

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

IVO SOUZA FERRAZ DE MELO

**4-METIL-BENZENOCARBOTIAMIDA APRESENTA ATIVIDADES EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS DE DOR E INFLAMAÇÃO**

Belo Horizonte

2018

IVO SOUZA FERRAZ DE MELO

**4-METIL-BENZENOCARBOTIAMIDA APRESENTA ATIVIDADES EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS DE DOR E INFLAMAÇÃO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadores:

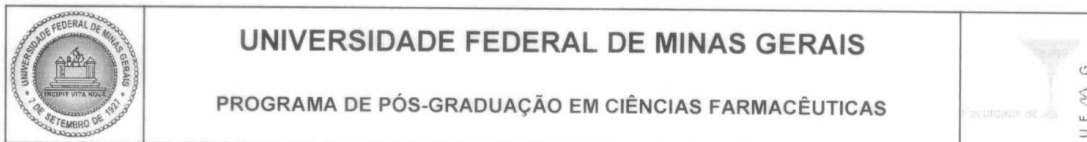
Prof. Dr. Márcio de Matos Coelho

Prof. Dr. Renes de Resende Machado.

Belo Horizonte

2018

(Folha de Aprovação)



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**4-metil-benzenocarbottiamida apresenta atividades em modelos experimentais de dor e inflamação**

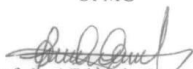
### IVO SOUZA FERRAZ DE MELO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Renes de Resende Machado - Coorientador  
UFMG



Prof. José Eduardo Gonçalves  
UFMG



Prof. Andréa de Castro Perez  
UFMG

Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2018.

Dedico o grau de Mestre

Aos meus pais, Maria Vitória e Ivonito, aos meus irmãos, Isadora e Ivan, à Dona Laura, à Vó Deja e à Tia Lia.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meus irmãos e demais familiares e amigos pelo apoio.

Aos professores, alunos e ex-alunos de pós-graduação e alunos de iniciação científica do laboratório de Farmacologia pela amizade, colaboração e auxílio. Em especial, aos orientadores Márcio de Matos Coelho e Renes de Resende Machado, exemplos de competência e dedicação, pelos ensinamentos, colaboração, paciência e amizade.

À professora Renata Barbosa de Oliveira e à aluna Jéssica Aparecida Vaz, do Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade Farmácia; à professora Luzia Valentina Modolo, do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas; ao aluno Leonardo da Silva Neto, do Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas; e à professora Lirlândia Pires de Sousa e à aluna Izabela Galvão, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia; pelas colaborações na síntese da 4-metil-benzenocarbottiamida e nas avaliações da liberação de H<sub>2</sub>S e da atividade de mieloperoxidase.

À professora Sheila Monteiro Lisboa, pelas valiosas dicas e pela ajuda inestimável durante uma das mais surpreendentes experiências no mestrado, o Estágio em Docência.

A todos os professores de minha vida que, nas andanças de mais de vinte anos de aprendizado, tive a honra de conhecer.

À Maria Adelaide Fernandes e ao José Batista Viturino, pelo profissionalismo, cooperação e grande apoio.

À Geise, por todo companheirismo e paciência, e por tudo que vivemos nesses últimos tempos.

À FAPEMIG, CAPES, CNPq e PRPq/UFMG pelo apoio financeiro.

*“Behind every beautiful thing, there's been some kind of pain”*

Bob Dylan

## RESUMO

O sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) é um gás de baixa massa molecular e modula diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo a inflamação e a dor. Ensaios pré-clínicos têm demonstrado que substâncias que doam H<sub>2</sub>S inibem a liberação de mediadores inflamatórios, o recrutamento de leucócitos, a hiperalgesia e a alodínia mecânica e o edema inflamatório. As tiobenzamidas são substâncias que doam H<sub>2</sub>S e que apresentam atividades em alguns modelos experimentais. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar as atividades da 4-metil-benzenocarbotiamida em modelos experimentais de inflamação e dores nociceptiva, inflamatória e neuropática em camundongos Swiss, bem como os possíveis mecanismos que medeiam essas atividades. A administração da 4-metil-benzenocarbotiamida (100 ou 150 mg/kg, i.p., -30 min) reduziu a resposta nociceptiva induzida por formaldeído (0,92%, 20 µL, i.p.). A segunda fase da resposta nociceptiva foi inibida por ambas as doses, enquanto a primeira fase foi inibida apenas pela maior dose da 4-metil-benzenocarbotiamida. A 4-metil-benzenocarbotiamida não inibiu a resposta nociceptiva induzida por calor (modelo de placa quente, 50 °C). A 4-metil-benzenocarbotiamida (150 mg/kg) atenuou a alodínia mecânica induzida por carragenina (600 µg, 30 µL, i.pl.). A atividade da 4-metil-benzenocarbotiamida nesse modelo experimental foi inibida pela administração prévia de ciproheptadina (5 ou 10 mg/kg, p.o.), mas não de naltrexona (5 ou 10 mg/kg, i.p) ou glibenclamida (20 ou 40 mg/kg, p.o). No modelo de alodínia mecânica induzida por constrição nervo isquiático, a 4-metil-benzenocarbotiamida não apresentou atividade. A atividade motora dos animais, avaliada pelo tempo de permanência na haste girante, não foi prejudicada pela administração da 4-metil-benzenocarbotiamida. A 4-metil-benzenocarbotiamida (50, 100 ou 150 mg/kg) reduziu o edema de pata, a produção de fator de necrose tumoral-α e CXCL1 e a atividade da mieloperoxidase induzidos por carragenina. Foi observado, ainda, que a 4-metil-benzenocarbotiamida libera H<sub>2</sub>S *in vitro*. Concluindo, os resultados do presente estudo demonstram a atividade da 4-metil-benzenocarbotiamida em modelos de inflamação e dores nociceptiva e inflamatória. Os resultados indicam que a atividade da substância está relacionada com a ativação de mecanismos serotoninérgicos e a redução da produção de citocinas e do recrutamento de leucócitos. A demonstração da atividade da 4-metil-benzenocarbotiamida em modelos de dor e inflamação pode estimular a realização de estudos adicionais visando à avaliação dessa molécula como candidata a fármaco útil no tratamento de pacientes com condições dolorosas e inflamatórias.

Palavras-chave: 4-metil-benzenocarbotiamida, sulfeto de hidrogênio, dor, nocicepção, inflamação, edema.

## ABSTRACT

Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) is a low molecular weight gas that mediates several pathophysiological processes, including inflammation and pain. Preclinical assays have demonstrated that H<sub>2</sub>S donors reduce production of inflammatory mediators, recruitment of leukocytes, edema, allodynia and hyperalgesia. Thiobenzamides are H<sub>2</sub>S donors and exhibit activities in many experimental models. Thus, the present study aimed to evaluate the activities of 4-methylbenzenecarbothioamide in experimental models of inflammation, and nociceptive, inflammatory and neuropathic pain in mice, as well as their mechanisms of action. 4-methylbenzenecarbothioamide (100 or 150 mg/kg, i.p., -30 min) reduced the nociceptive response induced by formaldehyde. The second phase of this response was inhibited by both doses, while the first phase was inhibited only by the highest dose. 4-methylbenzenecarbothioamide did not inhibit the nociceptive response induced by heat (hot plate test, 50 °C). Mechanical allodynia induced by carrageenan (600 µg, 30 µl, i.pl.) was attenuated by 4-methylbenzenecarbothioamide (150 mg/kg). The effect induced by 4-methylbenzenecarbothioamide in this model was inhibited by previous administration of cyproheptadine (5 or 10 mg/kg, p.o.), but not by naltrexone (5 or 10 mg/kg, i.p.) or glibenclamide (20 or 40 mg/kg, p.o.). 4-methylbenzenecarbothioamide did not inhibit mechanical allodynia induced by constriction of the sciatic nerve. The motor activity, evaluated by the time mice spent on the rota-rod, was not changed by 4-methylbenzenecarbothioamide. 4-methylbenzenecarbothioamide (50, 100 or 150 mg/kg) inhibited paw edema, production of tumor necrosis factor-α and CXCL1 and myeloperoxidase activity induced by carrageenan. It was also shown that 4-methylbenzenecarbothioamide releases H<sub>2</sub>S *in vitro*. In conclusion, the results of the present study demonstrate the activity of 4-methylbenzenecarbothioamide in different models of inflammation and nociceptive and inflammatory pain. The results indicate that the activity of 4-methylbenzenecarbothioamide involves activation of the serotonergic pathway and reduction of cytokines production and leukocyte recruitment. The demonstration of the activity of 4-methylbenzenecarbothioamide in models of pain and inflammation may stimulate further studies aiming to evaluate this molecule as a potential candidate useful in the treatment of patients with painful and inflammatory disorders.

Keywords: 4-methylbenzenecarbothioamide, hydrogen sulfide, pain, nociception, inflammation, edema.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 - Exemplos de benzotiamidas e polímero ou híbridos que utilizem benzotiamidas como doadoras de H<sub>2</sub>S.....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 2 - Estrutura química da 4-metil-benzenocarbotiamida.....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 3 - Aparato usado para a avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 4 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 5 - Aparato usado para a avaliação da resposta nociceptiva induzida por calor.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 6 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre a resposta nociceptiva induzida por calor.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 7 – Aparato utilizado para a avaliação da alodínia mecânica.....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 8 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina.....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 9 - Escala temporal de avaliação da duração do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 10 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre a alodínia induzida por carragenina em animais previamente tratados com naltrexona, ciproheptadina ou glibenclamida .....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 11 - Escala temporal de avaliação da duração do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre a alodínia mecânica induzida por constrição do nervo isquiático.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 12 - Aparato usado para a avaliação da atividade motora.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 13 – Escala temporal de avaliação dos efeitos induzidos pela 4-metil-benzenocarbotiamida ou pelo fenobarbital sobre a coordenação motora.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 14 - Aparato utilizado para a avaliação do edema de pata.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 15 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre o edema de pata induzido por carragenina.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 16 - Escala temporal de avaliação da duração do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre o edema de pata induzido por carragenina.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 17 - Efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre o comportamento de lambida induzido por formaldeído.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 18 - Efeitos induzidos pela 4-metil-benzenocarbotiamida ou dipirona sobre o tempo de permanência dos camundongos na placa quente.....</b>	<b>55</b>

<b>Figura 19 - Efeitos induzidos pela 4-metil-benzenocarbotiamida ou pela dexametasona sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina.....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 20 - Duração do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 21 – Efeito induzido pela naltrexona sobre a atividade antialodínica da 4-metil-benzenocarbotiamida.....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 22 – Efeito induzido pela ciproheptadina sobre a atividade antialodínica da 4-metil-benzenocarbotiamida.....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 23 – Efeito induzido pela glibenclamida sobre a atividade antialodínica da 4-metil-benzenocarbotiamida.....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 24 - Alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo isquiático.....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 25 – Efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre a alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo isquiático.....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 26 - Efeitos induzidos pela 4-metil-benzenocarbotiamida ou pelo fenobarbital sobre o tempo de permanência dos animais na haste girante.....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 27 - Efeitos induzidos pela 4-metil-benzenocarbotiamida ou pela dexametasona sobre o edema de pata induzido por carragenina.....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 28 - Duração do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre o edema de pata induzido por carragenina.....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 29 - Efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre a concentração de TNF-<math>\alpha</math> e CXCL1 na pata de animais coletada 4 h após a injeção de carragenina.....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 30 - Efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre a atividade da MPO na pata de animais coletada 4 h após a injeção de carragenina.....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 31 – Concentração de H<sub>2</sub>S após incubação da suspensão de 4-metil-benzenocarbotiamida em solução tampão de PBS 100 mM.....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 32 – Hidrólise de tioacetamidas.....</b>	<b>81</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
±	Mais ou menos
3-MST	3-Mercaptopiruvato sulfotransferase
4-HBC	4-Hidróxi-benzenocarbotiamida
4-MBC	4-Metil-benzenocarbotiamida
5-HT	Serotonina
ADT-OH	5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditiolano-3-tiona
AIE	Anti-inflamatório esteroide
AINE	Anti-inflamatório não-esteroide
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
C	Ciproheptadina
CBS	Cistationa β-sintase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFA	Adjuvante Completo de Freund
cm	Centímetro
CMC	Carboximetilcelulose
CO	Monóxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
CSE	Cistationa γ-liase
CXCL-1	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>
Dexa	Dexametasona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
et al.	e outros
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EUA	Estados Unidos da América
G	Glibenclamida
h	Hora
H <sub>2</sub> S	Sulfeto de hidrogênio
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
ICAM	Molécula de adesão intracelular
IFN	Interferon
IL	Interleucina
K <sub>ATP</sub>	(Canais) para potássio dependentes de ATP
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilograma
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
Ltda	Limitada
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mmol	Milimol
MPO	Mieloperoxidase
n	Número de animais experimentais
N	Naltrexona
Na <sub>2</sub> S	Sulfeto de sódio
NaHS	Hidrossulfeto de sódio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
Nrf	Fator nuclear eritroide
OPD	Ortofenilenodiamina

P	Probabilidade de significância
p.	Página
<i>p.o.</i>	<i>Per os</i>
p/v	Concentração em peso por volume
pA	Picoampères
PAF	Fator de ativação plaquetária
PEG	Polietilenoglicol
PBS	Tampão fosfato-salino
PG	Prostaglandina
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
PP	Ponteira de polietileno
ppm	Parte por milhão
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
SNC	Sistema nervoso central
TF	Transdutor de força
TGFβ	Fator de crescimento transformante beta
TNF	Fator de necrose tumoral
TRP	<i>Transient receptor potential cation channel</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
v	Volume
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>1.1</b>	<b>Dor</b>	<b>16</b>
<b>1.1.1</b>	<b><u>Dor nociceptiva</u></b>	<b>16</b>
<b>1.1.2</b>	<b><u>Dor inflamatória</u></b>	<b>17</b>
<b>1.1.3</b>	<b><u>Dor neuropática</u></b>	<b>20</b>
<b>1.1.4</b>	<b><u>Dor disfuncional</u></b>	<b>22</b>
<b>1.2</b>	<b>Farmacoterapia da dor e inflamação</b>	<b>22</b>
<b>1.3</b>	<b>Sulfeto de hidrogênio</b>	<b>24</b>
<b>1.3.1</b>	<b><u>Atividades anti-inflamatória e antinociceptiva relacionadas ao H<sub>2</sub>S</u></b>	<b>28</b>
<b>1.3.2</b>	<b><u>Benzotiamidas</u></b>	<b>30</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	<b>35</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Animais experimentais</b>	<b>36</b>
<b>4.2</b>	<b>Drogas, reagentes e veículos</b>	<b>36</b>
<b>4.3</b>	<b>Preparo das soluções e suspensões, doses e vias de administração</b>	<b>38</b>
<b>4.3.1</b>	<b><u>4-Metil-benzenocarbotiamida</u></b>	<b>38</b>
<b>4.3.2</b>	<b><u>Estímulos inflamatórios</u></b>	<b>38</b>
<b>4.3.3</b>	<b><u>Suspensão de CMC</u></b>	<b>38</b>
<b>4.3.4</b>	<b><u>Antagonistas de receptores e bloqueador de canal iônico</u></b>	<b>38</b>
<b>4.3.5</b>	<b><u>Dipirona, dexametasona e fenobarbital</u></b>	<b>39</b>
<b>4.3.6</b>	<b><u>Soluções usadas nos ensaios para a determinação das concentrações de TNF-<math>\alpha</math> ou CXCL1</u></b>	<b>39</b>
<b>4.3.7</b>	<b><u>Soluções usadas na quantificação de H<sub>2</sub>S</u></b>	<b>40</b>
<b>4.4</b>	<b>Avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído</b>	<b>41</b>
<b>4.5</b>	<b>Avaliação da resposta nociceptiva induzida por calor</b>	<b>42</b>

4.6	Avaliação da alodínia mecânica induzida por carragenina	43
4.6.1	<u>Avaliação da duração do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida no modelo de alodínia mecânica induzida por carragenina</u>	45
4.7	Avaliação dos efeitos induzidos por naltrexona, glibenclamida ou ciproheptadina sobre a atividade da 4-metil-benzenocarbotiamida no modelo de alodínia mecânica induzida por carragenina	45
4.8	Avaliação da alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo isquiático	46
4.9	Avaliação da atividade motora	47
4.10	Avaliação do edema de pata induzido por carragenina	48
4.10.1	<u>Avaliação da duração do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida no modelo de edema de pata induzido por carragenina</u>	50
4.11	Determinação da concentração de TNF- $\alpha$ e CXCL1 e atividade da mieloperoxidase	50
4.12	Quantificação de H <sub>2</sub> S	52
4.13	Análise estatística	53
5	RESULTADOS	54
5.1	Efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído	54
5.2	Efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre a resposta nociceptiva induzida por calor	55
5.3	Efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina	56
5.3.1	<u>Duração do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina</u>	57
5.4	Efeitos induzidos por naltrexona, glibenclamida ou ciproheptadina sobre a atividade antialodínica da 4-metil-benzenocarbotiamida	58
5.5	Efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre a alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo isquiático	61
5.6	Efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre a atividade motora	63
5.7	Efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre o edema de pata induzido por carragenina	64

5.7.1	<b><u>Duração do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre o edema de pata induzido por carragenina</u></b>	65
5.8	<b>Efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre a produção de TNF-<math>\alpha</math> e CXCL1 e a atividade da MPO induzidas por carragenina</b>	67
5.9	<b>Liberação de H<sub>2</sub>S <i>in vitro</i> pela 4-metil-benzenocarbotiamida</b>	68
6	<b>DISCUSSÃO</b>	70
6.1	<b>Atividade da 4-metil-benzenocarbotiamida em modelos experimentais de dor</b>	71
6.2	<b>Atividade da 4-metil-benzenocarbotiamida em modelo experimental de inflamação aguda</b>	76
6.3	<b>Liberação de H<sub>2</sub>S <i>in vitro</i> pela 4-metil-benzenocarbotiamida</b>	80
6.4	<b>Limitações</b>	81
6.5	<b>Perspectivas</b>	82
7	<b>CONCLUSÃO</b>	83
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	84

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Dor

Segundo a *International Association for the Study of Pain (IASP)*, a dor é definida como uma experiência desagradável que envolve aspectos sensoriais e emocionais e que está associada a uma lesão real ou potencial. Assim, essa experiência envolve, além da transdução de sinais pelo sistema nervoso, fatores cognitivos e afetivos (AUVRAY *et al.*, 2010). A dor é uma das experiências mais comuns na população e é, provavelmente, o sintoma que mais frequentemente leva pacientes a procurar assistência médica (LOESER e MELZACK, 1999). A dor geralmente faz com que o indivíduo evite estímulos que apresentem ameaça à sua integridade, sendo esse processo essencial para o bem-estar e sobrevivência do organismo, além de importante para a detecção e a avaliação de diversas doenças (BASBAUM *et al.*, 2009; OSSIPOV, 2012). A dor pode ser classificada de várias formas, como, por exemplo, de acordo com sua localização, duração ou intensidade (ORR *et al.*, 2017). Woolf (2004; 2010) propôs uma categorização, baseada nos estímulos e mecanismos neuroquímicos envolvidos, que consiste em dor nociceptiva, dor neuropática, dor disfuncional e dor inflamatória.

#### 1.1.1 Dor nociceptiva

A nociceção consiste no processo pelo qual os estímulos nocivos são detectados, codificados e processados pelo sistema nervoso. Assim, a dor nociceptiva é resultante da ativação de nociceptores por um estímulo, podendo este ser térmico, mecânico ou químico (MILLAN, 1999; BARROT, 2012; COHEN e MAO, 2014). Nociceptores são ramos periféricos de neurônios sensoriais que podem ser classificados de acordo com sua velocidade condução, diâmetro e grau de mielinização. Os dois tipos principais, nesse contexto, são: os nociceptores A $\delta$ , que são mielinizados e de diâmetro médio, que são ativados por estímulos agudos; e nociceptores C, de pequeno diâmetro e não-mielinizados, relacionadas à dor difusa e lenta (BASBAUM *et al.*, 2009).

A dor nociceptiva tem um caráter protetor, visto que sinaliza ao organismo estímulos ambientais nocivos potenciais ou reais. Assim, essa resposta protetora visa evitar ou

reduzir uma lesão tecidual, acelerar a cicatrização do tecido e, conseqüentemente, a recuperação do organismo (SCHOLZ e WOOLF, 2002; WOOLF, 2010). Distúrbios envolvendo a percepção de estímulos nocivos ilustram claramente a importância fisiológica desse tipo de dor, como a insensibilidade congênita à dor, em que o portador constantemente apresenta queimaduras, feridas e fraturas, reduzindo drasticamente sua expectativa de vida. Nesse distúrbio, ocorrem mutações gênicas que resultam na ausência da expressão de canais para sódio voltagem-dependentes essenciais para o processamento nociceptivo (COX *et al.*, 2010; WOOD, 2014).

### **1.1.2 Dor inflamatória**

A dor inflamatória resulta da produção e ação de múltiplos mediadores inflamatórios e está relacionada à inflamação decorrente de lesão ou infecção tecidual. A liberação de mediadores inflamatórios pode sensibilizar ou estimular nociceptores gerando alodínia ou hiperalgesia (WOOLF, 2004). Segundo a IASP, a alodínia é definida como a dor causada por um estímulo que, normalmente, não provoca dor, enquanto a hiperalgesia é caracterizada pela dor de maior intensidade causada por um estímulo originalmente doloroso. A dor inflamatória contribui para que o dano seja minimizado pois induz comportamentos de esquiva que favorecem a reparação, ou seja, o indivíduo evita o movimento da região lesionada ou seu contato com qualquer objeto (MEDZHITOV, 2008).

A inflamação é uma resposta protetora, que envolve diversos processos bioquímicos e celulares, a uma agressão, visando à restauração da homeostasia. Esse processo pode ser causado por diversos estímulos exógenos ou endógenos (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; KOTAS e MEDZHITOV, 2015). A inflamação ocorre no tecido conjuntivo vascularizado e envolve células do sistema imunológico, vasos sanguíneos e diversos mediadores inflamatórios. O processo inflamatório consiste em cinco sinais e sintomas cardinais clássicos: rubor, tumor, calor, dor e perda de função. A inflamação é geralmente dividida em inflamação aguda e inflamação crônica. A inflamação aguda tem como objetivo restabelecer as funções normais do tecido afetado, visando destruir ou isolar o agente nocivo e contribuir para a reparação do tecido lesado. Assim, a inflamação aguda é uma resposta adaptativa que visa à

proteção do hospedeiro e a restauração da homeostasia. Entretanto, a inflamação crônica pode ser prejudicial, prolongando e induzindo lesão tecidual por meio de liberação exacerbada de enzimas lisossomais, mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (MEDZHITOV, 2008; COLLINS, 2009; NATHAN e DING, 2010).

A inflamação aguda é de duração relativamente curta, podendo durar minutos, horas ou alguns dias. Suas principais características são: aumento do fluxo sanguíneo, exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas e migração de leucócitos. Quando a inflamação não é resolutive ou se torna desordenada, o processo pode progredir para um estado crônico, estendendo-se por semanas, meses ou anos. A inflamação crônica envolve, principalmente, presença de macrófagos e linfócitos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual. Exemplos de doenças caracterizadas por inflamação crônica são asma, artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico. A inflamação crônica também pode estar associada a diversos tipos de câncer e trauma (MURPHY, 2011).

O aumento do fluxo sanguíneo durante a inflamação é consequência da vasodilatação induzida por vários mediadores. O aumento da permeabilidade vascular que ocorre durante o processo inflamatório visa facilitar a chegada de proteínas de fase aguda e anticorpos ao sítio inflamatório. Essa maior permeabilidade vascular permite, então, o fluxo do exsudato, um líquido rico em proteínas plasmáticas, do compartimento intravascular para o espaço intersticial e seu acúmulo, caracterizando o edema (RYAN e MAJNO, 1977; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

A migração de leucócitos envolve, inicialmente, eventos de adesão, através de moléculas ligadas ao endotélio. Havendo a aderência à superfície endotelial, os leucócitos migram da luz endotelial para o espaço extravascular, onde há a migração para o sítio inflamatório induzida por mediadores com atividade quimiotática. O tipo celular prevalente nessa fase inicial da inflamação é o neutrófilo, um leucócito presente no sangue (representando cerca de 60 a 65% dos leucócitos na corrente sanguínea) com núcleo em forma segmentada e que tem como funções principais a fagocitose de materiais estranhos e microrganismos e a degradação de tecido

necrosado (RYAN e MAJNO, 1977; KUBER e WARD, 2000; LEY *et al.*, 2007; MAYADAS *et al.*, 2014).

Os mediadores inflamatórios são moléculas que desempenham papéis importantes na indução dos vários sinais e sintomas da inflamação. Alguns exemplos de mediadores incluem citocinas, prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs), cininas e proteínas de fase aguda (FEGHALI e WRIGHT, 1997; KIM e DEUTSCHMAN, 2000).

As citocinas são polipeptídios secretados, de acordo com os estímulos envolvidos, por diversas células, como macrófagos, linfócitos e fibroblastos. Nesse grupo, incluem-se as interleucinas (ILs), interferons (IFNs), fatores estimuladores de colônia (CSFs), quimiocinas, o fator de crescimento transformante beta (TGF $\beta$ ) e os fatores de necrose tumoral (TNFs) (ZHANG e AN, 2007). Algumas citocinas podem agravar o processo (citocinas pró-inflamatórias), ao passo que outras reduzem a inflamação e promovem a resolução e a cura (citocinas anti-inflamatórias).

O TNF- $\alpha$  é sintetizado, principalmente, por monócitos, macrófagos e células da glia, embora linfócitos T, neutrófilos, mastócitos e neurônios também sejam capazes de produzir essa citocina. Após procedimentos cirúrgicos, traumas ou infecções, TNF- $\alpha$  é uma das primeiras proteínas envolvidas no processo inflamatório. O TNF- $\alpha$ , além de induzir sua própria secreção, é capaz de estimular a síntese de outros mediadores inflamatórios, como, por exemplo, PGE<sub>2</sub> e IL-1; tem a propriedade de estimular produção de colagenase e PGE<sub>2</sub> por sinoviócitos, o que contribui para desenvolvimento do processo inflamatório em articulações; além de estar relacionada à indução de apoptose de células tumorais ou infectadas e à estimulação da adesão de leucócitos (HICKEY *et al.*, 1997; CHU, 2013). O TNF- $\alpha$ , ainda, reduz o limiar para a ativação dos nociceptores C e induz a expressão de metaloproteinases de matriz, que, por sua vez, são capazes de induzir liberação de citocinas e degradação de mielina (KOBAYASHI *et al.*, 2008; SHUBAYEV *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Outros mediadores importantes são as quimiocinas, que exibem atividade quimiotática e, assim, induzem a ativação e migração de leucócitos ao local de lesão ou infecção. De acordo com a presença e posição de resíduos de cisteína, as quimiocinas podem ser agrupadas em quatro grupos: quimiocinas CC, CXC, C e CX3C (ZHANG e AN,

2007). A CXCL1, *chemokine (C-X-C motif) ligand 1*, é uma quimiocina da família CXC que, além da quimiotaxia de neutrófilos, também tem papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da dor inflamatória, através da sensibilização periférica e central, por sua ação em receptores CXCR2 (MURPHY *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2017).

Outros mediadores químicos envolvidos no processo inflamatório incluem os metabólitos inflamatórios lipídicos, tais como o fator de ativação plaquetária (PAF) e os numerosos derivados do ácido araquidônico, como as PGs e os LTs. O ácido araquidônico é gerado a partir de fosfolípidos das membranas celulares e pode ser posteriormente clivado pelas enzimas ciclooxigenases (COXs) e 5-lipoxigenase, dando origem a seus metabólitos (FEGHALI e WRIGHT, 1997). Esses mediadores estão presentes em processos inflamatórios e, em geral, atuam como moléculas pró-inflamatórias. Os LTs induzem contração do músculo liso, enquanto algumas PGs induzem vasodilatação, relaxamento do músculo liso, aumento da permeabilidade vascular, sensibilização de nociceptores, entre outras alterações (PITCHFORD e LEVINE, 1991; HARIZI *et al.*, 2008).

