimentais receberam as doses de 50, 100 e 200 mg/kg da HPA - 05, o grupo controle recebeu água e duas gotas de *Tween* 80 e o grupo padrão recebeu fenitoína na dose 25 mg/kg, via ip. Após 60 minutos, todos os animais foram submetidos a um choque auricular de 150 pulsos/segundos e com duração de 0,5 segundo (Eletroestimulador ECT UNIT 7801). Os principais parâmetros observados foram: o número de animais que apresentam convulsões tônicas, o registro de mortes e o tempo de flexão e a extensão das patas (TORTORIELLO; ORTEGA, 1993).

3.2.2 Investigação da atividade ansiolítica

3.2.2.1 Teste do labirinto em cruz elevado

Para este experimento foram utilizados grupos de 08 camundongos machos, divididos em experimentais nas doses de 50, 100 ou 200 mg/kg, ip. (substância teste), veículo (controle) e padrão (diazepam 1,0 mg/kg, via i.p.). Cada animal foi submetido individualmente ao aparelho apenas uma vez, por 5 minutos.

3.2.3 Avaliação da atividade antinociceptiva

3.2.3.1 Teste da formalina

Grupos de camundongos (n = 8 machos) receberam via i.p., os seguintes pré-tratamentos: veículo (grupo controle), os grupos experimentais nas doses de 50, 100 ou 200 mg/kg, i.p. e a morfina 10 mg/kg, i.p. (grupo padrão). Após 30 minutos, 20 µL de solução de formalina 2,5%, que consiste em 0,92% de formaldeído em solução salina, foram injetados na região subplantar da pata posterior direita dos camundongos. Em seguida, esses animais foram colocados nas caixas de observação, sendo, então, registrado o tempo total de lambida da pata que recebeu

a formalina durante 5 minutos (1ª fase). Após um período de 10 minutos, novamente foi contabilizado o parâmetro citado por mais 15 minutos (2ª fase).

3.2.4 Avaliação dos mecanismos de ação

3.2.4.1 Participação dos canais de K^+_{ATP}

Na tentativa de investigar o papel dos canais de K^+_{ATP} na antinocicepção causada pela HPA - 05, os camundongos (n=8) foram pré-tratados com a glibenclamida (bloqueador dos canais de K^+_{ATP} , 10 mg/kg, i.p.) e, quinze minutos depois, receberam a HPA - 05 (200 mg/kg,i.p.). Após quinze minutos da administração da glibenclamida e uma hora do tratamento com a HPA-05, foram injetados 20 μ L de solução de formalina 2,5 % na pata direita do animal, para avaliação do comportamento nociceptivo.

3.2.4.2 Participação do sistema GABAérgico

A fim de evidenciar o envolvimento do sistema GABAérgico na ação antinociceptiva da HPA - 05, os animais (n=8) foram pré-tratados com a bicuculina (antagonista $GABA_A$, 1 mg/kg, i.p.) quinze minutos antes da administração da HPA - 05 (200 mg/kg, i.p.). Após quinze minutos da administração da bicuculina e uma hora do tratamento com a HPA-05, foram injetados 20 μ L de solução de formalina 2,5 % na pata direita do animal, para avaliação do comportamento nociceptivo.

3.2.4.3 Participação do sistema noradrenérgico

Diferentes grupos de animais (n=8) foram pré - tratados com o antagonista dos receptores noradrenérgicos α_2 , a ioimbina (1 mg/kg. i.p) e, 15 min depois, foram tratados com a HPA - 05 (200 mg/kg, i.p.) ou veículo (controle). Após uma hora do tratamento com a HPA-05, injetaram-se 20 μ L de solução de formalina 2,5 % na pata direita do animal, para avaliação do comportamento nociceptivo.

3.2.4.4 Participação do sistema Colinérgico - muscarínico

A fim de se avaliar a participação das vias descendentes inibitórias colinérgicas-muscarínicas, camundongos (n=8) foram pré-tratados com atropina (antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos; 0,1 mg/kg; i.p.) e, após 15 min, com a HPA - 05 (200 mg/kg; i.p.) ou veículo (controle). Decorridos 60 min. desse último tratamento, os animais foram submetidos ao teste da formalina 2,5%.

3.2.4.5 Participação do sistema Glutamatérgico

Na tentativa de se obter evidências mais diretas a respeito da interação da HPA - 05 com os receptores glutamatérgicos, os animais (n=8) receberam HPA - 05 nas três doses (50, 100 e 200 mg/kg) ou o veículo (controle) e uma injeção de uma solução de glutamato (6,8 μ mol) subplantar (20 μ L), e 60 min após os tratamentos, foi observado o tempo de lambida da pata. Um dos grupos foi pré-tratado com o antagonista dos receptores N - metil - D - aspartato (NMDA) e o alfa - amino - 3 - hidróxido - 5 - metil - 4 - ácido isolepropionico (AMPA) - receptores ionotrópicos ativados pelo glutamato, o MK 801 (0,03 μ mol, i.p), e, após 15 min, foi administrada a solução do glutamato, também se observando o tempo de lambida da pata.

3.2.4.6 Participação do sistema L-arginina/óxido nítrico

Para avaliar se parte da atividade antinociceptiva apresentada pela HPA -05 envolve a inibição da via L-arginina/óxido nítrico, os camundongos foram pré-tratados com L-arginina (substrato para a enzima sintase do óxido nítrico; NOS; 100 mg/kg, i.p.) e, após 15 min, com a HPA - 05 (200 mg/kg, i.p) ou veículo (controle), ou com o inibidor da NOS, N^w – nitro-L-arginina (L-NOARG, 50 mg/kg, i.p.). Decorridos 60 min do último tratamento, os animais foram submetidos ao teste da formalina.

3.2.4.7 Participação do sistema Dopaminérgico

A fim de evidenciar o envolvimento do sistema dopaminérgico na ação antinociceptiva da HPA - 05, os animais foram pré-tratados com a sulpirida (antagonista dos receptores D₂ dopaminérgicos, 20 mg/kg, i.p.) quinze minutos antes da administração da HPA - 05 (200 mg/kg, i.p.). Após quinze minutos da administração da sulpirida e uma hora do tratamento com a HPA-05, foram injetados 20µL de solução de formalina 2,5% na pata direita do animal, para avaliação do comportamento nociceptivo.

3.2.4.8 Participação do sistema Adenosínico

Para avaliar se a atividade antinociceptiva da HPA - 05 ocorre através do sistema adenosínico, os animais foram pré-tratados com a cafeína (10 mg/kg, i.p.) quinze minutos antes da administração da HPA - 05 (200 mg/kg, i.p.). Após quinze minutos da administração da cafeína e uma hora do tratamento com a HPA-05, foi injetado uma solução de formalina 2,5% na pata direita do animal, para avaliação do comportamento nociceptivo.

3.3 Estudo da Atividade Anti-inflamatória

3.3.1 Peritonite induzida por carragenina (Cg)

A carragenina foi utilizada como estímulo, para produzir uma resposta inflamatória aguda na cavidade peritoneal em camundongos após 4 h, com grande número de leucócitos no exsudato. Para avaliar a possível atividade da HPA-05 no recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal, foram utilizados cinco grupos de camundongos machos (n=8).

Os animais foram pré-tratados por via i.p. com o veículo, HPA - 05 (50, 100 e 200mg/kg, i.p) ou dexametasona (0,5 mg/kg), por via subcutânea (s.c.). Após 30 minutos, os animais receberam carragenina 1% por via i.p. (Cg; 500 µg/cavidade), dissolvida em 0,5 mL de salina estéril. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após a injeção de Cg. Para tanto, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, anteriormente anestesiados. Em seguida, as células presentes na cavidade peritoneal foram coletadas através de lavagem, injetando-se 3,0 mL de salina

contendo 5 UI/mL de heparina. Os abdomens dos animais foram levemente massageados, e, através de uma incisão, foram coletados os fluidos peritoneais, utilizando-se uma pipeta de Pasteur de plástico.

A contagem total dos leucócitos foi realizada conforme descrito por Souza e Ferreira (1985). Nesse procedimento, o fluido coletado de cada animal foi diluído no reagente de Turk (1:40) e, posteriormente, usado para a contagem global de leucócitos em câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos como as médias dos números de leucócitos totais ($\times 10^6$ /mL) de cada grupo experimental.

A contagem diferencial de leucócitos é um dos principais parâmetros de avaliação da resposta inflamatória (PORFIRE et al., 2009). Diante disso, 100µL de uma solução diluída (1:10) do lavado peritoneal, posteriormente, foram centrifugados em uma citocentrífuga a 1500 rpm, por 15 minutos, para obtenção das lâminas. As células foram coradas com a coloração de May-Gruanwald-Giemsa, e a contagem diferencial foi realizada com objetiva de 100X.

3.4 Análise Estatística

Os resultados deste estudo foram analisados através do programa Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software Incorporated, San Diego, USA). Para dados que seguem a frequência de distribuição normal, foram utilizados métodos paramétricos de análise estatística, ANOVA (para mais de três amostras), seguido do teste de Dunnett ou Bonferroni para comparação entre as médias. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (e.p.m), sendo os resultados considerados significativos quando apresentaram valores de $p < 0,05$.

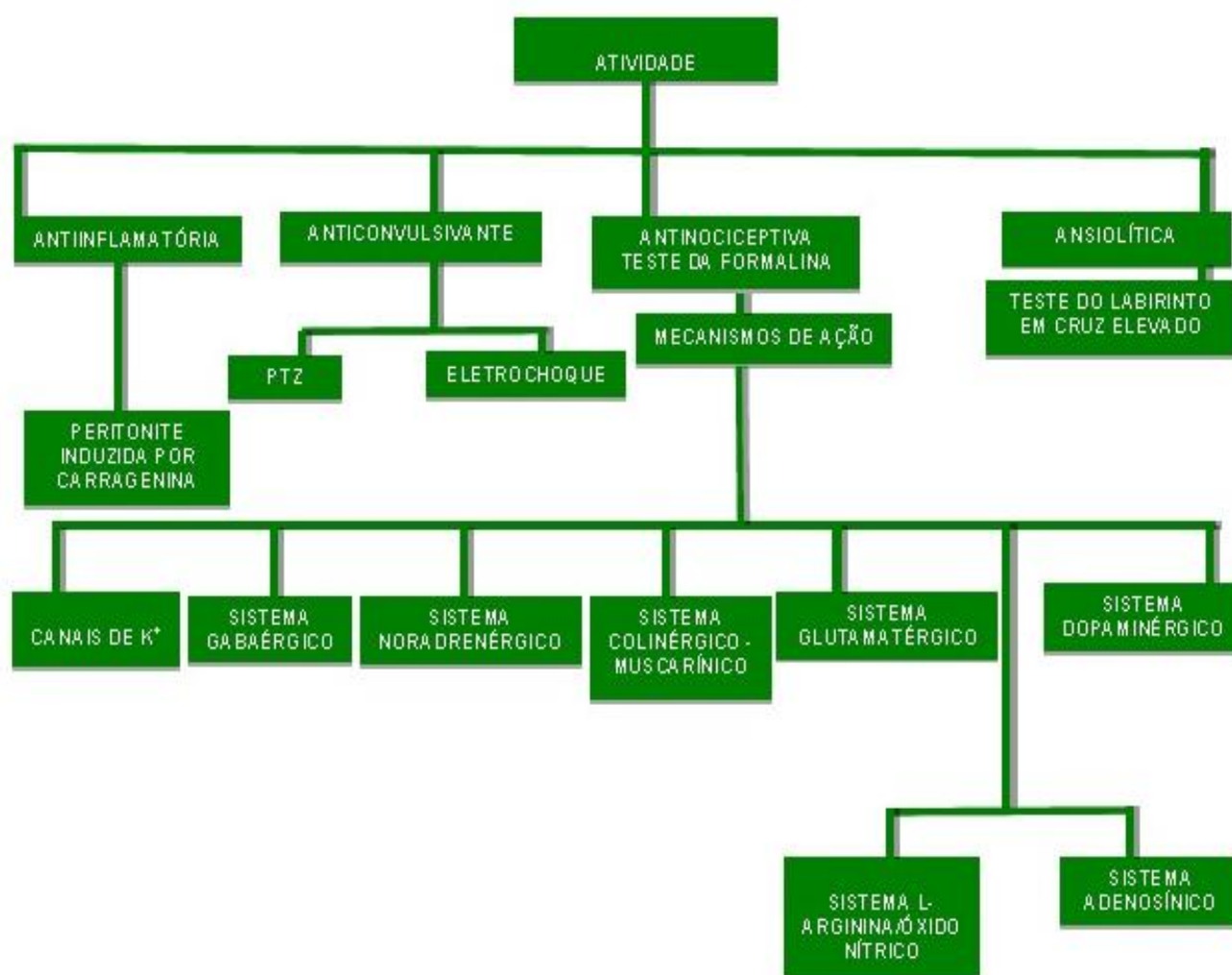


Figura 6: Fluxograma dos procedimentos para avaliação dos efeitos psicofarmacológicos da HPA-05 em camundongos via intraperitoneal.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Investigação da Atividade Anticonvulsivante

4.1.1 Teste das convulsões induzidas pelo Pentilenotetrazol

Durante os testes das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol, observou-se que todos os grupos de animais apresentaram convulsões dos tipos clônica e tônico/clônica. Ao mesmo tempo, observou-se uma redução do percentual de animais que apresentaram convulsões tônico/clônicas dos que receberam o tratamento com a HPA - 05 nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg, via i.p, quando comparados com o grupo controle, como observado na Tabela 1. Não foi observada nenhuma morte nas doses e via testada.

Tabela 1: Efeito da HPA - 05 sobre o tipo de convulsão no teste das quimioconvulsões induzidas pelo Pentilenotetrazol em camundongos

Tratamento mg/Kg	Tipo de convulsão	
	Clônica (%)	Tônico/clônica (%)
Veículo	100	30
HPA - 05 50	100	15
HPA - 05 100	100	5
HPA - 05 200	100	1
Diazepam	0	0

(%) representa o número de animais que apresentaram a convulsão.

O tratamento com a HPA - 05 nas doses de 100 ($295 \pm 12,2$ s) ou 200 mg/Kg ($412,5 \pm 32,4$ s), via i.p da HPA – 05, aumentou ($p < 0,05$) a latência para o início de convulsões induzidas quimicamente pelo PTZ em comparação com o grupo controle negativo, no qual administrou-se apenas o veículo ($99,3 \pm 17,8$ s), utilizando o diazepam na dose de 2mg/kg ($825 \pm 64,8$ s) como controle positivo (Gráfico 1).

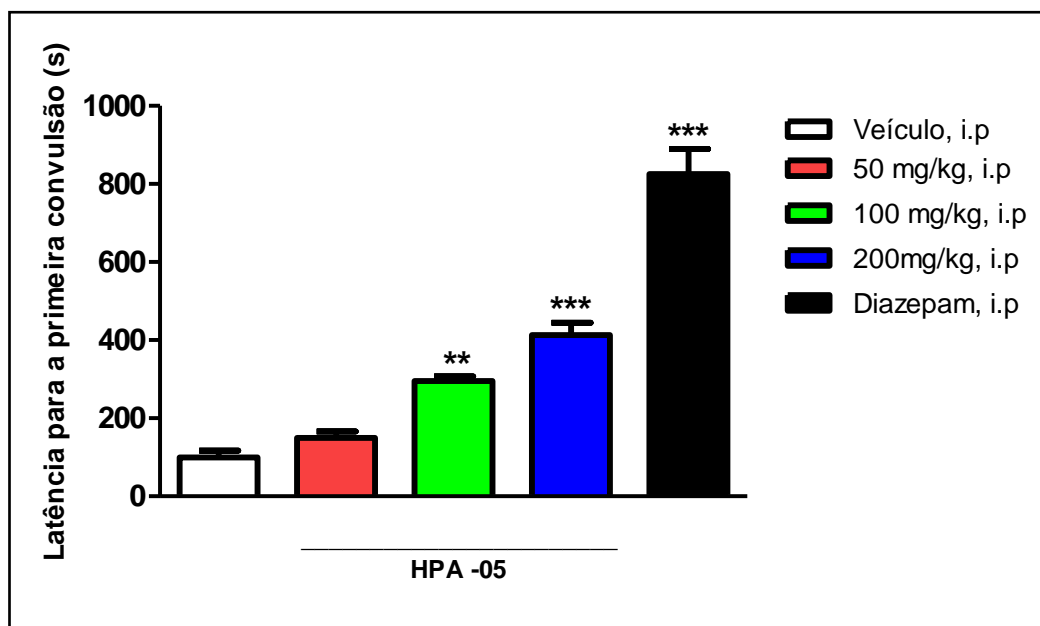


Gráfico 1: Efeito da HPA - 05 na latência para a primeira convulsão durante o teste das convulsões induzidas pelo PTZ. * $p < 0,05$. [Cada coluna representa média \pm e.p.m (n=8) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Bonferroni)].

