**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**
**Faculdade de Farmácia**
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

SARAH OLIVIA ALVES MENDES DA COSTA

# ATIVIDADES DO RI75, UM ANÁLOGO DA CURCUMINA, EM MODELO DE NEUROPATIA INDUZIDA POR QUIMIOTERÁPICO

Belo Horizonte
2024

SARAH OLIVIA ALVES MENDES DA COSTA

# ATIVIDADES DO RI75, UM ANÁLOGO DA CURCUMINA, EM MODELO DE NEUROPATIA INDUZIDA POR QUIMIOTERÁPICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Renes de Resende Machado

Coorientador: Prof. Dr. Márcio de Matos Coelho

Belo Horizonte

2024

Costa, Sarah Olivia Alves Mendes da.
C837a Atividades do RI75, um análogo da curcumina, em modelo de neuropatia induzida por quimioterápico [recurso eletrônico] / Sarah Olivia Alves Mendes da Costa. – 2024.
1 recurso eletrônico (97 f. : il.) : pdf

Orientador: Renes de Resende Machado.
Coorientador: Márcio de Matos Coelho.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Curcumina – Teses. 2. Dor – Teses. 3. Paclitaxel – Teses. 4. Citocinas – Teses. I. Machado, Renes de Resende. II. Coelho, Márcio de Matos. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:615.4

Elaborado por Darlene Teresinha Schuler – CRB-6/1759

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

“ATIVIDADES DO RI75, UM ANÁLOGO DA CURCUMINA, EM MODELO DE NEUROPATIA INDUZIDA POR QUIMIOTERÁPICO”

**SARAH OLIVÍA ALVES MENDES DA COSTA**

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

Prof. Dr. Ivo Souza Ferraz de Melo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP - USP

Prof. Dr. Felipe Fernandes Rodrigues
Centro Universitário de Sete Lagoas-UNIFEMM

Prof. Dr. José Eduardo Gonçalves
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Caryne Margotto Bertollo
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Renes de Resende Machado – Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Márcio de Matos Coelho – Coorientador
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 29 de novembro de 2024.

Documento assinado eletronicamente por **Marcio de Matos Coelho**, **Professor(a)**, em 29/11/2024, às 17:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Caryne Margotto Bertollo**, **Professora do Magistério Superior**, em 29/11/2024, às 17:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Jose Eduardo Goncalves**, **Professor do Magistério Superior**, em 29/11/2024, às 17:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Ivo Souza Ferraz de Melo**, **Usuário Externo**, em 29/11/2024, às 19:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Renes de Resende Machado**, **Professor do Magistério Superior**, em 01/12/2024, às 22:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Felipe Fernandes Rodrigues**, **Usuário Externo**, em 02/12/2024, às 08:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3763550** e o código CRC **B9CB977B**.

**Referência:** Processo nº 23072.269354/2024-12 SEI nº 3763550

A todos aqueles que, por diversas circunstâncias, não tiveram a oportunidade de acessar o conhecimento que almejavam. Também a mim mesma, que, apesar de ir de encontro com as estatísticas e enfrentar inúmeras dificuldades, perseverei na busca de meus objetivos.

Que nossas vozes se unam na busca por um futuro onde todos tenham dignidade e oportunidades!

**Agradecimento**

À Espiritualidade, por ter me sustentado nesse processo.

Ao meu querido núcleo familiar e amigos que me auxiliaram nessa caminhada e estiveram ao meu lado apoiando minhas decisões e me dando forças. Em especial, agradeço imensamente à minha mãe, Deonide, que “sob muito sol, me auxiliou para chegar até aqui pela sombra”!

Aos colaboradores dos Laboratórios de Farmacologia, Farmacotécnica, Farmacognosia, Química Farmacêutica, Biologia Celular, e ao Biotério da FAFAR/UFMG, que auxiliaram a realização deste trabalho.