### **1.1.3 Dor neuropática**

A dor neuropática é definida pela IASP como uma dor causada por lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial que, diferentemente das dores nociceptiva e inflamatória, não tem função adaptativa conhecida (WOOLF, 2010; FINNERUP *et al.*, 2016). Apesar das limitações dos dados epidemiológicos disponíveis, estima-se que a prevalência da dor neuropática seja alta, chegando a 10% (van HECKE *et al.*, 2014).

As lesões ou doenças que resultam em dor neuropática podem ter diversas causas. Na dor neuropática central, quando a lesão ou doença ocorre na medula espinhal ou no cérebro, as causas incluem distúrbios cerebrovasculares, como doença de Parkinson, lesão da medula espinhal, doenças desmielinizantes e esclerose múltipla (WATSON e SANDRONI, 2016). As causas da dor neuropática periférica, que envolve nociceptores (tipos C ou A $\delta$ ), são, principalmente, diabetes mellitus, infecções (HIV e

hanseníase, principalmente), neuropatias e canalopatias hereditárias, quimioterapia, doenças inflamatórias, lesões de nervos e amputações (COLLOCA *et al.*, 2017).

A dor neuropática pode se estabelecer por meio de diversos mecanismos que levam a diferentes manifestações. O paciente com dor neuropática pode apresentar desde sintomas sensoriais, como dormência e formigamento, até deficiências motoras, como distonia (contrações musculares involuntárias) e espasticidade (alteração no tônus muscular). Entre os sintomas incluem-se, ainda, hipoestesia (sensação reduzida a um estímulo não doloroso) e hipoalgesia (sensação reduzida a um estímulo doloroso) mecânica ou térmica, relacionados a danos diretos aos neurônios sensoriais, e alodínias mecânica e térmica e hiperalgesias mecânica e térmica, resultantes de diminuição no limiar de ativação dos nociceptores. Também, é muito comum que o paciente reporte dor espontânea, que, geralmente, se apresenta como uma sensação de pequenos choques elétricos ou de ardência na pele (COHEN e MAO, 2014).

Devido ao grande impacto na qualidade de vida dos pacientes, diversos estudos têm investigado os mecanismos que podem levar ao desenvolvimento da dor neuropática. Um dos principais mecanismos propostos é a atividade ectópica de neurônios aferentes da medula espinhal, induzida por lesões ao sistema nervoso, sendo uma das principais responsáveis pelas manifestações espontâneas da dor neuropática. Nesse contexto, ocorre alteração da expressão, distribuição e fosforilação de diversos canais iônicos, resultando em potenciais de ação anormais, muitas vezes na ausência de qualquer estímulo. Outro mecanismo tem início com a atividade de nociceptores e inclui mudanças pré- e pós-sinápticas, assim como um aumento na excitabilidade da membrana pós-sináptica de neurônios secundários. O resultado global é uma hiperexcitabilidade da medula espinhal, que passa a perceber como nocivas informações sensoriais não nocivas. Após lesões em nervos periféricos, pode ocorrer, também, uma grande liberação de mediadores inflamatórios que, além de diminuir o limiar de nociceptores, ativam mais células, como células não-neurais imunes e células da glia (WOOLF, 2004; HEHN *et al.*, 2012; COHEN e MAO, 2014; HAROUTOUNIAN *et al.*, 2014; YAN *et al.*, 2017).

#### **1.1.4 Dor disfuncional**

A dor disfuncional ocorre em diversas condições nas quais não há presença de qualquer estímulo nocivo, inflamação ou anormalidade neuronal periférica identificáveis (SCHECHTER, 2014). Essas condições clínicas incluem fibromialgia, síndrome do intestino irritável, cefaleia tensional, entre outras. Apesar de não estar claro, na maioria dos casos, o que causa e mantém esse tipo de dor, algumas doenças podem envolver disfunções dos canais iônicos ou alterações na neurotransmissão, resultando em amplificação de sinais nociceptivos e processamento sensorial alterado. Assim como a dor neuropática, a dor disfuncional não tem função adaptativa conhecida. Existem, ainda, outras características em comum com a dor neuropática, como limiar de dor reduzido e aumento progressivo da dor em resposta a estímulos repetidos (WOOLF, 2004; 2010; COSTIGAN *et al.*, 2009).

#### **1.2 Farmacoterapia da dor e inflamação**

Embora a dor e a inflamação sejam processos que, muitas vezes, são benéficos ao organismo, em muitos casos há necessidade do controle desses processos. Assim, foram desenvolvidos vários fármacos que visam ao alívio da dor ou inflamação. Um dos principais objetivos da intervenção farmacoterapêutica é a redução da dor, pois está entre os sinais e sintomas que mais causam desconforto aos pacientes e os levam a procurarem por algum serviço de saúde. Embora diversas terapias possam ser usadas visando ao alívio da dor, a farmacoterapia é a mais comum. Há um grande número de fármacos de diferentes classes farmacológicas que podem ser utilizados nesse contexto, sendo administrados por diferentes vias e com diferentes perfis de eficácia e segurança.

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) são os fármacos de escolha para o tratamento de pacientes com condições dolorosas leves a moderadas. O principal mecanismo de ação proposto para os AINEs, a inibição das COXs, foi descrito por Vane (1971) quando investigava as atividades do ácido acetilsalicílico. A COX é a enzima responsável pela conversão do ácido araquidônico em PGG<sub>2</sub> e PGH<sub>2</sub>, que servirão de substrato para outras enzimas para a produção de PGs, mediadores com papel importante na indução de vários sinais e sintomas da resposta inflamatória.

Assim, a produção reduzida de PGs contribui para as atividades antipirética, antiedematogênica e analgésica dos AINEs (STEINMEYER, 2000). Embora não haja uma diferenciação bem estabelecida, dois grandes grupos são representados: os AINEs tradicionais e não seletivos que inibem COX-1 e COX-2 e os inibidores com maior seletividade pela COX-2, os coxibes. Além das ações já citadas, o ácido acetilsalicílico, AINE não-seletivo, induz efeito antiplaquetário, reduzindo, assim, o risco de reinfarto do miocárdio e acidente vascular cerebral. A inibição de COX também está relacionada a reações adversas cardiovasculares, como trombose arterial, hipertensão e insuficiência cardíaca, e lesões na mucosa gástrica, uma vez que as prostaglandinas também estão envolvidas no controle da agregação plaquetária, pressão arterial e mecanismos de defesa da mucosa gástrica (DAY e GRAHAM, 2013).

Outra classe de fármacos anti-inflamatórios, os anti-inflamatórios esteroides (AIEs), é utilizada, principalmente, por pacientes com doenças inflamatórias crônicas, tais como asma, artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico (BARNES e ADCOCK, 1993). A atividade analgésica dos AIEs, entretanto, é bastante reduzida. O principal mecanismo de ação é decorrente da ligação dos AIEs aos denominados receptores de glicocorticoides (GRs), receptores localizado no citoplasma de praticamente todas células conhecidas. Assim, após a interação do AIE com o receptor, o complexo formado é translocado para o núcleo, onde se liga a regiões específicas do DNA, além de interagir com fatores de transcrição, como o fator nuclear kB (NF- kB), de modo a inibir suas funções. Como resultado, ocorre a inibição da transcrição de genes para diversas enzimas inflamatórias ou mediadores de natureza proteica, ocorrendo, então, produção reduzida de citocinas (IL-1, IL-6, TNF, IFN- $\gamma$ ), eicosanoides (pela redução da expressão do gene para COX-2), óxido nítrico (NO) e fatores de adesão celular. Os AIEs também são capazes ativar a transcrição de genes para proteínas anti-inflamatórias, como IL-10, e atuar por mecanismos não genômicos, explicando a sua ampla atividade anti-inflamatória (NEWTON, 2000; NELSON *et al.*, 2003; BASCHANT e TUCKERMANN, 2010; COUTINHO e CHAPMAN, 2011). Apesar disso, o uso dos AIEs também deve ser racional, devido a diversas reações adversas que podem ocorrer, como supressão da resposta imune, osteoporose, insuficiência adrenal, resistência à insulina e hipertensão arterial sistêmica, principalmente quando o

tratamento é prolongado e são usadas doses elevadas (BASCHANT e TUCKERMANN, 2010; MOGHADAM-KIA e WERTH, 2010; RANG *et al.*, 2012).

Outra abordagem farmacoterapêutica visando ao alívio da dor envolve o uso dos analgésicos opioides, que possuem maior atividade analgésica e são úteis no tratamento de pacientes relatando dores moderadas a intensas. A atividade desses fármacos ocorre por meio da interação com receptores opioides, com três tipos descritos,  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  (PAPICH, 2000). Apesar de apresentar elevada atividade analgésica, o uso de opioides está associado a reações adversas graves, tais como sedação, náuseas, vômitos, constipação, confusão mental e depressão respiratória. O seu uso também pode levar à tolerância e, assim, necessidade do uso em doses maiores, além de causar dependência (INTURRISI, 2002). Um dos principais usos dos opioides é no alívio da dor em pacientes com câncer, que, quando em estágio avançado, apresentam dores moderadas a intensas em 70 a 80 % dos casos (CARACENI *et al.*, 2012).

Embora a maioria dos fármacos utilizados para tratamento de pacientes com condições dolorosas e inflamatórias seja eficaz, a farmacoterapia da dor e inflamação ainda apresenta limitações. Reações adversas graves, heterogeneidade das condições clínicas e multiplicidade de mecanismos relacionados aos processos de dor e inflamação são algumas das razões que justificam a busca por novas alternativas farmacoterapêuticas, com a perspectiva da descoberta de fármacos analgésicos e anti-inflamatórios mais eficazes e seguros (YEKKIRALA *et al.*, 2017).

### **1.3 Sulfeto de hidrogênio**

Há alguns anos, gases de baixa massa molecular, denominados gasotransmissores, como NO, monóxido de carbono (CO) e sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), têm sido amplamente estudados (MUSTAFA *et al.*, 2009). Os gasotransmissores são moléculas gasosas com diversos papéis como mediadores biológicos no corpo humano, produzidos e regulados por sistemas enzimáticos e com funções independentes de um receptor específico (WANG, 2003). Palmer *et al.* (1987), ao demonstrarem que o NO era o fator derivado do endotélio importante para o

relaxamento da aorta de coelho após administração de acetilcolina (FURCHGOTT E ZAWADZKI, 1980), permitiram, pela primeira vez, a identificação de um gasotransmissor. Posteriormente, foi demonstrado que o CO, outra molécula gasosa simples, também possui papel fisiológico importante, promovendo, por exemplo, relaxamento de vasos sanguíneos (MARKS *et al.*, 1991; FORESTI *et al.*, 2004). Abe e Kimura (1996), ao demonstrarem o papel do H<sub>2</sub>S na regulação da função neuronal, deram início a busca pelo entendimento do papel regulatório desse terceiro gasotransmissor em processos fisiológicos e patológicos.

O H<sub>2</sub>S é sintetizado em células de mamíferos a partir de L-cisteína, por duas enzimas dependentes de piridoxal 5-fosfato, a cistationa β-sintase (CBS) e a cistationa γ-liase (CSE), e por 3-mercaptopiruvato sulfotransferase (3-MST) (WANG, 2002; SZABÓ, 2007; SHIBUYA *et al.*, 2009). Essas enzimas estão amplamente distribuídas no organismo humano, com presença de CBS e 3-MST principalmente no sistema nervoso e CSE presente em diversos órgãos. Isso faz com que o H<sub>2</sub>S endógeno esteja presente em diversos tecidos e seja capaz de alcançar alvos moleculares em diversos sistemas, como cardiovascular, respiratório, renal, reprodutivo, entre outros (ZHAO *et al.*, 2001; KIMURA, 2010). Além disso, o H<sub>2</sub>S é capaz de atravessar membranas biológicas facilmente, sem necessidade de receptores específicos, assim como os outros gasotransmissores (SESTITO *et al.*, 2017). Em diversos processos, é demonstrado que o H<sub>2</sub>S pode induzir efeitos opostos, dependendo de alguns fatores como concentração e órgão ou tecido avaliado (CACANYIOVA *et al.*, 2016).

Tem sido demonstrado e acredita-se que muitos dos efeitos induzidos pelo H<sub>2</sub>S sejam mediados pela S-sulfidração de proteínas. A S-sulfidração de proteínas medeia diversas funções celulares e vias metabólicas. Esse processo tem a propriedade de modificar a conformação local e função de proteínas-alvo, através da modificação do grupo –SH em resíduos de cisteína para o grupo -SSH. Entre os principais efeitos decorrentes dessa modificação induzida pelo H<sub>2</sub>S estão: ativação de canais para potássio sensíveis a ATP (K<sub>ATP</sub>); ativação do fator nuclear eritroide 2 (Nrf2), que regula a expressão de diversas enzimas citoprotetoras, que têm papel importante em sistemas antioxidantes e resposta ao estresse oxidativo; transcrição de genes anti-apoptóticos; manutenção da replicação de DNA mitocondrial; estimulação da gliconeogênese e adipogênese; indução de diferenciação celular; inibição de

proliferação celular e promoção de fosforilação, entre outras (PAUL e SNYDER, 2012; JU *et al.*, 2017; MENG *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2017).

O papel modulador do H<sub>2</sub>S na função cardiovascular é um dos mais bem estudados, principalmente a sua atividade vasodilatadora. Hosoki *et al.* (1997) demonstraram a presença de enzimas produtoras de H<sub>2</sub>S em vasos e que este gás induz relaxamento de músculo liso. Posteriormente observou-se que o efeito vasodilatador induzido pelo H<sub>2</sub>S ocorre através da ativação de canais K<sub>ATP</sub> (ZHAO *et al.*, 2001). Atualmente, sabe-se que o H<sub>2</sub>S tem papel duplo sobre a regulação do tônus vascular, tendo sido demonstrada vasoconstrição após administração de cisteína e consequente aumento de H<sub>2</sub>S endógeno (LIM *et al.*, 2008). O H<sub>2</sub>S induz efeito cardioprotetor em diversos distúrbios cardíacos, como infarto do miocárdio, arritmia, hipertrofia cardíaca, fibrose do miocárdio e insuficiência cardíaca. Essa proteção se deve, principalmente, às atividades antioxidante e antiapoptótica, além da ativação canais K<sub>ATP</sub> e preservação da função mitocondrial (CALVERT *et al.*, 2009; SHEN *et al.*, 2015).

Além de importante na regulação na função cardiovascular, a ativação de canais K<sub>ATP</sub> pelo H<sub>2</sub>S é importante para secreção de insulina por células β, proteção neuronal e regulação da nocicepção e inflamação, o que demonstra o potencial papel desse neurotransmissor em diversas condições, tais como diabetes, doenças neurodegenerativas e condições dolorosas e inflamatórias. O H<sub>2</sub>S ainda interage com outros canais iônicos, como canais para cálcio voltagem-dependentes e canais para potássio ativados por cálcio; modula níveis de segundos mensageiros, como adenosina monofosfato cíclico e guanosina monofosfato cíclico; e ainda pode diminuir ou aumentar as concentrações de cálcio intracelular, embora o significado do papel nesses processos ainda não esteja bem claro (KABIL *et al.*, 2014; WALLACE e WANG, 2015).

Visto o amplo espectro de atividades relacionadas ao H<sub>2</sub>S, o interesse pelo uso desse neurotransmissor como ferramenta farmacológica é crescente. A administração do próprio H<sub>2</sub>S, porém, apresenta dificuldades, visto que a substância, sob temperatura e pressão ambientes, é um gás incolor, conhecido por sua toxicidade. A exposição ao gás H<sub>2</sub>S em concentrações até 300 ppm leva a edema pulmonar e em concentrações acima de 1000 ppm causa morte imediata. Nesse contexto, substâncias doadoras de

H<sub>2</sub>S representam uma importante ferramenta para estudo das atividades *in vitro* e *in vivo* do H<sub>2</sub>S ou para uso em situações nas quais as concentrações de H<sub>2</sub>S estão diminuídas (por aumento de consumo ou diminuição da produção) (ZHAO *et al.*, 2014; SZABÓ, 2017). Diversas substâncias têm sido desenvolvidas nos últimos anos, com diferentes mecanismos de liberação de H<sub>2</sub>S.

Sais inorgânicos, como sulfeto de sódio (Na<sub>2</sub>S) e hidrossulfeto de sódio (NaHS) são compostos que liberam H<sub>2</sub>S rapidamente (FIORUCCI *et al.*, 2005; ANDRUSKI *et al.*, 2008) e têm sido amplamente utilizados em diversos estudos para investigação de efeitos induzidos pelo H<sub>2</sub>S. Diversas atividades atribuídas ao H<sub>2</sub>S foram demonstradas por meio do uso dessas substâncias, como diminuição da produção de citocinas, regulação de canais iônicos, regulação neurogênica e efeitos cardioprotetores. Apesar de terem contribuído para diversas descobertas, o fato de esses compostos induzirem um aumento das concentrações plasmáticas de H<sub>2</sub>S de muito curta duração faz com que sua aplicação terapêutica seja limitada (SONG *et al.*, 2014; ZHENG *et al.*, 2015).

Outra abordagem bastante utilizada no desenvolvimento de compostos doadores de H<sub>2</sub>S, é a avaliação de compostos híbridos doadores de H<sub>2</sub>S, nos quais a porção que libera H<sub>2</sub>S está ligada covalentemente a um fármaco conhecido. Diversos estudos foram desenvolvidos de forma similar, utilizando substâncias análogas liberadoras de NO (WALLACE *et al.*, 1994). As tiobenzamidas e a 5-(4-hidroxifenil)-3H-1,2-ditolano-3-tiona (ADT-OH) são exemplos de unidades doadoras de H<sub>2</sub>S bastante utilizadas em diversos estudos. ATB-429 (DISTRUTTI *et al.*, 2006), ATB-337 (SIDHAPURIWALA *et al.*, 2007), ATB-343 (WALLACE, 2007) e ATB-346 (WALLACE *et al.*, 2010) são exemplos de moléculas em que um fármaco conhecido foi acoplado à ADT-OH ou a uma tiobenzamida e que apresentam atividades em vários modelos.

Os AINEs são uma das principais classes de fármacos utilizados como protótipos para híbridos doadores de H<sub>2</sub>S. Tem sido demonstrado que o uso de AINEs acoplados a doadores de H<sub>2</sub>S está associado a um menor risco de reações adversas gastrointestinais, como úlceras e hemorragias, e atividade anti-inflamatória de maior magnitude (WALLACE *et al.*, 2007a; EKUNDI-VALENTIM *et al.*, 2013). Diversos AINEs, como indometacina, diclofenaco e naproxeno, acoplados a doadores de H<sub>2</sub>S foram desenvolvidos e são tidos como candidatos a fármacos para uso clínico. O ATB-

346, sintetizado a partir do acoplamento do naproxeno com uma tiobenzamida, é um AINE doador de H<sub>2</sub>S que está sendo avaliado em ensaio clínicos de fase II (CALIENDO *et al.*, 2010; WALLACE *et al.*, 2017).

### **1.3.1 Atividades anti-inflamatória e antinociceptiva relacionadas ao H<sub>2</sub>S**

Diversos efeitos induzidos por substâncias que doam H<sub>2</sub>S sobre várias vias bioquímicas importantes para o desenvolvimento da resposta inflamatória foram amplamente demonstrados em ensaios farmacológicos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*. Na inflamação, assim como em outros processos, o H<sub>2</sub>S apresenta atividades diversas que dependem da concentração e do tecido envolvido (FARO *et al.*, 2014). Apesar dos primeiros estudos relacionando H<sub>2</sub>S e inflamação terem demonstrado o papel pró-inflamatório do H<sub>2</sub>S (BHATIA *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2005), diversos outros estudos demonstraram atividades anti-inflamatórias. Diferentes modelos experimentais e diferentes doadores de H<sub>2</sub>S ou inibidores da produção endógena de H<sub>2</sub>S utilizados são alguns dos fatores que podem justificar essas respostas aparentemente contraditórias (STEIN e BAILEY, 2013).

Tem sido demonstrado, em diversos modelos de inflamação, que o H<sub>2</sub>S atua de diferentes maneiras. Uma das mais bem demonstradas é redução da produção de citocinas pró-inflamatórias. Fiorucci *et al.* (2005) demonstraram, em um modelo inflamação gástrica, que a administração prévia de NaHS reduz em cerca 70% as concentrações do RNA mensageiro de TNF- $\alpha$ . Diversos estudos posteriores, em diferentes modelos experimentais, conseguiram relacionar a redução da expressão ou de concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$  ao uso de compostos doadores de H<sub>2</sub>S ou de híbridos liberadores de H<sub>2</sub>S (HU *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2011; FAN *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2013; DIEF *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2017b). De forma semelhante, o H<sub>2</sub>S está relacionado à produção reduzida de IL-1 $\beta$  (ESECHIE *et al.*, 2008; WHITEMAN *et al.*, 2010, FAN *et al.*, 2013; FONSECA *et al.*, 2015, KAYAR-YASAR *et al.*, 2017; ZIMMERMANN *et al.*, 2017), IL-4 (XIA *et al.*, 2017), IL-6 (BURGUERA *et al.*, 2014; KIDA *et al.*, 2015; RIOS *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2016; XIN *et al.*, 2016), IL-8 (LI *et al.*, 2008; PERRY *et al.*, 2011), IL-18 (CAO *et al.*, 2016; LUO *et al.*, 2017), IL-2 e IL-12 (FIORUCCI *et al.*, 2007). Além disso, o H<sub>2</sub>S induz

aumento da concentração de IL-10, uma citocina relacionada a atividades anti-inflamatórias (LI *et al.*, 2009; WHITEMAN *et al.*, 2010; TALAEI, 2016). O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição que regula genes envolvidos no processo inflamatório e no início e progressão de diversas doenças. Sua ativação está relacionada ao aumento da produção de várias citocinas, moléculas de adesão molecular e substâncias envolvidas no processo de apoptose. Visto que o H<sub>2</sub>S reduz a expressão de várias citocinas, foi investigado e demonstrado, também, que o H<sub>2</sub>S reduz a ativação do NF- $\kappa$ B em diversos modelos de inflamação (OH *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2009; FAN *et al.*, 2013; CAO *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2017)

O H<sub>2</sub>S também é capaz de modular eventos celulares e vasculares no processo inflamatório. Estudos têm demonstrado que o uso de doadores ou híbridos doadores de H<sub>2</sub>S reduzem a adesão de leucócitos no endotélio vascular (ANDRUSKI *et al.*, 2008; PERNA *et al.*, 2013; DIEF *et al.*, 2015) e da migração de dessas células a sítios inflamatórios (EKUNDI-VALENTIM *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2016; FALLER *et al.*, 2017; ZIMMERMANN *et al.*, 2017). Relacionado a essas atividades, foi demonstrado que o H<sub>2</sub>S também reduz a expressão da molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) e do antígeno 1 associado à função linfocítica (LFA-1), importantes na adesão de leucócitos às células endoteliais e na migração extravascular destes (FIORUCCI *et al.*, 2005; *et al.*, CHEN *et al.*, 2010; TALAEI, 2016). Esse gasotransmissor também atenua sinais resultantes do processo inflamatório, como o edema de pata (ZANARDO *et al.*, 2006; SIDHAPURIWALA *et al.* 2007; WALLACE *et al.*, 2010, DUDEK *et al.*, 2013), edema epitelial tubular em modelo de isquemia e reperfusão hepática (CHEN *et al.*, 2010), edema em articulações (EKUNDI-VALENTIM *et al.*, 2013; DIEF *et al.*, 2015) e edema cerebral (GENG *et al.*, 2015; CAO *et al.*, 2016; ZHAO *et al.*, 2017a).

Em modelos de dor, o H<sub>2</sub>S também possui papel duplo. Foi demonstrado que o H<sub>2</sub>S endógeno está relacionado a efeitos pró-nociceptivos, enquanto efeitos antinociceptivos estão mais relacionados ao H<sub>2</sub>S exógeno (CUNHA *et al.*, 2008a; DONATTI *et al.*, 2014). Distrutti *et al.* (2006) demonstraram, em modelo de distensão colorretal em camundongos, que o NaHS reduz a hipersensibilidade. Posteriormente, foram demonstradas outras atividades em modelos de dor relacionadas à administração de doadores de H<sub>2</sub>S, como redução da alodínia mecânica induzida por lipopolissacarídeo (LPS), PGE<sub>2</sub> (CUNHA *et al.*, 2008a), carragenina (EKUNDI-

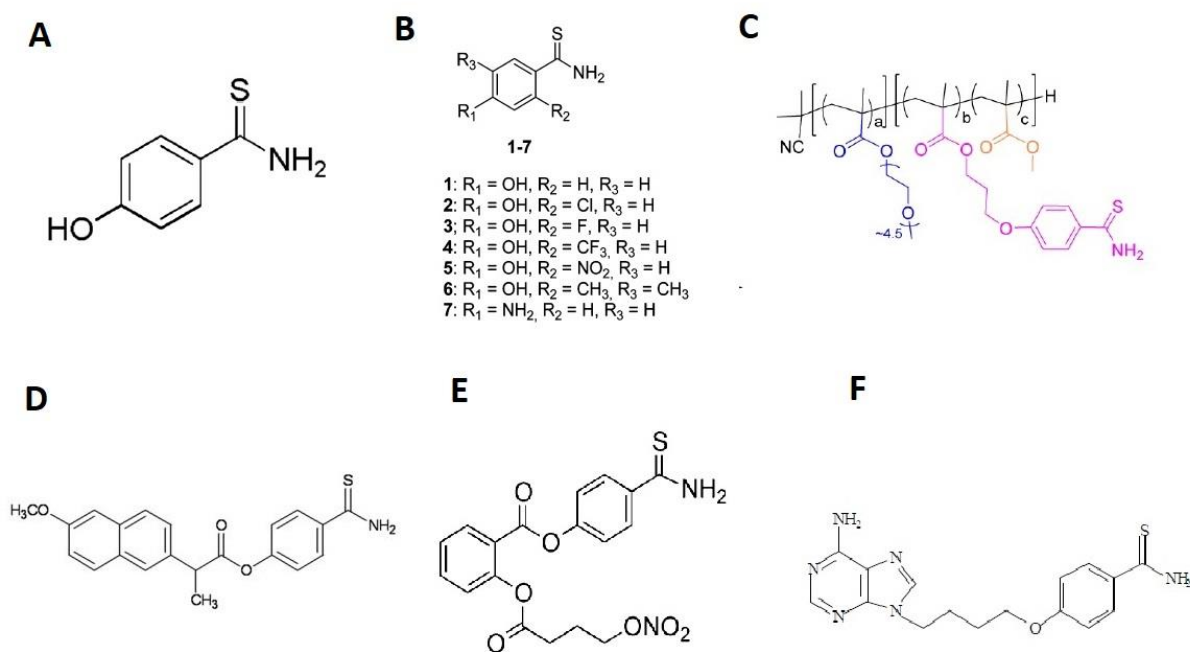
VALENTIM *et al.*, 2010) ou zimosano (DIEF *et al.*, 2015), redução de comportamento nociceptivo em modelo de dor orofacial induzida por formalina (DONATTI *et al.*, 2014), redução da hiperalgesia em modelo de retirada de opioides (YANG *et al.*, 2014) e redução de contorções induzidas por ácido acético (FONSECA *et al.*, 2015). Em modelos de dor neuropática, também foi observada atividade relacionada ao uso de H<sub>2</sub>S, como a reversão da alodínia mecânica e da hiperalgesia térmica induzidas por constrição do nervo isquiático (KIDA *et al.*, 2015) e redução da alodínia ao frio induzida por paclitaxel ou oxaliplatina (MANELLI *et al.*, 2017). Em modelo de câncer nos ossos, a inalação de H<sub>2</sub>S reduziu a alodínia mecânica e a hiperalgesia térmica, com redução da ativação da micróglia (ZHUANG *et al.*, 2017).