4.1.2 Teste das convulsões induzidas pelo Eletrochoque Auricular Máximo

Na tabela 2, pode-se observar que todos os animais (n=8) apresentaram convulsão tônica, ao serem submetidos ao teste de convulsões induzidas pelo Eletrochoque auricular, tanto no grupo controle negativo (veículo) quanto nos animais tratados na dose de 50 mg/ Kg, via i.p. Os grupos tratados nas doses de 100 e 200 mg/Kg, via i.p, apresentaram 37% (n=8) de convulsão tônica. Observou-se a ausência de mortalidade até 48 horas após a realização do experimento em todos os grupos testados.

Tabela 2: Efeito da HPA -05 sobre o tipo de convulsão e mortalidade no teste das convulsões induzidas pelo Eletrochoque auricular

Tratamento (mg/Kg, i.p.)	% de animais que apresentaram convulsão tônica	% de mortes (até 48 horas)
VEÍCULO	100	0
50	100	0
100	37,5	0
200	37,5	0
Fenitoína 25	0	0

Os efeitos da HPA-05 nas doses de 50 ($17,6 \pm 0,9$ s), 100 ($6,3 \pm 3,1$ s) ou 200 mg/Kg ($4,6 \pm 2,3$ s), sobre as convulsões induzidas pelo eletrochoque em camundongos ($n=8$), estão representados no Gráfico 2. Observou-se nos tratamentos com as doses de 100 e 200 mg/Kg um efeito protetor da HPA - 05 quando comparado ao grupo controle negativo ($16,3 \pm 0,5$ s). A fenitoína, droga padrão, na dose de 25 mg/kg, protegeu os animais das convulsões induzidas pelo eletrochoque auricular devido a diminuição na duração das convulsões ($0,4 \pm 0,2$ s).

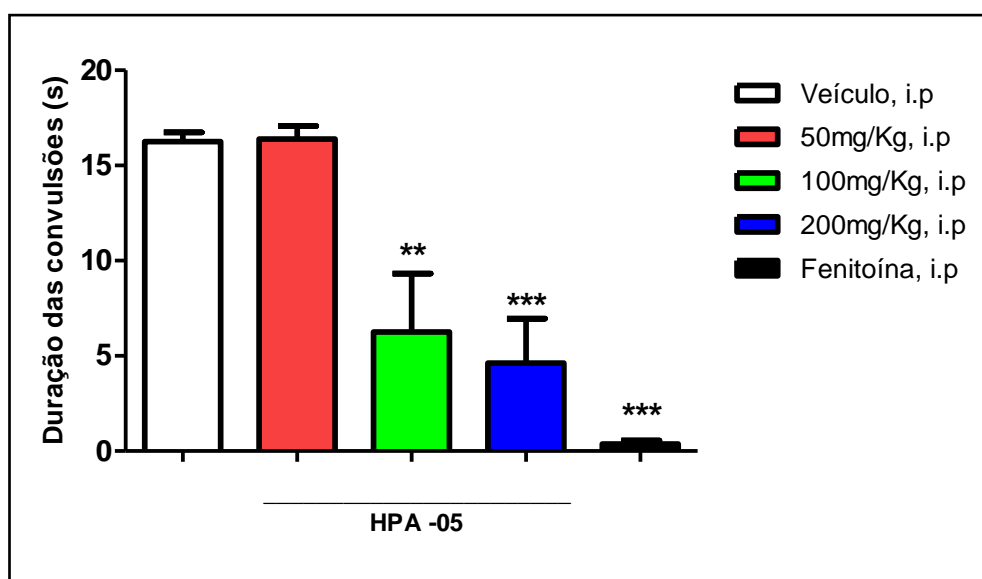


Gráfico 2: Efeito da HPA - 05 sobre as convulsões induzidas pelo eletrochoque auricular máximo. * $p<0,05$. [Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. ANOVA "one-way" seguido Teste de Bonferroni)].

4.2 Investigação da Atividade Ansiolítica

4.2.1 Teste do labirinto em cruz elevado

O tempo de permanência e o número de entrada nos braços fechados nos animais tratados com a HPA-05 nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, via i.p, não interferiram de maneira significativa, no número de entradas e o tempo de permanência nos braços fechados, quando comparados com os do grupo controle negativo.

Os resultados apresentados nos gráficos 3 e 4 demonstram que os animais tratados com as doses de 50, 100 e 200 mg/Kg , via i.p, não apresentaram alterações significativas no número de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos quando comparados ao controle negativo ($8,7 \pm 0,7$; $25,4 \pm 5,2s$).

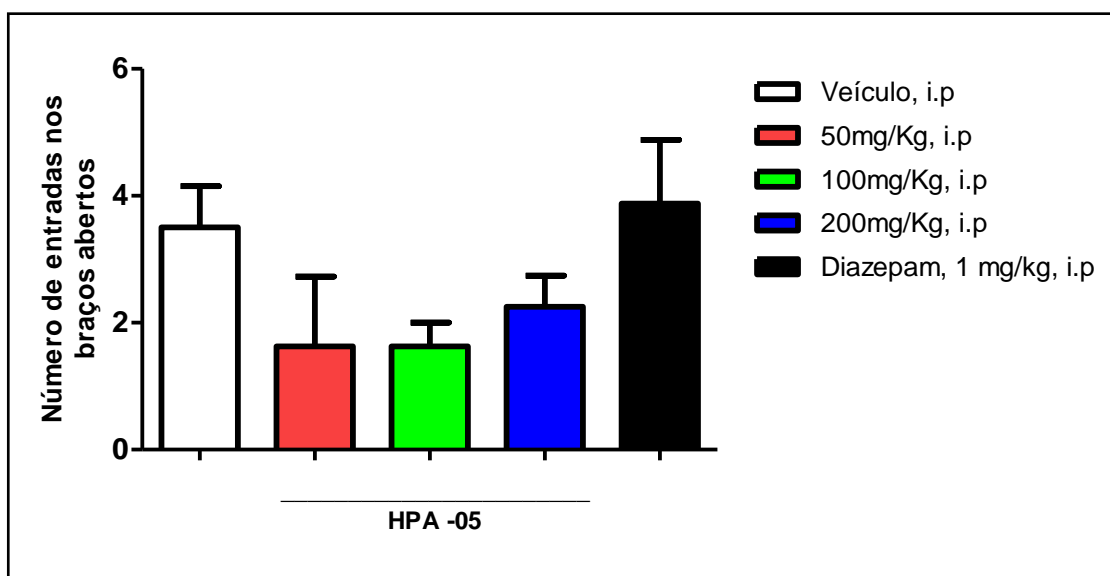


Gráfico 3: Efeito da HPA - 05 sobre o número de entradas nos braços abertos no teste do Labirinto em Cruz Elevado. [Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Bonferroni].

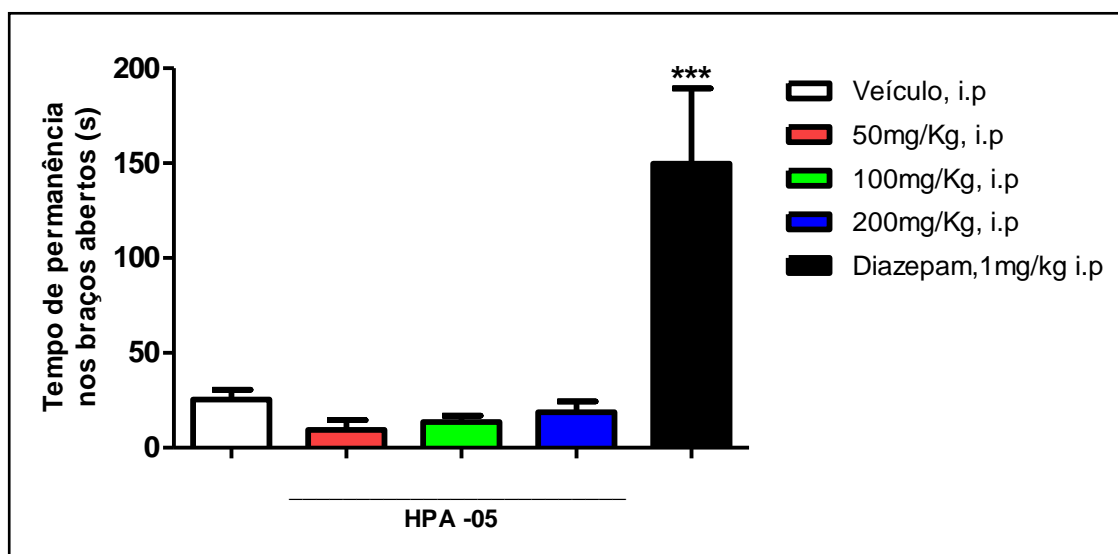


Gráfico 4: Efeito da HPA - 05 sobre o tempo de permanência nos braços abertos no teste do Labirinto em Cruz Elevado. * $p < 0,05$. [Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Bonferroni].

4.3 Mecanismos de Ação da Atividade Antinociceptiva

4.3.1 Participação dos canais de K^+_{ATP}

Pode-se observar nos gráficos 5 e 6, que os camundongos tratados com HPA - 05 (200 mg/kg, i.p) apresentaram uma diminuição na resposta à dor na primeira ($37,3 \pm 8,9s$) e na segunda fase ($92 \pm 24,4s$), quando comparados ao grupo controle negativo ($96,1 \pm 15,6s$ e $222,8 \pm 27,4 s$, respectivamente).

No grupo de animais que recebeu apenas a glibenclamida (10 mg/kg, i.p.), não foi observada qualquer alteração no tempo de lambida da pata em nenhuma das fases (1ª fase - $94,38,1 \pm 7,7s$ e 2ª fase - $194,9 \pm 17,7s$), em relação ao grupo controle. O pré-tratamento com glibenclamida nos animais que, posteriormente, receberiam a HPA - 05 apresentou uma inibição de 60,2% ($57,88 \pm 3,7s$) e 77,3% ($172,5 \pm 24,6s$).

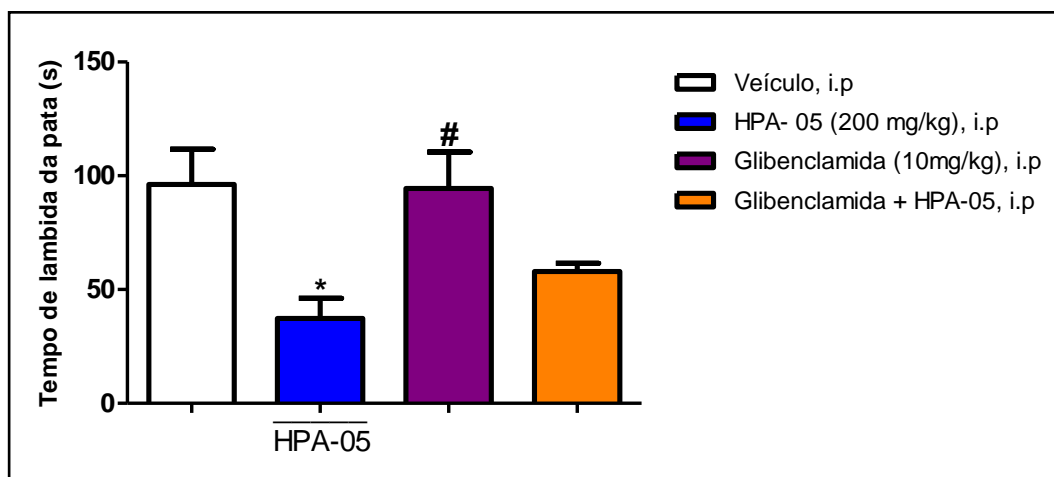


Gráfico 5: Efeito do pré-tratamento com glibenclamide (10 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p.), na primeira fase do teste da formalina. [Cada coluna representa média \pm e.p.m (n=8) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). *p<0,05 versus grupo controle. #p<0,05 versus HPA-05].

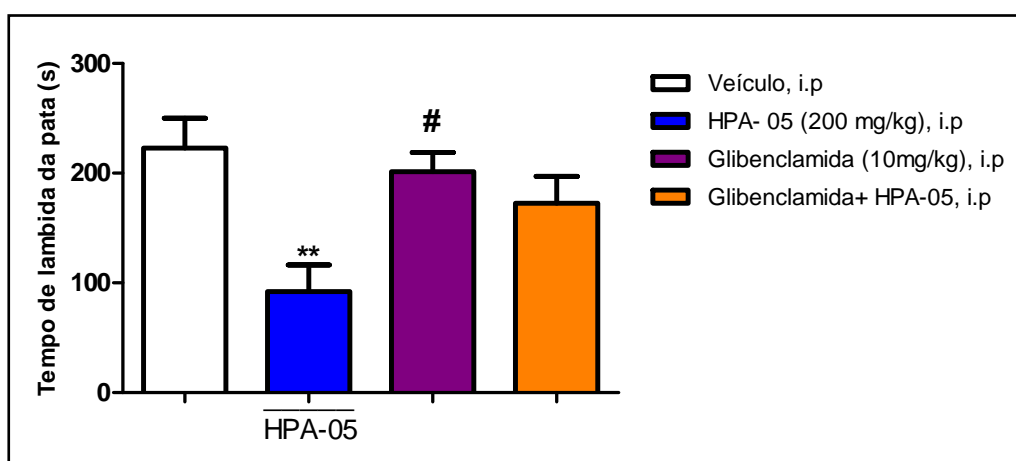


Gráfico 6: Efeito do pré-tratamento com glibenclamide (10 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p.), na segunda fase do teste da formalina. [Cada coluna representa média \pm e.p.m (n=8) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). *p<0,05 versus grupo controle; #p<0,05 versus HPA-05].

4.3.2 Participação do sistema GABAérgico

Na primeira fase do teste da formalina, os camundongos tratados com HPA - 05 (200 mg/Kg, i.p) causaram uma diminuição no tempo de lambida da pata ($60,3 \pm 8,1s$), em relação ao grupo que recebeu apenas a formalina ($140,0 \pm 15,9s$). O grupo de animais pré-tratados com a bicuculina (1mg/kg), quinze minutos antes da

administração da HPA-05, aumentou o efeito antinociceptivo da substância em estudo ($56,3 \pm 9,7s$) quando comparado ao grupo controle negativo (Gráfico 7).

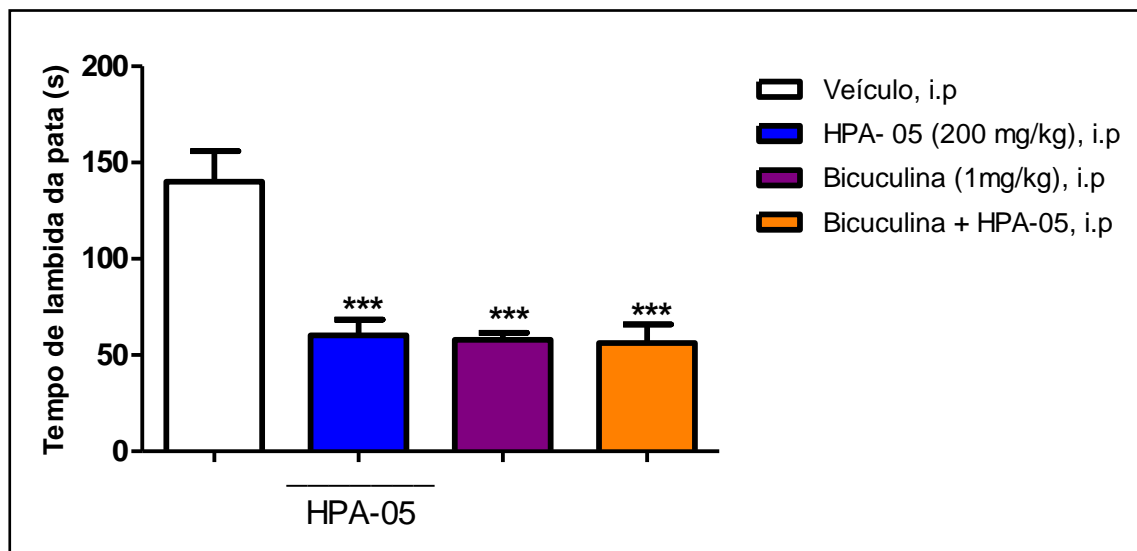


Gráfico 7: Efeito do pré-tratamento com a bicuculina (1 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p.), na primeira fase do teste da formalina. [Cada coluna representa média \pm e.p.m (n=8) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). * $p < 0,05$ versus grupo controle].

Os resultados da segunda fase da formalina evidenciam que o tratamento com a HPA - 05 também resultou em uma redução no tempo de lambida da pata ($154,4 \pm 17,9$), quando comparado ao grupo controle negativo ($228,1 \pm 19,7$). O grupo que recebeu o antagonista GABAérgico e, posteriormente, a HPA - 05 apresentou um aumento no comportamento antinociceptivo ($28,5 \pm 8,8$), em comparação com o grupo que recebeu apenas a HPA-05 (Gráfico 8).

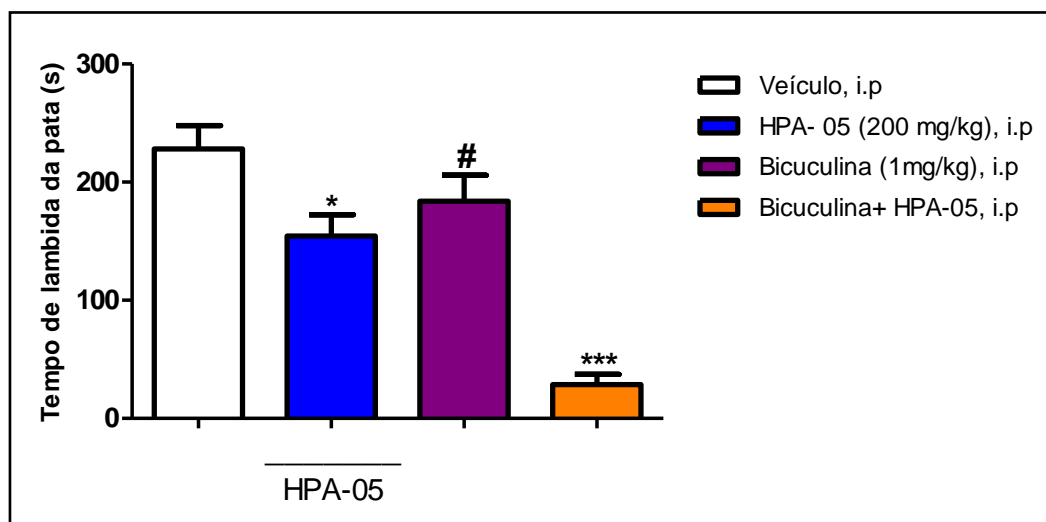


Gráfico 8: Efeito do pré-tratamento com a bicuculina (1 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p), na segunda fase do teste da formalina. [Cada coluna representa média \pm e.p.m (n=8) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). * $p < 0,05$ versus grupo controle. # $p < 0,05$ versus Bicuculina + HPA-05].

4.3.3 Participação do sistema noradrenérgico

Os resultados mostrados nos gráficos 9 e 10 revelam que os camundongos tratados com a HPA - 05 (200mg/Kg, i.p), nas duas fases do teste da formalina, reduziram o tempo de lambida da pata (1ª fase - $53,1 \pm 6,8$ s e 2ª fase - $115,9 \pm 24,5$ s) quando comparados ao grupo controle (1ª fase - $94,7 \pm 13,3$ s e 2ª fase - $230,3 \pm 29,7$ s).

Os grupos foram inicialmente tratados com a ioimbina (1mg/kg) e, posteriormente, a HPA - 05, não foi capaz de reverter o comportamento antinociceptivo (1ª fase - $53,7 \pm 9,8$ e 2ª fase - $28,5 \pm 8,8$), em comparação com o grupo que recebeu apenas a HPA-05 (1ª fase - $53,1 \pm 6,8$ e 2ª fase - $115,9 \pm 24,5$).

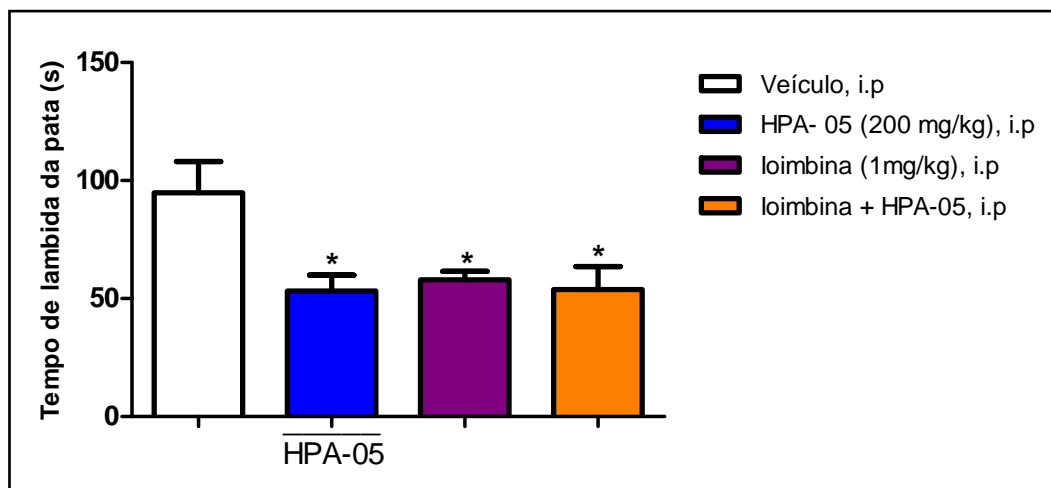


Gráfico 9: Efeito do pré-tratamento com a ioimbina (1 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p.), na primeira fase do teste da formalina. [Cada coluna representa média \pm e.p.m (n=8) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). * $p < 0,05$ versus grupo controle].

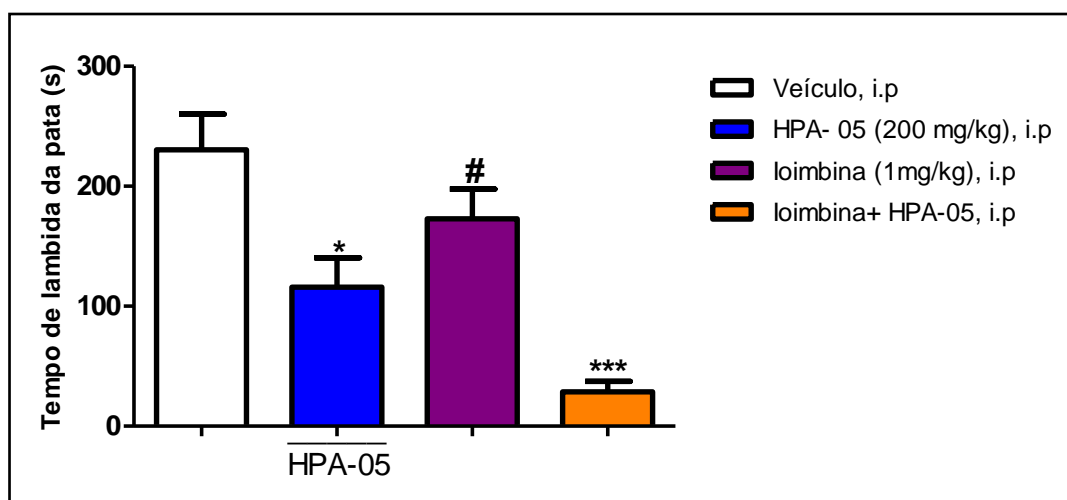


Gráfico 10: Efeito do pré-tratamento com a ioimbina (1 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p.), na segunda fase do teste da formalina. Cada coluna representa média \pm e.p.m (n=8) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). * $p < 0,05$ versus grupo controle; # $p < 0,05$ versus loimbina+ HPA-05.

4.3.4 Participação do sistema Colinérgico - muscarínico

Conforme os dados apresentados nos gráficos 11 e 12, os camundongos tratados com a HPA - 05 (200mg/Kg, i.p), nas duas fases do teste da formalina, reduziram o tempo de lambida da pata (1ª fase - $51,5 \pm 6,1$ s e 2ª fase - $115,9 \pm 24,5$ s) quando comparados ao grupo controle negativo (1ª fase - $94,7 \pm 13,4$ s e 2ª fase - $230,3 \pm 29,8$ s).

O pré-tratamento com atropina (1ª fase - $51,3 \pm 7,2$ s e 2ª fase - $90,6 \pm 19,7$ s) não reverteu o efeito antinociceptivo da HPA - 05 em nenhuma das fases da nocicepção induzida por formalina.

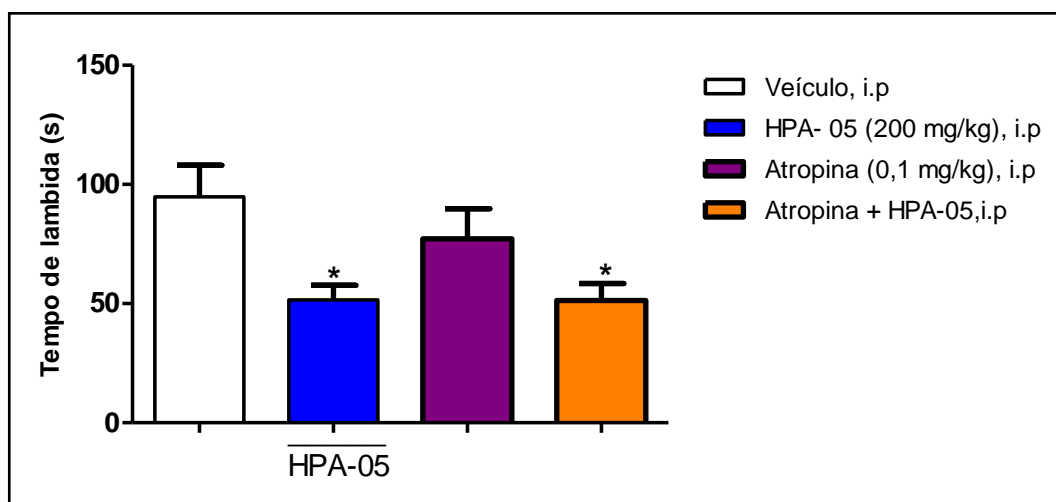


Gráfico 11: Efeito do pré-tratamento com a atropina (0,1 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p), na primeira fase do teste da formalina. [Cada coluna representa média \pm e.p.m (n=8) (ANOVA "one-way" seguido pelo Teste de Dunnett). *p<0,05 versus grupo controle].

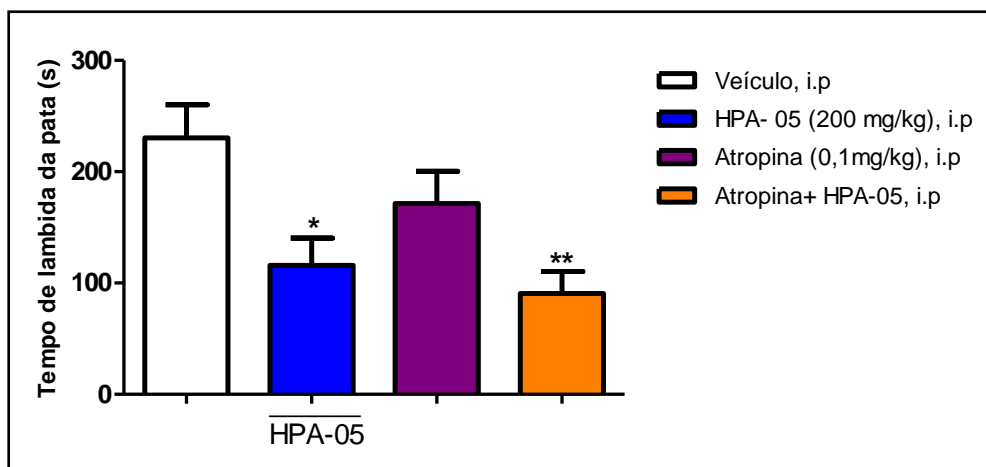


Gráfico 12: Efeito do pré-tratamento com a atropina (0,1 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p), na segunda fase do teste da formalina. [Cada coluna representa média \pm e.p.m (n=8) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). *p<0,05 versus grupo controle].

4.3.5 Participação do sistema Glutamatérgico

O pré-tratamento dos animais com a HPA -05 nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg, i.p, não evidenciaram uma redução significativa no tempo de lambida da pata ($146,9 \pm 22,1$ s; $170,0 \pm 22,3$ s; $167,6 \pm 25,3$ s) respectivamente, em relação ao grupo controle ($178,9 \pm 27,8$ s) (Gráfico 13).

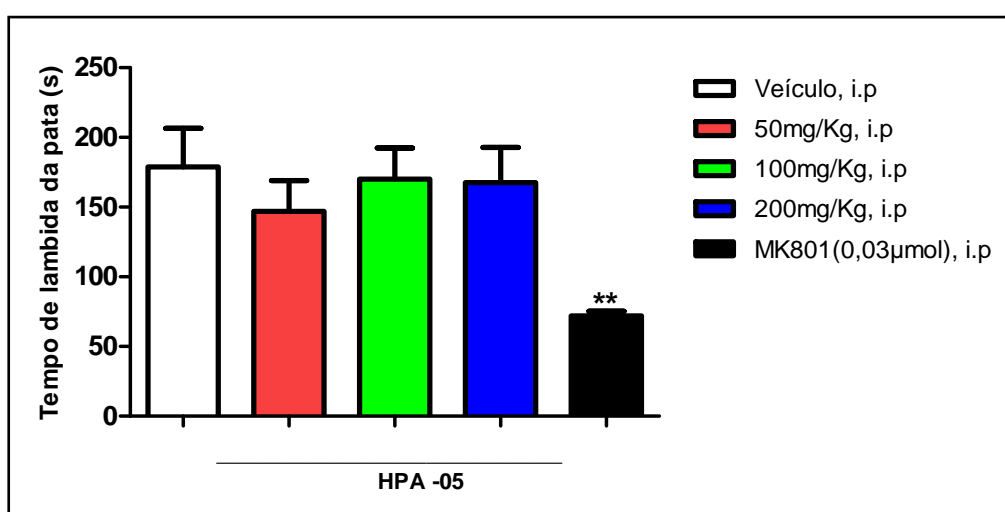


Gráfico 13: Efeito do pré-tratamento com a HPA - 05 (50, 100 e 200 mg/Kg, i.p), no teste do Glutamato. [Cada coluna representa média \pm e.p.m (n=8). *p<0,05. Os valores estão expressos em média \pm e.p.m. ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett].

4.3.6 Participação do sistema L-arginina/óxido nítrico

Os resultados demonstrados no Gráfico 14 sugerem que na primeira fase do teste da formalina, os camundongos tratados com a HPA - 05 (200 mg/Kg, i.p) causaram uma diminuição no tempo de lambida da pata ($37,3 \pm 3,0s$) em relação ao grupo que recebeu apenas a formalina ($77,8 \pm 3,0s$). O grupo de animais pré-tratados com a L- arginina, quinze minutos antes da administração da HPA - 05, inibiu a antinocicepção induzida pela droga em estudo ($76,7 \pm 12,3s$).

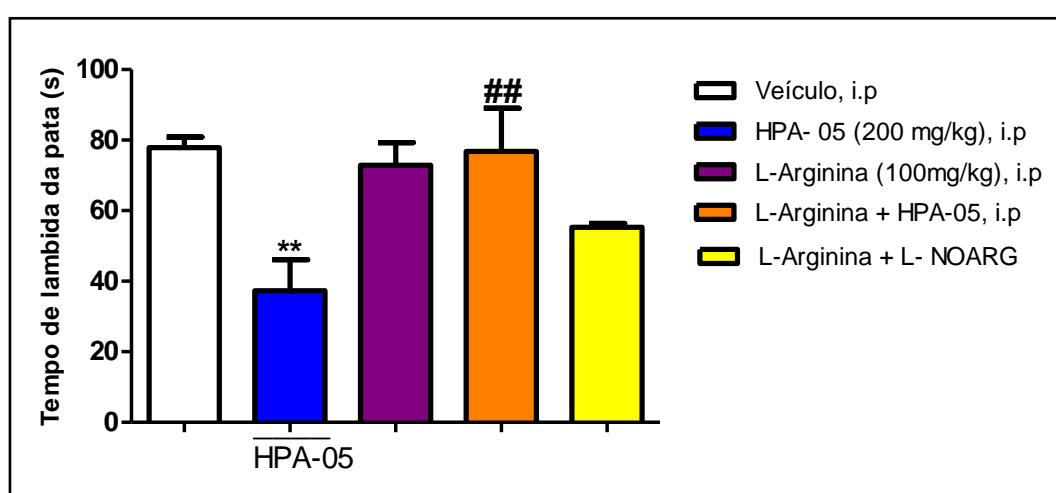


Gráfico 14: Efeito do pré-tratamento com a L- arginina (100 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p), na primeira fase do teste da formalina. [Cada coluna representa média \pm e.p.m (n=8) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). * $p < 0,05$; versus grupo controle; ## $p < 0,01$ versus HPA-05].

Na segunda fase da formalina, os resultados evidenciam que o tratamento com a HPA - 05 também resultou em uma redução no tempo de lambida da pata ($26,3 \pm 12,5s$), quando comparado ao grupo controle negativo ($202,1 \pm 44,6$). O grupo que recebeu a L - arginina e, posteriormente, a HPA - 05 apresentou um comportamento antinociceptivo ($27,7 \pm 15,9$), em comparação com o grupo que recebeu apenas o veículo (Gráfico 15).