Visto que ativação de canais K<sub>ATP</sub> pelo H<sub>2</sub>S é bem demonstrada, muitos estudos investigaram a correlação dessa propriedade com efeitos induzidos pelo H<sub>2</sub>S em diversos modelos. A demonstração de que antagonistas de canais K<sub>ATP</sub> são capazes de reverter os efeitos induzidos pelo H<sub>2</sub>S em modelos de dor (DISTRUTTI *et al.*, 2006; CUNHA *et al.*, 2008a; DONATTI *et al.*, 2014; FONSECA *et al.*, 2015) e inflamação (ZANARDO *et al.*, 2006; ANDRUSKI *et al.*, 2008; DUDEK *et al.*, 2013) indica que essa via tem grande importância nas atividades antinociceptiva e anti-inflamatória desse gasotransmissor. Entretanto, são necessárias investigações adicionais que avaliem a participação de outras vias importantes para o desenvolvimento da dor e da resposta inflamatória.

### **1.3.2 Benzotiamidas**

Benzotiamidas, tiobenzamidas, ariltioamidas ou benzocarbotiamidas são substâncias em que a estrutura básica consiste das funções orgânicas tiocetona e amina ligados a um benzil (**Figura 1**). Essas substâncias liberam H<sub>2</sub>S por meio de um mecanismo de hidrólise, promovido por ácido ou base (HALL e SATCHELL, 1974). O grupo de Wallace *et al.* (2007b) foi um dos primeiros a utilizar uma benzotiamida, a 4-hidróxi-benzenocarbotiamida, como doador de H<sub>2</sub>S em modelos farmacológicos, avaliando o efeito induzido por doadores de H<sub>2</sub>S em modelo de úlcera gástrica. Posteriormente, o grupo de Wallace *et al.* (2010) desenvolveu um híbrido doador de H<sub>2</sub>S derivado do naproxeno, o ATB-346, utilizando a 4-hidróxi-benzenocarbotiamida (4-HBC) como

porção doadora de H<sub>2</sub>S acoplada ao AINE. Em outro estudo, no qual foram sintetizados e avaliados compostos híbridos doadores de H<sub>2</sub>S e NO derivados do ácido acetilsalicílico, a 4-HBC também foi utilizado como porção doadora de H<sub>2</sub>S em um dos híbridos avaliados (KODELA *et al.*, 2012).



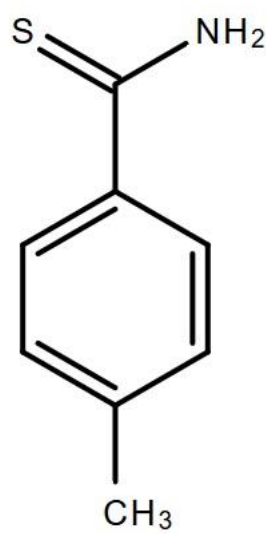
**Figura 1** – Exemplos de benzotiamidas e polímero ou híbridos que utilizem benzotiamidas como doadoras de H<sub>2</sub>S. (A) 4-Hidróxi-benzenocarbottiamida (Wallace *et al.*, 2007b); (B) 4-hidróxi-benzenocarbottiamida, análogos 2- e 2,5-substituídos e 4-aminobenzotiamida (Martelli *et al.*, 2013); (C) polímero [POEGMA<sub>a</sub>]-*block*-[PTHA<sub>b</sub>-*co*-PMMA<sub>c</sub>]-H (Ercole *et al.*, 2015); (D) ATB-346 (Wallace *et al.*, 2010); (E) NOSH-3 (4-carbamotioilfenil 2-((4-(nitrooxi)butanoil)-oxi)benzoato) (Kodela *et al.*, 2012); (F) Híbrido de adenina e 4-HBC (Lougiakis *et al.*, 2016).

Martelli *et al.* (2013) demonstraram que diversas ariltioamidas, com diferentes padrões de substituição no anel benzênico, eram capazes de liberar H<sub>2</sub>S *in vitro*. Algumas, porém, como a 4-HBC, só exibiam essa propriedade na presença de tióis orgânicos (glutathiona e L-cisteína). Além disso, foi demonstrado que a 4-HBC reverteu a vasoconstrição induzida por noradrenalina em anéis aórticos de ratos. Polímeros acoplados à 4-HBC foram sintetizados e também avaliados quanto a sua capacidade de liberar H<sub>2</sub>S *in vitro* na ausência e presença de L-cisteína. Apesar de ter sido demonstrada a liberação de H<sub>2</sub>S pelos polímeros na ausência de L-cisteína, a presença desse aminoácido permitiu uma liberação de H<sub>2</sub>S significativamente maior

(ERCOLE *et al.*, 2016). Híbridos de adenina com 4-HBC conferiram cardioproteção aumentada em relação à adenina em modelo de isquemia do miocárdio, além de ter sido demonstrada a capacidade de liberar H<sub>2</sub>S *in vitro* tanto pelo híbrido quanto pela 4-HBC por mecanismo de hidrólise da ligação tioamida. Nesse mesmo estudo, também foi observado que esses compostos, na presença de glutathione, levam à formação de persulfetos. Esse último achado indica que, em condições fisiológicas, essa classe de doadores de H<sub>2</sub>S pode atuar de modo a promover S-sulfidração de proteínas, um dos principais mecanismos em que os efeitos biológicos relacionados ao H<sub>2</sub>S se origina (LOUGIAKIS *et al.*, 2016).

Apesar de apresentar algumas diferenças em relação às tiobenzamidas, como a estrutura do anel benzênico e as cadeias laterais ligadas a este, as tioamidas etionamida e protionamida são fármacos já bem estabelecidos utilizados como agentes orais de segunda linha no tratamento de pacientes pediátricos com tuberculose (THEE *et al.*, 2016). Embora possuam a função tioamida e alguns estudos demonstrarem a presença de H<sub>2</sub>S durante a decomposição desses fármacos (TAGAMI e MAEDA, 1983), não há estudos que relacionem atividades biológicas dessas substâncias com capacidade de doar H<sub>2</sub>S.

As tiobenzamidas estão incluídas, assim como o ADT-OH, na classe de moléculas que são utilizadas como doadoras de H<sub>2</sub>S nos estudos que avaliam efeitos relacionados ao H<sub>2</sub>S (PAPAPETROPOULOS *et al.*, 2015). Visto que os estudos disponíveis indicam que o H<sub>2</sub>S possui atividade em diversos modelos de dor e inflamação, e que as tiobenzamidas são doadores de H<sub>2</sub>S, tanto como porção para síntese de híbridos quanto isoladamente, a continuidade das investigações nessa área é plenamente justificada. Logo, é racional imaginar que a investigação dos efeitos induzidos por uma tiobenzamida em modelos de dor e inflamação pode trazer mais conhecimento sobre esses mecanismos de ação e levar, de acordo com os resultados, à perspectiva de uso de uma substância dessa classe como anti-inflamatório e/ou analgésico. Assim, foi proposta a caracterização, no presente estudo, dos efeitos induzidos pela 4-metil-benzenocarbottiamida (**Figura 2**), em diferentes modelos experimentais de dor e inflamação.



**Figura 2 - Estrutura química da 4-metil-benzenocarbotiamida.**

## 2 JUSTIFICATIVA

Visto que vários fármacos disponíveis para o tratamento de pacientes com condições inflamatórias e dolorosas ainda apresentam limitações como eficácia reduzida ou segurança inadequada, faz-se necessário o desenvolvimento de novas alternativas farmacoterapêuticas que sejam mais eficazes e tenham melhores perfis de segurança. O uso de substâncias doadoras de H<sub>2</sub>S em diversos estudos tem crescido de forma exponencial nos últimos anos. O H<sub>2</sub>S, atualmente, aparece como uma molécula amplamente investigada em ensaios pré-clínicos, visto o seu potencial em atuar em diferentes processos fisiológicos e patológicos. Apesar do número crescente de estudos envolvendo o H<sub>2</sub>S, ainda existem muitas atividades e mecanismos relacionados ao H<sub>2</sub>S a serem elucidados. O H<sub>2</sub>S possui atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias, principalmente quando tem origem exógena, por meio da administração de substâncias que são capazes de doar esse gás. As tiobenzamidas são substâncias que liberam H<sub>2</sub>S e apresentam diversas atividades biológicas relacionadas a essa propriedade. Nesse contexto, a investigação da atividade de uma benzotiamida, a 4-metil-benzenocarbottiamida, em modelos de dor e inflamação, assim como dos possíveis mecanismos envolvidos nessa atividade, podem levar a melhor caracterização do seu perfil farmacológico e à maior interesse na investigação dessa molécula como candidato à fármaco útil no tratamento de pacientes com diversas condições inflamatórias e dolorosas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Determinar as atividades da 4-metil-benzenocarbotiamida em diferentes modelos experimentais de dor e inflamação, bem como os possíveis mecanismos envolvidos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar e avaliar os efeitos induzidos pela 4-metil-benzenocarbotiamida em modelos experimentais de inflamação e de dores nociceptiva, inflamatória e neuropática.
- Determinar os mecanismos envolvidos nas atividades da 4-metil-benzenocarbotiamida, principalmente os efeitos sobre a ativação dos sistemas opioidérgico e serotoninérgico e dos canais  $K_{ATP}$ , a produção de citocinas inflamatórias e a atividade da mieloperoxidase.
- Determinar a capacidade de liberação de  $H_2S$  *in vitro* pela 4-metil-benzenocarbotiamida.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (25 a 30 g) provenientes do Biotério da Faculdade de Farmácia da UFMG. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 h e em sala com temperatura controlada de  $27 \pm 1$  °C, a qual corresponde à zona de termoneutralidade para roedores (GORDON, 1990). Ração e água foram fornecidas *ad libitum*, exceto quando o protocolo exigia administração *per os* (*p.o.*), no qual a ração foi retirada 12 h antes do tratamento. Os animais foram ambientados na sala de experimentação por pelo menos dois dias antes da realização dos experimentos. Após o término destes, os animais foram submetidos à eutanásia. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG) sob o número de protocolo 22/2016. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações para experimentação relacionada à dor em animais (ZIMMERMANN, 1986).

### 4.2 Fármacos, reagentes e veículos

- 4-Metil-benzenocarbotiamida; sintetizado pelo Profa. Renata Barbosa de Oliveira – Laboratório de Química Farmacêutica, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, UFMG - Composto doador de H<sub>2</sub>S avaliado nos modelos experimentais de dor e inflamação.
- Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA; Sigma-Aldrich, EUA) - Reagente para preparo da solução de extração de citocinas e da solução padrão utilizada na calibração do eletrodo rígido de H<sub>2</sub>S.
- Ácido sulfúrico (Merck, Alemanha) – reagente para preparo da solução de parada para reação colorimétrica no ensaio de ELISA.
- Albumina sérica bovina (BSA; Sigma-Aldrich, EUA) - Reagente para preparo da solução de extração de citocinas e tampão de bloqueio no ensaio de ELISA.
- Aprotinina (Sigma-Aldrich, EUA) – Reagente para preparo de solução de extração de citocinas.
- Carboximetilcelulose (CMC) (Sigma-Aldrich, EUA) – Veículo.

- Carragenina  $\lambda$  tipo IV (Sigma-Aldrich, EUA) - Estímulo nocivo/inflamatório.
- Cloreto de benzalcônio (Sigma-Aldrich, EUA) - Reagente para preparo de solução de extração de citocinas.
- Cloridrato de cetamina (União Química, Brasil) - Anestésico.
- Cloridrato de ciproheptadina (Sigma-Aldrich, EUA) - Antagonista serotoninérgico.
- Cloridrato de naltrexona (Sigma-Aldrich, EUA) - Antagonista opioidérgico.
- Cloridrato de xilazina (União Química, Brasil) - Coadjuvante de anestesia.
- Cloreto de sódio (NaCl) 0,9% p/v injetável (EquiPLEX, Brasil) - Veículo usado para o preparo das soluções ou suspensões utilizadas em administrações intraperitoneal (i.p.) ou intraplantar (i.pl.)
- Cloreto de sódio (NaCl) 0,9 % p/v não injetável (Sanobiol, Brasil) - Veículo usado para o preparo das soluções ou suspensões administradas *p.o.*
- Dexametasona 21-fosfato dissódico (Sigma-Aldrich, EUA) - Anti-inflamatório esteroide.
- Dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich, EUA) – Veículo para preparo da solução de extração de citocinas.
- Dipirona sódica (Sanofi Aventis, Brasil) – Analgésico.
- Fenobarbital (Sanofi Aventis, Brasil) - Fármaco depressor do Sistema nervoso central (SNC).
- Fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF; Sigma-Aldrich, EUA) - reagente para preparo da solução de extração de citocinas.
- Formaldeído 0,92% (Sigma-Aldrich, EUA) - Estímulo nociceptivo/inflamatório.
- Glibenclamida (Sigma-Aldrich, EUA) - Bloqueador de canais  $K_{ATP}$ .
- Ortofenilenodiamina (OPD; Sigma, EUA) - reagente para preparo da solução do substrato no ensaio de ELISA.
- Peróxido de hidrogênio (Synth, Brasil) - reagente para preparo da solução do substrato no ensaio de ELISA.
- Polietilenoglicol (PEG) 400 (Synth, Brasil) – Veículo.
- Sulfeto de sódio (Sigma-Aldrich, EUA) – Doador de  $H_2S$  utilizado na solução padrão para calibração do eletrodo rígido para determinação de  $H_2S$ .
- Solução de PBS pH 7,2 – Reagente utilizado no ensaio de ELISA e na quantificação de  $H_2S$ .

- Tween 20 (Sigma, EUA) - reagente utilizado no ensaio de ELISA.

### **4.3 Preparo das soluções e suspensões, doses e vias de administração**

#### **4.3.1 4-Metil-benzenocarbotiamida**

As suspensões de 4-metil-benzenocarbotiamida foram preparadas em solução de PEG 400 e salina estéril (proporção 4:6) e administradas imediatamente por via i.p. em volume de 10 mL/kg. As doses utilizadas nos protocolos experimentais foram de 50, 100 e 150 mg/kg.

#### **4.3.2 Estímulos inflamatórios**

- **Formaldeído**

A solução de formaldeído 0,92% foi preparada em solução de cloreto de sódio a 0,9% p/v, imediatamente antes de cada experimento. Foram injetados 20 µL dessa solução por via i.pl. na pata posterior direita dos camundongos.

- **Carragenina**

A suspensão de carragenina 2% foi preparada em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v, no dia anterior ao experimento e armazenada sob refrigeração. Foram injetados 30 µL (600 µg de carragenina) dessa suspensão por via i.pl. na pata posterior direita dos camundongos.

#### **4.3.3 Suspensão de CMC**

A suspensão de CMC 0,5% (p/v) foi preparada em solução salina 0,9%, no dia anterior ao experimento.

#### **4.3.4 Antagonistas de receptores e bloqueador de canal iônico**

- **Naltrexona**

A solução de naltrexona foi preparada imediatamente antes da administração em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v. As doses utilizadas foram de 5 e 10 mg/kg, sendo administradas por via i.p. em volume de 4 mL/kg.

- **Glibenclamida e ciproheptadina**

As suspensões foram preparadas imediatamente antes de cada administração em suspensão de CMC 0,5% p/v em cloreto de sódio 0,9% p/v. As doses de glibenclamida foram de 20 e 40 mg/kg e as doses de ciproheptadina foram de 5 e 10 mg/kg. As suspensões foram administradas *p.o.* em volume de 10 mL/kg.

#### **4.3.5 Dipirona, dexametasona e fenobarbital**

As soluções foram preparadas imediatamente antes de cada administração em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v. As doses de dipirona, dexametasona e fenobarbital foram 500 mg/kg, 5 mg/kg e 50 mg/kg, respectivamente. As soluções de dipirona e fenobarbital foram administradas *p.o.* em volume de 10 mL/kg e 8 mL/kg, respectivamente. A dexametasona foi administrada por via i.p. em volume de 10 mL/kg.

#### **4.3.6 Soluções usadas nos ensaios para a determinação das concentrações de TNF- $\alpha$ ou CXCL1**

- **Solução tampão fosfato-salino (PBS)**

Reagentes: 12 g de NaCl; 0,302 g de KCl; 1,725 g de fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ); 0,306 g de fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Os reagentes foram dissolvidos em 1500 mL de água destilada e o pH foi ajustado para 7,4.

- **Solução para extração de citocinas**

Reagentes: 2,34 g de NaCl; 50  $\mu\text{L}$  de Tween 20; 500 mg de BSA; 4,48 mg de cloreto de benzalcônio; 37,2 mg de EDTA; 2  $\mu\text{L}$  de aprotinina; 1,7 mg de PMSF (dissolvidos em 100  $\mu\text{L}$  de DMSO). Os reagentes foram dissolvidos em 100 mL da solução de PBS.

- **Solução tampão de lavagem**

Reagente: Tween 20 0,1% em solução de PBS.

- **Solução tampão de bloqueio (BSA 1%)**

Reagente: 200 mg de BSA dissolvidos em 20 mL de PBS.

- **Solução diluente das amostras (BSA 0,1%)**

Reagente: 40 mg de BSA dissolvidos em 40 mL de PBS.

- **Solução tampão citrato**

Reagentes: 0,335 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e 0,129 g de ácido cítrico. Os reagentes foram dissolvidos em 25 mL de água destilada e o pH foi ajustado para 5,0.

- **Solução do substrato OPD**

Reagentes: 9,6 mg de OPD e 4,8  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30%. Os reagentes foram dissolvidos em 24 mL de solução tampão citrato.

- **Solução de parada para reação colorimétrica**

Reagente: ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 1 M)

#### **4.3.7 Soluções usadas na quantificação de $\text{H}_2\text{S}$**

- **Solução de sulfeto de sódio**

Reagentes: 5 mg de EDTA e 35,25 mg de sulfeto de sódio ( $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ). Os reagentes foram dissolvidos em 250 mL água desoxigenada previamente com atmosfera de argônio e a solução foi mantida ao abrigo da luz e sob refrigeração.

- **Solução tampão fosfato (PBS)**

Reagentes: 20 g de  $\text{NaCl}$ ; 0,5 g de  $\text{KCl}$ ; 3,55 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 0,68 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Os reagentes foram dissolvidos em 250 mL de água ultrapura e o pH foi ajustado para 7,2.

#### 4.4 Avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído

No dia do experimento, os animais foram colocados sob funis de vidro (18 cm de diâmetro e 14 cm de altura) cerca de 10 min antes da administração de formaldeído, para ambientação (**Figura 3**). A divisão dos grupos foi feita de forma que as massas corporais médias dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes, sendo utilizados sete animais para cada grupo experimental. Foram injetados 20  $\mu$ L da solução de formaldeído 0,92% por via i.pl. na pata posterior direita dos camundongos. A 4-metil-benzenocarbotiamida foi administrada por via i.p. nas doses de 50, 100 ou 150 mg/kg, 30 min antes da injeção de formaldeído. A duração do comportamento de lambida após a injeção i.pl. de formaldeído foi determinada nos períodos de 0-5 min e de 15-30 min, que correspondem à primeira e à segunda fase da resposta nociceptiva, respectivamente (**Figura 4**). Nesse modelo, o controle da temperatura ambiente (27-28 °C) é importante, pois a segunda fase da resposta nociceptiva é bastante reduzida quando o experimento é realizado em temperatura inferior a 23 °C (TJØLSEN *et al.*, 1992). Os resultados foram expressos como a duração do comportamento de lambida da pata injetada, durante a primeira e a segunda fase da resposta nociceptiva.



**Figura 3** - Aparato usado para a avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído.



**Figura 4 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida (4-MBC) sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído.**

#### 4.5 Avaliação da resposta nociceptiva induzida por calor

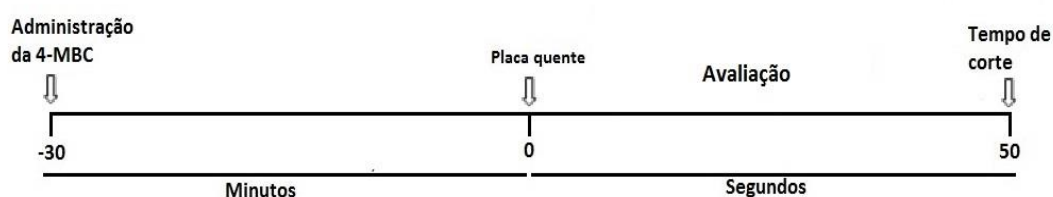
A avaliação da resposta nociceptiva induzida por calor foi realizada com auxílio da placa quente (Insight Ltda, Ribeirão Preto, Brasil – **Figura 5**). Este modelo foi originalmente descrito por Woolfe & MacDonald (1944). Os animais foram colocados sob a superfície não aquecida da placa durante 2 min para ambientação nos três dias anteriores ao experimento. A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as massas corporais médias dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes.



**Figura 5 - Aparato usado para a avaliação da resposta nociceptiva induzida por calor.**

Para cada grupo experimental foram utilizados sete animais. No momento do teste, os camundongos foram colocados, individualmente, sobre a placa metálica aquecida

na temperatura estabelecida e o tempo para que os animais exibissem comportamentos indicativos de desconforto (lambida das patas ou saltos) foi determinado e considerado como a latência para a resposta nociceptiva. A temperatura utilizada foi 50 °C e o tempo de corte foi de 50 s, a fim de evitar a ocorrência de lesão tecidual (**Figura 6**). A 4-metil-benzenocarbotiamida foi administrada por via i.p. nas doses de 50, 100 ou 150 mg/kg, 30 min antes da realização do experimento.



**Figura 6 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida (4-MBC) sobre a resposta nociceptiva induzida por calor.**

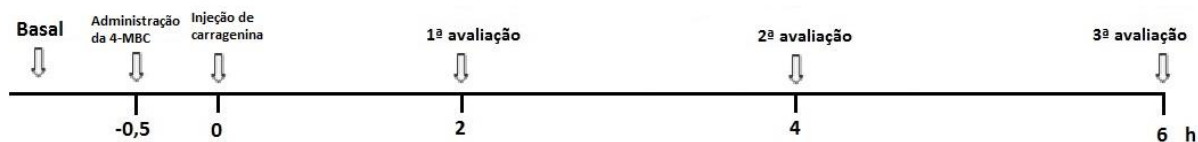
#### 4.6 Avaliação da alodínia mecânica induzida por carragenina

Os camundongos foram colocados em compartimentos de acrílico (22 x 18 x 14 cm) dispostos sobre um suporte que possui como base uma tela metálica. Os animais foram ambientados no aparato em uma sessão diária de 60 min cada, durante dois dias antes da realização do experimento e em uma sessão de 10 min, imediatamente antes do experimento. A alodínia mecânica foi avaliada por meio do uso de um analgesímetro digital (Insight Ltda., Ribeirão Preto, Brasil), o qual permite determinar o limiar para a retirada da pata, que é expresso em gramas (g). Uma ponteira de polietileno, acoplada a um braço transdutor de força (faixa: 0,1 a 1000 g, ou aproximadamente 0,1 a 10 N), foi pressionada sobre o centro da superfície plantar da pata posterior direita de cada animal (**Figura 7**) e um aumento gradual de pressão foi feito até que o animal retirasse a pata. O valor indicando a pressão a qual fez com que o animal removesse a pata foi registrado automaticamente. Para cada animal, foram feitas cinco avaliações em intervalos de 20 s, descartando-se o maior e o menor valor e calculando-se o limiar nociceptivo como a média das três medidas restantes.



**Figura 7 – Aparato utilizado para a avaliação da alodínia mecânica. PP - ponteira de polietileno; TF - transdutor de força. O sítio de estimulação é o centro delimitado pelos pontos pretos.**

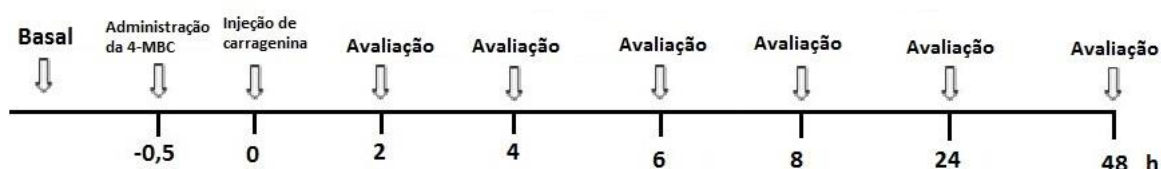
O limiar basal para retirada de pata de cada animal foi determinado no dia anterior ao teste e a divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as massas corporais e os limiares basais médios dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes. Para cada grupo experimental, foram utilizados sete animais. A 4-metil-benzenocarbotiamida foi administrada por via i.p., nas doses de 50, 100 ou 150 mg/kg, 30 min antes da administração i.pl. de 600  $\mu$ g de carragenina (20  $\mu$ L da suspensão) e os animais foram avaliados 2, 4 e 6 h após a injeção do estímulo inflamatório (**Figura 8**).



**Figura 8 - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida (4-MBC) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina.**

#### **4.6.1 Avaliação da duração do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida no modelo de alodínia mecânica induzida por carragenina**

Com o objetivo de verificar a duração do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida no modelo de alodínia mecânica induzida por carragenina, foi avaliado o limiar nociceptivo até confirmação da ausência do efeito da 4-metil-benzenocarbotiamida, que foi administrada. Nesse protocolo, a 4-metil-benzenocarbotiamida foi administrada por via i.p., na dose de 150 mg/kg, 30 min antes da administração i.pl. de 600 µg de carragenina (20 µL da suspensão) e os animais foram avaliados 2, 4, 6, 8, 24 e 48 h após a injeção do estímulo inflamatório (**Figura 9**).



**Figura 9** - Escala temporal de avaliação da duração do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida (4-MBC) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina.

#### **4.7 Avaliação dos efeitos induzidos por naltrexona, glibenclamida ou ciproheptadina sobre a atividade da 4-metil-benzenocarbotiamida no modelo de alodínia mecânica induzida por carragenina**

A fim de avaliar possíveis mecanismos envolvidos na atividade da 4-metil-benzenocarbotiamida no modelo de alodínia mecânica induzida por carragenina, foram utilizados antagonistas opioidérgico (naltrexona) ou serotoninérgico (ciproheptadina) e um bloqueador de canais  $K_{ATP}$  (glibenclamida). Naltrexona (- 30 min) foi administrada por via i.p., enquanto glibenclamida e ciproheptadina (- 30 min) foram administradas *p.o.* (**Figura 10**), previamente à administração da 4-metil-benzenocarbotiamida. A carragenina (600 µg, 30 µL) foi injetada por via i.pl. 30 min após a administração da 4-metil-benzenocarbotiamida e a alodínia mecânica foi avaliada 2, 4 e 6 h após a administração do estímulo inflamatório.



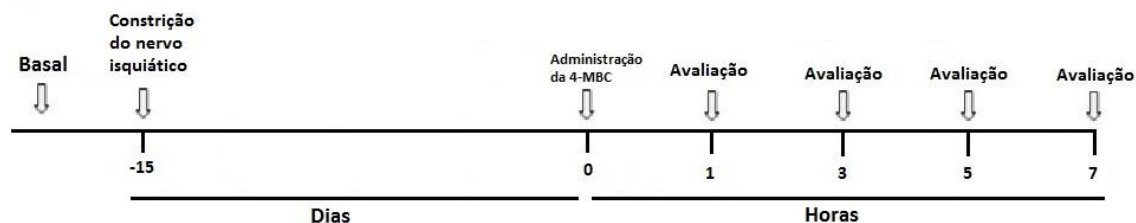
**Figura 10** - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida (4-MBC) sobre a alodínia induzida por carragenina em animais previamente tratados com naltrexona, ciproheptadina ou glibenclamida.