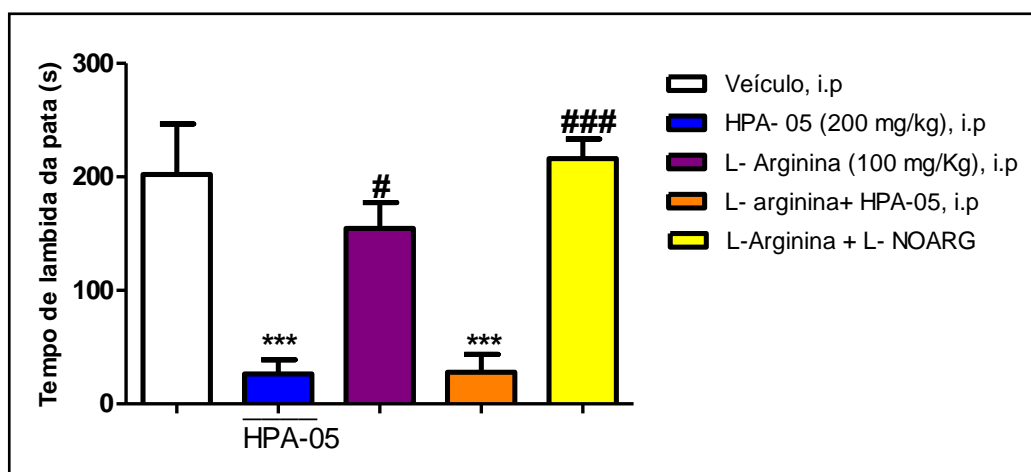


Gráfico 15: Efeito do pré-tratamento com a L- arginina (100 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p), na segunda fase do teste da formalina. [Cada coluna representa média \pm e.p.m (n=8) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). *p<0,05; versus grupo controle; #p<0,05 versus HPA-05].

4.3.7 Participação do sistema Dopaminérgico

O pré - tratamento dos animais com a sulpirida (20 mg/Kg), um antagonista dos receptores D_2 dopaminérgicos, não reverteu significativamente o efeito antinociceptivo da HPA - 05 (200 mg/Kg, i.p), em comparação ao grupo tratado apenas com a HPA-05 ($37,3 \pm 8,9$) (Gráfico 16)

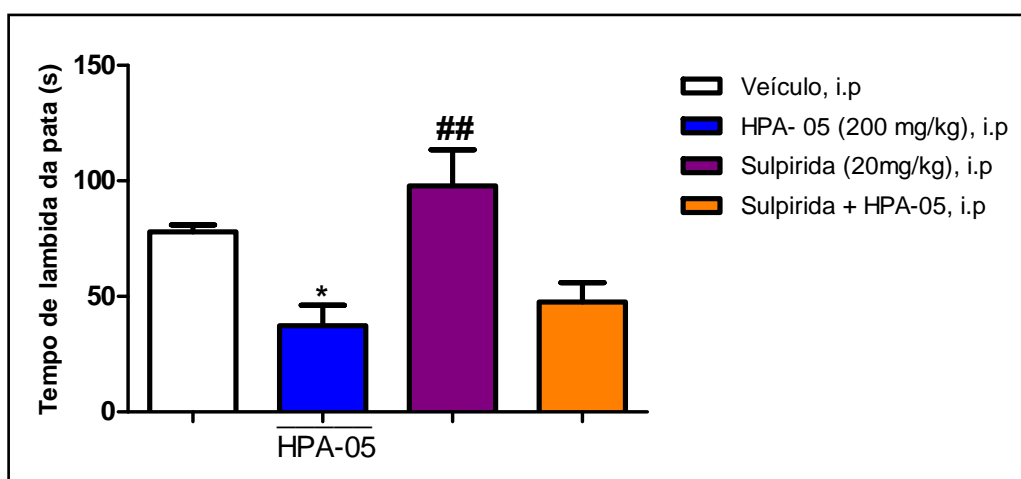


Gráfico 16: Efeito do pré-tratamento com a Sulpirida (20 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p), na primeira fase do teste da formalina. [Cada coluna representa média \pm e.p.m (n=8) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). *p<0,05; versus grupo controle; #p<0,05 versus HPA-05].

Os resultados da segunda fase da formalina evidenciam que o tratamento com a HPA - 05 também resultou em uma redução no tempo de lambida da pata ($15,6 \pm 6,8$), quando comparado ao grupo controle negativo ($177,0 \pm 25,1$). O grupo que recebeu o antagonista dopaminérgico e, posteriormente, a HPA - 05 apresentou uma redução no comportamento antinociceptivo ($126,9 \pm 25,1$), em comparação com o grupo que recebeu apenas a HPA-05 (Gráfico 17).

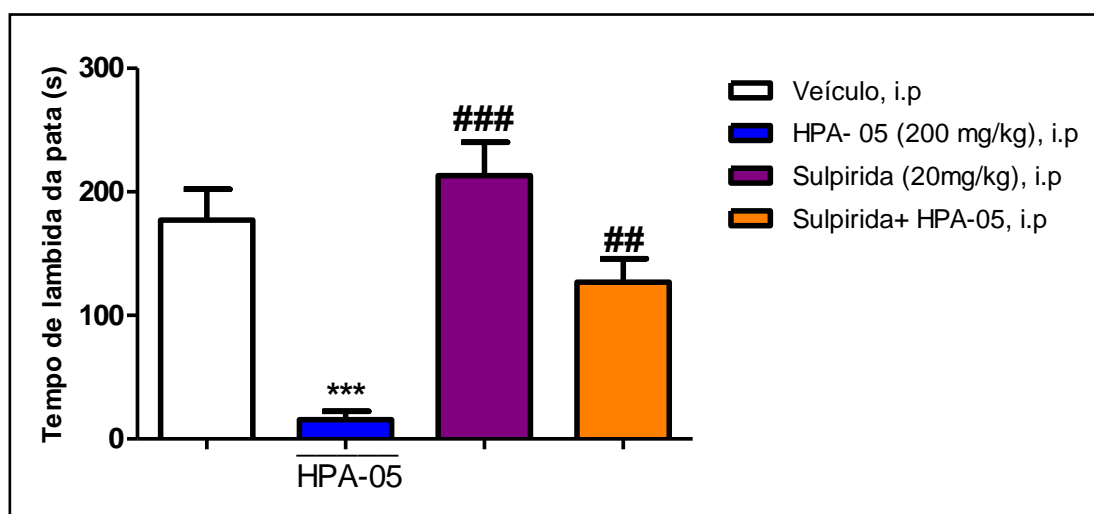


Gráfico 17: Efeito do pré-tratamento com a Sulpirida (20 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p.), na segunda fase do teste da formalina. [Cada coluna representa média \pm e.p.m (n=8) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). *p<0,05 versus grupo controle; #p<0,05 versus HPA-05].

4.3.8 Participação do sistema Adenosínico

De acordo com os dados apresentados no Gráfico 18, o pré - tratamento com a cafeína (10 mg/kg, i.p.), antagonista não seletivo dos receptores adenosínico foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo produzido pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p.).

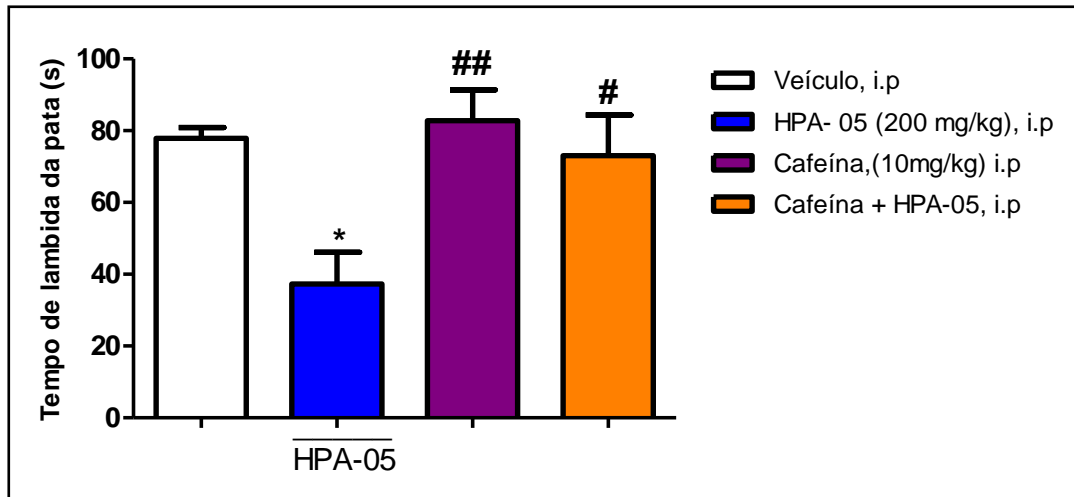


Gráfico 18: Efeito do pré-tratamento com a Cafeína (10 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p.), na primeira da fase do teste da formalina. [Cada coluna representa média \pm e.p.m (n=8) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). * $p < 0,05$ versus grupo controle; # $p < 0,05$ versus HPA-05].

O pré-tratamento com a cafeína ($38,25 \pm 13,4$) não reverteu o efeito antinociceptivo da HPA - 05 na segunda fase da nocicepção induzida por formalina (Gráfico 19).

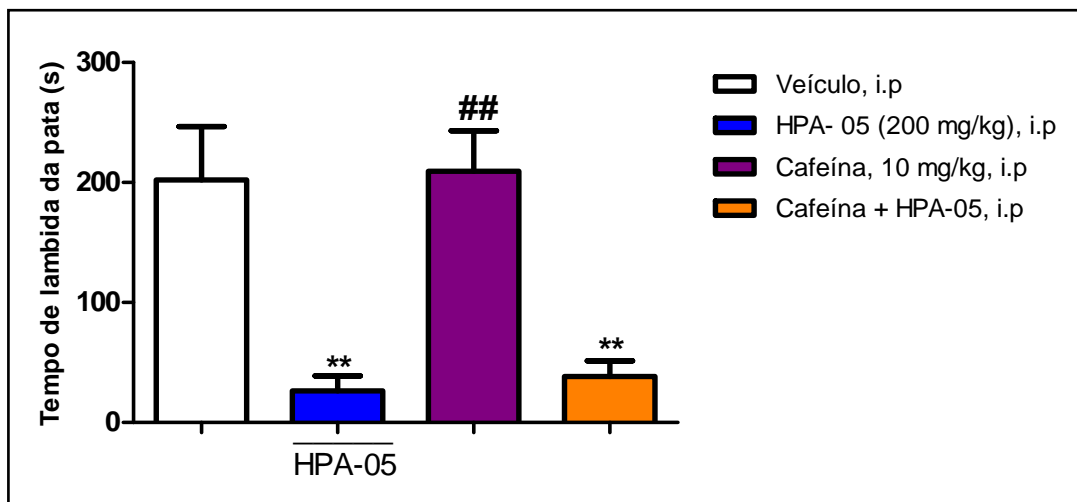


Gráfico 19: Efeito do pré-tratamento com a Cafeína (10 mg/kg, i.p.) na antinocicepção causada pela HPA - 05 (200 mg/kg, i.p.), na segunda da fase do teste da formalina. [Cada coluna representa média \pm e.p.m (n=8) (ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett). * $p < 0,05$ versus grupo controle; # $p < 0,05$ versus HPA-05].

4.4 Estudo da Atividade Anti-inflamatória

4.4.1 Peritonite induzida por carragenina (Cg)

A aplicação via cavidade intraperitoneal de carragenina induz uma peritonite, causando migração de células. Como mostrado no gráfico 20A, à administração da carragenina aumentou o número de leucócitos totais em $8,8 \pm 1,4 \times 10^6/\text{mL}$ mas o pré-tratamento com a HPA-05 diminuiu a população de leucócitos nas doses de 100 ($4 \pm 0,6 \times 10^6$ leucócitos/mL) e 200 ($3 \pm 0,6 \times 10^6$ leucócitos/mL) mg/kg em 45,5% e 34,1% respectivamente. A dexametasona (2 mg/kg, s.c.), droga padrão, inibiu em 36,4% ($3,2 \pm 0,4 \times 10^6$ leucócitos/mL) o infiltrado celular. Como esperado também houve significativa redução da migração de neutrófilos nos animais tratados com a HPA - 05 nas doses de 100 ($5,6 \pm 0,3 \times 10^6$ leucócitos/mL) e 200 mg/Kg ($4,7 \pm 0,3 \times 10^6$ leucócitos/mL) e na dexametasona ($4,4 \pm 0,4 \times 10^6$ neutrófilos/mL), utilizada como padrão. Os dados estão expostos no gráfico 20B.

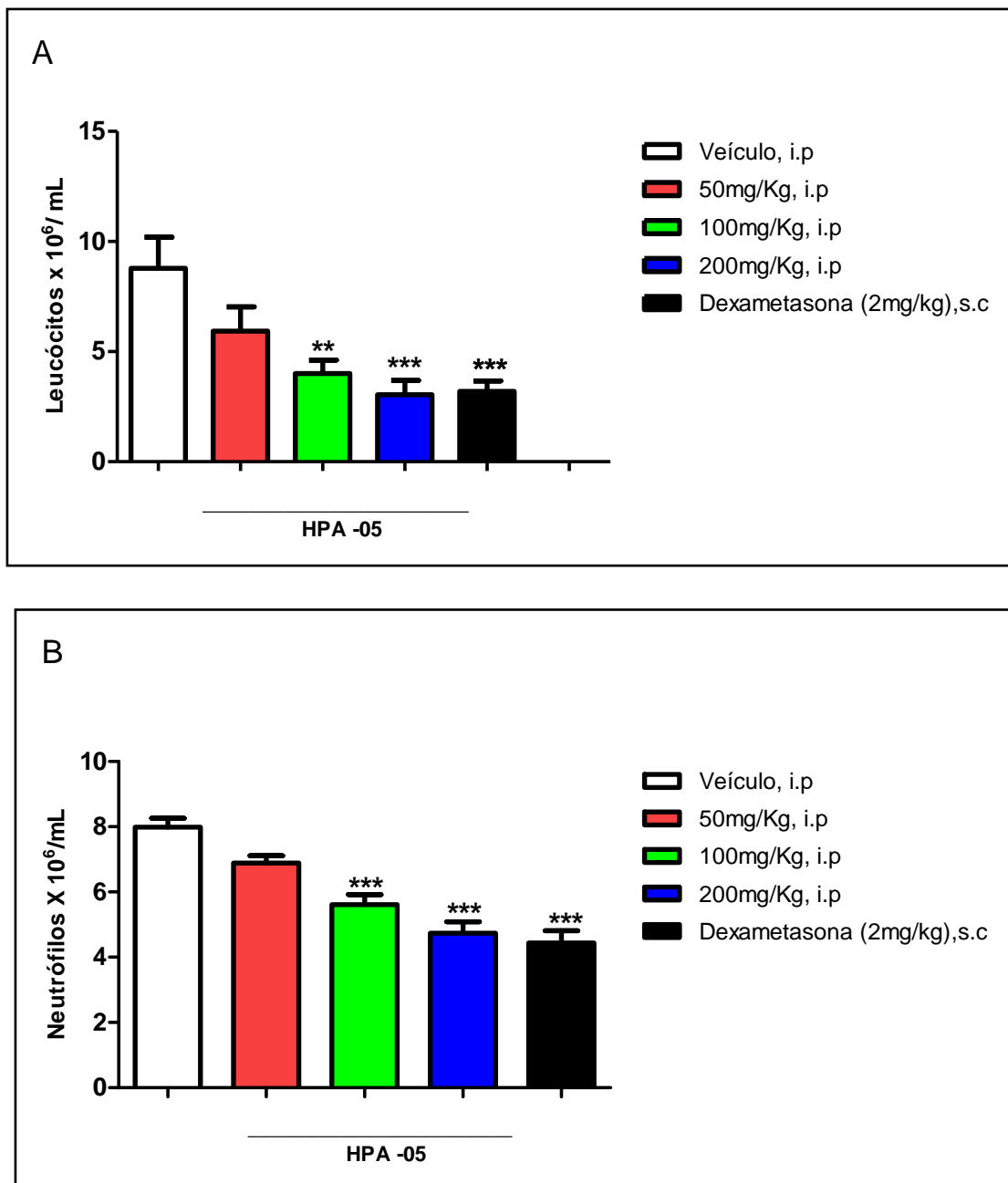


Gráfico 20: Efeito da administração da HPA – 05 e da dexametasona (2mg/kg, s.c.) sobre a migração de leucócitos totais (A) e neutrófilos (B), na peritonite induzida por carragenina. [*p<0,05. Os valores estão expressos em média ± e.p.m. ANOVA “one-way” seguido pelo Teste de Dunnett)].

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os fatores que motivaram as pesquisas com o derivado imidazolidínico 3-fenil-5-(4-metilfenil)-imidazolidin-2,4-diona (HPA-05) consistiram no fato de que compostos hidantoínicos apresentam diversas atividades farmacológicas, incluindo - se, dentre elas, atividade anticonvulsivante e no tratamento da dor neuropática, apresentada pelo fármaco fenitoína. Além disso, a HPA- 05 apresenta similaridade estrutural com outros compostos desta mesma classe, que, tem demonstrado possuir atividade antinociceptiva (HARDMAN, 1996; BERTOLUCCI, 2011; CARVALHO; QUEIROZ, 2011).

Os resultados dos testes preliminares foram realizados por SALGADO (2011), nos quais se observou que a HPA-05 apresenta baixa toxicidade, uma vez que não se pôde determinar a DL_{50} , visto que a mesma encontrou-se acima da dose máxima testada (1000 mg/kg). Pode-se constatar a atividade psicofarmacológica, depressora e antinociceptiva, do derivado imidazolidínico, a partir da triagem farmacológica comportamental. Nos testes gerais, para avaliar a ação no sistema nervoso central, foram realizados, os testes do campo aberto e barra giratória (*Rota-Rod*), observou-se uma possível atividade ansiolítica e depressora do SNC, pois a HPA-05 não interferiu na coordenação motora dos animais, descartando-se, assim um possível efeito miorrelaxante ou neurotóxico. Para avaliar a atividade antinoceptiva, realizou-se o teste das contorções induzidas pelo ácido acético, teste da placa quente e teste da formalina, bem como se observou que a HPA-05 apresentou atividade antinociceptiva e/ou inibiu a liberação de mediadores inflamatórios ou citocinas. Após a confirmação da atividade antinociceptiva central da HPA-05, partiu-se para a investigação de um possível mecanismo de ação envolvendo este sistema. Para tanto, os animais foram novamente submetidos ao teste da formalina, onde alguns grupos receberam o pré-tratamento com o antagonista opióide não-seletivo naloxona. A dose de 200 mg/kg foi escolhida para a realização dos testes antinociceptivos pelo fato de que demonstrou um efeito mais pronunciado. Em relação a esta metodologia, verificou-se que em ambas as fases o efeito antinociceptivo da HPA-05 não foi revertido pelo bloqueio prévio dos receptores opióides, através da naloxona. Sztanke et. al. (2005) relataram que compostos derivados da molécula 8-aril-3,4-dioxo-2H,8H-6,7-diidroimidazol[2,1-c][1,2,4]triazina,

tiveram seu efeito antinociceptivo revertido pela naloxona, o que indica uma possível participação da via opioide nesta resposta. Da mesma forma, apesar de pertencerem à mesma classe, o derivado HPA-05 inibe a via nociceptiva central por mecanismos que não os opioides. (SALGADO, 2011).

Seguindo-se os estudos de SALGADO (2001), seguiu-se com a investigação do possível mecanismo de ação da HPA – 05. Foram realizados experimentos para verificar a participação dos canais de K^+ . Neles se utilizou uma sulfonilureia, a glibenclamida, muito usada na prática clínica em pacientes diabéticos. Os efeitos das sulfonilureias são iniciados pela ligação e bloqueio de um canal de K^+ sensível ao ATP. Desta maneira, a condutância reduzida ao K^+ provoca a despolarização da membrana das células β e influxo de Ca^{+2} através dos canais de Ca^{+2} sensíveis à voltagem e subsequente estímulo da secreção de insulina. Os canais de K^+ neurais estão divididos em quatro classes, de acordo com as suas estruturas e agonistas específicos: Canais de K^+ dependente de voltagem (K_v), os quais aumentam a sua atividade em estados de despolarização da membrana e são importantes reguladores do potencial de membrana em resposta a estímulos despolarizantes; os ativados por cálcio (K_{Ca}) respondem a alterações dos níveis de Ca^{+2} intracelular para regular o potencial de membrana; Os retificadores de entrada (K_{ir}) parecem mediar a vasodilatação induzida pelo K^+ extracelular e os canais de K^+ sensíveis a ATP (K_{ATP}) constituem o alvo de numerosos estímulos vasodilatadores. (GUTMAN et al., 2003; OCAÑA et al., 2004).

Os estudos com outros derivados imidazolidínicos tais como: phenotamine, (-)-cibenzolina, (+)-cibenzolina, alinidina, oximetazolina, antazolina, midaglizole, xilometazolina, tramazolina e ST91 (2 -(2,6-dietilphenilamino) -2 - cloridrato de imidazolina) demonstraram a não participação dos canais de potássio, corroborando com o que foi observado nos resultados da HPA - 05 (SAKUTA; OKAMOTO, 1994).

Muitos trabalhos mostram o envolvimento dos receptores GABA na modulação da dor, essencialmente através do sistema inibitório descendente (MATSUMOTO, 1989; MACDONALD; OLSEN, 1994; TATSUO et al., 1997). Em condições saudáveis, os interneurônios GABAérgicos e glicinérgicos servem como “portas”, controlando a transmissão do sinal nociceptivo da periferia até o sistema nervoso central (ZEILHOFER; MOHLER; DI LIO, 2009). Estudos recentes sugerem que um déficit na inibição mediada pelo neurotransmissor GABA na medula espinhal está relacionado com o surgimento da dor de diversas origens (ZEILHOFER, 2008;

ZEILHOFER; MOHLER; DI LIO, 2009). Embora haja progresso no desenvolvimento de novos fármacos, a utilização sistêmica de agonistas GABAérgicos é limitada por efeitos colaterais em outros sistemas que não estão envolvidos na dor (JASMIN; WU; OHARA, 2004; ENNA; MCCARSON, 2006).

Frente a estes dados, avaliou-se a participação dos receptores GABA_A na antinocicepção mediada pela HPA -05, através da utilização de um antagonista, a bicuculina. Uma vez bloqueada, a via GABAérgica, pode provocar neuropatias, devido à perda da inibição mediada pelo receptor GABA no mecanismo nociceptivo (GREEN; DICKENSON, 1997; MALAN; MATA; PORRECA, 2002; BASBAUM; BAUTISTA; SCHERRER, 2009).

A HPA-05 foi capaz de diminuir o tempo de lambida da pata nas duas fases do teste da formalina, entretanto esse efeito não foi inibido ao administrar a bicuculina. Esse resultado indica que o efeito antinociceptivo da HPA- 05 não é mediado pelos receptores GABA_A. Observou-se também uma redução no tempo de lambida da pata quando a bicuculina foi administrada juntamente com a HPA - 05 nas duas fases do teste da formalina indicando um possível sinergismo por potenciação entre as duas drogas.

Sinergismo é definido como um tipo de resposta farmacológica obtida a partir da associação de dois ou mais medicamentos, cuja resultante é maior do que simples soma dos efeitos isolados de cada um deles. O sinergismo pode ocorrer com medicamentos que possuem os mesmos mecanismos de ação (aditivo); que agem por diferentes modos (somação) ou com aqueles que atuam em diferentes receptores farmacológicos (potencialização). Das associações sinérgicas podem surgir efeitos terapêuticos ou tóxicos (NIES; SPIELBERG, 1996; OLGA, 1994).

Em seguida, buscou-se estudar a possível participação da via descendente inibitórias mais amplamente estudada, a noradrenérgica, na atividade antinociceptiva da HPA- 05. Essa via desempenha um importante papel no controle do impulso nociceptivo, atuando de maneira bastante importante na inibição da transmissão da informação nociceptiva. As projeções de neurônios noradrenérgicos ao corno dorsal, desempenham ações diversas, pró ou antinociceptivas, através da ação da noradrenalina sobre seus receptores, conforme o tipo de receptor ativado e sua localização. A ativação dos receptores inibitórios α_2 pós-sinápticos no corno dorsal provoca uma redução moderada da estimulação dos neurônios de projeção pelas fibras aferentes primárias, e também uma redução na liberação de transmissores

prónociceptivos, como a substância P e o glutamato, a partir de seus terminais (MILLAN et al., 1999).

Desta forma, a ativação espinal destes receptores constitui uma importante estratégia terapêutica, e agonistas seletivos α_2 têm sido amplamente utilizados na clínica (EISENACH, 1994). Em contrapartida, receptores adrenérgicos α_1 são essencialmente excitatórios, dado seu acoplamento positivo à PLC e correntes de Ca^{2+} e sua ação inibitória sobre correntes de K^+ , e desempenham papel facilitatório quando localizados nos neurônios de projeção ou nas fibras aferentes primárias. Porém, esses receptores também apresentam um papel importante na antinocicepção espinal provocada pela noradrenalina, quando localizados em interneurônios inibitórios (HOWE et al., 1983).

Os resultados desse estudo demonstraram que os efeitos antinociceptivos exibidos pela HPA-05, não foram revertidos quando a ioimbina foi administrada, em nenhuma das fases no teste da formalina, indicando que o efeito antinociceptivo da HPA - 05 não se deve a mecanismos adrenérgicos mediados através deste receptor. Observou-se, no entanto, uma ação sinérgica entre a ioimbina e a HPA-05, pela redução significativa do tempo de lambida da pata em ambas as fases no teste da formalina.

O derivado imidazolidínico HPA - 05 não exerce sua ação antinociceptiva pela via colinérgica, visto que a administração do antagonista muscarínico não seletivo, a atropina não reverteu a antinocicepção causada pela substância em estudo.

A acetilcolina participa da via inibitória descendente como modulador das respostas supra - medulares. Isto pode ser verificado analisando as alterações no limiar algico de animais submetidos ao teste do *Tail flick* (WATANABE et al., 2003).

A transsecção medular de animais pré - tratados com agonistas colinérgicos gera uma atenuação do limiar nociceptivo (JAIN, 2004). O exato papel da acetilcolina neste sistema não é bem conhecido. Bannon et al. (1998) descreveram que o antagonismo do sistema colinérgico pode levar a um efeito antinociceptivo. Corroborando, portanto, com o que foi observado no nosso estudo.

Quando injetado por via subplantar, o glutamato induz um comportamento característico de nocicepção de rápido início e curta duração, semelhante àquele provocado pela formalina, durante a primeira fase (BEIRITH et al., 2002). Este efeito do glutamato é mediado por receptores glutamatérgicos NMDA (N-metil-D-aspartato) e não-NMDA, nos níveis periférico, espinal e supraespinal, através de

mecanismos dependentes da via L- arginina/ óxido nítrico e da participação de neurocininas e cininas, ativando receptores NK e B2, respectivamente (BEIRITH et al., 2002).

Os resultados apresentados no presente trabalho mostraram que o pré-tratamento com a HPA - 05 não reduziu a reatividade dos animais, ou seja, o tempo de lambida da pata. Portanto, a ação antinociceptiva da HPA - 05 não envolve a via glutamatérgica. Entretanto o pré - tratamento com o antagonista dos receptores ionotrópicos do glutamato, MK801, reduziu o tempo de lambida da pata. Além disso, a utilização de drogas cujo mecanismo de ação envolve o antagonismo dos receptores NMDA e inibição da síntese de óxido nítrico pode tornar-se uma ferramenta terapêutica importante para o tratamento da dor (FAIRBANKS et al., 2000).

Investigou-se a participação do sistema de transmissão L- arginina / óxido nítrico na atividade antinociceptiva da HPA -05. Sabe-se que a produção de óxido nítrico está relacionada com a transmissão nociceptiva, a partir da ação de diversos mediadores pró-inflamatórios (MILLAN, 1999; 2002). Além disso, a liberação espinal de óxido nítrico interfere com a nocicepção em vários níveis de transmissão e modulação desta resposta (MELLER; GEBHART, 1993). Moore et al., (1991) demonstraram que o inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS), L - nitroarginina (L-NOARG), administrado pelas vias sistêmica e central, possui efeito antinociceptivo em ambas as fases da nocicepção induzida pela formalina.

O pré-tratamento dos animais com L- arginina foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo demonstrado pela HPA-05, sugerindo que o sistema L- arginina/ óxido nítrico está diretamente envolvido neste efeito na primeira fase do teste da formalina. O mesmo resultado não foi verificado na segunda fase desse teste, onde observou-se que o pré - tratamento com L-arginina não conseguiu reverter a antinocicepção causada pela HPA - 05, apresentando, em vez disso, um efeito sinérgico com a mesma, reduzindo significativamente o tempo de lambida da pata.

O teste da formalina, que é um teste clássico de nocicepção é sensível às diferentes classes de substâncias antinociceptivas. O teste, que consiste na injeção i.pl. de uma solução de formalina, provoca uma resposta comportamental bifásica, cujos mecanismos fisiológicos já foram bastante investigados e descritos (TJØLSEN et al., 1992). As duas fases da resposta à formalina têm mediação química e mecanismos modulatório distintos, apresentando diferenças marcantes quanto à sua

sensibilidade às substâncias analgésicas (HUNSKAAR; HOLE, 1987; TJØLSEN et al., 1992; GUY; ABBOT, 1992).

A primeira fase (neurogênica) da nocicepção inicia-se imediatamente após a injeção de formalina e perdura por cerca de 5 min. Acredita-se que nesta fase ocorra uma estimulação direta dos nociceptores, predominantemente das fibras-C, com a participação da substância P, glutamato, bradicinina e GABA (KANEKO; HAMMOND, 1997; SEVOSTIANOVA et al., 2003; SHIBATA et al., 1989; SHIELDS et al., 2010). Essa fase é sensível apenas a analgésicos que atuam sobre o SNC (HUNSKAAR e HOLE, 1987). À primeira fase segue-se um período de quiescência, ou interfase, que dura em torno de dez minutos e é resultante da inibição ativa da excitabilidade dos nociceptores (HENRY et al., 1999).

A segunda fase (inflamatória) da nocicepção, que se inicia a partir dos quinze minutos após a injeção de formalina, é resultante de dois componentes: a sensibilização central dos nociceptores e neurônios de segunda ordem, e a ação de mediadores inflamatórios, como a histamina, 5-HT, bradicinina e a prostaglandina, liberados em decorrência da lesão tecidual (TJØLSEN et al., 1992; HOLE; TJØLSEN, 1993). Esta segunda fase da nocicepção pode ser inibida tanto por anti-inflamatórios não-esteroidais, como por substâncias que atuam no SNC (HUNSKAAR; HOLE, 1987). O teste da formalina produz um estímulo nociceptivo de caráter tônico e moderado, que persiste por alguns minutos, e do qual o animal não pode se esquivar. Portanto, costuma-se associar este modelo ao que mais se assemelha à condição clínica de dor, sendo um modelo útil para a investigação de fármacos analgésicos em potencial (TJØLSEN et al., 1992).

Dentro deste contexto, os resultados mostraram que o pré-tratamento com a HPA - 05 juntamente com a L-arginina, i.p., inibindo a primeira fase da formalina sugerem que a antinocicepção causada pela HPA -05 estaria atuando em mecanismos centrais, uma vez que o controle da primeira fase da nocicepção induzida pela formalina é realizado exclusivamente no SNC.

A relação do sistema dopaminérgico com a modulação da nocicepção é demonstrada pela presença de receptores dopaminérgicos, principalmente do subtipo D₂ e seu respectivo mRNA codificador em áreas do corno dorsal. Estudos de imunohistoquímica mostram que esses receptores estão localizados em terminais centrais de fibras aferentes primárias, estabelecendo a relação entre o sistema dopaminérgico e o controle da dor (VAN DIJKEN et al., 1996).

Os resultados mostraram que o efeito antinociceptivo causado pela HPA-05 sugere não ser dependente da ativação dos receptores dopaminérgicos D_2 , uma vez que o tratamento com o antagonista seletivo dos receptores D_2 (Sulpirida), não conseguiu reverter o efeito antinociceptivo da HPA-05, na primeira fase da formalina.

Na segunda fase da formalina observou-se uma redução no comportamento antinociceptivo da HPA-05, em comparação com o grupo que recebeu apenas a HPA-05, sugerindo que a atividade antinociceptiva da HPA-05 pode envolver os receptores D_2 da Dopamina. Dentro deste contexto, sugere-se que a atividade antinociceptiva da HPA-05 estaria atuando na sensibilização central dos nociceptores e neurônios de segunda ordem, e a ação de mediadores inflamatórios, como a histamina, 5-HT, bradicinina e a prostaglandina, liberados em decorrência da lesão tecidual.

A adenosina é um neurotransmissor endógeno que atua sobre receptores de membrana específicos acoplados a proteína G (WU et al., 2005). Quatro subtipos de receptores de adenosina foram identificados: A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 (WU et al., 2005). Os receptores A_1 estão associados à antinocicepção, por inibição da atividade neuronal na medula espinhal e do gânglio da raiz dorsal, enquanto que os receptores A_{2A} , A_{2B} e A_3 , estão envolvidos com atividades pró - nociceptivas. A cafeína é um antagonista não seletivo de receptores de adenosina, apresentando afinidade por receptores do Tipo A_1 e A_2 (SOUTO MAIOR, 2011).