#### 4.8 Avaliação da alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo isquiático

Os animais foram anestesiados com uma injeção i.p. de uma solução contendo cetamina (90 mg/kg) e xilazina (9 mg/kg). Em seguida, por meio de uma incisão na região do bíceps femoral, previamente tricotomizada e higienizada com iodopolividona 10% p/v, um segmento do nervo isquiático foi exposto. Foram feitas quatro ligaduras, espaçadas em 1 mm uma das outras, no segmento exposto, com fio Cat-Gut 4.0 cromado (Brasuture, São Sebastião do Gramma, Brasil). A força de constrição foi exercida de forma a não impedir a circulação sanguínea pela vasculatura superficial epineural e todo o procedimento foi realizado de forma a evitar lesões nos nervos ou em regiões próximas que pudessem afetar a atividade motora dos animais ou causar lesão muscular. Para a padronização, foram utilizados dois grupos: o grupo controle (falso-operado), composto por animais submetidos a uma falsa cirurgia, na qual o nervo não foi constringido, apenas visualizado, e o grupo de animais submetidos à cirurgia (operado). A avaliação da alodínia mecânica nos animais submetidos à cirurgia ou à falsa cirurgia foi realizada conforme descrito anteriormente (item 4.6).

No dia anterior à realização da cirurgia, o limiar basal para retirada de pata de cada animal foi determinado. A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as massas corporais e os limiares basais médios dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes. Após quinze dias de realização da cirurgia, a 4-metil-benzenocarbotiamida foi administrada *p.o.* nas doses de 50, 100 ou 150 mg/kg

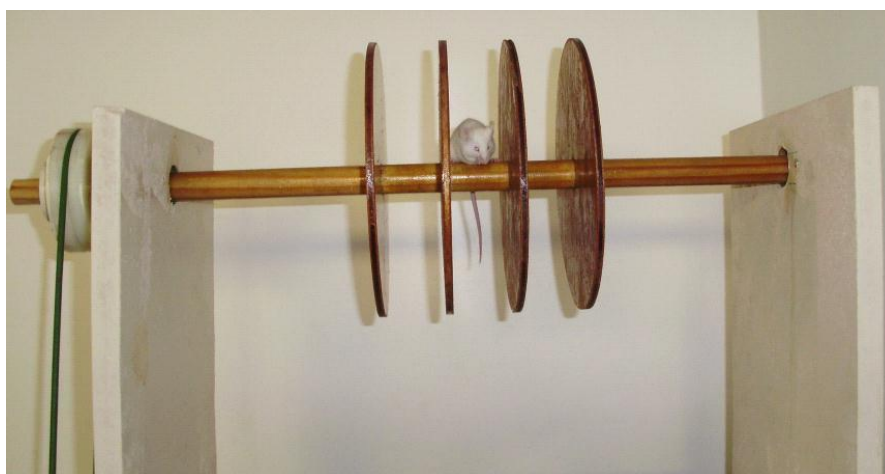
e a alodínia mecânica foi avaliada 1, 3, 5 e 7 h após a administração do composto (Figura 11).



**Figura 11** - Escala temporal de avaliação da duração do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbottiamida (4-MBC) sobre a alodínia mecânica induzida por constrição do nervo isquiático.

#### 4.9 Avaliação da atividade motora

A atividade motora foi avaliada na haste girante (2,3 cm de diâmetro, 14 rpm; **Figura 12**), de acordo com o procedimento proposto por Vaz *et al.* (1996), que representa uma modificação daquele originalmente descrito por Dunham e Miya (1957). Nos três dias que antecederam os experimentos, os animais foram treinados no aparato durante 120 s. No dia do experimento, os animais foram colocados sobre a haste e o tempo basal de permanência foi determinado. O tempo de corte foi de 120 s.



**Figura 12** - Aparato usado para a avaliação da atividade motora.

A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que os tempos basais médios dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes. Para cada grupo experimental foram utilizados seis animais. A 4-metil-benzenocarbotiamida (50, 100 ou 150 mg/kg; i.p.) ou o controle positivo fenobarbital (50 mg/kg, p.o.) foram administrados 30 min antes da primeira avaliação na haste girante. As seguintes avaliações ocorreram 0,5; 1,5; 3 e 6 h após administração da 4-metil-benzenocarbotiamida, fenobarbital ou veículo (**Figura 13**).



**Figura 13** – Escala temporal de avaliação dos efeitos induzidos pela 4-metil-benzenocarbotiamida (4-MBC) ou pelo fenobarbital sobre a coordenação motora.

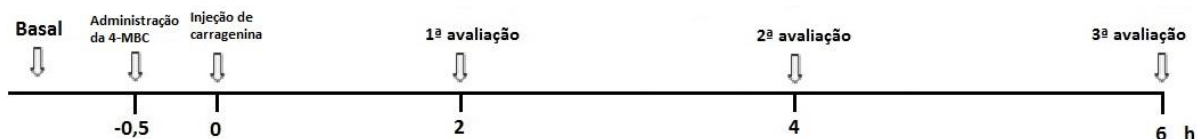
#### 4.10 Avaliação do edema de pata induzido por carragenina

Para a avaliação do edema de pata foi usado um pletismômetro (Modelo 7140, Ugo Basile, Itália). Esse aparelho contém uma célula cilíndrica para a medida do volume de pata, preenchida com uma solução de baixa concentração eletrolítica, conectada a outra célula, dentro da qual existe um eletrodo. Um sistema de vasos comunicantes faz com que o deslocamento da solução eletrolítica na célula onde a pata do animal é mergulhada resulte em um deslocamento da solução na célula que contém o eletrodo (**Figura 14**). Após ter sido calibrado, o aparelho converte o deslocamento do líquido em volume, que é indicado em um visor digital. Quando a pata do animal é introduzida na célula de medida até a articulação tíbio-tarsal, um pedal é pressionado pelo experimentador, que fixa o valor do volume observado.



**Figura 14** - Aparato utilizado para a avaliação do edema de pata.

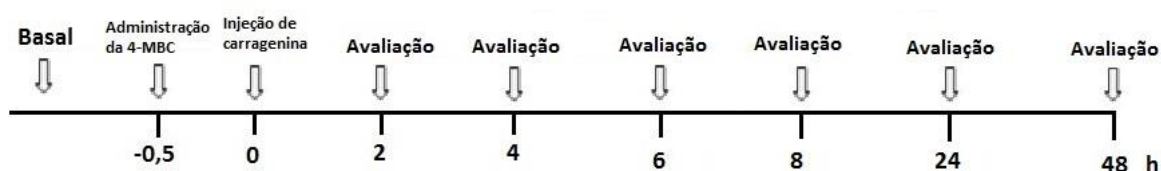
O volume de pata basal de cada animal foi medido no dia anterior ao experimento e a divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as massas corporais e os volumes de pata basais médios dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes. Para cada grupo experimental, foram utilizados sete animais. A 4-metil-benzenocarbottiamida foi administrada i.p., nas doses de 50, 100 ou 150 mg/kg, 30 min antes da administração por via i.pl. de 600 µg de carragenina (20 µL da suspensão) e os animais foram avaliados 2, 4 e 6 h após a injeção do estímulo inflamatório (**Figura 15**).



**Figura 15** - Escala temporal de avaliação do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbottiamida (4-MBC) sobre o edema de pata induzido por carragenina.

#### **4.10.1 Avaliação da duração do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida no modelo de edema de pata induzido por carragenina**

Com o objetivo de verificar a duração do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida no modelo de edema de pata induzido por carragenina, foi avaliado o volume da pata até confirmação da ausência do efeito da 4-metil-benzenocarbotiamida, que foi administrada, por via i.p., na dose de 150 mg/kg, 30 min antes da administração i.pl. de 600 µg de carragenina (20 µL da suspensão) e os animais foram avaliados 2, 4, 6, 8, 24 e 48 h após a injeção do estímulo inflamatório (Figura 16).



**Figura 16** - Escala temporal de avaliação da duração do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida (4-MBC) sobre o edema de pata induzido por carragenina.

#### **4.11 Determinação da concentração de TNF- $\alpha$ e CXCL1 e atividade de mieloperoxidase**

- **Coleta e preparo das amostras**

A 4-metil-benzenocarbotiamida (150 mg/kg) foi administrada por via i.p., 30 min antes da injeção do estímulo inflamatório e o edema de pata foi avaliado previamente à coleta. Posteriormente, com os animais anestesiados, foi realizada a coleta do tecido da pata direita posterior, coletado 4 h após administração i.pl. de carragenina. Após a coleta das amostras de tecido da pata dos camundongos, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e foi feita a determinação das massas dos tecidos, que, logo após, foram armazenados no freezer a -20 °C. Posteriormente, os tecidos foram descongelados e processados em homogeneizador de tecidos (Modelo

ULTRA 80-11, Ultrastirrer) em solução para extração de citocinas, seguido de centrifugação para utilização do sobrenadante (3000 rpm, 10 min. a 4°C). Para cada 100 mg de tecido foi utilizado 1 mL de solução de extração de citocinas. O sobrenadante resultante foi recolhido para a determinação das concentrações de TNF- $\alpha$  e CXCL1. O sedimento do homogeneizado foi usado para a determinação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).

- **Determinação da concentração de TNF- $\alpha$  e CXCL1**

Os sobrenadantes resultantes da homogeneização e da centrifugação das amostras foram recolhidos e armazenados a -70 °C. As concentrações de TNF- $\alpha$  e CXCL1 foram determinadas de acordo com as instruções do fabricante R&D Systems. O ensaio foi realizado em placa de microtitulação de 96 poços. O anticorpo de captura foi diluído em PBS e foram adicionados 50  $\mu$ L dessa solução em cada poço. A placa foi mantida na geladeira (4 °C) durante 12 h. Posteriormente, a placa foi lavada com tampão de lavagem e bloqueada com tampão de bloqueio (BSA 1%). Após 1 h, a placa foi lavada novamente e foram adicionados 50  $\mu$ L de TNF- $\alpha$  ou CXCL1 (duplicata), em diluição seriada, correspondentes à curva-padrão, nas duas primeiras colunas da placa. Nos outros poços, foram adicionados 50  $\mu$ L dos sobrenadantes (diluídos na proporção 1:3, no caso na quantificação de CXCL1 ou sem diluição, no caso da quantificação de TNF- $\alpha$ ) em BSA 0,1% e nos últimos dois poços, foram adicionados 50  $\mu$ L de PBS (branco). A placa foi devidamente vedada e armazenada na geladeira (4 °C) durante 12 h.

Em seguida, a placa foi lavada e foram adicionados 50  $\mu$ L do anticorpo de detecção em cada poço e, durante 2 h, a placa foi vedada e mantida em temperatura ambiente. Após esse período, a placa foi lavada e foram adicionados 50  $\mu$ L do revelador estreptavidina em cada poço e, durante 20 min, a placa foi mantida, novamente, em temperatura ambiente. Finalmente, foram adicionados 50  $\mu$ L da solução do substrato (OPD) em cada poço. A reação foi devidamente monitorada e, com aparecimento de coloração amarelada (20 a 30 min) a reação foi interrompida com a adição de 25  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A leitura foi feita no leitor de ELISA, usando comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos em quantidade de TNF- $\alpha$  ou CXCL1 presente no tecido (pg/100 mg de tecido).

- **Atividade da MPO**

Ao sedimento resultante após centrifugação do tecido homogeneizado, foram adicionados 750 µL de solução de NaCl 0,2% gelado para cada 50 mg de tecido. Em seguida, foi adicionado NaCl 1,6% com glicose 5% gelado (750 µL para cada 50 mg de tecido). Uma nova homogeneização foi realizada e o homogenato foi armazenado a -70 °C até a realização do ensaio. Os homogenatos foram inicialmente descongelados em temperatura ambiente e novamente congelados em nitrogênio líquido, por três vezes. Em seguida, foram descongelados em água corrente. Os congelamentos e descongelamentos foram repetidos por três vezes. Após esses ciclos, os homogenatos foram centrifugados por 15 min a 10.000 rpm a 4 °C e os sobrenadantes obtidos foram coletados para a realização do ensaio enzimático. O ensaio foi realizado em placa de microtitulação de 96 poços. Nos primeiros dois poços, foram adicionados 25 µL de tampão PBS (branco). Nos outros poços, foram adicionados, em duplicata, 25 µL dos sobrenadantes diluídos (1:3). Após o preenchimento da placa com todas as amostras, foram adicionados 25 µL da solução de 3,3',5,5',-tetrametilbenzidina (TMB; 3,8 mg/mL em DMSO) em cada poço e a placa foi incubada a 37 °C por 5 min. Após esse intervalo, foram adicionados 100 µL da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em cada poço e a placa foi incubada novamente a 37 °C por 5 min. Para finalizar, foram adicionados 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em cada poço. A atividade da MPO foi calculada de acordo com a alteração da densidade óptica (D.O.), avaliada em leitor de ELISA, usando comprimento de onda de 450 nm.

#### **4.12 Quantificação de H<sub>2</sub>S**

Com o objetivo de avaliar a liberação de H<sub>2</sub>S na suspensão de 4-metil-benzenocarbotiamida, foi utilizado o analisador de radicais livres TBR4100 (WPI, USA) equipado com o sensor amperométrico ISO-H<sub>2</sub>S-2 (eletrodo rígido de sulfeto de hidrogênio). No dia anterior ao experimento, foi preparada a solução de Na<sub>2</sub>S 2 mM em EDTA, utilizada para calibração do eletrodo. O eletrodo foi imerso, ainda no mesmo dia, na solução tampão PBS 100 mM para polarização por aproximadamente

12 h, de modo que linha de base se apresentasse estável e com valor menor que 75.000 pA a 25 °C.

Foi construída uma curva de calibração, no dia do experimento, com a adição de cinco alíquotas conhecidas da solução padrão de Na<sub>2</sub>S (5, 10, 20 e 40 µL) à solução tampão em contato com o eletrodo. A curva de calibração foi criada por meio da plotagem das alterações na corrente (pA) em função das diferentes concentrações (µM) da solução padrão, utilizando-se, de acordo com instruções do fabricante, a equação  $H_2S = [Na_2S]/3.04173977$ .

Para a determinação da liberação de H<sub>2</sub>S pela 4-metil-benzenocarbottiamida, uma alíquota de 100 µL do composto, na concentração de 15 mg/mL (equivalente à dose de 150 mg/kg, volume 10 mL/kg) foi adicionada, à solução tampão PBS 100 mM em contato com o eletrodo. Foram obtidos os valores correspondentes às alterações na corrente (pA) nos intervalos de 42 s; 1,5; 3; 6; 9; 15; 30; 45; 60; 65 e 70 min após a preparação da suspensão da 4-metil-benzenocarbottiamida em PEG 400/salina estéril. Os valores correspondentes às concentrações de H<sub>2</sub>S foram, então, calculados de acordo com a curva de calibração obtida.

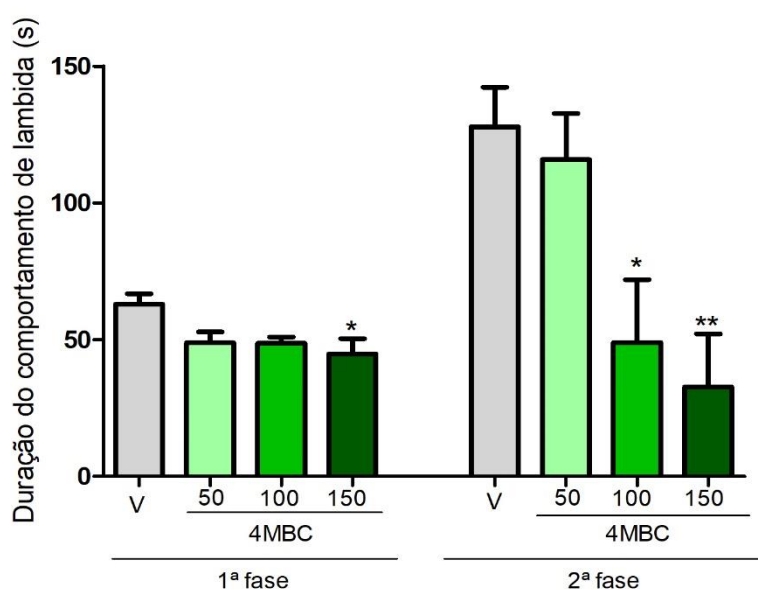
#### **4.13 Análise estatística**

Os dados foram analisados pelo programa *GraphPad Prism 5.0* (San Diego, CA, EUA) e os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. Os resultados referentes aos modelos de avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído ou placa quente, atividade motora e quantificação de TNF-α ou CXCL1 foram analisados por meio da análise de variância simples de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de Newman-Keuls. Os resultados referentes aos modelos de alodínia mecânica e edema de pata induzidos por carragenina e alodínia mecânica induzida por constrição do nervo isquiático foram analisados por meio de análise de variância de duas vias, seguida de teste de Bonferroni, exceto os resultados referentes à área sob a curva dos respectivos testes, as quais foram analisados por meio da análise de variância simples de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de Newman-Keuls ou teste t de Student. Adotou-se um nível de significância de 5% em relação ao grupo controle.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído

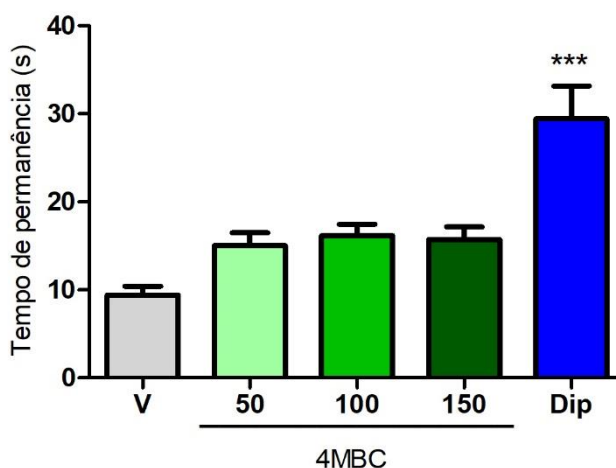
A administração i.pl. de formaldeído na pata posterior direita dos camundongos induziu um comportamento nociceptivo caracterizado por lambida, flexão da pata e manutenção desta fora de contato com a superfície. As durações médias do comportamento de lambida, parâmetro avaliado como resposta nociceptiva, do grupo controle (veículo), tratado com PEG 400 e salina estéril por via i.p., foram de, aproximadamente, 63 s na primeira fase e 128 s na segunda fase. A 4-metil-benzenocarbotiamida, nas doses de 100 e 150 mg/kg, inibiu a segunda fase da resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído. A primeira fase dessa resposta foi inibida apenas pela maior dose (**Figura 17**).



**Figura 17** - Efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida (4MBC; 50, 100 ou 150 mg/kg; i.p.; -30 min) sobre o comportamento de lambida induzido por formaldeído (0,92%; 20 µL; i.pl.). V = veículo. \* e \*\* indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente).  $n = 7$ .

## 5.2 Efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre a resposta nociceptiva induzida por calor

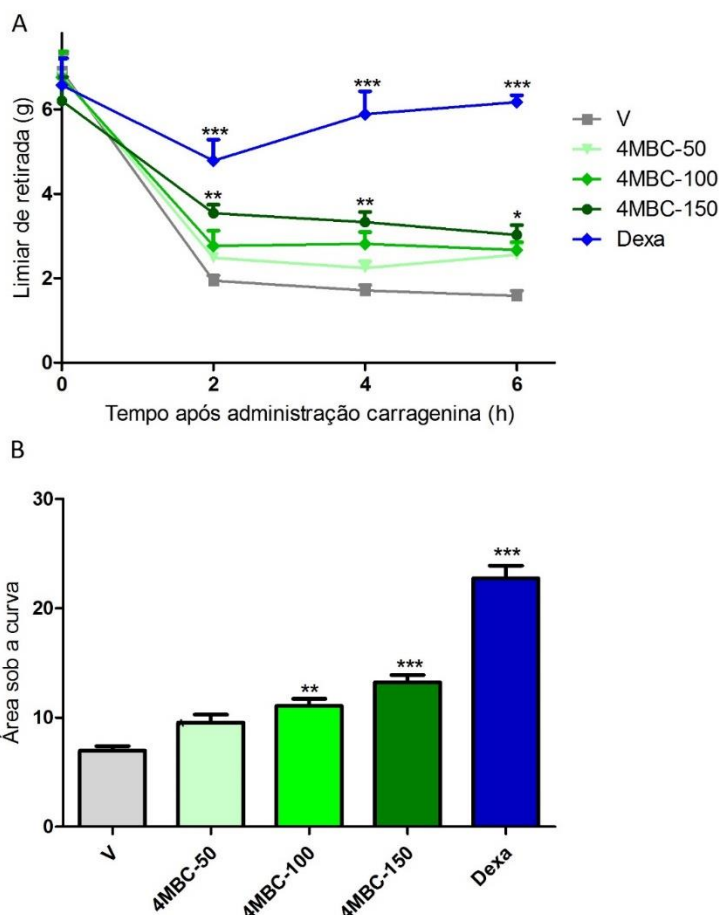
A resposta nociceptiva induzida por calor foi avaliada por meio da determinação da latência para os animais apresentarem o comportamento nociceptivo. As respostas comportamentais utilizadas para indicar a percepção do estímulo nocivo pelo animal foram lambida das patas anteriores ou posteriores ou saltos. O grupo controle teve uma latência média de aproximadamente 10 s. A 4-metil-benzenocarbotiamida, nas doses de 50, 100 e 150 mg/Kg, não inibiu a resposta nociceptiva induzida por calor, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa entre as latências médias dos grupos que receberam o composto e a latência média do grupo controle. O grupo tratado com dipirona, controle positivo do experimento, teve uma latência média de 30 s (**Figura 18**).



**Figura 18** - Efeitos induzidos pela 4-metil-benzenocarbotiamida (4MBC; 50, 100 e 150 mg/kg; i.p.; -30 min) ou dipirona (Dip; 500 mg/kg, p.o., -30 min) sobre o tempo de permanência dos camundongos na placa quente (50 °C). V = veículo. \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (V) ( $p < 0,001$ ).  $n = 7$ .

### 5.3 Efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina

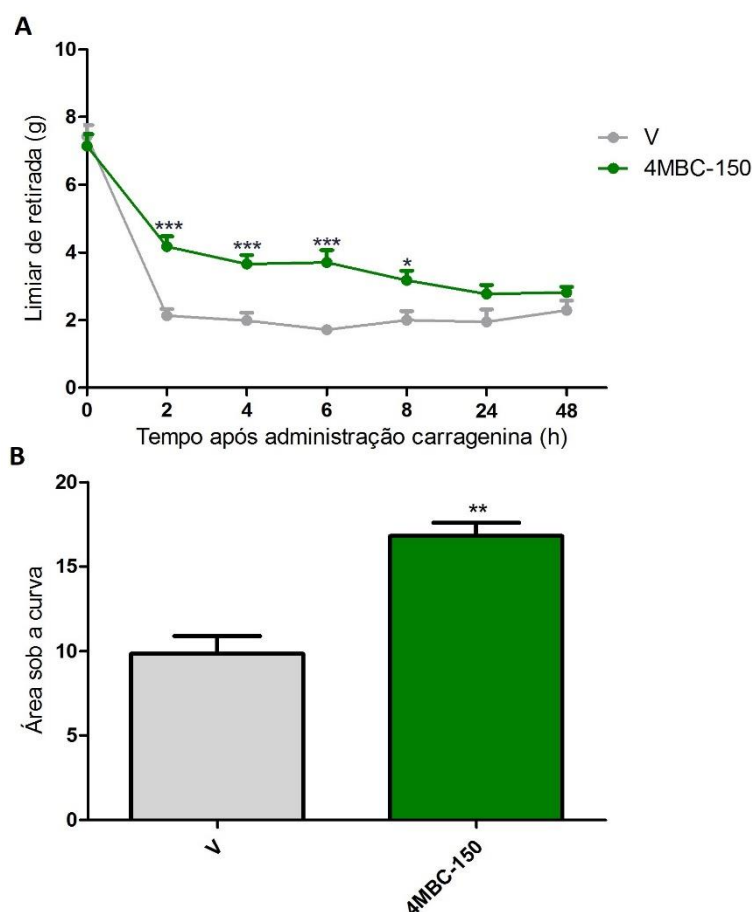
Para a avaliação da atividade da 4-metil-benzenocarbotiamida no modelo de alodínia mecânica, foi feita a administração da substância 30 min antes da injeção i.pl. de carragenina. O grupo controle, após receber carragenina, apresentou uma diminuição acentuada do limiar nociceptivo, que se manteve reduzido durante todo o período de avaliação (2, 4 e 6 h). A 4-metil-benzenocarbotiamida, na dose de 150 mg/kg, inibiu a alodínia mecânica nas avaliações realizadas na 2<sup>a</sup>, na 4<sup>a</sup> e na 6<sup>a</sup> h após injeção de carragenina. A dexametasona, utilizada como controle positivo do experimento, reduziu a alodínia mecânica induzida pela carragenina nos períodos avaliados (**Figura 19**).



**Figura 19:** Efeitos induzidos pela 4-metil-benzenocarbotiamida (4MBC; 50, 100 ou 150 mg/kg; i.p.; - 30 min) ou pela dexametasona (Dexa; 5 mg/kg, i.p., -30 min) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina (600 µg, 30 µL, i.pl.). V = veículo. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. \*, \*\* e \*\*\* indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (V) ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).  $n = 7$ .

### 5.3.1 Duração do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina

Conforme demonstrado na **figura 19**, a 4-metil-benzenocarbotiamida, na dose de 150 mg/kg, induziu efeito antialodínico duradouro, que se manteve até o último momento avaliado (6 h). Desta forma, foi avaliada, em um novo protocolo, a duração do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida no modelo de alodínia mecânica induzida por carragenina. A administração da 4-metil-benzenocarbotiamida, na dose de 150 mg/kg, atenuou a alodínia mecânica induzida pela carragenina até a 8ª h após administração do estímulo inflamatório. Na 24ª h e na 48ª h, não houve diferença estatisticamente significativa entre os limiares dos dois grupos (**Figura 20**).



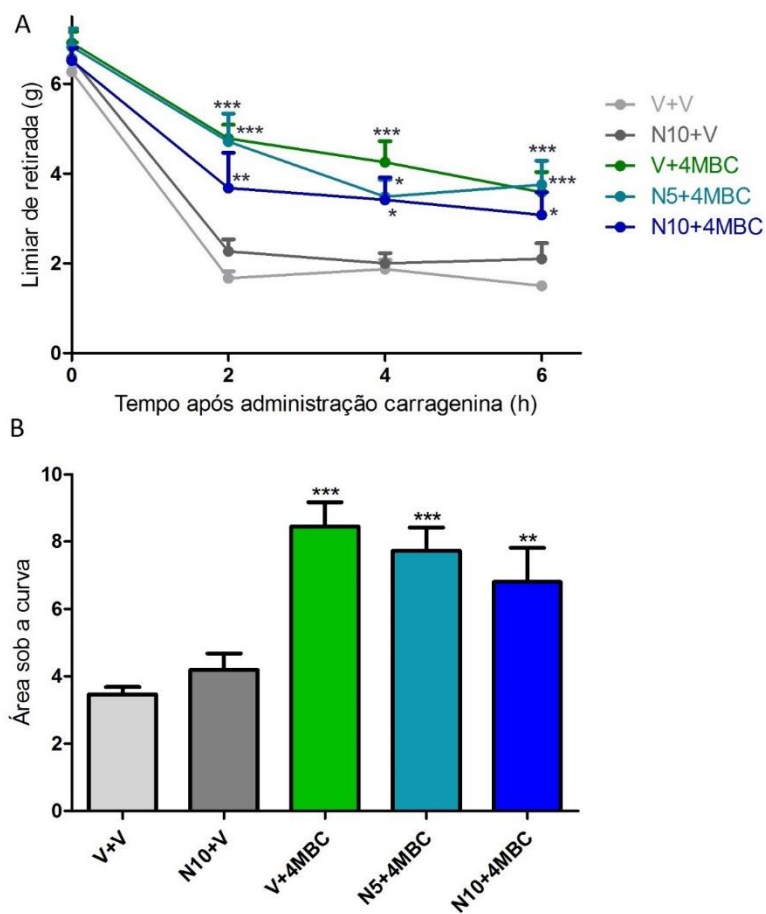
**Figura 20:** Duração do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida (4MBC; 150 mg/kg, i.p., - 30 min) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina (600 µg, 30 µL, i.pl.). V = veículo. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. V = veículo. \*, \*\* e \*\*\* indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (V) ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).  $n = 7$ .