Os efeitos exercidos pela interação da cafeína com a HPA - 05 mostram uma reversão do efeito antinociceptivo da HPA - 05 pela cafeína, na primeira fase do teste da formalina. A partir desses resultados, pode ser sugerido que o mecanismo de antinocicepção pode estar envolvido com os receptores A_1 e /ou A_2 através de mecanismos centrais, uma vez que o controle da primeira fase da nocicepção induzida pela formalina é realizado exclusivamente no SNC. O mesmo não foi observado na segunda fase do teste da formalina, onde o tratamento com a cafeína não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo da HPA -05, ocorrendo um efeito sinérgico entre ambas.

Outros estudos realizados anteriormente para testar o envolvimento dos receptores da adenosina em processos de antinocicepção. Pesquisadores utilizando o teste da formalina, em ratos, pesquisadores perceberam que a administração periférica local de amitriptilina produzia antinocicepção, e que este efeito era

parcialmente revertido pela coadministração de cafeína, nas duas fases do teste (SAWYNOK; REID, 1999).

Dando continuidade aos estudos para avaliação psicofarmacológica da HPA - 05, foram realizados testes com o objetivo de avaliar a possibilidade de essa droga apresentar um perfil de atividade anticonvulsivante. Com esta finalidade, duas metodologias foram empregadas: o teste das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ) e o teste do eletrochoque máximo (ECM). Tais modelos clássicos continuam sendo amplamente empregados nas pesquisas de novas drogas anticonvulsivantes e apresentam características particulares que os credenciam como metodologias de escolha (SMITH; WILCOX; WHITE, 2007).

O pentilenotetrazol (PTZ) é uma das principais substâncias indutoras de convulsão utilizadas na triagem pré-clínica de novos fármacos anticonvulsivantes (LÖSCHER; SCHMIDT, 2006; RANG et al., 2012), podendo ser utilizado como modelo de crises generalizadas dos tipos ausência, mioclônicas e de crises tônico-clônicas (OLIVEIRA et al., 2001).

A inibição das convulsões induzidas pelo PTZ é uma metodologia extensamente utilizada para avaliar o efeito anticonvulsivante de drogas em animais (LOWSON et al., 1991). O PTZ atua inibindo os canais de cloreto associados a receptores GABA_A (LÖSCHER; SCHMIDT, 2002). Portanto, sabe-se que o bloqueio das convulsões induzidas quimicamente pelo PTZ em roedores, é uma característica de algumas drogas depressoras do SNC pertencentes à classe dos anticonvulsivantes (ANCA et al., 1993).

Segundo Kupferberg e Schmutz (1997), de maneira geral, o PTZ permite a identificação eficaz de compostos contra crises de ausência quando injetado por via intravenosa e permite uma avaliação genérica do potencial anticonvulsivante de uma droga quando administrado em altas doses por via intraperitoneal.

Pode-se constatar que nos animais tratados com as doses de 100 e 200 mg/Kg, i.p., da HPA – 05, houve uma redução da incidência de convulsões induzidas pelo PTZ, assim como uma alteração qualitativa que pode ser comprovada pelo aumento significativo da latência para o início das crises convulsivas nesses grupos. O aumento da latência para o aparecimento das convulsões é um forte indicativo de uma ação anticonvulsivante e drogas como diazepam e clonazepam aumentam este parâmetro (QUINTANS JÚNIOR et al., 2008).

O diazepam (2mg/Kg), utilizado como padrão positivo, aumentou a latência da convulsão e obteve 100% de sobrevivência dos animais. Este efeito deve a sua ação no receptor GABA_A/ Benzodiazepínicos, sendo um fármaco com conhecida ação anticonvulsivante.

O Teste das convulsões induzidas pelo eletrochoque auricular máximo, baseia-se na observação de que a estimulação, por meio de pulsos elétricos repetitivos e usando parâmetros adequados, é capaz de induzir um padrão característico de atividade epiléptica em diferentes estruturas neuronais que, auto mantida, é comumente denominada como pós-descarga (QUINTANS JÚNIOR et al., 2002). Este teste é mais utilizado, frequentemente, como um modelo animal para a identificação da atividade anticonvulsivante de drogas eficazes no “grande-mal” (QUINTANS JÚNIOR et al., 2002). O teste do eletrochoque identifica agentes ativos contra convulsões tônico-clônicas generalizadas, devido ao bloqueio da propagação das convulsões (BLANCO et al., 2007).

Os resultados desse teste evidenciaram, portanto, que a HPA - 05 apresenta um perfil semelhante às drogas anticonvulsivantes utilizadas no tratamento do grande mal epiléptico, já que promoveu uma proteção das convulsões induzidas pelo eletrochoque auricular nos parâmetros descritos, em comparação aos animais tratados apenas com o veículo. Os resultados corroboram com os dados relatados na literatura, onde a fenitoína é a hidantoína mais conhecida, sendo empregada como fármaco de primeira escolha no tratamento de crises epiléticas parciais e generalizadas do tipo tônico-clônica, mas contra-indicada nas crises de ausência. Seu mecanismo de ação envolve o bloqueio dos canais de Na⁺ dependentes de voltagem, com maior afinidade por aqueles que se encontram no estado inativado, impedindo, assim, que esses canais possam retornar ao estado de repouso, necessários para a geração de novos potenciais de ação (RANG et al., 2012).

Seguiu-se com o teste do Labirinto em cruz elevado (LCE), que foi originalmente desenvolvido por Pellow e colaboradores (1985) e se tornou um modelo para o estudo do comportamento de ansiedade em ratos e, subsequentemente, em camundongos (LISTER, 1987; CORNÉLIO; NUNER-DE-SOUZA, 2009; BUCKMAN et al., 2009; GRUNDMANN et al., 2009). É baseado na aversão natural que os roedores apresentam a áreas abertas e elevadas (RABBANI et al., 2008; RAUPP et al., 2008), sendo o teste mais utilizado para a procura de novos agentes ansiolíticos semelhantes aos benzodiazepínicos (CHEN et al., 2004).

Este teste é, pois, fundamentado no comportamento exploratório do animal e na aversão dos roedores por espaços abertos e altura, onde as substâncias ansiolíticas levam o animal a aumentar o número de entradas e/ou o tempo de permanência nos braços abertos. Os parâmetros avaliados neste teste foram: latência para a primeira entrada nos braços abertos e fechados; número de entradas nos braços abertos e fechados (ALMEIDA, 2006).

Nesse teste, não foi observado nenhuma modificação comportamental dos animais indicativa de um possível efeito ansiolítico, uma vez que nenhuma dose da HPA - 05 produziu um aumento significativo no número de entradas e no tempo de permanência nos braços abertos.

Como a HPA - 05 apresentou uma boa eficácia nos modelos do ácido acético, e no modelo da formalina, reduzindo a segunda fase (inflamatória) da resposta nociceptiva (SALGADO, 2011), foi investigada a atividade anti-inflamatória do composto utilizando o modelo da peritonite induzida por carragenina.

O tratamento dos animais com HPA - 05 nas doses de 100 e 200 mg/Kg e na via analisada, reduziu significativamente a migração de leucócitos, neutrófilos e o extravasamento plasmático 4 h após a administração de carragenina, quando comparadas ao grupo que recebeu apenas o veículo. Esses dados corroboram com os resultados anteriores obtidos no modelo do ácido acético e da formalina.

A peritonite induzida por carragenina é um modelo experimental bem caracterizado de inflamação aguda, empregada largamente para testar novas terapias anti-inflamatórias por permitir a quantificação e correlação da migração celular e do exsudato inflamatório (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). A carragenina é uma substância caracterizada por elicitar a liberação de vários mediadores inflamatórios, tais como histamina, serotonina e cininas na primeira fase, nas quais são responsáveis pelo desenvolvimento dos eventos vasculares, enquanto uma segunda fase é mantida por outros mediadores, tais como citocinas (IL-1 e TNF- α), prostaglandinas e óxido nítrico. Associado a isso, esse evento também é caracterizado por apresentar um infiltrado celular intenso, onde se destaca a presença de neutrófilos com produção de radicais livres derivados do oxigênio (DI ROSA et al., 1971; DAMAS et al., 1990).

Vários mediadores pró-inflamatórios estão envolvidos na inflamação aguda induzida por carragenina como neuropeptídeos, prostaglandinas, NO e citocinas (DE CASTRO FRANCA et al., 2007). Em relação à participação de citocinas

próinflamatórias neste modelo, está bem estabelecido que os leucócitos, entre outras células, produzem IL-1b, IL-6, IL-8 e TNF- α (PEREIRA, MEDEIROS, FRODE, 2006). Por outro lado, os macrófagos produzem IL-10, uma citocina anti-inflamatória que possui mecanismos importantes no controle da inflamação (MOSSER, ZHANG, 2008).

Guerra et al., (2011) avaliaram a capacidade anti-inflamatória dos derivados imidazolidínicos: 5 - (1H-indol-3-il-metileno)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (LPSF/NN-56) e 3 - (4-bromo-benzil) -5 - (1H-indol-3-il-metileno)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (LPSF/NN-52) e evidenciaram a atividade anti-inflamatória dos compostos, por uma redução tanto na migração de leucócitos quanto a liberação de TNF- α e IL-1 β no modelos da peritonite. Estes resultados indicaram que os compostos testados exibiram atividades promissoras antiinflamatórias e antinociceptiva que provavelmente estão envolvidos na modulação do sistema imunológico.

Corroborando com pesquisas nas quais foram demonstradas atividades anti-inflamatórias e analgésicas em diferentes derivados imidazolidínicos (CARVALHO; SALGADO; QUEIROZ, 2011), os resultados revelaram que o composto 3-fenil-5-(4-metilfenil)-imidazolidin-2,4-diona (HPA - 05) possui propriedades analgésicas, anti-inflamatória e anticonvulsivantes, sinalizando perspectivas favoráveis para o desenvolvimento de novos fármacos para o controle da dor inflamatória e convulsões.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos nos estudos psicofarmacológicos pré-clínicos do 3-fenil-5-(4-metilfenil)-imidazolidin-2,4-diona (HPA-05) em camundongos, nas doses utilizadas e na via testada, é possível concluir que:

- ✓ HPA - 05 se mostrou efetiva em inibir as convulsões induzidas por pentilenotetrazol e pelo eletrochoque auricular, o que revela uma propriedade de fármacos anticonvulsivantes nestes testes;
- ✓ Não apresentou atividade ansiolítica por não aumentar significativamente o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos no teste do labirinto em cruz elevado;
- ✓ A atividade antinociceptiva da HPA – 05 tem o envolvimento do sistema L-arginina/ óxido nítrico na fase neurogênica do teste da formalina, receptores dopaminérgicos D_2 na fase inflamatória da formalina, adenosínicos na fase neurogênica da formalina;
- ✓ Não envolvem a participação dos canais de K^+_{ATP} , receptores GABAérgicos, glutamatérgicos, noradrenérgicos, muscarínicos, via sistema L-arginina/ óxido nítrico na fase inflamatória da formalina, dopaminérgicos D_2 na fase neurogênica da formalina e adenosínico na fase inflamatória da formalina;
- ✓ A HPA - 05 foi capaz de reduzir a quantidade de leucócitos e neutrófilos para cavidade intraperitoneal dos animais indicando uma atividade anti-inflamatória.

PERPECTIVAS

7 PERSPECTIVAS

HPA-05 é uma substância promissora no que diz respeito às propriedades apresentadas, tais como atividade antinociceptiva, anticonvulsivante e anti-inflamatória, portanto revela importantes propriedades para o desenvolvimento de um novo fármaco. Atualmente encontra-se em patente, por isso poucos estudos foram desenvolvidos, será necessária a continuidade dos estudos com esse derivado imidazolidínico, devendo-se fazer estudos mais específicos para comprovar seus mecanismos de ação, utilizando outras técnicas *in vitro*, como *patch clamp* e *single sucrose gap*. Também será necessária a realização de testes biológicos com HPA-05, por outras vias de administração. Estes poderão garantir a segurança do seu uso sem, no entanto causar prejuízos ao organismo, como alterações sanguíneas ou danos teciduais em órgãos vitais.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADAMS, D. H.; NASH, G. B. Disturbance of leucocyte circulation and adhesion to the endothelium as factors in circulatory pathology. **British Journal of Anaesthesia**. v. 77, p. 17-31, 1996.

ADEREM, A.; SMITH, K. D. A systems approach to dissecting immunity and inflammation. **Seminars in Immunology**. v.16, p. 55-67, 2004.

ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: Fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 357p., 2006.

ANCA, J.M.; LAMELA, M., CALLEJA, J.M. Activity on the central nervous system of *Himantalia elongata*. **Planta médica**, v. 59, p. 218-21, 1993.

AOKI, M.; TSUJI, M.; TAKEDA, H.; HARADA, Y.; NOHARA, J.; MATSUMIYA, T.; CHIBA, H. Antidepressants enhance the antinociceptive effects of carbamazepine in the acetic acid-induced writhing test in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 550, p. 78–83, 2006.

ARICIOGLU, F.; KORCEGEZ, E.; BOZKURT, A.; OZYALCIN, S. Effect of agmatine on acute and mononeuropathic pain. **The New York Academy of Sciences**, v. 1009, p. 106–115, 2003.

ATTAL, N. Chronic neuropathic pain: mechanisms and treatment. **Clinical Journal of Pain**, v. 16, p. 118–130, 2000.

BACKONJA, M. M. Use of anticonvulsants for treatment of neuropathic pain. **Neurology**, v. 59, p.14–17, 2002.

BALDESSARINI, R. J.; TARAIZI, F. I. Tratamento Farmacológico da Psicose e da Mania. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 11ª Ed. Rio de Janeiro: Ed. McGraw Hill, Cap. 18, p. 411-446, 2006.

BARNES, P. J.; ADOKC, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends in Pharmacological Sciences**. v.14, p. 436-441, 1993.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinas: As bases moleculares da ação dos fármacos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v.139, p.267-284, 2009.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R.; RODRIGUES, A. L.; CRECZYNSKI - PASA, T. B.; CALIXTO, J.B. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone in formalin capsaicin and glutamate test. Study of supraspinal of the mechanism of action. **Eur. J. Pharmacol**, v. 233-245, 1998.

BENEDETTI, M. S.; RUTY, B.; BALTES, E. Induction of endogenous pathway by antiepileptics and clinical implications. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 19, p. 511–529, 2005.

BERTOLUCCI, P. H. F.; FERRAZ, H. B.; FELIX, E. P. V.; PEDROSO, J. L. **Guia de Neurologia**. São Paulo: Manole, 1140p. 2011.

BESSON, P.; PERL, E. R. Responses of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. **Journal of Neurophysiology**. 32:1025-1043, 1969.

BHALLA, S.; RAPOLAVICIUTE, V.; GULATI, A. Determination of alpha(2)-adrenoceptor and imidazoline receptor involvement in augmentation of morphine and oxycodone analgesia by agmatine and BMS182874. **European Journal Pharmacology**, v. 651, p. 109–121, 2011.

BLANCO, M. M.; COSTA, C. A. R. A.; FREIRE, A. O.; SANTOS JÚNIOR, J. G.; COSTA, M. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. **Phytomedicine**, p. 2-6, 2007.

BRAINER-LIMA, Opioides e receptores de membrana celular. Revisão atualizada. **Neurobiologia**. v.4,p.149-158, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME. 7.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 250 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRAUN-FILHO, J. L.; BRAUN, L. Dor aguda. **Dor, Diagnóstico & Tratamento**, v. 1, p. 3-14, 2004.

BUCKMAN, S. G. et al. Increased elevated plus-maze open-arm time in mice during spontaneous morphine withdrawal. **Behav. Brain Res.**, v. 197, p. 454-456, 2009.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179, 2000.

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

CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M. Inflammatory pain: kinins and antagonists. **Current Opinion in Anesthesiology**, v. 14, p. 519-526, 2001.

CARVALHO, F. L. **Avaliação psicofarmacológica do derivado imidazolidínico IM-7 em camundongos**. 2011. 119f. Dissertação (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia) – UFPB/CCS/LTF, João Pessoa, 2011.

COOK, D.L.; The B-cell response to oral hypoglycemic agents. **Diabetes Res Clin Prac**, 28(suppl): S81-9, 1995.

CORNÉLIO, A. M.; NUNES - DE - SOUZA, R. L. Open elevated plus maze-induced antinociception in rats: A non-opioid type of pain inhibition? **Physiol. Behav.**, v. 96, p. 440-447, 2009.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Doenças da imunidade. In: SCHOEN, F. J. (Ed.). **Robbins patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

COURTEIX, C.; PRIVAT, A. M.; PELISSIER, T.; HERNANDEZ, A.; ESCHALIER, A.; FIALIP, J. Agmatine induces antihyperalgesic effects in diabetic rats and a superadditive interaction with R(-)-3-(2-carboxypiperazine-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid, a N-methyl-D-aspartate-receptor antagonist. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 322, p. 1237-1245, 2007.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, L. T.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of American**. v. 99, p. 13926-13931, 2002.

CHAUDHARY, U. J.; DUNCAN, J. S.; LEMIEUX, L. A. A dialogue with historical concepts of epilepsy from the Babylonians to Hughlings Jackson: Persistent beliefs. **Epilepsy and Behavior**, v. 21. p. 109-114; 2011.

CHEN, S. W. et al., Possible anxiolytic effects of taurine in the mouse elevated plus-maze. *Life Sci*, v. 75, p. 1503-1511, 2004.

DAMAS, J.; BOURDON, V.; REMACLE-VOLON, G.; ADAM, A. Kinins and peritoneal exudates induced by carrageenin and zymosan in rats. **British Journal of Pharmacology**. v.101, p.418-422, 1990.

DE CASTRO FRANCA, S.; CORREA, M. M.; DOS SANTOS SCHIVO, I. R.; GARCIA LEME, J.; GIGLIO, J. R. A low molecular weight proinflammatory factor from rat spleen lymphocytes. Isolation and partial characterization. **Inflammation**, v. 30, n. 3-4, p. 87-96, 2007.

DELEO, J. A. Basic science of pain. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 88-A, supplement 2, p. 58-62, 2006.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenin and turpentine. **Journal of Pathology**. v.104, p.15-29, 1971.

DICKENSON, A. H. Plasticity: implications for opioid and othes pharmacological interventions in specific pain states. **Behavioral and Brain Science**, v. 3, p. 392 - 403, 1997.

DOGRUL, A.; COSKUN, I.; UZBAY, T. The contribution of alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in peripheral imidazoline and adrenoceptor agonist-induced nociception. **Anesthesia & Analgesia**, v. 103, p. 471–477, 2006.

DOGRUL, A.; GARDELL, L. R.; OSSIPOV, M. H.; TULUNAY, F. C.; LAI, J.; PORRECA, F. Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. **Pain**. v.105, p. 159 – 168, 2003.

DRAY, A.; PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends in Neurosciences**, v. 16, p. 99-104, 1993.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia**. v. 75, n.2, 125-13,1995.

DUBNER, R.; BENNETT, G. J. Spinal mechanisms of nociception. **Annual Review of Neuroscience**, 6: 11-14,1983.

DURÁNTEZ, E. R.; TORRECILLA, M.; PINEDA, J. & UGEDO, L. Attenuation of acute and chronic effects of morphine by the imidazoline receptor ligand 2-(2-benzofuranyl)-2-imidazoline in rat locus coeruleus neurons. **British Journal of Pharmacology**, v. 138, p. 494, 2003.

EISENACH, J.C. Alpha2 agonists and analgesia. **Exp. Opin. Invest. Drugs** 3: 1005–1010, 1994.

ENNA, S.J.; MCCARSON, K.E. The role of GABA in the mediation and perception of pain. **Advances in Pharmacology**, v.54, p.1-27, 2006.

FAGGION, S. A.; CUNHA, A. O. S.; FACHIM, H. A.; GAVIN, A. S.; SANTOS, W. F.; PEREIRA, A. M. S.; BELEBONI, R. O. Anticonvulsant profile of the alkaloids (+) - erythravine and (+)-11- α -hydroxy--erythravine isolated from the flowers of *Erythrina mulungu* Mart ex Benth (Leguminosae - Papilionaceae). **Epilepsy & Behavior**, v. 20, p. 441-446, 2011.

FAIRBANKS, C. A.; SCHREIBER, K. L.; BREWER, K. L.; YU, C. G.; STONE, L. S.; KITTO, K. F.; NGUYEN, H. O.; GROCHOLSKI, B. M.; SHOEMAN, D. W.; KEHL, L. J.; REGUNATHAN, S.; REIS, D. J.; YEZIERSKI, R. P.; WILCOX, G. L. Agmatine reverses pain induced by inflammation, neuropathy, and spinal cord injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, U. S. A. v. 97, p. 10584–10589, 2000.

FANTONE, J. C.; WARD, P. A. Inflamação. In: RUBIN, E.; FARBER, J. L. **Patologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 2, p. 32-73, 2002.

FERREIRA, S. H. Hiperálgia inflamatória óxido nítrico y control periférico Del dolor. **Revista Latino Americana de Dolor**. v. 1, n. 2, p. 6-17, 1995.

FIELDS, W. L. Understanding how opioids contribute to reward and analgesia. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v. 32, n. 3, p. 242-246, 2007.

FURST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**. v. 48, p. 129-41, 1999.

GADOTTI, V. M.; TIBOLA, D.; PASZCUK, A. F.; RODRIGUES, A. L.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. Contribution of spinal glutamatergic receptors to the antinociception caused by agmatine in mice. **Brain Research**, v. 1093, p. 116–122, 2006.

GALEOTTI, N.; GHELARDINI, C.; VINCI, M.C.; BARTOLINI, A. Role of potassium channels in the antinociception induced by agonists of alpha2-adrenoceptors. **British Journal of Pharmacology**, v.126, p.1214-1220, 1999.

GILBERT, A. K.; HOSZTAFI, S.; MAHURTER, L.; PASTERNAK, G. W. Pharmacological characterization of dihydromorphine, 6-acetyldihydromorphine and dihydroheroin analgesia and its differentiation from morphine. **European Journal of Pharmacology**. v. 25, p. 123-130, 2004.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory solution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews**. 3: 104 – 416, 2004.

GOODMAN, GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2006.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. **Fundamentos de psicofarmacologia**. São Paulo: Atheneu, p. 135, 2001.

GREEN, G.M.; DICKENSON, A. GABA-receptor control of the amplitude and duration of the neuronal responses to formalin in the rat spinal cord. **European Journal of Pain**, v.1, p.95-104, 1997.

GRICHNIK, K.P.; FERRANTE, F.M. The difference between acute and chronic pain. **Mount Sinai Journal of Medicine**, v.58, p.217-220, 1991.

GRIFFIN, R. S.; WOOLF, C. J. Farmacologia da analgesia. In: GOLAN, D. E.; TASHJIAN-JÚNIOR, A. H.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W. **Princípios de Farmacologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 16, p. 240-259, 2009.

GRUNDMANN, O. et al. Kaempferol from the leaves of *Apocynum venetum* possesses anxiolytic activities in the elevated plus-maze test in mice. **Phytomedicine**, v. 16, p. 295-302, 2009.

GUERRA, A. S.; MALTA, D.J.; LARANJEIRA, L. P.; MAIA, M. B.; COLAÇO, N. C.; DE LIMA, M.D.O.C; GALDINO, S. L.; PITTA, I. D. A. R.; GONÇALVES-SILVA, T. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indole-imidazolidine derivatives. **Int. Immunopharmacol.** v. 11. p. 1816-22. 2011.

GUIEU, R.; PERAGUT, J. C.; ROUSSEL, P.; HASSANI, H.; SAMPIERI, F.; BECHIS, G.; GOLA, R.; ROCHAT, H. Adenosine and Neuropathic Pain. **Pain**, v. 68, p. 271-274, 1996.

GUTMAN, G.A. et. al. International Union of Pharmacology: XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. **Pharmacology Reviews**, v. 55, p. 583–586, 2003.

GUY, E.R.; ABBOTT, F.V. The behavioral response to formalin in preweanling rats. **Pain** 51: 81-90, 1992.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia medica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1008p. 2002.

HALARIS, A.; PLIETZ, J. Agmatine: metabolic pathway and spectrum of activity in brain. **CNS Drugs**, v. 21, p. 885–900, 2007.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W.; GILMAN, A. G. Goodman & Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9. ed. México: McGraw-Hill, 1996.

HELMS, J.E.; BARONE, C.P. Physiology and treatment of pain. **Critical Care Nurse**, v.28, p.38-49, 2008.

HENRY, J.L.; YASHPAL, K.; PITCHER, G.M.; CODERRE, T.J. Physiological evidence that the interphase in the formalin test is due to active inhibition. **Pain** 82: 57–63, 1999.

HOLE, K.; TJØLSEN, A. The tail-flick and formalin tests in rodents: changes in skin temperature as a confounding factor. **Pain** 53: 247-254, 1993.

HOWE, J.R.; WANG, J.T.; YAKSH, T.L. Selective antagonism of the antinociceptive effect of intrathecally applied α -adrenergic agonists by intrathecal prazosin and intrathecal yohimbine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 224: 552–558, 1983.

HUNG, O. L.; SHIH, R. D. Antiepileptic Drugs: The Old and the New. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 29, p. 141-150, 2011.

HUNSKAAR S, HOLE K. The formalin test in mice: dissociation between Inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain.** 30:103– 14. 1987.

KANEKO, M.; HAMMOND, D. L. Role of spinal gamma-aminobutyric acid A receptors in formalin-induced nociception in the rat. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 282, n. 2, p. 928-938, 1997.

KATRITZKY, A. R.; REES, C. W.; SCRIVEN, E. F. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, Eds. Pergamon Press, Oxford 1996, vol.3,5. b) BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. F. Química Medicinal: **As bases moleculares de ação dos fármacos**. Artmed Editora, Porto Alegre, RS, 2001, p.53-81.

KLAUMANN, P.R.; WOUK, A.F.P.F.; SILLAS, T. Pathophysiology of Pain. **Archives of Veterinary Science**, v.13, p. 1-12, 2008.

KUPFERBERG, H.J.; SCHMUTZ, M. Screening of nem compounds and the role of the pharmaceutical industry. In: Engel J, Pedley T (eds.). *Epilepsy: A comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1417-34, 1997 in ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: Fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 357p. 2006.

LIRA, S. R. S. **Efeitos farmacológicos do extrato etanólico de *Combretum leprosum* Mart. & Eicher sobre o sistema nervoso central**. 2001. 70f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

LISTER, R. G., The use of plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, v. 92, p. 180-185, 1987.

LÖSCHER W., SCHMIDT D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. **Epilepsy Research**, v. 50, p.3–16, 2002.

LOWSON, S.; GENT, J.P.; GOODCHILD, C.S. Convulsive thresholds in mice during the recovery phase from anesthesia induced by propofol, thiopentone, methohexitone and etomidate. **British Journal of Pharmacology**, v. 102(4), p. 879-82, 1991.

JASMIN, L.; WU, M.V.; OHARA, P.T. GABA puts a stop to pain. **Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorder**, v.3, p.457-505, 2004.

JAIN, K. D. Modulators of nicotinic acetylcholine receptors as analgesics. **Curr. Opin. Investig. Drugs.**, v. 5, p. 76-78, 2004.

JONES, S. L. Anatomy of pain. In: Sinatra, R.S.; Hord, A.H. Ginsberg.; Prebele, L. **Acute pain mechanisms & management**. St. Louis: Mosby- Year Book, 1992.

JENSEN, T.S. Anticonvulsants in neuropathic pain: rationale and clinical evidence. **European Journal of Pain**, v. 6, p. 61–68, 2002.

JESSEL, T. M.; KELLY, D. D. Pain and Analgesia. In: New York: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Principles of Neuroscience**. 3^a Ed. Elsevier, 1992.

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

LIM, R. F.; HILTY, D. M.; JERANT, A. F. An algorithm for treating psychotic disorders in primary care. **Primary Psychiatry**, v. 8, n. 8, p. 68–72, 2001.

LIRA, S. R. S. **Efeitos farmacológicos do extrato etanólico de *Combretum leprosum* Mart. & Eicher sobre o sistema nervoso central**. Dissertação de Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (Mestre em Farmacologia) - 70^f Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2001.

LOESER, J.D.; MELZACK R. Pain: an overview. **Lancet**. p. 1607-09, 1999.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs: Innovative strategies. **Epilepsy Research**, v. 69, p. 183-272, 2006.

MACHELSKA, H.; STEIN, C. Immune mechanisms in pain control. **Anesthesia & Analgesia**. v.95, p.1002-1008, 2002.

McQUAY, H. J. Anticonvulsant drugs for management of pain: a systematic review. **British Medical Journal**, v. 311, p. 1047-1052, 1995.

McQUAY, H. J. Antidepressants and chronic pain. Effective Analgesia in Neuropathic Pain and other Syndromes. **British Medical Journal**, v. 314, p. 763, 1997.

MALAN, T.P.; MATA, H.P.;PORRECA, F. Spinal GABA(A) and GABA(B) receptor pharmacology in a rat model of neuropathicpain. **Anesthesiology**, v.96, p.1161-1167, 2002.

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

MATSUMOTO, R.R. GABA receptors: are cellular differences reflected in function? **Brain Research Reviews**, v.14, p.203-225, 1989.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n.7203, p. 428-35, 2008.

MELLER, S.T.; GEBHART, G.F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain** 52: 127-36, 1993.

MELO, C. M. **Estudo da atividade antiinflamatória e antinociceptiva do ácido hawthornico, derivado de *Egletes viscosa* Less, em camundongos:** possíveis mecanismos. Dissertação de Mestrado em Farmacologia (Mestre em Farmacologia) - 97f Universidade Federal do Ceará. Ceará, Fortaleza, 2006.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v. 150, n. 699, p. 971-79, 1965.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. **Classification of chronic pain:** descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms, Seattle: IASP Press, 1994.

MEYER, R. A; CAMPBELL, J. N; RAJA, S. N. Peripheral mechanisms of pain. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994.

MILLAN, M. J. The role of descending noradrenergic and serotonergic pathways in the modulation of nociception: focus on receptor multiplicity. In: DICKENSON, A.;

BESSION, J. M. The Pharmacology of Pain. **Handbook of Experimental Pharmacology**, Berlin: Springer Verlag, 1997.

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

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

MOORE, P.K.; OLUYOMI, A.O.; BABBEDGE, R.C.; WALLACE, P.; HART, S.L. L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **Br. J. Pharmacol.** 102: 198-202, 1991.

MORAES, D. S. C.; CAMARGO, E. A. Antidepressivos e anticonvulsivos utilizados no tratamento da dor neuropática. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 77, p. 44-47, 1999.

MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunol Rev**, v. 226, p. 205-18, 2008.

MOTA, V. G., **Estudos Psicofarmacológicos de *Dioclea virgata* (Rich.) Amshoff (Fabaceae) em Modelos Animais**, Dissertação de Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (Mestre em Farmacologia), 118f. – Universidade Federal da Paraíba – João Pessoa, 2008.

NIES, AS.; SPIELBERG, SE Principles of Therapeutics. In: GOODMAN ; GILMAN'S. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9th New York, Mc Graw-Hill, 1996.Cap.3, p.43-62.

OBARA, I.; MAKUCH, W.; SPETEA, M.; SCHÜTZ, J.; SCHMIDHAMMER, H.; PRZEWLOCKI, R.; PRZEWLOCKA, B. Local peripheral antinociceptive effects of 14-O-methyloxymorphone derivatives in inflammatory and neuropathic pain in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 558, p. 60-67, 2007.

OCAÑA, M.; CENDÁN, C.M.; COBOS, E.J.; ENTRENA, J.M.; BAEYENS, J.M. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities **European Journal of Pain**, v. 500, p.1-3, 2004.

OGA, S.; BASILE, AC. **Medicamentos e suas interações**. São Paulo, Atheneu, 1994.

OLIVEIRA F. A.; ALMEIDA R.N.; SOUSA M. F. V.; BARBOSA-FILHO J.M.; DINIZ S.A.; MEDEIROS I.A.; Anticonvulsant properties of N-salicyloyltryptamine in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.68, p.199-202, 2001.

OLIVEIRA, L. F. Farmacologia da Dor. In: CAVALCANTI, I. L.; MADALENA, M. L. **Dor**. Rio de Janeiro: sociedade de Anestesiologia do Estado do Rio de Janeiro, p. 37-52, 2003.

OLIVEIRA, S. M.; SILVA, J. B. P.; HERNANDES, M. Z.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R. Estrutura, reatividade e propriedades biológicas de hidantoínas. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 614-622, 2008.

OLIVEIRA, L. E. G. **Estudo da atividade psiscofarmacológica do Tetrahidrolinalol em roedores e seus possíveis mecanismos de ação**. Tese de Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, 152p. – Universidade Federal da Paraíba – João Pessoa, 2010.

ONAL, A.; SOYKAN, N. Agmatine produces antinociception in tonic pain in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 69, p. 93–97, 2001.

PASZCUK, A. F.; GADOTTI, V. M.; TIBOLA, D.; QUINTAO, N. L.; RODRIGUES, A. L.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. Anti-hypernociceptive properties of agmatine in persistent inflammatory and neuropathic models of pain in mice. **Brain Research**, v. 1159, p. 124–133, 2007.