#### **5.4 Efeitos induzidos por naltrexona, glibenclamida ou ciproheptadina sobre a atividade antialodínica da 4-metil-benzenocarbotiamida**

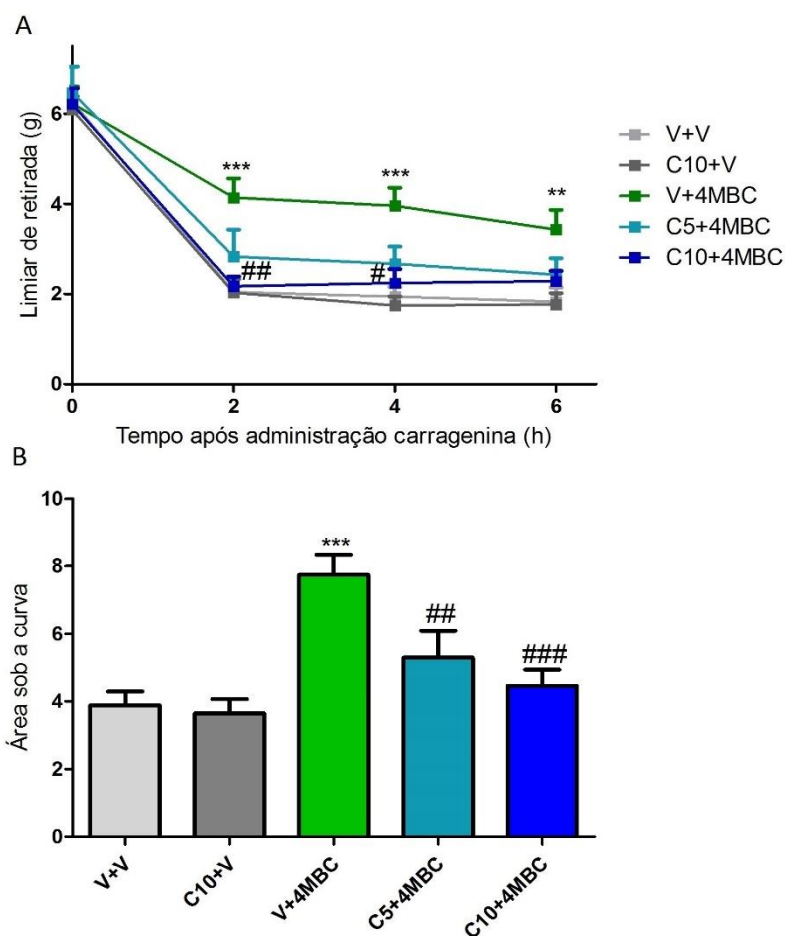
Tendo sido demonstrado o efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida, na dose de 150 mg/kg, sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina, foram investigados os mecanismos possivelmente envolvidos na atividade antialodínica da substância. Para isso, foram avaliados os efeitos induzidos por naltrexona, ciproheptadina ou glibenclamida sobre essa atividade.

A naltrexona, administrada isoladamente na dose de 10 mg/kg, não alterou a alodínia mecânica induzida por carragenina. Essa resposta foi inibida pelo tratamento com 4-metil-benzenocarbotiamida. A atividade antialodínica da 4-metil-benzenocarbotiamida não foi atenuada pela administração prévia de naltrexona, nas doses de 5 e 10 mg/kg (**Figura 21**).

A ciproheptadina, administrada isoladamente, na dose de 20 mg/kg, não alterou a alodínia mecânica induzida por carragenina. Essa resposta foi inibida pelo tratamento com 4-metil-benzenocarbotiamida. Entretanto, quando houve a administração prévia de ciproheptadina, nas doses de 5 e 10 mg/kg, a atividade antialodínica da 4-metil-benzenocarbotiamida foi atenuada na 2<sup>a</sup> e na 4<sup>a</sup> h após a administração de carragenina (**Figura 22A**). Uma avaliação global indicou redução significativa do limiar nociceptivo no grupo pré-tratado com a ciproheptadina, nas doses de 5 ou 10 mg/kg, e que receberam a 4-metil-benzenocarbotiamida (**Figura 22B**).

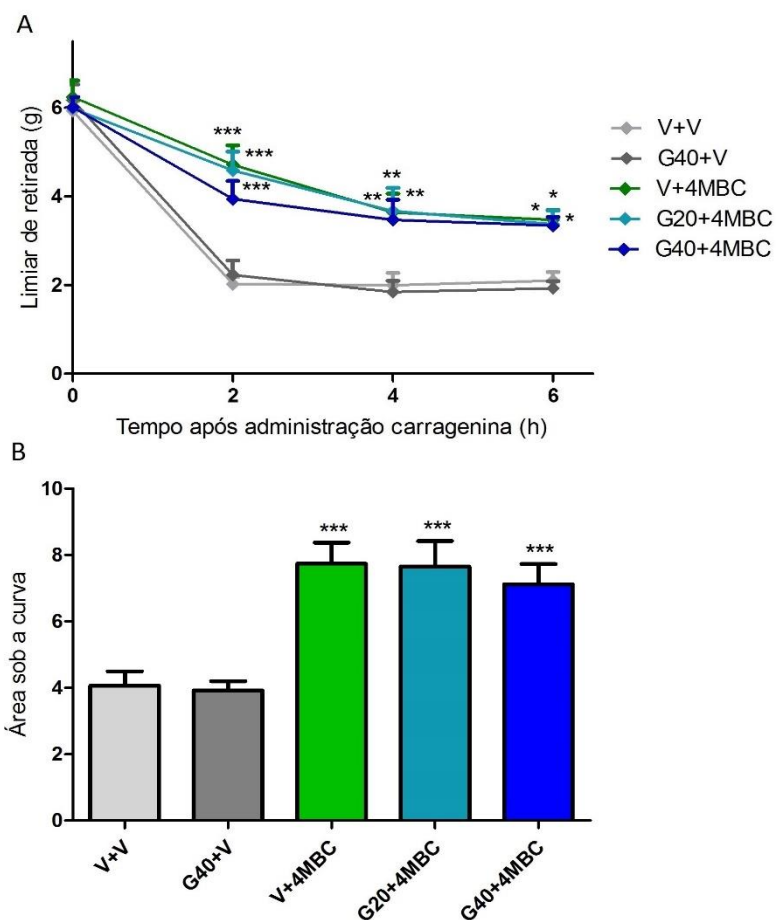


**Figura 21** – Efeito induzido pela naltrexona (N; 5 ou 10 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antialodínica da 4-metil-benzenocarbonyltyramida (4MBC; 150 mg/kg, i.p.). A naltrexona foi administrada 30 min antes da 4-metil-benzenocarbonyltyramida e essa foi administrada 30 min antes da carragenina. V = veículo. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. \*, \*\* e \*\*\* indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).  $n = 7$ .



**Figura 22** – Efeito induzido pela ciproheptadina (C; 5 ou 10 mg/kg, *p.o.*) sobre a atividade antialodínica da 4-metil-benzenocarbottiamida (4MBC; 150 mg/kg, *i.p.*). A ciproheptadina foi administrada 30 min antes da 4-metil-benzenocarbottiamida e essa foi administrada 30 min antes da carragenina. V = veículo. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. \*\* e \*\*\* indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente). #, ## e ### indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo tratado com 4-metil-benzenocarbottiamida ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).  $n=7$ .

A glibenclamida, administrada isoladamente na dose de 40 mg/kg, não alterou a alodínia mecânica. Essa resposta foi inibida pelo tratamento com 4-metil-benzenocarbottiamida. A atividade antialodínica da 4-metil-benzenocarbottiamida não foi atenuada pela administração prévia de glibenclamida, nas doses de 20 e 40 mg/kg (Figura 23).

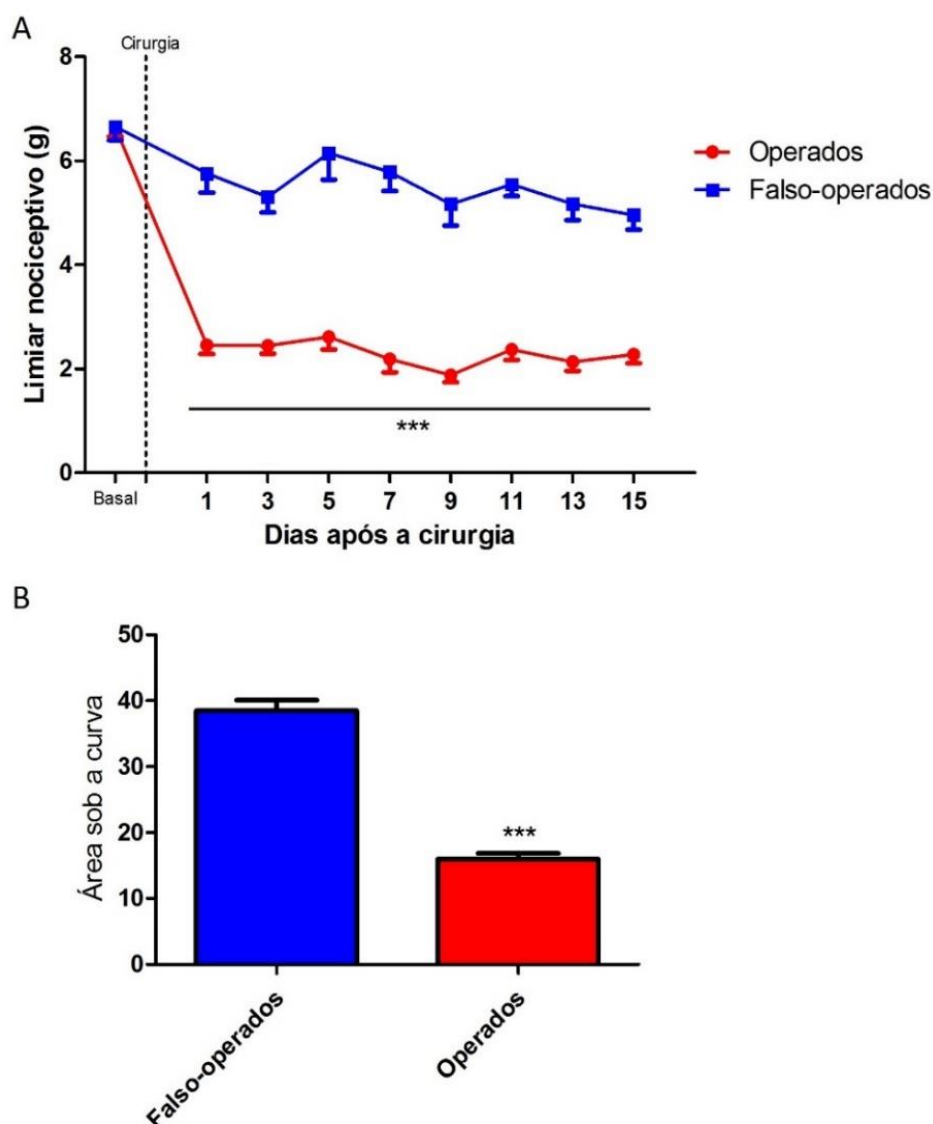


**Figura 23** – Efeito induzido pela glibenclamida (G; 20 ou 40 mg/kg, *p.o.*) sobre a atividade antialodínica da 4-metil-benzenocarbonylthiamida (4MBC; 150 mg/kg, *i.p.*). A glibenclamida foi administrada 30 min antes da 4-metil-benzenocarbonylthiamida e essa foi administrada 30 min antes da carragenina. V = veículo. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. \*, \*\* e \*\*\* indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).  $n = 7$ .

### 5.5 Efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbonylthiamida sobre a alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo isquiático

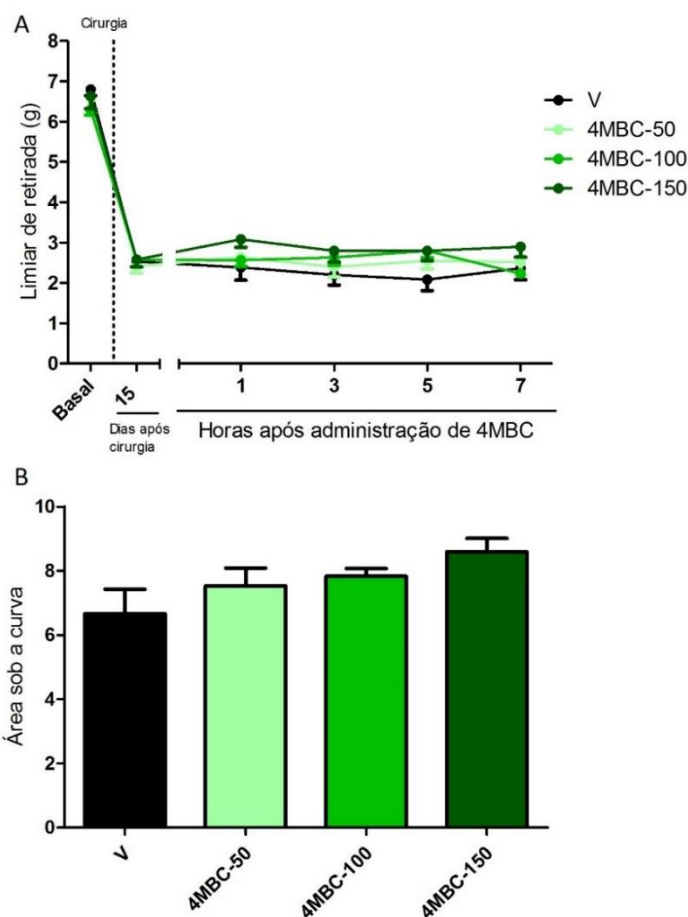
Inicialmente, foi realizada a padronização do modelo de dor neuropática induzida pela constrição do nervo isquiático. A alodínia mecânica, avaliada por meio da estimulação da pata ipsilateral à constrição do nervo, foi avaliada diariamente durante 15 dias após a cirurgia. Observou-se que a alodínia mecânica se estabeleceu no 1º dia após a

cirurgia e se manteve durante todo o período avaliado (**Figura 24**). Nesse grupo, não houve diferenças estatísticas entre os valores do limiar nociceptivo dos diferentes dias avaliados após a intervenção. No grupo dos animais submetidos à falsa cirurgia (falso-operados), não houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores basais e os valores obtidos após a intervenção.



**Figura 24** - Alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo isquiático. Falso operados: grupo de animais nos quais o nervo foi apenas visualizado. Operados: grupo de animais submetidos à cirurgia. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. \*\*\* indica diferença estatística em comparação com o grupo falso-operado ( $p < 0,001$ ).  $n = 6$ .

A 4-metil-benzenocarbottiamida, nas doses de 50, 100 ou 150 mg/kg, administrada no 15º dia após o procedimento cirúrgico, não alterou a alodínia mecânica causada pela constrição do nervo isquiático (**Figura 25**)

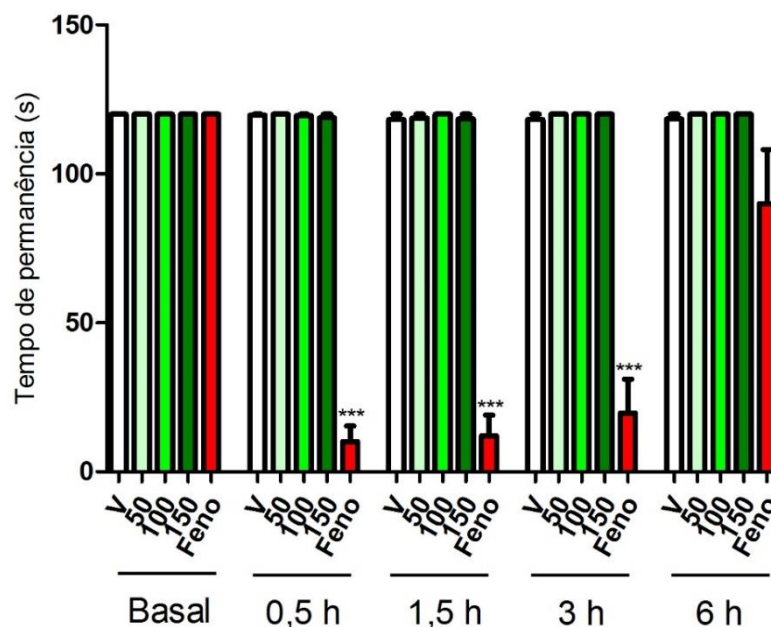


**Figura 25** – Efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbottiamida (4MBC; 50, 100 ou 150 mg/kg; i.p.; 15º dia após cirurgia) sobre a alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo isquiático. V = veículo. n=6.

### 5.6 Efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbottiamida sobre a atividade motora

A atividade motora dos camundongos foi avaliada na haste girante com o objetivo de validar os resultados obtidos nos modelos de dor. A 4-metil-benzenocarbottiamida, nas doses de 50, 100 ou 150 mg/kg, não alterou o tempo de permanência dos animais na haste girante nos momentos avaliados (0,5; 1,5; 3 e 6 h após administração da

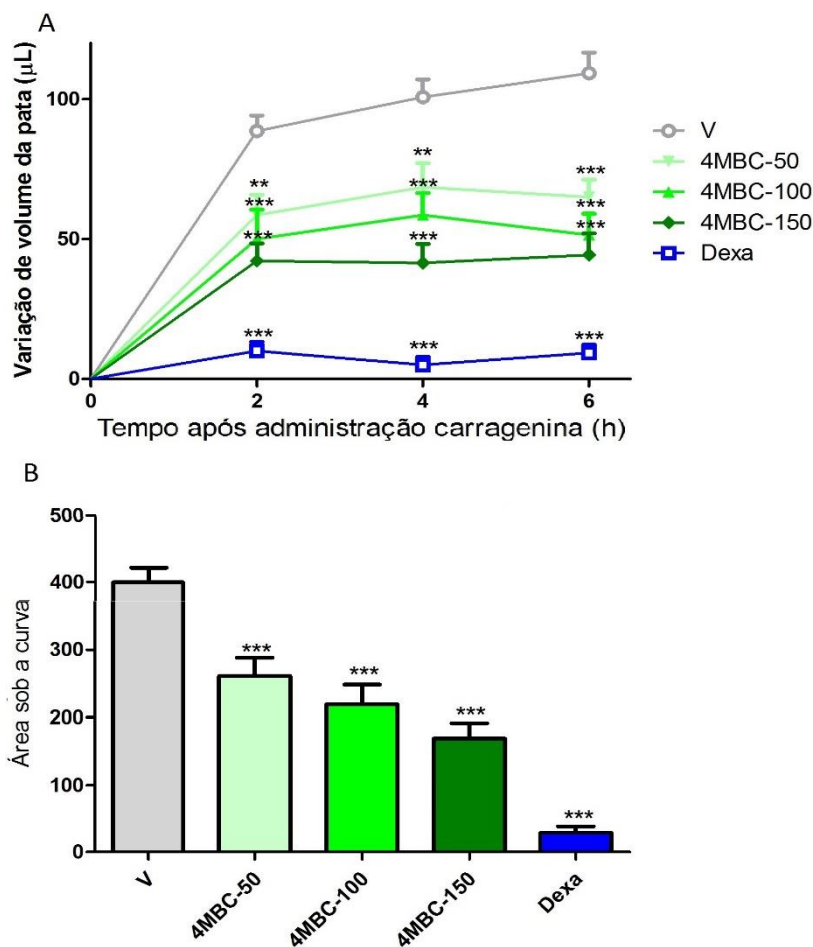
substância). Entretanto, o fenobarbital reduziu significativamente esse tempo de permanência 0,5; 1,5 e 3 h após sua administração (**Figura 26**).



**Figura 26** - Efeitos induzidos pela 4-metil-benzenocarbotiamida (50, 100 ou 150 mg/kg; i.p.) ou pelo fenobarbital (Feno; 50 mg/kg, p.o.) sobre o tempo de permanência dos animais na haste girante. V = veículo. \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (V) ( $p < 0,001$ ).  $n = 7$ .

### 5.7 Efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre o edema de pata induzido por carragenina

A atividade da 4-metil-benzenocarbotiamida no modelo de edema de pata induzido por carragenina foi avaliada logo após a avaliação do efeito induzido por essa substância sobre a alodínia mecânica. A 4-metil-benzenocarbotiamida, nas doses avaliadas (50, 100 ou 150 mg/kg), inibiu o edema de pata nos intervalos avaliados nesse protocolo (2, 4 e 6 h após injeção i.pl. de carragenina). A dexametasona, utilizada como controle positivo do experimento, inibiu a formação do edema de pata nesse modelo (**Figura 27**).

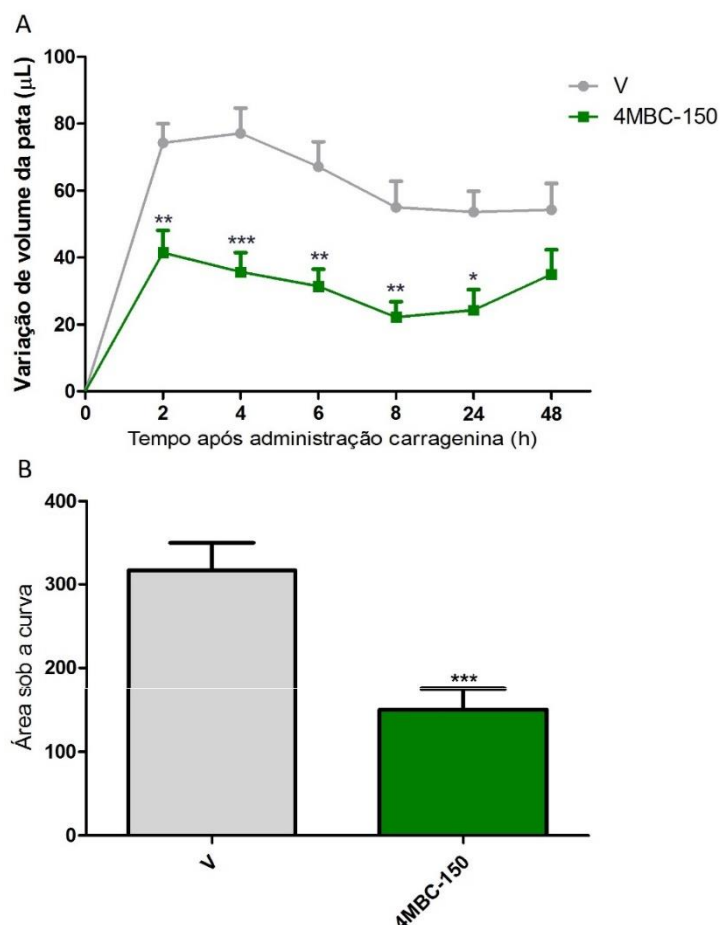


**Figura 27:** Efeitos induzidos pela 4-metil-benzenocarbotiamida (4MBC; 50, 100 ou 150 mg/kg; i.p.; -30 min) ou pela dexametasona (Dexa; 5 mg/kg, i.p., -30 min) sobre o edema de pata induzido por carragenina (600 µg, 30 µL, i.pl.). V = veículo. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. \*\* e \*\*\* indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (V) ( $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).  $n = 7$ .

### 5.7.1 Duração do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre o edema de pata induzido por carragenina

Conforme demonstrado na **figura 27**, o tratamento com a 4-metil-benzenocarbotiamida reduziu o edema de pata de forma dose-dependente e duradoura, permanecendo até o último intervalo avaliado (6 h). Desta forma, foi avaliada, em um novo protocolo, a duração do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida no modelo de edema de pata induzido por carragenina. A administração da 4-metil-benzenocarbotiamida, na dose de 150 mg/kg, atenuou a

alodínia mecânica induzida pela carragenina até a 24<sup>a</sup> h após injeção do estímulo inflamatório, não apresentando diferença estatisticamente significativa no momento posteriormente avaliado (48<sup>a</sup> h) (**Figura 28**).

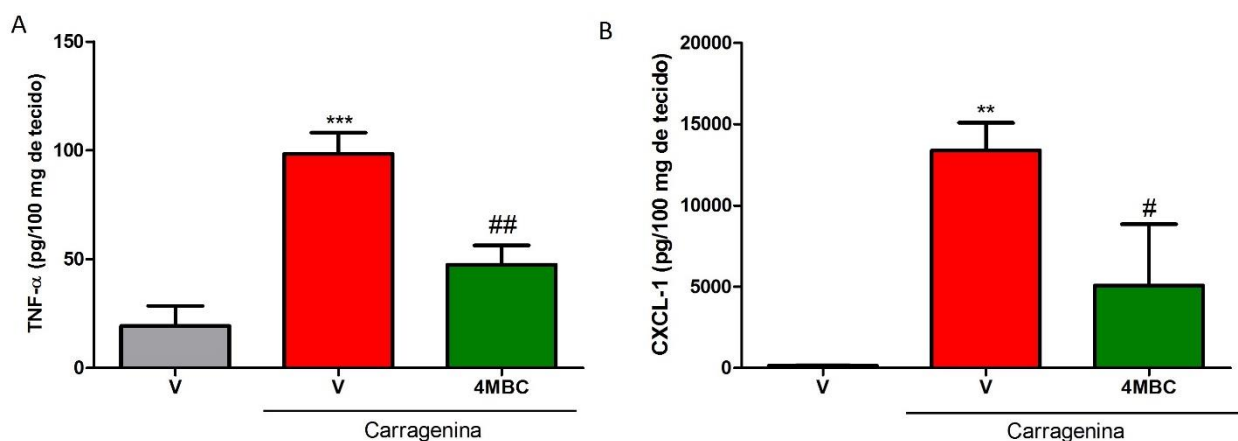


**Figura 28:** Duração do efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida (4MBC; 150 mg/kg, i.p., - 30 min) sobre o edema de pata induzido por carragenina (600 µg, 30 µL, i.pl.). V = veículo.

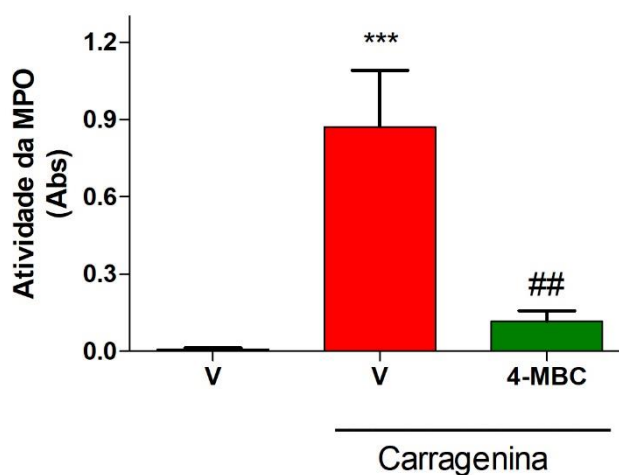
(A) Curso temporal e (B) área sob a curva. V = veículo. \*, \*\* e \*\*\* indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).  $n = 7$ .

### 5.8 Efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida sobre a produção de TNF- $\alpha$ e CXCL1 e a atividade da MPO induzidas por carragenina

Quatro horas após a injeção i.pl. de carragenina (600  $\mu$ g), houve um aumento das concentrações de TNF- $\alpha$  e CXCL1 na pata dos animais. Foi observado que o tratamento prévio (30 min) com a 4-metil-benzenocarbotiamida (150 mg/kg) reduziu as concentrações de TNF- $\alpha$  e CXCL1 na pata dos animais na 4<sup>a</sup> h após a injeção do estímulo inflamatório (**Figura 29**). A 4-metil-benzenocarbotiamida também reduziu a atividade da MPO, confirmando o menor recrutamento neutrofílico para o local da inflamação (**Figura 30**).



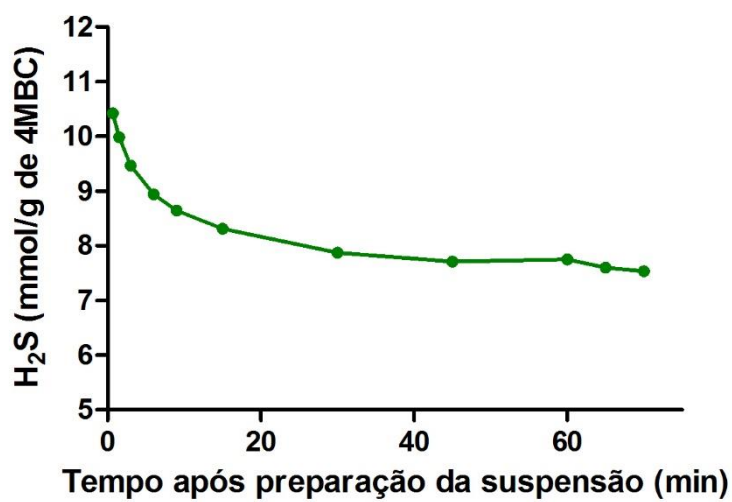
**Figura 29** - Efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida (4MBC; 150 mg/kg, i. p., -30 min) sobre a concentração de (A) TNF- $\alpha$  e (B) CXCL1 na pata dos animais coletada 4 h após a injeção de carragenina (600  $\mu$ g, 30  $\mu$ L, i.pl.). V = veículo. \*\* e \*\*\* indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle ( $p > 0,01$  e  $p < 0,001$ ; respectivamente). # e ## indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo V/carragenina ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ; respectivamente).  $n = 6$ .



**Figura 30** - Efeito induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida (4MBC; 150 mg/kg, i. p., -30 min) sobre a atividade da MPO na pata dos animais coletada 4 h após a injeção de carragenina (600 µg, 30 µL, i.pl.). V = veículo. \*\*\* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). ## indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo V/carragenina ( $p < 0,01$ ).  $n = 6$ .

### 5.9 Liberação de H<sub>2</sub>S *in vitro* pela 4-metil-benzenocarbotiamida

A liberação de H<sub>2</sub>S pela 4-metil-benzenocarbotiamida (100 µL, 15 mg/mL) foi determinada em diferentes tempos após a preparação da suspensão da substância. No primeiro tempo avaliado, 42 s após a 4-metil-benzenocarbotiamida ser preparada em PEG 400 e salina estéril, foi detectada a presença de H<sub>2</sub>S na suspensão. Nesse ensaio, a liberação de H<sub>2</sub>S pela substância se manteve por até 70 min (**Figura 31**).



**Figura 31** – Concentração de  $H_2S$  após incubação da suspensão de 4-metil-benzenocarbottiamida (4MBC; 15 mg/mL) em solução tampão de PBS 100 mM.

## 6 DISCUSSÃO

As limitações apresentadas por muitos fármacos utilizados como analgésicos e anti-inflamatórios, como eficácia reduzida e segurança inadequada, instigam a busca por novas terapias para pacientes acometidos por condições dolorosas ou inflamatórias e ainda representam um grande desafio. Assim, a busca por novas alternativas farmacoterapêuticas torna-se necessária. Diversos estudos demonstraram que o H<sub>2</sub>S é um mediador gasoso que atua em diversos processos, incluindo dor e inflamação. Apesar de controversos, muitos resultados sugerem que o H<sub>2</sub>S atenua a dor e a resposta inflamatória, principalmente quando proveniente de fontes exógenas.

Diversas atividades relacionadas à administração de substâncias doadoras de H<sub>2</sub>S têm sido demonstradas. Em modelos inflamatórios, estas incluem redução da expressão e/ou liberação de mediadores inflamatórios, redução da adesão e migração de leucócitos e, assim, redução do edema inflamatório. Ainda, são relatadas atividades antinociceptivas em vários modelos, resultando em redução de hiperalgesia, alodínia e outros comportamentos nociceptivos.

As tiobenzamidas são substâncias que liberam H<sub>2</sub>S e são utilizadas, acopladas ou não a outras moléculas conhecidas, para avaliação de efeitos induzidos pelo H<sub>2</sub>S em modelos experimentais. Em ambos os casos, substâncias dessa classe apresentam atividades em modelos de doenças cardiovasculares e inflamação gástrica, por exemplo.

No presente estudo, foi avaliada a atividade da 4-metil-benzenocarbotiamida em diferentes modelos experimentais de dor e inflamação. A 4-metil-benzenocarbotiamida apresentou atividade em modelos de dores nociceptiva e inflamatória e edema inflamatório. A atividade em modelos de dor e edema inflamatórios da 4-metil-benzenocarbotiamida parece envolver mecanismos serotoninérgicos e redução da produção de citocinas e da atividade da MPO. Foi verificado, ainda, que a 4-metil-benzenocarbotiamida libera H<sub>2</sub>S *in vitro*.

## 6.1 Atividade da 4-metil-benzenocarbotiamida em modelos experimentais de dor

Neste estudo, foi demonstrada a atividade antinociceptiva da 4-metil-benzenocarbotiamida em diferentes modelos experimentais de dor inflamatória (segunda fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído e alodínia mecânica induzida por carragenina) e dor nociceptiva (primeira fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído).

A resposta nociceptiva induzida por formaldeído, um dos modelos usados no presente estudo, possui duas fases distintas que correspondem a aspectos tanto da dor nociceptiva (primeira fase) quanto da dor inflamatória (segunda fase). A primeira fase ocorre de 0 a 5 min após a injeção de formaldeído e envolve a ativação direta de nociceptores, principalmente nociceptores C. A segunda fase ocorre entre 15 e 30 min após a administração do formaldeído e resulta da ativação e sensibilização de nociceptores associadas à produção de vários mediadores inflamatórios (TJØLSEN *et al.*, 1992). Geralmente, fármacos analgésicos que agem predominantemente no SNC, como opioides, bem como alguns AINEs em doses mais elevadas, como o ácido acetilsalicílico, inibem ambas as fases, enquanto fármacos que apresentam atividade predominantemente anti-inflamatória geralmente inibem a segunda fase da resposta (HUNSKAAR e HOLE, 1987).

A 4-metil-benzenocarbotiamida, na dose de 150 mg/kg, atenuou a primeira fase da resposta induzida por formaldeído. A segunda fase da resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído foi atenuada pela 4-metil-benzenocarbotiamida, nas doses de 100 mg/kg e 150 mg/kg. Embora a substância tenha inibido ambas as fases, a inibição da segunda fase ocorreu em maior extensão. A atividade de um doador de H<sub>2</sub>S, o Na<sub>2</sub>S, também foi descrita na segunda fase de um teste similar, apesar desse teste apresentar via de administração do formaldeído (lábio superior direito) e parâmetro avaliado (rubor facial) diferentes (DONATTI *et al.*, 2014). A segunda fase desse teste também envolve resposta inflamatória e sensibilização de fibras aferentes (DALLEL *et al.*, 1995) e a resposta induzida pelo NaHS se assemelha àquela induzida pela 4-metil-benzenocarbotiamida nesse modelo.

Tendo em vista os resultados anteriores demonstrando que a 4-metil-benzenocarbotiamida reduziu a primeira fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído, um estímulo químico, foi investigada a atividade dessa substância em um modelo experimental de dor provocada por estímulo térmico. No modelo da placa quente, a temperatura da placa representa um estímulo nocivo e causa a ativação direta dos nociceptores (Le BARS *et al.*, 2001). A temperatura utilizada no presente estudo foi de 50 °C, visto que uma temperatura maior pode reduzir a probabilidade de detectar o efeito antinociceptivo neste modelo experimental (GODIN *et al.*, 2011). Neste modelo, ocorre a ativação de receptores da família TRP (*Transient receptor potential cation channel*) pelo estímulo nocivo (calor) (TOMINAGA, 2007). Analgésicos que atuam, principalmente, por meio de mecanismos centrais, como os opioides e antidepressivos tricíclicos, são capazes de inibir a resposta nociceptiva induzida por calor (LOH *et al.*, 1976; ROSLAND *et al.*, 1988).

A 4-metil-benzenocarbotiamida não elevou a latência do comportamento nociceptivo no modelo da placa quente. Embora a substância tenha inibido a fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído que corresponde, assim como o teste de placa quente, a um modelo de dor nociceptiva, deve ser considerado o fato de os dois modelos apresentarem estímulos de naturezas diferentes, podendo apresentar ativação de receptores diferentes, como receptores TRPA1 para formaldeído (KERSTEIN *et al.*, 2009) e TRPV3 (XU *et al.*, 2002) para o estímulo térmico. Além disso, a atividade da 4-metil-benzenocarbotiamida ocorreu em menor extensão durante a primeira fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído. Cunha *et al.* (2008a), ao estudarem o papel do H<sub>2</sub>S endógeno e exógeno em modelos de dor, verificaram que o NaHS não apresenta atividade no modelo de placa quente, ao passo que atividade em modelos de dor inflamatória foi observada. Devido à possibilidade da ausência de atividade ou atividade reduzida em modelos de dor nociceptiva resultarem de concentrações reduzidas das moléculas no SNC, estudos adicionais avaliando efeitos induzidos pela administração central da 4-metil-benzenocarbotiamida e de outros doadores de H<sub>2</sub>S são necessários para obtenção de conhecimento mais amplo do perfil de atividade dessas moléculas e do papel do H<sub>2</sub>S no processamento nociceptivo.

Tendo em vista os resultados anteriores indicando a atividade da 4-metil-benzenocarbotiamida na segunda fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído, a atividade dessa substância foi avaliada em outro modelo experimental de dor inflamatória, a alodínia mecânica induzida por carragenina. A carragenina é uma mistura de polissacarídeos extraída de algas marinhas da família *Rhodophyceae* e composta, principalmente, por D-galactose sulfatada. A injeção i.pl. de carragenina induz um processo inflamatório local, que envolve a produção e ação de vários mediadores inflamatórios e resulta em maior sensibilidade aos estímulos térmicos e mecânicos no local da lesão. A alodínia mecânica é uma resposta amplamente reconhecida e indica a sensibilização marcante dos nociceptores induzida por múltiplos mediadores inflamatórios (POSADAS *et al.*, 2004; GREGORY *et al.*, 2013).

No presente estudo, a alodínia mecânica induzida pela injeção i.pl. de carragenina foi inibida pela 4-metil-benzenocarbotiamida. Atividades de doadores de H<sub>2</sub>S em modelos de dor inflamatória têm sido demonstradas em diversos estudos. Em modelo de sinovite induzida pela injeção de carragenina na articulação do joelho de ratos, foi demonstrado que o 1,3-ditio-2,4-difosfatano-2,4-disulfeto-2,4-bis(4-metóxfenil), um doador de H<sub>2</sub>S comumente conhecido como reagente de Lawesson, inibe a alodínia e induz efeito sobre outros parâmetros indicativos da resposta dolorosa, como a mobilidade dos animais (EKUNDI-VALENTIM *et al.*, 2010). Cunha *et al.* (2008a) demonstraram que o NaHS também apresenta essa atividade em modelo de hipernocicepção induzida por LPS ou PGE<sub>2</sub>, estímulos também utilizados em modelos de dor inflamatória (FERREIRA *et al.*, 1997; CUNHA *et al.*, 2008b). Outro estudo, utilizando um modelo de dor induzida por câncer nos ossos em ratos, demonstrou que a inalação de H<sub>2</sub>S reduz a hiperalgesia térmica e a alodínia mecânica, avaliadas, respectivamente, por meio da determinação da latência e do limiar de retirada de pata (ZHUANG *et al.*, 2017).

Visando à investigação do papel de receptores opioidérgicos e serotoninérgicos e também de canais K<sub>ATP</sub> na atividade da 4-metil-benzenocarbotiamida em modelo de dor inflamatória induzida por carragenina, foram utilizadas as seguintes ferramentas farmacológicas: naltrexona, ciproheptadina e glibenclamida. Vários estudos indicam que a ativação de vias opioidérgicas (GRAY *et al.*, 1998; HERNANDEZ-LEON *et al.*, 2016), serotoninérgicas (DUMAN *et al.*, 2004; KOSTADINOV *et al.*, 2012) e de canais

$K_{ATP}$  (LEÓN-REYES *et al.*, 2009; HAJHASHEMI e AMIN; 2011) contribuem para a atividade de vários fármacos em diferentes modelos experimentais de dor.

A administração prévia de naltrexona, um antagonista não seletivo de receptores opioidérgicos (YAKSH & WALLACE, 2012), não alterou a atividade antialodínica da 4-metil-benzenocarbotiamida, o que sugere que mecanismos opioidérgicos não sejam relevantes para a expressão dessa atividade. Ainda existem poucas informações sobre efeitos induzidos por doadores de  $H_2S$  sobre vias opioidérgicas. Distrutti *et al.* (2010) demonstraram que a atividade antinociceptiva de  $Na_2S$  em modelo de distensão colorretal é revertida pela administração central de um antagonista de receptores opioides do tipo  $\mu$  e que o  $H_2S$  causa mudanças conformacionais nesses receptores. Embora a importância da via opioidérgica para efeitos induzidos por doadores de  $H_2S$  ainda não esteja bem elucidada, as interações entre estes podem depender dos doadores de  $H_2S$  avaliados, modelos e estímulos utilizados e receptores opioides envolvidos.

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é uma amina biogênica que induz seus efeitos por meio da interação com receptores serotoninérgicos que estão amplamente distribuídos no SNC e no sistema nervoso periférico. O papel da 5-HT no processamento da dor é bastante complexo e varia de acordo com sua concentração e local de atuação, com o subtipo de receptor envolvido e com o estímulo nociceptivo utilizado (MILLAN, 2002; SOMMER, 2004; OSSIPOV *et al.*, 2014). A administração prévia de ciproheptadina inibiu o efeito antialodínico induzido pela 4-metil-benzenocarbotiamida no modelo de dor inflamatória. A inibição da atividade da 4-metil-benzenocarbotiamida em animais previamente tratados com ciproheptadina indica que essa substância poderia ativar a via descendente inibitória serotoninérgica, interagindo com receptores serotoninérgicos ou facilitando a neurotransmissão serotoninérgica, o que poderia contribuir para a atividade antinociceptiva em alguns modelos experimentais. Embora não exista demonstração direta de efeitos induzidos pelo  $H_2S$  sobre a via serotoninérgica descendente, foi observado que o  $NaHS$  é capaz de induzir a liberação de 5-HT por diferentes tipos de células (UJIKE *et al.*, 2015; DELGERMURUN *et al.*, 2016). Assim, mais investigações, visando avaliar interações entre  $H_2S$  e as vias serotoninérgicas, são necessárias para a compreensão do significado desse resultado.

A glibenclamida, uma sulfonilureia amplamente utilizada no tratamento de pacientes diabéticos, tem como seu principal mecanismo de ação a inibição de canais  $K_{ATP}$  (SCHMID-ANTOMARCHI *et al.*, 1987). Assim, esse fármaco é amplamente utilizado como ferramenta na investigação de mecanismos de ação de diversas substâncias, incluindo aquelas que apresentam atividade antinociceptiva, como opioides (OCAÑA *et al.*, 1990; RODRIGUES e DUARTE, 2000), diclofenaco (ALVES *et al.*, 2004) e dipirona (ALVES e DUARTE, 2002). No presente estudo, no entanto, a glibenclamida não atenuou a atividade da 4-metil-benzenocarbotiamida no modelo de alodínia mecânica induzida por carragenina.

Tem sido demonstrado que diversos efeitos induzidos pelo  $H_2S$ , tanto endógeno quanto exógeno, como o efeito vasodilatador, ocorrem pela abertura de canais  $K_{ATP}$  (ZHAO *et al.*, 2001; TANG *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2005). Diversos estudos demonstraram que atividades de doadores de  $H_2S$  em modelos de dor também são revertidas por bloqueadores desses canais. Foi observado por Distrutti *et al.* (2006) que a atividade antinociceptiva do NaHS em um modelo de distensão colorretal é revertida pela administração prévia de glibenclamida. Em modelo similar ao utilizado no presente estudo, porém utilizando  $PGE_2$  como estímulo nociceptivo, Cunha *et al.* (2008a) demonstraram que a atividade de NaHS nesse modelo ocorre pela modulação de canais  $K_{ATP}$ . A atividade do  $Na_2S$  observada em modelo de dor orofacial induzida por formaldeído também parece ser mediada por canais  $K_{ATP}$  (DONATTI *et al.*, 2014). Apesar disso, alguns estudos demonstraram que esse mecanismo não deve ser relevante para a atividade do  $H_2S$  em outros modelos, como de úlcera gástrica induzida por ácido acético (WALLACE *et al.*, 2007b) ou de prurido e inflamação cutânea induzidas por histamina (RODRIGUES *et al.*, 2017). Assim, a interação entre  $H_2S$  e canais  $K_{ATP}$ , apesar de bem demonstrada em alguns sistemas, parece depender dos modelos e dos estímulos utilizados.

No presente estudo, também foi avaliada a atividade da 4-metil-benzenocarbotiamida em um modelo de dor neuropática. A 4-metil-benzenocarbotiamida, nas doses avaliadas, não reverteu a alodínia mecânica induzida pela constrição crônica do nervo isquiático. Alguns estudos, entretanto, conseguiram demonstrar efeitos induzidos por doadores de  $H_2S$  em modelos de dor neuropática. Kida *et al.* (2015) observaram que

a alodínia mecânica e a hiperalgesia térmica induzidas por constrição do nervo isquiático foram reduzidas pelo H<sub>2</sub>S. O tratamento, porém, consistia na inalação de uma mistura de ar e H<sub>2</sub>S, diferentemente da abordagem utilizada no presente estudo, no qual houve a administração i.p. de um doador de H<sub>2</sub>S. Uma abordagem similar, no entanto, foi utilizada por Manelli *et al.* (2017) em um modelo de dor neuropática, no qual doadores de H<sub>2</sub>S (NaHS, alil-isotiocianato, fenil- e carboxilfenil-isotiocianato), administrados por via subcutânea, apresentaram atividades em testes de sensibilidade ao frio. Nesse caso, todavia, os estímulos utilizados para indução da dor neuropática foram os fármacos antineoplásicos paclitaxel e oxaliplatina. Assim, apesar de atividade relacionada ao H<sub>2</sub>S em modelos de dor neuropática ser demonstrada, alguns fatores devem ser considerados, como vias de administração e estímulos utilizados, além de parâmetros avaliados no modelo.

Com o objetivo de investigar se as atividades antinociceptiva e antialodínica apresentadas pela 4-metil-benzenocarbotiamida poderiam resultar de incoordenação motora e/ou relaxamento muscular, avaliou-se o efeito induzido por essa molécula sobre o tempo de permanência dos animais na haste girante. Uma vez que a 4-metil-benzenocarbotiamida não alterou o tempo de permanência dos animais na haste girante, é pouco provável que a atenuação do comportamento nociceptivo induzida por essa substância nos modelos indicados seja resultado de comprometimento da atividade motora ou de relaxamento muscular. Essa observação, além de validar os resultados encontrados, coincide com outros estudos que demonstraram ausência de relação entre administração de doadores de H<sub>2</sub>S e incoordenação motora (CAMPOLO *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2015).

## **6.2 Atividade da 4-metil-benzenocarbotiamida em modelo experimental de inflamação aguda**

A administração local de carragenina induz resposta inflamatória local, que resulta da ação de vários mediadores, incluindo bradicinina, histamina, 5-HT, eicosanoides, citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Além disso, essa administração induz a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório e sua ativação leva à produção de vários dos mediadores mencionados. Um dos sinais resultantes,

o edema, é bastante útil para avaliar a atividade anti-inflamatória de substâncias e estudar a contribuição de mediadores envolvidos nos eventos vasculares associados ao processo inflamatório (SALVEMINI *et al.*, 1996).

Em concordância com sua atividade no modelo de dor inflamatória induzida também pela carragenina, a 4-metil-benzenocarbotiamida inibiu de forma marcante o edema de pata. Vários resultados semelhantes utilizando outros doadores de H<sub>2</sub>S foram obtidos por outros pesquisadores. Outros grupos de pesquisa demonstraram a redução de edema induzido por carragenina em animais tratados com doador de H<sub>2</sub>S (DUDEK *et al.*, 2013) ou diclofenaco acoplado a um doador de H<sub>2</sub>S (SIDHAPURIWALA *et al.*, 2007). Esse último apresentou atividade de maior magnitude quando comparado ao protótipo. Assim, também foi observado por Wallace *et al.* (2010) em modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA), em que o híbrido ATB-346 reduziu o edema de pata por mais tempo que o naproxeno, a molécula da qual o híbrido foi derivado. Outros estudos demonstraram que doadores de H<sub>2</sub>S também reduzem o edema em outros modelos, utilizando diferentes estímulos e locais de avaliação, como: edema cerebral por hemorragia subaracnoide (CAO *et al.*, 2016), em modelo de ressuscitação após parada cardíaca (GENG *et al.*, 2015), ou em modelo de neuroinflamação após hemorragia intracerebral (ZHAO *et al.*, 2017a); edema de orelha induzida por administração de xileno (SONG *et al.*, 2016) e edema de articulação de joelho induzida por zimosano (DIEF *et al.*, 2015).

Como citado anteriormente, o desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina depende da ação de diversos mediadores. O edema ocorre por consequência do aumento da permeabilidade de vasos e da pressão hidrostática dos capilares, e diminuição da pressão oncótica. Isso gera a exsudação de líquidos, facilitando o acesso de proteínas e anticorpos ao sítio inflamatório. O TNF- $\alpha$  participa de várias etapas do desenvolvimento do processo inflamatório e, assim, do edema. O TNF- $\alpha$  é capaz de induzir degradação da camada de glicocálix do endotélio; desestabilizar o citoesqueleto das células endoteliais; induzir a formação de espaços intercelulares; aumentar a fosforilação de caderinas, molécula importante para adesão das junções das células endoteliais e aumentar a expressão de outros mediadores importantes para o desenvolvimento do edema, como bradicinina (BRADLEY, 2008; ZELOVÁ e HOSEK, 2013).

Assim, visto que o TNF- $\alpha$  possui uma importância para o desenvolvimento do edema e da alodínia mecânica induzidos por carragenina (ROCHA *et al.*, 2006) e que a administração da 4-metil-benzenocarbotiamida promoveu uma redução dessas respostas, foi investigado o efeito induzido por essa molécula sobre a produção de TNF- $\alpha$  após a administração i.pl. de carragenina. Assim, a 4-metil-benzenocarbotiamida reduziu a produção de TNF- $\alpha$  induzida pela carragenina. Muitos estudos demonstram que doadores de H<sub>2</sub>S reduzem expressão ou produção de TNF- $\alpha$  em diversos modelos, incluindo modelos de dor e inflamação. O NaHS, um dos doadores de H<sub>2</sub>S mais utilizados, reduziu as concentrações de TNF- $\alpha$  em modelos de lesão gástrica (FIORUCCI *et al.*, 2005), micróglia ativada por LPS (HU *et al.*, 2007), neuroinflamação induzida por peptídeo beta-amiloide (FAN *et al.*, 2013), macrófagos estimulados por LPS (RIOS *et al.*, 2015), hemorragia subaracnoide (CAO *et al.*, 2016), inflamação e citotoxicidade induzidas por glicose (HUANG *et al.*, 2016), adesão pós-operatória (XIA *et al.*, 2017) e feridas em ratos obesos (ZHAO *et al.*, 2017b). Outro doador de H<sub>2</sub>S, o GYY4137, também diminuiu a produção de TNF- $\alpha$ , em modelo de inflamação sistêmica (LI *et al.*, 2009) e também em culturas macrófagos (WHITEMAN *et al.*, 2010) ou de sinoviócitos e condrócitos (LI *et al.*, 2013) estimulados por LPS. Híbridos doadores de H<sub>2</sub>S também apresentaram atividade inibitória sobre a expressão ou produção de TNF- $\alpha$  em modelos de inflamação, sendo, inclusive, maiores do que as apresentadas pelos fármacos utilizados como protótipos (FIORUCCI *et al.*, 2007; DIEF *et al.*, 2015).

A quimiocina CXCL1 possui papel no processamento nociceptivo em diferentes modelos experimentais de dor e inflamação. Assim como outras quimiocinas, a CXCL1 é importante para a atração de células polimorfonucleares para o sítio inflamatório (SILVA *et al.*, 2017). Foi observado que há aumento da produção dessa quimiocina em modelos experimentais de dor inflamatória (BRACK *et al.*, 2004) e animais deficientes para receptores dessa quimiocina apresentam atenuação do edema em modelos de inflamação (RITZMAN *et al.*, 2010). Assim, foi avaliada a atividade da 4-metil-benzenocarbotiamida sobre a produção dessa quimiocina após a injeção i.pl. de carragenina. A 4-metil-benzenocarbotiamida reduziu a produção de CXCL1 induzida pela carragenina. Há estudos que demonstraram que a redução da produção de H<sub>2</sub>S, que ocorre na doença arterial coronariana, pode elevar a

concentração de quimiocinas como CCL2 e CX3CL1 (GAO *et al.*, 2015). Além disso, o NAHS reduz a expressão de CX3CR1 e CX3CL1, através de um mecanismo que envolve a inibição da ativação de NF- $\kappa$ B (ZHANG *et al.*, 2012). Como anteriormente mencionado, tem sido demonstrado que substâncias doadoras de H<sub>2</sub>S reduzem a atividade do NF- $\kappa$ B. Visto que a expressão da CXCL1 é induzida pelo NF- $\kappa$ B (SILVA *et al.*, 2017), esses dados sugerem que, mesmo sem demonstração direta em estudos anteriores, a liberação de H<sub>2</sub>S pode estar relacionada à redução da produção de CXCL1.

A MPO é uma enzima produzida por leucócitos, liberada de forma aumentada durante eventos em que essas células estão ativadas, como a inflamação. Uma das suas principais funções é a produção de espécies reativas de oxigênio. Devido à sua importância durante os processos inflamatórios e ao fato de ser um indicador da presença de células polimorfonucleares nos tecidos, a MPO tem sido amplamente utilizada como marcador inflamatório de condições agudas e crônicas (QUEIROZ-JUNIOR *et al.*, 2009; KLINKE *et al.*, 2011). A atividade da MPO na pata dos animais após injeção de carragenina foi reduzida pela administração da 4-metil-benzenocarbotiamida. Sidhapuriwala *et al.* (2007), em modelo em que foi utilizado a carragenina como estímulo inflamatório, verificaram que a administração do S-diclofenaco, um híbrido doador de H<sub>2</sub>S, reduziu a atividade da MPO na pata dos animais, sendo este efeito de maior magnitude quando comparado àquele induzido pelo protótipo. Outros estudos também demonstraram a redução na atividade dessa enzima após administração de doadores de H<sub>2</sub>S (PÁLINKÁS *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2017).