PELLOW, S. et al. Validation of open: closed arms entries in an elevated plus-maze measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

PEREIRA, R.; MEDEIROS, Y. S.; FRODE, T. S. Antiinflammatory effects of Tacrolimus in a mouse model of pleurisy. **Transpl Immunol**, v. 16, n. 2, p. 105-11, 2006.

PERKINS, N. M., TRACEY, D. J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. **Neuroscience**. v.101, p. 745 – 757, 2000.

POLATIN, P. B.; DERSH, J. D. Psychotropic medication in chronic spinal disorders. **The Spine Journal**, v. 4, p. 436-450, 2004.

PINTO, M. S. C. T. A percepção da dor receptores envolvidos. **Revista da Faculdade de Medicina de Lisboa**, v. 5, p. 253-262, 2000.

PORFIRE, A.S.; PÂRVU, A.E.; DAICOVICIU, D.; LEUCUTA, S.E. Evaluation of antiinflammatory activity of liposome encapsulated superoxide dismutase in rats peritonitis. **Farmacia**, v.57 p.412-423, 2009.

QUEIROZ, R. B. **Evidências pré-clínicas da ação antinociceptiva do 3-fenil 5-(4-etilfenil)-imidazolidina-2,4-diona**. 2011. 96f. Dissertação (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia) – UFPB/CCS/LTF, João Pessoa, 2011.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; AGRA, M. F.; SOUZA, M. F. V.; BARBOSA-FILHO, J. M. Avaliação da atividade anticonvulsivante de plantas do Nordeste Brasileiro. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 21, p. 179-184, 2002.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; ALMEIDA, J. R. G. S.; LIMA, J. T.; NUNES, X. P.; SIQUEIRA, J. S.; OLIVEIRA, L. E. G.; ALMEIDA, R. N.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Plants with anticonvulsant properties - a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18. p. 798-819, 2008.

RABBANI, M.; SAJJADI, S. E.; MOHAMMADI, A. Evaluation of the anxiolytic effect *Nepeta persica* Boiss, in mice. **eCAM**, v. 2, p. 181-186, 2008.

RAINVILLE, P. Brain mechanisms of pain affect and pain modulation. **Current Opinion Neurobiology**, v. 12, p. 195-204, 2002.

RANG, H. P. et al. Rang & Dale. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 778p., 2012.

RAUPP, I. M. et AL. Anxiolytic-like effect of chronic treatment with *Erythrina velutina* extract in the elevated plus-maze test. **J. Ethnopharmacol.**, v. 118, p. 295-299, 2008.

REIS, D. J.; REGUNATHAN, S. Agmatine: a novel neurotransmitter? **Advances in Pharmacology**, v. 42, p. 645–649, 1998a.

REIS, D. J.; REGUNATHAN, S. Agmatine: an endogenous ligand at imidazoline receptors may be a novel neurotransmitter in brain. **Journal of the autonomic nervous system**, v. 72, p. 80–85, 1998b.

REITAN, J. F. Current concepts in managing câncer pain. **Drug Benefit Trend**. v. 8, p.37-48, 1996.

REN, K.; DUBNER, R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. **Nature Medicine**. v. 16, p.1267-1276, 2010.

RENTON, T. An update on pain. **British Dental Journal**, v. 22, p. 335-338, 2008.

ROBERTS II, L. J.; MORROW, J. D. Analgésico-antipiréticos, agentes antiinflamatórios e fármacos utilizados no tratamento da gota. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (Ed.). **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.

ROSENBERG, H. F.; GALLIN, J. I. Inflammation. In: PAUL, W. E. (Ed.). **Fundamental immunology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999.

ROTHROCK, J. F. Clinical studies of valproate for migraine prophylaxis. **Cephalalgia**, v. 17, p. 81-83, 1997.

SANTOS, A. R.; GADOTTI, V. M.; OLIVEIRA, G. L.; TIBOLA, D.; PASZCZUK, A. F.; NETO, A.; SPINDOLA, H. M.; SOUZA, M. M.; RODRIGUES, A. L.; CALIXTO, J. B. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. **Neuropharmacology**, v. 48, p. 1021–1034, 2005.

SAKATA, R. K.; GOZZANI, J. L. Fisiopatologia da dor. **Revista brasileira de Medicina**, v. 51, p.3-11, 1994.

SALGADO, P. R. R. **Avaliação da atividade antinociceptiva central de HPA-05: um derivado imidazolidínico**. 2011. 138f. Dissertação (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Farmacologia) – UFPB/CCS/LTF, João Pessoa, 2011.

SAKUTA, H.; OKAOKAMOTO, K. Inhibition by imidazoline and imidazolidine derivatives of glibenclamide-sensitive K⁺ currents in *Xenopus* oocytes. **Eur J Pharmacol**. Jul 11; 259(3):223-31., Saitama, Japan. 1994.

SEVOSTIANOVA, N.; ZVARTAU, E.; BESPALOV, A.; DANYSZ, W. Effects of morphine on formalin-induced nociception in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 462, p. 109-113, 2003.

SOUZA, G. E. P.; FERREIRA, S. H. Blockade Antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Ag Actions**. v. 17, p. 97-103, 1985.

SOUZA, S. S; VOLTARELLI, J. C.; FERRIANI, R. A. Imunologia da reprodução humana. **Imunologia Clínica**. 30: 277-288, abr./jun, 1997.

SAWYNOK, J.; REID, A. R.; DOAK, G. J. Caffeine antinociception in the rat hot plate and formalin tests and locomotor stimulation: involvement of noradrenergic mechanisms. **Pain**, v. 61, p. 203 - 213, 1995.

SAWYNOK, J.; ESSER, M. J.; REID, A. R. Antidepressants as analgesics: an overview of central and peripheral mechanisms of action. **Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN**, v. 26, n. 1, p. 21–29, 2001.

SCHATZBERG, A. F.; COLE, J. O.; DEBATTISTA C. **Manual of clinical Psychopharmacology**. 4. ed. Washington, DC: American Psychiatric Publishing, 2003.

SCHOFFERMAN J. The use of medications for low back pain. In: Cole, A. J.; Herring, S. A., editors. **The low back pain handbook**. 2. ed. Philadelphia, PA: Hanley and Belfus, 2003.

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

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain** 38: 347-352, 1989.

SHIELDS, S. D.; CAVANAUGH, D. J.; LEE, H.; ANDERSON, D. J.; BASBAUM, A. I. Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. **Pain**, v. 151, p. 422-429, 2010.

SMITH, M; WILCOX, K. S.; WHITE, H. S. Discovery of Antiepileptic Drugs. **Neuro Therapeutics**, v. 4, p. 12-17, 2007.

SOUTO MAIOR, F. N., **Atividade ansiolítica e antinociceptiva do óxido de linalol em Modelos Animais**, Tese de Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos

Bioativos (Doutor em Farmacologia), 105f. – Universidade Federal da Paraíba – João Pessoa, 2011.

SPANSWICK, C.; MAIN, C. **Pain management:** an interdisciplinary approach. Churchill Livingstone: Edinburgh, p. 93; 2000.

STAMFORD, J. A. Descending control of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v.75, p. 217-227, 1995.

STEFAN, H.; PAULINI-RUF, A.; HOPFENGÄRTNER, R.; RAMPP, S. Network characteristics of idiopathic generalized epilepsies in combined MEG/EEG. **Epilepsy Research**, v. 85, p. 187 - 198, 2009.

SZTANKE, K.; FIDECKA, S.; KEDZIERSKA, E.; KARZMARZYK, Z.; PIHLAJA, K.; MATOSIUK, D. Antinociceptive activity of new imidazolidine carbonyl derivatives. Part 4. Synthesis and pharmacological activity of 8-aryl-3,4-dioxo-2H,8H-6,7-dihydroimidazo[2,1-c] [1,2,4]triazines. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 40, p. 127-134, 2005.

TAIWO, Y. O.; LEVINE, J. D. Further confirmation of the role of adenylyl-cyclase and of AMPc-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. **Neuroscience**, v. 44, p. 131-135, 1991.

TATSUO, M.A.; YOKORO, C.M.; SALGADO, J.V.; PESQUERO, S.M.; SANTANA, M.A.; FRANCISCHI, J.N. Hyperalgesic effect induced by barbiturates, midazolam and ethanol: pharmacological evidence for GABA-A receptor involvement. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, p.251-256, 1997.

TAYLOR, P. Agentes que atuam na junção neuromuscular e nos gânglios autônomos. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005. cap. 9, p.147-162.

TEIXEIRA, M. L.; FIGUEIRÓ, J. A.; YENG, L. T.; PIMENTA, C. A. M. Tratamento multidisciplinar do doente com dor. In: CARVALHO, M. M. M. J. **Dor um estudo multidisciplinar**. 1. ed. São Paulo: Summus, 380p, 1999.

TEIXEIRA, M.J. Physiopathology of nociception and pain suppression. JBA, Curitiba, v.1, n.4, p.329-334, Oct./Dec. 2001.

TORTORIELLO, J. ORTEGA, A. Sedative effect of galphimine B, a norsecotriterpenoid from *Galphimia glauca*. *Planta Medica*, v. 59, p. 398-400, 1993 *in* ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: Fundamentos práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 357p., 2006.

TJØLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: DICKENSON, A.; BESSON, J. M. (Ed.). **The pharmacology of pain**. Berlin: Springer-Verlag, p. 1-20. 1997.

TJØLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain** 51: 5-17, 1992.

THOMAS, G. Química Medicinal - Uma Introdução. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

TRACEY, I.; MANTYH, P. W. The Cerebral Signature for Pain Perception and Its Modulation. **Neuron Review**, v. 55, p. 377-391, 2007.

VALE, F. M. Dor – Novos aspectos fisiopatológicos e conseqüentes estratégias farmacológicas. **Revista da Faculdade de Medicina de Lisboa**, Série III, v. 5, n. 5, p. 291-304, 2000.

VAN DIJKEN, H.; DIJK, J.; VOOM, P.; HOLSTEGE, J.C. Localization of dopamine D₂ receptor in rat spinal cord identified with immunocytochemistry and in situ hybridization. **Eur. J. Neurosc.** 8: 621 - 628, 1996.

VELISEK, L.; VERESOVÁ, S.; PÔBISOVÁ, H.; MARES, P. Excitatory amino acid antagonist and pentylenetetrazol-induced seizures during ontogenesis II: the effects of MK-801. **Psychopharmacology**, v. 104, p. 510-4, 1991.

VENÂNCIO, A. M. **Toxicidade aguda e atividade antinociceptiva do óleo essencial do *Ocimum basilicum* L. (manjeriço), em mus *Musculus (camundongos)***. 2006. Dissertação do Mestrado da Universidade Federal de Sergipe, Aracajú, SE, 2006.

VANE, J. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biology** 231:232-239, 1971.

VANE, J.; BOTTING, R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **FASEB Journal**. v.1, p. 89-96, 1987.

VANE, J, Towards a better aspirin. **Nature**. v. 367, p. 215-216, 1994.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. New insights into the mood of antinflammatory drugs. **Inflammation Research**. v. 44, p. 1-10, 1995.

VILELA FILHO, O. Dor: anatomia funcional, classificacao e fisiopatologia. **Jovem Medico**, v. 2, p. 125-132, 1998.

VIVIER, E.; MALISSEN, B. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. **Nature Immunology**. v. 6, n. 1, p. 17-21, 2005.

WAISBROD, H. *et al.* Chronic pain in paraplegics. **Neurosurgery**, v.15, p.993-994, 1984.

WALL, P.D., MELZACK, R. **Textbook of pain**. 4. ed. New York: Churchill Livingstone, 1999.

WATANABE, H.; ZHAO, Q.; MATSUMOTO, K.; TOHDA, M.; MURAKAMI, Y.; ZHANG, S.H.; KANG, T.H.; MAHAKUNAKORN, P.; MARUYAMA, Y.; AKAKIBARA, I.; AIMI, N.; TAKAYAMA, H. Pharmacological evidence for antidementia effect of Chotosan (Gouteng-san), a traditional Kampo medicine. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 75: 635-643, 2003.

WATKINS, L.R., MAIER, S.F. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. **Physiological Reviews**. v. 82, p. 981 - 1011, 2002.

WELCH, S. P.; MARTIN, B. R. Analgésicos opióides e não-opióides. In: CRAIG, C.; STITEL, R. E. **Farmacologia moderna com aplicações clínicas**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, cap. 26, p. 290-308.

WOOLF, C. J.; MANNION, R. J. **Neuropathic pain**: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *The Lancet*, v. 353, n. 9168, p. 1959-1964, 1999.

WHO. Model List of Essential Medicines (EML). 16. ed. 43 p, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/Updated_sixteenth_adult_list_en.pdf>. Acesso em: 08 nov. 2010.

WU, N.; SU, R. B.; LI, J. Agmatine and imidazoline receptors: their role in opioid analgesia, tolerance and dependence. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 28, p. 629–641, 2008.

WU, W. P.; HAO, J. X.; HALLDNER, L.; LOVDAHL; C.DELANDER, G. E.; WIESENFELD - HALLIN, Z.; FREDHOLM, B. B.; XU, X. J. Increased nociceptive response in mice lacking the adenosine A1 receptor. **Pain**. V. 113.p. 395-404. 2005.


YOSHIMURA, M.; FURUE, H. Mechanisms for the antinociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. **Journal of Pharmacological Science**, v. 101, p. 107-117, 2006.

ZEILHOFER, H.U. Loss of glycinergic and GABAergic inhibition in chronic pain—contributions of inflammation and microglia. **International Immunopharmacology**, v.8, p.182-187, 2008.


ZEILHOFER, H.U.;MÖHLER, H.; DI LIO, A. GABAergic analgesia: new insights from mutant mice and subtype-selective agonists. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.30, p.397-402, 2009.

ZEILHOFER, H.U.; WILDNER, H.; YÉVENES, G.E. Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. **Physiological Reviews**, v.92, p.193-235, 2012.

ANEXOS

Anexo I - Certidão da comissão de ética no uso de animais

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO

João Pessoa, 25 de julho de 2012.
CEUA Nº 1105/12

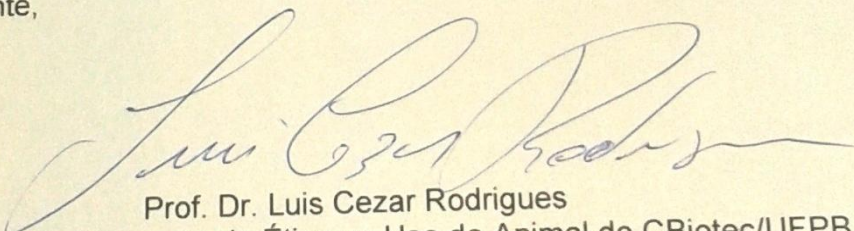
Ilmo(a). Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Departamento Fisiologia e Patologia - CCS - UFPB

Orientando(a) : Ana Karina Holanda Leite Maia

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **25/07/12** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PSICOFARMACOLÓGICOS DE COMPOSTOS IMIDAZOLIDÍNICOS EM CAMUNDONGOS.**

Com previsão de empregar **488** animais - **Camundongos.**
Para serem utilizados no período de **01/03/2012** a **30/03/2014**

Atenciosamente,



Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – CBiotec
Centro de Biotecnologia – Universidade Federal da Paraíba
<https://sites.google.com/site/ceuacbiotec/> – ceua@cbiotec.ufpb.br

Anexo II - Resumos publicados em anais de eventos científicos durante o curso do doutorado

1. Resumo 23.124 – PSYCHOPHARMACOLOGICAL EFFECTS OF ERYTHROXYLUM CAATINGAE PLOWMAN foi apresentado na XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, realizado de 24 a 27 de agosto de 2011 no Rio de Janeiro, RJ.
2. Resumo 23.200 – EVALUATION OF THE ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF THE THIOPHENIC 6CN10 DERIVED foi apresentado na XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, realizado de 24 a 27 de agosto de 2011 no Rio de Janeiro, RJ.
3. Resumo - AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CENTRAIS DO METANÓLICO BRUTO DE ERYTHROXYLUM CAATINGAE PLOWMAN EM CAMUNDONGOS foi apresentado no V Simpósio Iberoamericano de Plantas Medicinais, realizado de 18 a 20 de outubro de 2010 em Itajai, SC.
4. Resumo - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CENTRAL DO ÓLEO ESSENCIAL DE LIPPIA MICROPHYLLA (VERBENACEAE) E DO TIMOL EM CAMUNDONGOS foi apresentado no V Simpósio Iberoamericano de Plantas Medicinais, realizado de 18 a 20 de outubro de 2010 em Itajai, SC.
5. Resumo - ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM RATOS CRONICAMENTE TRATADOS COM PRAXELIS CLEMATIDEA R. M. KING & H. ROB foi apresentado no XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, realizado de 14 a 17 de setembro de 2010 em João Pessoa , PB.