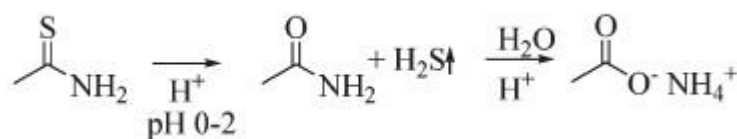
Assim, por meio da demonstração das atividades da 4-metil-benzenocarbotiamida sobre a produção de CXCL1 e sobre a atividade da MPO, foi demonstrado, mesmo que de forma indireta, que essa substância inibe a ativação e o recrutamento de leucócitos. Esses resultados são corroborados por outros autores que avaliaram a atividade de doadores de H<sub>2</sub>S sobre esses eventos. Kaya-Yasar *et al.* (2017), por exemplo, verificaram que o NaHS é capaz de reduzir a infiltração de neutrófilos no lavado broncoalveolar após inflamação induzida por LPS. O mesmo resultado foi observado por LIN *et al.* (2016), dessa vez por administração do GYY4137 em modelo de obstrução uretral crônica. Além da redução do recrutamento de neutrófilos pelo

H<sub>2</sub>S exógeno, foi observado que esse evento pode ser exacerbado quando a síntese de H<sub>2</sub>S é inibida (ZANARDO *et al.*, 2006).

### 6.3 Liberação de H<sub>2</sub>S *in vitro* pela 4-metil-benzenocarbotiamida

A demonstração de que a 4-metil-benzenocarbotiamida é capaz de doar H<sub>2</sub>S foi necessária, embora diversos estudos tenham demonstrado a liberação de H<sub>2</sub>S por substâncias dessa classe, algumas com pequenas diferenças estruturais (MARTELLI *et al.*, 2013). Foi verificado, durante o tempo analisado, que a suspensão da 4-metil-benzenocarbotiamida libera H<sub>2</sub>S em solução de PBS. Devido às limitações operacionais, não foi possível avaliar a liberação de H<sub>2</sub>S por tempos maiores. Porém, a demonstração de que a 4-metil-benzenocarbotiamida libera H<sub>2</sub>S *in vitro* reforça a relação dos resultados encontrados pela administração da substância com as propriedades do H<sub>2</sub>S em modelos experimentais de dor e inflamação. Além disso, a liberação de H<sub>2</sub>S *in vitro* apenas na presença da solução tampão demonstra que a 4-metil-benzenocarbotiamida não requer a presença de tióis orgânicos para essa liberação, ao contrário do demonstrado por Martelli *et al.* (2013) para a 4-hidróxi-benzenocarbotiamida.

Não há muitos estudos que demonstrem como as tiobenzamidas liberam H<sub>2</sub>S. Caliendo *et al.* (2010) levantaram a hipótese de que o mecanismo de hidrólise de tioacetamidas (**Figura 32**) pode ocorrer de forma similar para tiobenzamidas, embora essa reação ocorra de forma ainda mais facilitada para as tiobenzamidas, pelo fato de a presença do anel aromático tornar os intermediários mais estáveis do que os formados pela reação da tioacetamida. Lougiakis *et al.* (2016) também sugerem que esse mecanismo deve ser o que leva à liberação de H<sub>2</sub>S por tiobenzamidas. Porém, ao contrário das condições de valores baixos de pH sugeridas por Caliendo *et al.*, essa hipótese é levantada a partir de resultados obtidos em pH 7,4, aproximando-se mais ao que deve ocorrer *in vivo*.



**Figura 32 – Hidrólise de tioacetamidas.**

Fonte: Caliendo *et al.*, 2010 (Adaptado)

#### 6.4 Limitações

Os resultados do presente estudo são promissores quando se tem em perspectiva a investigação da 4-metil-benzenocarbotiamida como um candidato à fármaco analgésico e anti-inflamatório. Porém, sabe-se que a translação de resultados de ensaios pré-clínicos para ensaios clínicos é limitada, visto que há uma grande diferença entre o elevado número de moléculas que apresentam atividade antinociceptiva e anti-inflamatória em ensaios pré-clínicos e o reduzido número de fármacos analgésicos aprovados nas últimas décadas. O presente estudo, apesar de ter avaliado a atividade da 4-metil-benzenocarbotiamida em diferentes modelos de dor e inflamação, ainda indica a necessidade de outros modelos para caracterização do perfil da molécula.

A relação entre as atividades da 4-metil-benzenocarbotiamida e as propriedades de H<sub>2</sub>S ainda não está estabelecida. Estudos avaliando molécula análoga destituída de enxofre podem auxiliar na construção dessa relação (MANELLI *et al.*, 2017). Diversas ferramentas também podem ser utilizadas para inibir a produção e ação do H<sub>2</sub>S, como inibição das enzimas produtoras de H<sub>2</sub>S ou uso de sequestradores de H<sub>2</sub>S, tais como hemoglobina e hidroxocobalamina, embora estes apresentem a desvantagem de não serem seletivos para H<sub>2</sub>S (PAPAPETROPOULOS *et al.*, 2015). Embora tenha sido demonstrada a liberação de H<sub>2</sub>S pela substância avaliada, ainda se fazem necessárias abordagens que demonstrem essa propriedade durante períodos mais prolongados e *in vivo*, levando, assim, a maior compreensão do perfil de liberação.

Estudos que avaliem outros mecanismos que estejam envolvidos e perfis farmacocinético e toxicológico também se fazem necessários.

### **6.5 Perspectivas**

A 4-metil-benzenocarbotiida apresenta atividades antinociceptiva e anti-inflamatória em vários modelos experimentais. Os resultados, ao demonstrarem estar relacionados com ativação da via serotoninérgica, redução da produção de TNF- $\alpha$  e CXCL1 e redução da atividade da MPO, são expressivos, considerando que os principais mecanismos envolvidos na ação de fármacos analgésicos e anti-inflamatórios incluem inibição da produção, da liberação ou da ação de mediadores inflamatórios. Estudos adicionais devem ser conduzidos, reforçando a relação entre atividade e liberação de H<sub>2</sub>S, investigando com quais alvos moleculares a 4-metil-benzenocarbotiamida interage e, assim, contribuindo para o entendimento das atividades da substância e do H<sub>2</sub>S.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que a 4-metil-benzenocarbotiamida apresenta atividades em modelos de dores nociceptiva e inflamatória e também em modelo de edema inflamatório, provavelmente relacionadas com a ativação de mecanismos serotoninérgicos e inibição da produção e/ou ação de mediadores inflamatórios e do recrutamento de leucócitos. Foi demonstrado, ainda, que a 4-metil-benzenocarbotiamida libera  $H_2S$  *in vitro*. Esse perfil indica que a 4-metil-benzenocarbotiamida possui potencial para ser avaliada como candidato a fármaco útil para o tratamento de pacientes com condições inflamatórias e dolorosas ou como molécula doadora de  $H_2S$  na síntese de híbridos que possam apresentar melhor perfil farmacológico em relação ao protótipo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K.; KIMURA, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. **The Journal of Neuroscience**. v. 16, n. 3, p.1066-1071, 1996.

ALVES, D.; DUARTE, I. Involvement of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrene. **European Journal of Pharmacology**. v. 444, n. 1-2, p. 47-52, 2002.

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

ANDRUSKI, B.; MCCAFFERTY, D. M.; IGNACY, T.; MILLEN, B.; MCDOUGALL, J. J. Leukocyte trafficking and pain behavioral responses to a hydrogen sulfide donor in acute monoarthritis. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 295, n. 3, p. 814-820, 2008.

AUVRAY, M.; MYIN, E.; SPENCE, C. The sensory-discriminative and affective-motivational aspects of pain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 34, n. 2, p.214-223, 2010.

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

BARNES, P. J.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 14, n. 12, p. 436-441, 1993.

BASCHANT, U.; TUCKERMANN, J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. v. 120, n.2-3, p. 69-75, 2010.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**. v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.

BHATIA, M.; SIDHAPURIWALA, J.; MOOCHHALA, S. M.; MOORE, P. K. Hydrogen sulphide is a mediator of carrageenan-induced hindpaw oedema in the rat. **British Journal of Pharmacology**. v. 145, v. 2, p. 141-144, 2005.

BRACK, A.; RITTNER, H. L.; MACHELSKA, H.; LEDER, K.; MOUSA, S. A.; SCHÄFER, M.; STEIN, C. Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells. **Pain**. v. 112, n. 3, p. 229-238, 2004.

BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **Journal of Pathology**. v. 214, n. 2, p. 149-160, 2008.

BURGUERA, E. F.; VELA-ANERO, A.; MAGALHÃES, J.; MEIJIDE-FAÍLDE, R.; BLANCO, F. J. Effect of hydrogen sulfide sources on inflammation and catabolic markers on interleukin 1 $\beta$ -stimulated human articular chondrocytes. **Osteoarthritis and Cartilage**. v. 22, n. 7, p. 1026-1035, 2014.

CACANYIOVA, S.; BERENYIOVA, A.; KRISTEK F. The role of hydrogen sulphide in blood pressure regulation. **Physiological Research**. v. 24, n. 65, p. 273-289, 2016.

CALIENDO, G.; CIRINO, G.; SANTAGADA, V.; WALLACE, J. L. Synthesis and biological effects of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S): development of H<sub>2</sub>S-releasing drugs as pharmaceuticals. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 53, n. 17, p. 6275-6286, 2010.

CALVERT, J. W.; JHA, S.; GUNDEWAR. S.; ELROD, J. W.; RAMACHANDRAN, A.; PATTILLO, C. B.; KEVIL, C. G.; LEFER, D. J. Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. **Circulation Research**. v. 105, n. 4, p. 365-374, 2009.

CAMPOLO, M.; ESPOSITO, E.; AHMAD, A.; DI PAOLA, R.; PATERNITI, I.; CORDARO, M.; BRUSCHETTA, G.; WALLACE, J. L.; CUZZOCREA, S. Hydrogen

sulfide-releasing cyclooxygenase inhibitor ATB-346 enhances motor function and reduces cortical lesion volume following traumatic brain injury in mice. **Journal of Neuroinflammation**. v. 11, n. 196, 2014.

CAO, H.; ZHOU, X.; ZHANG, J.; HUANG, X.; ZHAI, Y.; ZHANG, X.; CHU, L. Hydrogen sulfide protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats by inhibiting NF- $\kappa$ B expression and regulating Th1/Th2 balance. **Toxicology Letters**. v. 224, n. 3, p. 379-394, 2014.

CAO, S.; ZHU, P.; YU, X.; CHEN, J.; LI, J.; YAN, F.; WANG, L.; YU, J.; CHEN, G. Hydrogen sulfide attenuates brain edema in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats: Possible involvement of MMP-9 induced blood-brain barrier disruption and AQP4 expression. **Neuroscience Letters**. v. 621, p. 88-97, 2016.

CARACENI, A.; HANKS, G.; KAASA, S.; BENNETT, M. I.; BRUNELLI, C.; CHERNY, N.; DALE, O.; DE CONNO, F.; FALLON, M.; HANNA, M.; HAUGEN, D. F.; JUHL, G.; KING, S.; KLEPSTAD, P.; LAUGSAND, E. A.; MALTONI, M.; MERCADANTE, S.; NABAL, M.; PIGNI, A.; RADBRUCH, L.; REID, C.; SJOGREN, P.; STONE, P. C.; TASSINARI, D.; ZEPPESELLA, G. Use of opioids analgesics in the treatment of cancer pain: evidence-based recommendations from the EAPC. **Lancet Oncology**. v. 13, n. 2, p. 58-68, 2012.

CHEN, X.; XU, W.; WANG, Y.; LUO, H.; QUAN, S.; ZHOU, J.; YANG, N.; ZHANG, T.; WU, L.; LIU, J.; LONG, X.; ZHU, N.; XIE, H.; LUO, Z. Hydrogen sulfide reduces kidney injury due to urinary-derived sepsis by inhibiting NF- $\kappa$ B expression, decreasing TNF- $\alpha$  levels and increasing IL-10 levels. **Experimental and Therapeutic Medicine**. v. 8, n. 2, p. 464-470, 2014.

CHEN, Y.; LIU, Z.; XIE, X. Hydrogen sulphide attenuates renal and cardiac injury after total hepatic ischemia and reperfusion. **Journal of Surgical Research**. v. 164, n. 2, p. 305-313, 2010.

CHU, W. Tumor necrosis factor. **Cancer Letters**. v. 328, n. 3, p. 222-225, 2013.

COHEN, S. P.; MAO, J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. **BMJ**. v. 348, p. 1-12, 2014.

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

COLLOCA, L.; LUDMAN, T.; BOUHASSIRA, D.; BARON, R.; DICKENSON, A. H.; YARNITSKY, D.; FREEMAN, R.; TRUINI, A.; ATTAL, N.; FINNERUP, N. B.; ECCLESTON, C.; KALSO, E.; BENNETT, D. L.; DWORKIN, R. H.; RAJA, S. N. Neuropathic pain. **Nature Reviews. Disease Primers**. v. 3, 2017.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annual Review of Neuroscience**. v. 32, p. 1-32, 2009.

COX, J. J.; SHEYNIN, J.; SHORER, Z.; REIMANN, F.; NICHOLAS, A. K.; ZUBOVIC, L.; BARALLE, M.; WRAIGE, E.; MANOR, E.; LEVY, J.; WOODS, C. G.; PARVARI, R. Congenital insensitivity to pain: novel SCN9A missense and in-frame deletion mutations. **Human Mutation**. v. 31, n. 9, p. 1670-1686, 2010.

COUTINHO, A. E.; CHAPMAN, K. E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 335, n. 1, p. 2-13, 2011.

CUNHA, T. M.; DAL-SECCO, D.; VERRI, W. A.; GUERRERO, A. T.; SOUZA, G. R.; VIEIRA, S. M.; LOTUFO, C. M.; NETO, A. F.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Dual role of hydrogen sulfide in mechanical inflammatory hypernociception. **European Journal of Pharmacology**. v. 590, p. 127-135, 2008a.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; SCHIVO, I. R.; NAPIMOGA, M. H.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 83, n. 4, p. 824-832, 2008b.

DALLEL, R.; RABOISSON, P.; CLAVELOU, P.; SAADE, M.; WODA, A. Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. **Pain**. v. 61, n. 1, p. 11-16, 1995.

DAY, R. O; GRAHAM, G. G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). **BMJ**. v. 346, p. 1-7, 2013.

DELGERMURUN, D.; YAMAGUCHI, S.; ICHII, O.; KON, Y.; ITO, S.; OTSUGURO, K. Hydrogen sulfide activates TRPA1 and releases 5-HT from epithelioid cells of the chicken thoracic aorta. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 187, p. 43-49, 2016.

DIEF, A. E.; MOSTAFA, D. K.; SHARARA, G. M.; ZEITOUN, T. H. Hydrogen sulfide releasing naproxen offers better anti-inflammatory and chondroprotective effect relative to naproxen in a rat model of zymosan induced arthritis. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. v. 19, n. 8, p. 1537-1546, 2015.

DISTRUTTI, E.; SEDIARI, L.; MENCARELLI, A.; RENGA, B.; ORLANDI, S.; RUSSO, G.; CALIENDO, G.; SANTAGADA, V.; CIRINO, G.; WALLACE, J. L.; FIORUCCI, S. 5-Amino-2-hydroxybenzoic acid 4-(5-thioxo-5H-[1,2]dithiol-3yl)-phenyl ester (ATB-429), a hydrogen sulfide-releasing derivative of mesalamine, exerts antinociceptive effects in a model of postinflammatory hypersensitivity. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 319, n. 1, p. 447-458, 2006.

DISTRUTTI, E.; CIPRIANI, S.; RENGA, B.; MENCARELLI, A.; MIGLIORATI, M.; CIANETTI, S.; FIORUCCI, S. Hydrogen sulphide induces  $\mu$  opioid receptor-dependent analgesia in a rodent model of visceral pain. **Molecular Pain**. v. 6, n. 36, 2010.

DONATTI, A. F.; ARAUJO, R. M.; SORIANO, R. N.; AZEVEDO, L. U.; LEITE-PANISSI, C. A.; BRANCO, L. G. Role of hydrogen sulfide in the formalin-induced orofacial pain in rats. **European Journal of Pharmacology**. v. 738, p. 49-56, 2014.

DUDEK, M.; BILSKA-WILKOSZ, A.; KNUTELSKA, J.; MOGILSKI, S.; BEDNARSKI, M.; ZYGMUNT, M.; ICIEK, M.; SAPA, J.; BUGAJSKI, D.; FILIPEK, B.; WŁODEK, L. Are anti-inflammatory properties of lipoic acid associated with the formation of hydrogen sulfide? **Pharmacological Reports**. v. 65, n. 4, p. 1018-1024, 2013.

DUMAN, E. N.; KESIM, M.; KADIOGLU, M.; YARIS, E.; KALYONCU, N. I.; ERCIYES, N. Possible involvement of opioidergic and serotonergic mechanisms in antinociceptive effect of paroxetine in acute pain. **Journal of Pharmacological Sciences**. v. 94, n. 2, p. 161-165, 2004.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of American Pharmacology Association**. v. 46, n. 3, p. 208-9, 1957.

EKUNDI-VALENTIM, E.; SANTOS, K. T.; CAMARGO, E. A.; DENADAI-SOUZA, A.; TEIXEIRA, S. A.; ZANONI, C. I.; GRANT, A. D.; WALLACE, J. L.; MUSCARÁ, M. N.; COSTA, S. K. Differing effects of exogenous and endogenous hydrogen sulphide in carrageenan-induced knee joint synovitis in the rat. **British Journal of Pharmacology**. v. 159, n. 7, p. 1463-1474, 2010.

EKUNDI-VALENTIM, E.; MESQUITA, F. P.; SANTOS, K. T.; de PAULA, M. A.; FLORENZANO, J.; ZANONI, C. I.; RODRIGUES, L.; de NUCCI, G.; TEIXEIRA, S. A.; FERREIRA, H. H.; WALLACE, J. L.; COSTA, S. K.; MUSCARÁ, M. N. A comparative study on the anti-inflammatory effects of single oral doses of naproxen and its hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S)-releasing derivative ATB-346 in rats with carrageenan-induced synovitis. **Medical Gas Research**. v. 3, n. 24, p. 1-9, 2013.

ERCOLE, F.; MANSFELD, F. M.; KAVALLARIS, M.; WHITTAKER, M. R.; QUINN, J. F.; HALLS, M. L.; DAVIS, T. P. Macromolecular hydrogen sulfide donors trigger spatiotemporally confined changes in cell signaling. **Biomacromolecules**. v. 17, n. 1, p. 371-383, 2016.

ESECHIE, A.; KISS, L.; OLAH, G.; HORVÁTH, E. M.; HAWKINS, H.; SZABÓ, C.; TRABER, D. L. Protective effect of hydrogen sulfide in a murine model of acute lung

injury induced by combined burn and smoke inhalation. **Clinical Science**. v. 115, n. 3, p. 91-97, 2008.

FALLER, S.; SEILER, R.; DONUS, R.; ENGELSTAEDTER, H.; HOETZEL, A.; SPASSOV, S. G. Pre- and posttreatment with hydrogen sulfide prevents ventilator-induced lung injury by limiting inflammation and oxidation. **PLoS One**. v. 12, n. 4, 2017.

FAN, H.; GUO, Y.; LIANG, X.; YUAN, Y.; QI, X.; WANG, M.; MA, J.; ZHOU, H. Hydrogen sulfide protects against amyloid beta-peptide induced neuronal injury via attenuating inflammatory responses in a rat model. **Journal of Biomedical Research**. v. 27, n. 4, p. 296-304, 2013.

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

FEGHALI, C. A.; WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Frontiers in Bioscience**. v. 2, p. 12-26, 1997.

FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; LORENZETTI, B. B.; MICHELIN, M. A.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. J.; POOLE, S. Role of lipocortin-1 in the anti-hyperalgesic actions of dexamethasone. **British Journal of Pharmacology**. v. 121, n. 5, p. 883-888, 1997.

FINNERUP, N. B.; HAROUTOUNIAN, S.; KAMERMAN, P.; BARON, R.; BENNETT, D. L.; BOUHASSIRA, D.; CRUCCU, G.; FREEMAN, R.; HANSSON, P.; NURMIKKO, T.; RAJA, S. N.; RICE, A. S.; SERRA, J.; SMITH, B. H.; TREEDE, R. D.; JENSEN, T. S. Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice. **Pain**. v. 157, n. 8, p. 1599-1606, 2016.

FIORUCCI, S.; ANTONELLI, E.; DISTRUTTI, E.; RIZZO, G.; MENCARELLI, A.; ORLANDI, S.; ZANARDO, R.; RENGA, B.; DI SANTE, M.; MORELLI, A.; CIRINO, G.; WALLACE, J. L. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. **Gastroenterology**. v. 129, n. 4, p. 1210-1224, 2005.

FIORUCCI, S.; ORLANDI, S.; MENCARELLI, A.; CALIENDO, G.; SANTAGADA, V.; DISTRUTTI, E.; SANTUCCI, L.; CIRINO, G.; WALLACE, J. L. Enhanced activity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of mesalamine (ATB-429) in a mouse model of colitis. **British Journal of Pharmacology**. v. 150, n. 8, p. 996-1002, 2007.

FONSECA, M. D.; CUNHA, F. Q.; KASHFI, K.; CUNHA, T. M. NOSH-aspirin (NBS-1120), a dual nitric oxide and hydrogen sulfide-releasing hybrid, reduces inflammatory pain. **Pharmacology Research and Perspectives**. v. 3, n. 3, p. 1-12, 2015.

FORESTI, R.; HAMMAD, J.; CLARK, J. E.; JOHNSON, T. R.; MANN, B. E.; FRIEBE, A.; GREEN, C. J.; MOTTERLINI, R. Vasoactive properties of CORM-3, a novel water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. **British Journal of Pharmacology**. v. 142, n. 3, p. 453-460, 2004.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**. v. 288, n. 5789, p. 373-376, 1980.

GAO, L.; XU, Z.; YIN, Z.; CHEN, K.; WANG, C.; ZHANG, H. Association of hydrogen sulfide with alterations of monocyte chemokine receptors, CCR2 and CX3CR1 in patients with coronary artery disease. **Inflammation Research**. v. 64, n. 8, p. 627-635, 2015.

GENG, Y.; LI, E.; MU, Q.; ZHANG, Y.; WEI, X.; LI, H.; CHENG, L.; ZHANG, B. Hydrogen sulfide inhalation decreases early blood-brain barrier permeability and brain edema induced by cardiac arrest and resuscitation. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**. v. 35, n. 3, p. 494-500, 2015.

GRAY, A. M.; SPENCER, P. S.; SEWELL, R. D. The involvement of the opioidergic system in the antinociceptive mechanism of action of antidepressant compounds. **British Journal of Pharmacology**. v. 124, n. 4, p. 669-674, 1998.

GREGORY, N.; HARRIS, A. L.; ROBINSON, C. R.; DOUGHERTY, P. M.; FUCHS, P. N. SLUKA, K. A. An overview of animal models of pain: disease models and outcome measures. **The Journal of Pain**. v. 14, n. 11, p. 1255-1269, 2013.

GODIN, A. M.; FERREIRA, W. C.; ROCHA, L. T.; SENIUK, J. G.; PAIVA, A. L.; MERLO, L. A.; NASCIMENTO, E. B.; BASTOS, L. F.; COELHO, M. M. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of nicotinamide and its isomers in different experimental models. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 99, n. 4, p. 782-788, 2011.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiology and Behavior**. v. 47, n. 5, p. 963-991, 1990.

HAJHASHEMI, V.; AMIN, B. Effect of glibenclamide on antinociceptive effects of antidepressants of different classes. **Clinics**. v. 66, n. 2, p. 321-325, 2011.

HALL, A. J.; SATCHELL, D. P. N. Kinetics and mechanism of hydrogen ion catalysed hydrolysis of thiobenzamide. **Journal of the Chemical Society**. p. 1077-1080, 1974.

HARIZI, H.; CORCUFF J. B.; GUALDE, N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. **Trends in Molecular Medicine**. v. 14, n. 10, p. 461-469, 2008.

HAROUTOUNIAN, S.; NIKOLAJSEN, L.; BENDTSEN, T. F.; FINNERUP, N. B.; KRISTENSEN, A. D.; HASSELSTRØM, J. B.; JENSEN, T. S. Primary afferent input critical for maintaining spontaneous pain in peripheral neuropathy. **Pain**. v. 155, n. 7, p. 1272-1279, 2014.

HEHN, C. A.; BARON, R.; WOOLF, C. J. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. **Neuron**. v. 73, n. 4, p. 638-652, 2012.

HERNANDEZ-LEON, A.; FERNÁNDEZ-GUASTI, A.; GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E. Rutin antinociception involves opioidergic mechanism and descending modulation of

ventrolateral periaqueductal grey matter in rats. **European Journal of Pain**. v. 20, n. 2, p. 274-283, 2016.

HICKEY, M. J.; REINHARDT, P. H.; OSTROVSKY, L.; JONES, W. M.; JUTILA, M. A.; PAYNE, D.; ELLIOTT, J.; KUBES, P. Tumor necrosis factor-alpha induces leukocyte recruitment by different mechanisms *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Immunology**. v. 158, n. 7, p. 3391-4000, 1997.

HOSOKI, R.; MATSUKI, N.; KIMURA, H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 237, n. 3, p. 527-531, 1997.

HU, L.; WONG, P. T.; MOORE, P. K.; BIAN, J. S. Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in microglia. **Journal of Neurochemistry**. v. 100, n. 4, p. 1121-1128, 2007.

HUANG, C. W.; FENG, W.; PEH, M. T.; PEH, K.; DYMOCK, B. W.; MOORE, P. K. A novel slow-releasing hydrogen sulfide donor, FW1256, exerts anti-inflammatory effects in mouse macrophages and *in vivo*. **Pharmacological Research**. v. 113, p. 533-546, 2016.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**. v. 30, n. 1, p. 103-114, 1987.

International Association for the Study of Pain – IASP. Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org/Taxonomy>>. Acesso em 20 de novembro de 2017.

INTURRISI, C. E. Clinical pharmacology of opioids for pain. **The Clinical Journal of Pain**. v. 18, n. 4, p. 3-13, 2002.

JU, Y.; FU, M.; STOKES, E.; WU, L.; YANG, G. H<sub>2</sub>S-mediated protein S-sulfhydration: a prediction for its formation and regulation. **Molecules**. v. 22, n. 8, p. 1-11, 2017.

KABIL, O.; MOTL, N.; BANERJEE, R. H<sub>2</sub>S and its role in redox signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1844, n. 8, p. 1355-1366, 2014.

KAYAR-YASAR, Y.; KARAMAN, Y.; BOZKURT, T. E.; ONDER, S. C.; SAHIN-ERDEMLI, I. Effects of intranasal treatment with slow (GYY4137) and rapid (NaHS) donors of hydrogen sulfide in lipopolysaccharide-induced airway inflammation in mice. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**. v. 45, p. 170-180, 2017.

KERSTEIN, P. C.; DEL CAMINO, D.; MORAN, M. M.; STUCKY, C. L. Pharmacological blockade of TRPA1 inhibits mechanical firing in nociceptors. **Molecular Pain**. v. 5, n. 19, 2009.

KIDA, K.; MARUTANI, E.; NGUYEN, R. K.; ICHINOSE, F. Inhaled hydrogen sulfide prevents neuropathic pain after peripheral nerve injury in mice. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**. v. 46, p. 87-92, 2015.

KIM, P. K.; DEUTSCHMAN, C. S. Inflammatory responses and mediators. **The Surgical Clinics of North America**. v. 80, p. 3, p. 885-894, 2000.

KIMURA, H. Hydrogen sulfide: from brain to gut. **Antioxidants and Redox Signaling**. v. 12, n. 9, p. 1111-1123, 2010.

KLINKE, A.; NUSSBAUM, C.; KUBALA, L.; FRIEDRICHS, K.; RUDOLPH, T. K.; RUDOLPH, V.; PAUST, H. J.; SCHRÖDER, C.; BENTEN, D.; LAU, D.; SZOCS, K.; FURTMÜLLER, P. G.; HEERINGA, P.; SYDOW, K.; DUCHSTEIN, H. J.; EHMKE, H.; SCHUMACHER, U.; MEINERTZ, T.; SPERANDIO, M.; BALDUS, S. Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. **Blood**. v. 117, n. 4, p. 1350-1358, 2011.

KOBAYASHI, H.; CHATTOPADHYAY, S.; KATO, K.; DOLKAS, J.; KIKUCHI, S.; MYERS, R. R.; SHUBAYEV, V. I. MMPs initiate Schwann cell-mediated MBP degradation and mechanical nociception after nerve damage. **Molecular and Cellular Neuroscience**. v. 39, n. 4, p. 619-627, 2008.

KODELA, R.; CHATTOPADHYAY, M.; KASHFI, K. NOSH-aspirin: a novel nitric oxide-hydrogen sulfide-releasing hybrid: a new class of anti-inflammatory pharmaceuticals. **ACS Medicinal Chemistry Letters**. v. 3, n. 3, p. 257-262, 2012.

KOSTADINOV, I. D.; DELEV, D. P.; KOSTADINOVA, I. I. Antinociceptive effect of clomipramine through interaction with serotonin 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptor subtypes. **Folia Medica**. v. 54, n. 4, p. 69-77, 2012.

KOTAS, M. E.; MEDZHITOV, R. Homeostasis, inflammation and disease susceptibility. **Cell**. v. 160, n. 5, p. 816-827, 2015.

KUBER, P.; WARD, P. A. Leukocyte recruitment and the acute inflammatory response. **Brain Pathology**. v. 10, p. 127-135, 2000.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**. v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LEE, M.; TAZZARI, V.; GIUSTARINI, D.; ROSSI, R.; SPARATORE, A.; DEL-SOLDATO, P.; MCGEER, E.; MCGEER, P. L. Effects of hydrogen sulfide-releasing L-DOPA derivatives on glial activation: potential for treating Parkinson disease. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 285, n. 23, p. 17318-17328, 2010.

LEÓN-REYES, M. R.; CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, G.; ORTIZ, M. I. Pharmacokinetic of diclofenac in the presence and absence of glibenclamide in the rat. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 12, n. 3, p. 280-287, 2009.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**. v. 7, p. 678-689, 2007.

LI, L.; BHATIA, M.; ZHU, Y. Z.; ZHU, Y. C.; RAMNATH, R. D.; WANG, Z. J.; ANUAR, F. B.; WHITEMAN, M.; SALTO-TELLEZ, M.; MOORE, P. K. Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. **FASEB Journal**. v. 19, n. 9, p. 1196-1198, 2005.

LI, L.; SALTO-TELLEZ, M.; TAN, C. H.; WHITEMAN, M.; MOORE, P. K. GYY4137, a novel hydrogen sulfide-releasing molecule, protects against endotoxic shock in the rat. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 47, n. 1, p. 103-113, 2009.

LI, L.; FOX, B.; KEEBLE, J.; SALTO-TELLEZ, M.; WINYARD, P. G.; WOOD, M. E.; MOORE, P. K.; WHITEMAN, M. The complex effects of the slow-releasing hydrogen sulfide donor GYY4137 in a model of acute joint inflammation and in human cartilage cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v. 17, n. 3, p. 365-376, 2013.

LI, T.; ZHAO, B.; WANG, C.; WANG, H.; LIU, Z.; LI, W.; JIN, H.; TANG, C.; DU, J. Regulatory effects of hydrogen sulfide on IL-6, IL-8 and IL-10 levels in the plasma and pulmonary tissue of rats with acute lung injury. **Experimental Biology and Medicine**. v. 233, n. 9, p. 1081-1087, 2008.

LIM, J. J.; LIU, Y. H.; KHIN, E. S.; BIAN, J. S. Vasoconstrictive effect of hydrogen sulfide involves downregulation of cAMP in vascular smooth muscle cells. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**. v. 295, n. 5, p. 1261-1270, 2008.

LIN, S.; VISRAM, F.; LIU, W.; HAIG, A.; JIANG, J.; MOK, A.; LIAN, D.; WOOD, M. E.; TORREGROSSA, R.; WHITEMAN, M.; LOBB, I.; SENER, A. GYY4137, a slow-releasing hydrogen sulfide donor, ameliorates renal damage associated with chronic obstructive uropathy. **The Journal of Urology**. v. 196, n. 6, p. 1778-1787, 2016.

LIU, Y.; SPARATORE, A.; DEL-SOLDATO, P.; BIAN, J. ACS84, a novel hydrogen sulfide-releasing compound, protects against amyloid  $\beta$ -induced cell cytotoxicity. **Neurochemistry International**. v. 58, n. 5, p. 591-598, 2011.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Pain**. v. 353, n. 9164, p. 1607-1609, 1999.

LOH, H. H.; TSENG, L. F.; WEI, E.; LI, C. H.  $\beta$ -Endorphin is a potent analgesic agent. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 73, n. 8, p. 2895-2898, 1976.

LOUGIAKIS, N.; PAPAPETROPOULOS, A.; GIKAS, E.; TOUMPAS, S.; EFENTAKIS, P.; WEDMANN, R.; ZOGA, A.; ZHOU, Z.; ILIODROMITIS, E. K.; SKALTSOUNIS, A. L.; FILIPOVIC, M. R.; POULI, N.; MARAKOS, P.; ANDREADOU, I. Synthesis and pharmacological evaluation of novel adenine-hydrogen sulfide slow release hybrids designed as multitarget cardioprotective agents. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 59, n. 5, p. 1776-1790, 2016.

LUO, Z.; REN, J. D.; HUANG, Z.; WANG, T.; XIANG, K.; CHENG, L.; TANG, L. J. The role of exogenous hydrogen sulfide in free fatty acids induced inflammation in macrophages. **Cellular Physiology and Biochemistry**. v. 42, n. 4, p. 1635-1644, 2017.

MANELLI, L. C.; LUCARINI, E.; MICHELI, L.; MOSCA, I.; AMBROSINO, P.; SOLDOVIERI, M. V.; MARTELLI, A.; TESTAI, L.; TAGLIALATELA, M.; CALDERONE, V.; GHELARDINI, C. Effects of natural and synthetic isothiocyanate-based H<sub>2</sub>S-releasers against chemotherapy-induced neuropathic pain: Role of Kv7 potassium channels. **Neuropharmacology**. v. 121, p. 49-59, 2017.

MARKS, G. S.; BRIEN, J. F.; NAKATSU, K.; MCLAUGHLIN, B. E. Does carbon monoxide have a physiological function? **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 12, n. 5, p. 185-188, 1991.

MARTELLI, A.; TESTAI, L.; CITI, V.; MARINO, A.; PUGLIESI, I.; BARRESI, E.; NESI, G.; RAPPOSELLI, S.; TALIANI, S.; DA SETTIMO, F.; BRESCHI, M. C.; CALDERONE, V. Arylthioamides as H<sub>2</sub>S donors: L-cysteine-activated releasing properties and vascular effects *in vitro* and *in vivo*. **ACS Medicinal Chemistry Letters**. v. 4, n. 10, p. 904-908, 2013.

MAYADAS, T. N.; CULLLERE, X.; LOWELL, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annual Review of Pathology**. v. 9, p. 181-218, 2014.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**. v. 454, n. 24, p. 428-435, 2008.

MENG, G; ZHAO, S.; XIE, L.; HAN, Y.; JI, Y. Protein S-sulfhydration by hydrogen sulfide in cardiovascular system. **British Journal of Pharmacology**. 2017.

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

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

MOGHADAM-KIA, S.; WERTH, V. P. Prevention and treatment of systemic glucocorticoid side effects. **International Journal of Dermatology**. v. 49, p. 239-248, n. 3, 2010.

MURPHY, P. M.; BAGGIOLINI, M.; CHARO, I. F.; HÉBERT, C. A.; HORUK, R.; MATSUSHIMA, K.; MILLER, L. H.; OPPENHEIM, J. J.; POWER, C. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. **Pharmacological Review**. v. 52, n. 1, p.145-176, 2000.

MURPHY S. W. Inflammation. In: RUBIN, E.; REISNER, H. M. **Essentials of Rubin's Pathology**. 6th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2011. p. 25-48.

MUSTAFA, A. K.; GADALLA, M. M.; SYNDER, S. H. Signaling by gasotransmitters. **Science Signaling**. v. 2, n. 68, 2009.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell**. v. 140, n. 6, p. 871-882, 2010.

NEWTON, R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? **Thorax**. v. 55, n. 7, p. 603-613, 2000.

OCAÑA, M.; DEL POZO, E.; BARRIOS, M.; ROBLES, L. I.; BAEYENS, J. M. An ATP-dependent potassium channel blocker antagonizes morphine analgesia. **European Journal of Pharmacology**. v. 186, p. 377-378, 1990.

OH, G.; PAE, H. O.; LEE, B. S.; KIM, B. N.; KIM, J. M.; KIM, H. R.; JEON, S. B.; JEON, W. K.; CHAE, H. J.; CHUNG, H. T. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 41, n. 1, p. 106-119, 2006.

OLIVEIRA, C. M. B; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Cytokines and Pain. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 61, n. 2, p. 255-265, 2011.

ORR, P. M.; SHANK, B. C.; BLACK, A. C. The role of pain classification systems in pain management. **Critical Care Nursing Clinics of North America**. v. 29, n. 4, p. 407-418, 2017.

OSSIPOV, M. H. The perception and endogenous modulation of pain. **Scientifica**. v. 2012, p. 1-25, 2012.

OSSIPOV, M. H.; MORIMURA, K.; PORRECA, F. Descending pain modulation and chronification of pain. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**. v. 8, n. 2, p. 143-151, 2014.

PÁLINKÁS, Z.; FURTMÜLLER, P. G.; NAGY, A.; JAKOPITSCH, C.; PIRKER, K. F.; MAGIEROWSKI, M.; JASNOS, K.; WALLACE, J. L.; OBINGER, C.; NAGY, P. Interactions of hydrogen sulfide with myeloperoxidase. **British Journal of Pharmacology**. v. 172, n. 6, p. 1516-1532, 2015.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**. v. 327, n. 6122, p. 524-526, 1987.

PAPAPETROPOULOS A.; WHITEMAN, M.; CIRINO, G. Pharmacological tools for hydrogen sulphide research: a brief, introductory guide for beginners. **British Journal of Pharmacology**. v. 172, n. 6, p. 1633-1637, 2015.

PAPICH, M. G. Pharmacological considerations for opiate analgesic and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **The Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice**. v. 30, n. 4, p. 815-837, 2000.

PAUL, B. D.; SNYDER, S. H. H<sub>2</sub>S signalling through protein sulfhydration and beyond. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**. v. 13, n. 8, p. 499-507, 2012.

PERNA, A. F.; SEPE, I.; LANZA, D.; CAPASSO, R.; ZAPPAVIGNA, S.; CAPASSO, G.; CARAGLIA, M.; INGROSSO, D. Hydrogen sulfide reduces cell adhesion and relevant inflammatory triggering by preventing ADAM17-dependent TNF- $\alpha$  activation. **Journal of Cellular Biochemistry**. v. 114, n. 7, p. 1536-1548, 2013.

PERRY, M. M.; HUI, C. K.; WHITEMAN, M.; WOOD, M. E.; ADCOCK, I.; KIRKHAM, P.; MICHAELOUDES, C.; CHUNG, K. F. Hydrogen sulfide inhibits proliferation and release of IL-8 from human airway smooth muscle cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. v. 45, n. 4, p. 746-752, 2011.

PITCHFORD S.; LEVINE J. D. Prostaglandins sensitize nociceptors in cell culture. **Neuroscience Letters**. v. 132, n. 1, p. 105-108, 1991.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**. v. 142, n. 2, p. 331-338, 2004.

QUEIROZ-JUNIOR, C. M.; PACHECO, C. M.; FONSECA, A. H.; KLEIN, A.; CALIARI, M. V.; DE FRANCISCHI, J. N. Myeloperoxidase content is a marker of systemic inflammation in a chronic condition: the example given by the periodontal disease in rats. **Mediators of Inflammation**. v. 2009, p. 1-7, 2009.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. A hipófise e o córtex da suprarrenal. In: RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. A. **Farmacologia**. 6ª Ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. Cap. 32, p. 394-410.

RIOS, E. C. S.; SZCZESNY, B.; SORIANO, F. G.; OLAH, G.; SZABÓ, C. Hydrogen sulfide attenuates cytokine production through the modulation of chromatin remodeling. **International Journal of Molecular Medicine**. v. 35, n. 6, p. 1741-1746, 2015.

RITZMAN, A. M.; HUGHES-HANKS, J. M.; BLAHO, V. A.; WAX, L. E.; MITCHELL, W. J.; BROWN, C. R. The chemokine receptor CXCR2 ligand KC (CXCL1) mediates neutrophil recruitment and is critical for development of experimental Lyme arthritis and carditis. **Infection and Immunity**. v. 78, n. 11, p. 4593-4600, 2010.

ROCHA, A. A. C.; FERNANDES, E. S.; QUINTÃO, N. L.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Relevance of tumour necrosis factor-alpha for the inflammatory and nociceptive responses evoked by carrageenan in the mouse paw. **British Journal of Pharmacology**. v. 148, n. 5, p. 688-695, 2006.

RODRIGUES, A. R. A.; DUARTE, I. D. G. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. **British Journal of Pharmacology**. v. 129, n. 1, p. 110-114, 2000.

RODRIGUES, L.; EKUNDI-VALENTIM, E.; FLORENZANO, J.; CERQUEIRA, A. R.; SOARES, A. G.; SCHMIDT, T. P.; SANTOS, K. T.; TEIXEIRA, S. A.; RIBELA, M. T.; RODRIGUES, S. F.; DE CARVALHO, M. H.; DE NUCCI, G.; WOOD, M.; WHITEMAN, M.; MUSCARÁ, M. N.; COSTA, S. K. Protective effects of exogenous and endogenous hydrogen sulfide in mast cell-mediated pruritus and cutaneous acute inflammation in mice. **Pharmacological Research**. v. 115, p. 255-266, 2017.

ROSLAND, J. H.; HUNSKAAR, S.; HOLE, K. Modification of the antinociceptive effect of morphine by acute and chronic administration of clomipramine in mice. **Pain**. v. 33, n. 3, p. 349-355, 1988.

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

SALVEMINI, D.; WANG, Z. Q.; WYATT, P. S.; BOURDON, D. M.; MARINO, M. H.; MANNING, P. T.; CURRIE, M. G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**. v. 118, n. 4, p. 829-838, 1996.

SCHECHTER, N. L. Functional pain: time for a new name. **JAMA Pediatrics**. v. 168, n. 8, p. 694-694, 2014

SCHMID-ANTOMARCHI, H.; DE WEILLE, J.; FOSSET, M.; LAZDUNSKI, M. The antidiabetic sulfonylurea glibenclamide is a potent blocker of the ATP-modulated K<sup>+</sup> channel in insulin secreting cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 146, n. 1, p. 21-25, 1987.

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

SESTITO, S.; NESI, G.; PI, R.; MACCHIA M.; RAPPOSELLI, S. Hydrogen sulfide: a worthwhile tool in the design of new multitarget drugs. **Frontiers in Chemistry**. v. 5, n. 72, 2017.

SHEN, Y.; SHEN, Z.; LUO, S.; GUO, W.; ZHU, Y. Z. The Cardioprotective Effects of Hydrogen Sulfide in Heart Diseases: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Potential. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2015, p. 1-13, 2015.

SHIBUYA, N.; TANAKA, M.; YOSHIDA, M.; OGASAWARA, Y.; TOGAWA, T.; ISHII, K.; KIMURA, H. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. **Antioxidants and Redox Signaling**. v. 11, n. 4, p. 703-714, 2009.

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

SHUBAYEV, V. I.; KATO, K.; MYERS, R. R. Cytokines in Pain. In: KRUGER, L.; LIGHT, A. R. **Translational Pain Research: From Mouse to Man**. Boca Raton: Taylor and Francis Group, 2010.

SIDHAPURIWALA, J.; LI, L.; SPARATORE, A.; BHATIA, M.; MOORE, P. K. Effect of S-diclofenac, a novel hydrogen sulfide releasing derivative, on carrageenan-induced hindpaw oedema formation in the rat. **European Journal of Pharmacology**. v. 569, n. 1-2, p. 149-154, 2007.

SILVA, R. L.; LOPES, A. H.; GUIMARÃES, R. M.; CUNHA, T. M. CXCL1/CXCR2 signaling in pathological pain: Role in peripheral and central sensitization. **Neurobiology of Disease**. v. 105, p. 109-116, 2017.

SOMMER, C. Serotonin in pain and analgesia: actions in the periphery. **Molecular Neurobiology**. v. 30, n. 2, p. 117-125, 2004.

SONG, H.; SUN, Y.; XU, G.; HOU, B.; AO, G. Synthesis and biological evaluation of novel hydrogen sulfide releasing glycyrrhetic acid derivatives. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. v. 31, n. 6, p. 1457-1463, 2016.

SONG, Z. J.; NG, M. Y.; LEE, Z.; DAI, W.; HAGEN, T.; MOORE, P. K.; HUANG, D.; DENG, L.; TAN, C. Hydrogen sulfide donors in research and drug development. **Medicinal Chemistry Communications**. v. 5, p. 557-570, 2014.

STEIN, A.; BAILEY, S. M. Redox Biology of Hydrogen Sulfide: Implications for Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. **Redox Biology**. v. 1, n. 1, p. 32-39, 2013.

STEINMEYER, J. Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Arthritis Research**. v. 2, n. 5, p. 379-385, 2000.

SZABÓ, C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. **Nature Reviews. Drug Discovery**. v. 6, n. 11, p. 917-935, 2007.

SZABÓ, C. A timeline of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) research: From environmental toxin to biological mediator. **Biochemical Pharmacology**. 2017.

TAGAMI, S.; MAEDA, H. Application of the ammonia gas-sensing electrode: determination of drugs having a carbothionamido group by decomposition with acid. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 72, n. 9, p. 988-991, 1983.

TALAEI, F. Pathophysiological Concepts in Multiple Sclerosis and the Therapeutic Effects of Hydrogen Sulfide. **Basic and Clinical Neuroscience**. v. 7, n. 2, p. 121-136, 2016.

TANG, G.; WU, L.; LIANG, W.; WANG, R. Direct stimulation of K<sub>ATP</sub> channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. **Molecular Pharmacology**. v. 68, n. 6, p. 1757-1764, 2005.

THEE, S.; GARCIA-PRATS, A. J.; DONALD, P. R.; HESSELING, A. C.; SCHAAF, H. S. A review of the use of ethionamide and prothionamide in childhood tuberculosis. **Tuberculosis**. v. 97, p. 126-136, 2016.

TJØLSEN, A.; BERGE, O-G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**. v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.

TOMINAGA, M. The Role of TRP Channels in Thermosensation. In: LIEDTKE, W. B.; HELLER, S. **TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2007, Cap. 20.

UJIKE, A.; OTSUGURO, K.; MIYAMOTO, R.; YAMAGUCHI, S.; ITO, S. Bidirectional effects of hydrogen sulfide via ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and transient receptor potential A1 channels in RIN14B cells. **European Journal of Pharmacology**. v. 764, p. 463-470, 2015.

VAN HECKE, O.; AUSTIN, S. K.; KHAN, R. A.; SMITH, B. H.; TORRANCE, N. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. **Pain**. v. 155, n. 4, p. 645-662, 2014.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biology**. v. 231, n. 25, p. 232-5, 1971.

VAZ, Z. R.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxyline derivative, on chemical and thermal models of nociception in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 278, n. 1, p. 304-312, 1996.

XIA, Y.; ZHU, Y. Z.; XU, C. Hydrogen sulfide prevents postoperative adhesion in a rat uterine horn model. **Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology**. v. 56, n. 1, p. 46-50, 2017.

XIN, H.; WANG, M.; TANG, W.; SHEN, Z.; MIAO, L.; WU, W.; LI, C.; WANG, X.; XIN, X.; ZHU, Y. Z. Hydrogen sulfide attenuates inflammatory hepcidin by reducing IL-6 secretion and promoting SIRT1-mediated STAT3 deacetylation. **Antioxidants and Redox Signaling**. v. 24, n. 2, p. 70-83, 2016.

XU, H.; RAMSEY, I. S.; KOTTECHA, S. A.; MORAN, M. M.; CHONG, J. A.; LAWSON, D.; GE, P.; LILLY, J.; SILOS-SANTIAGO, I.; XIE, Y.; DISTEFANO, P. S.; CURTIS, R.; CLAPHAM, D. E. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. **Nature**. v. 418, n. 6894, p. 181-186, 2002.

WALLACE, J. L.; REUTER, B.; CICALA, C.; MCKNIGHT, W.; GRISHAM, M. B.; CIRINO, G. Novel nonsteroidal anti-inflammatory drug derivatives with markedly reduced ulcerogenic properties in the rat. **Gastroenterology**. v. 107, n. 1, p. 173-179, 1994.

WALLACE, J. L. Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drugs. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 22, n. 10, p. 501-505, 2007.

WALLACE, J. L.; CALIENDO, G.; SANTAGADA, V.; CIRINO, G.; FIORUCCI, S. Gastrointestinal safety and anti-inflammatory effects of a hydrogen sulfide-releasing diclofenac derivative in the rat. **Gastroenterology**. v. 132, n. 1, p. 261-271, 2007a.

WALLACE, J. L.; DICAY, M.; MCKNIGHT, W.; MARTIN, G. R. Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats. **FASEB Journal**. v. 21, n. 14, p. 4070-4076, 2007b.

WALLACE, J. L.; CALIENDO, G.; SANTAGADA, V.; CIRINO, G. Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of naproxen (ATB-346). **British Journal of Pharmacology**. v. 159, n. 6, p. 1236-1246, 2010.

WALLACE, J. L.; WANG, R. Hydrogen sulfide-based therapeutics: exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter. **Nature Reviews. Drug Discovery**. v. 14, n. 5, p. 329-345, 2015.

WALLACE, J. L. VAUGHAN, D.; DICAY, M.; MACNAUGHTON, W. K.; de NUCCI, G. Hydrogen sulfide-releasing therapeutics: translation to the clinic. **Antioxidants and Redox Signaling**. p. 1-28, 2017

WANG, R. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? **FASEB Journal**. v. 16, n. 13, p. 1792-1798, 2002.

WANG, R. The gasotransmitter role of hydrogen sulfide. **Antioxidants and Redox Signaling**. v. 5, n. 4, p. 493-501, 2003.

WANG, X.; TIAN, B.; HUANG, Y.; PENG, X. Y.; CHEN, L. H.; LI, J. C.; LIU, T. Hydrogen sulfide-induced itch requires activation of Cav3.2 T-type calcium channel in mice. **Scientific Reports**. v. 5, n. 16768, 2015.

WATSON, J. C.; SANDRONI, P. Central neuropathic syndromes. **Mayo Clinic Proceedings**. V. 91, n. 3, p. 372-385, 2016.

WHITEMAN, M.; LI, L.; ROSE, P.; TAN, C. H.; PARKINSON, D. B.; MOORE, P. K. The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. **Antioxidants and Redox Signaling**. v. 12, n. 10, p. 1147-1154, 2010.

WOOD, J. The molecular basis of analgesia in CIP (congenital insensitivity to pain) SCN9A loss-of-function mutants. **Acta Physiologica**. s. 8:3, p. 41, 2014.

WOOLF, C. J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. **Annals of Internal Medicine**. v. 140, n. 6, p. 441-451, 2004.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? **The Journal of Clinical Investigation**. v. 120, n. 11, p. 3742-3744, 2010.

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

YAKSH, T. L.; WALLACE, M. Opioides, analgesia e tratamento da dor. In: BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLMANN, B.C. **Goodman & Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica**. 12<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: McGraw-Hill, 2012. p. 481-525.

YAN, Y. Y.; LI, C. Y.; ZHOU, L.; AO, L. Y.; FANG, W. R.; LI, Y. M. Research progress of mechanisms and drug therapy for neuropathic pain. **Life Sciences**. v. 190, p. 68-77, 2017.

YANG, H.; WU, Z. Y.; BIAN, J. S. Hydrogen sulfide inhibits opioid withdrawal-induced pain sensitization in rats by down-regulation of spinal calcitonin gene-related peptide expression in the spine. **International Journal of Neuropsychopharmacology**. v. 17, n. 9, p. 1387-1395, 2014.

YANG, W. YANG, G.; JIA, X.; WU, L.; WANG, R. Activation of K<sub>ATP</sub> channels by H<sub>2</sub>S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. **The Journal of Physiology**. v. 569, p. 519-531, 2005.

YEKKIRALA, A. S.; ROBERSON, D. P.; BEAN, B. P.; WOOLF, C. J. Breaking barriers to novel analgesic drug development. **Nature Reviews. Drug Discovery**. v. 16, n. 8, p. 545-564, 2017.

ZANARDO, R. C. O.; BRANCALEONE, V.; DISTRUTTI, E.; FIORUCCI, S.; CIRINO, G.; WALLACE, J. L. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. **FASEB Journal**. v. 20, n. 12, p. 2118-2120, 2006.

ZELOVÁ, H.; HOSEK, J. TNF- $\alpha$  signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. **Inflammation Research**. v. 62, n. 7, p. 641-651, 2013.

ZHANG, D.; DU, J.; TANG, C.; HUANG, Y.; JIN, H. H<sub>2</sub>S-induced sulfhydration: biological function and detection methodology. **Frontiers in Pharmacology**. v. 8, n. 608, p. 1-13, 2017.

ZHANG, H.; GUO, C.; WU, D.; ZHANG, A.; GU, T.; WANG, L.; WANG, C. Hydrogen sulfide inhibits the development of atherosclerosis with suppressing CX3CR1 and CX3CL1 expression. **PLoS One**. v. 7, n. 7, 2012.

ZHANG, J.; AN, J. Cytokines, inflammation and pain. **International Anesthesiology Clinics**. v. 45, n. 2, p. 27-37, 2007.

ZHAO, H.; LU, S.; CHAI, J.; ZHANG, Y.; MA, X.; CHEN, J.; GUAN, Q.; WAN, M.; LIU, Y. Hydrogen sulfide improves diabetic wound healing in ob/ob mice via attenuating inflammation. **Journal of Diabetes and Its Complications**. v. 31, n. 9, p. 1363-1369, 2017b.

ZHAO, H.; PAN, P.; YANG, Y.; GE, H.; CHEN, W.; QU, J.; SHI, J.; CUI, G.; LIU, X.; FENG, H.; CHEN, Y. Endogenous hydrogen sulphide attenuates NLRP3 inflammasome-mediated neuroinflammation by suppressing the P2X7 receptor after intracerebral haemorrhage in rats. **Journal of Neuroinflammation**. v. 14, n. 163, 2017a.

ZHAO, Y.; BIGGS, T. D.; XIAN, M. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) releasing agents: chemistry and biological applications. **Chemical Communications**. v. 50, n. 80, p. 11788-11805, 2014.

ZHAO, W.; ZHANG, J.; LU, Y; WANG, R. The vasorelaxant effect of H<sub>2</sub>S as a novel endogenous gaseous K<sub>ATP</sub> channel opener. **EMBO Journal**. v. 20, n. 21, p. 6008-6016, 2001.

ZHUANG, L.; LI, K.; WANG, G.; SHOU, T.; GAO, C.; MAO, Y.; BAO, M.; ZHAO, M. Preconditioning with hydrogen sulfide prevents bone cancer pain in rats through a proliferator-activated receptor gamma/p38/Jun N-terminal kinase pathway. **Experimental Biology and Medicine**. p. 1-9, 2017.

ZIMMERMANN, K. K.; SPASSOV, S. G.; STROSING, K. M.; IHLE, P. M.; ENGELSTAEDTER, H.; HOETZEL, A.; FALLER, S. Hydrogen sulfide exerts anti-oxidative and anti-inflammatory effects in acute lung injury. **Inflammation**. 2017.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**. v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.