À CAPES, FAPEMIG e à Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG, pela concessão de bolsa e auxílio financeiro.

## RESUMO

O manejo da dor neuropática induzida por quimioterápico (DNIQ) ainda é desafiador devido à falta de fármacos que previnem ou aliviam com eficácia essa condição. A modificação da estrutura química de substâncias com potencial terapêutico representa uma estratégia promissora no desenvolvimento de novos fármacos. A curcumina, um polifenol natural abundante no rizoma da *Curcuma longa,* é empregada na medicina tradicional devido às suas propriedades terapêuticas, principalmente a anti-inflamatória. Em virtude da baixa biodisponibilidade da curcumina, análogos desse polifenol têm sido sintetizados na tentativa de obter melhorias em características biofarmacêuticas e aumentar os efeitos biológicos. Ensaios pré-clínicos têm demonstrado que a curcumina e seus análogos apresentam atividade em diferentes modelos de dor. No presente estudo, avaliamos o efeito do RI75, um análogo tiazolil hidrazona da curcumina, em modelo murino de dor neuropática induzida por administrações repetidas de paclitaxel e investigamos possíveis mecanismos que medeiam tal efeito. A administração intraperitoneal (i.p.) do RI75 (20 e 40 mg/kg) reduziu a alodinia mecânica induzida pelo paclitaxel. Essa atividade foi atenuada pela administração prévia de AM251 (4 e 8 mg/kg, i.p.), naltrexona (5 e 10 mg/kg, i.p.) ou ciproheptadina (5 ou 10 mg/kg, i.p.), mas não de glibenclamida (20 ou 40 mg/kg, *per os*). O RI75 (40 mg/kg) reduziu as concentrações de fator de necrose tumoral (TNF-α) e CXCL-1 no nervo isquiático, gânglios da raiz dorsal e tálamo e atenuou as alterações histológicas do nervo isquiático induzidas pelo paclitaxel. Em células RAW 264.7 estimuladas por lipopolissacarídeo, o RI75 reduziu as concentrações de TNF-α e interleucina-1β (IL-1β). Em modelo com *Artemia salina L.*, o RI75 não apresentou toxicidade. Na avaliação preliminar da toxicidade sistêmica em camundongos, o RI75 (40 ou 80 mg/kg, i.p.) não induziu alterações hematológicas ou bioquímicas significativas. Em um ensaio *in vitro*, foi observado que a atividade antioxidante do RI75 é elevada. Concluindo, os resultados demonstram que o RI75, um análogo de curcumina, apresenta atividade antinociceptiva em modelo de dor neuropática induzida por paclitaxel. A atividade do RI75 está, provavelmente, associada com a ativação de mecanismos canabinoidérgicos, opioidérgicos e serotoninérgicos e redução de citocinas pró-inflamatórias, assim como, atividades neuroprotetora e antioxidante.

**Palavras-chave:** RI75; curcumina; análogos de curcumina; dor neuropática; paclitaxel; citocinas.

## ABSTRACT

The management of chemotherapy-induced neuropathic pain (CIPN) is still challenging due to the lack of drugs that effectively prevent or alleviate this condition. Modifying the chemical structure of substances with therapeutic potential represents a promising strategy in the development of new drugs. Curcumin, a natural polyphenol abundant in the rhizome of *Curcuma longa*, is used in traditional medicine due to its therapeutic properties, especially the anti-inflammatory one. Due to the low bioavailability of curcumin, analogues have been synthesized in an attempt to obtain improvements in biopharmaceutical characteristics and increase biological effects. Preclinical trials have demonstrated that curcumin and its analogues exhibit activities in different pain models. In the present study, we evaluated the effect of RI75, a thiazolyl hydrazone analogue of curcumin, in a murine model of neuropathic pain induced by repeated administrations of paclitaxel and investigated possible mechanisms that mediate this effect. Intraperitoneal (i.p.) administration of RI75 (20 and 40 mg/kg) reduced paclitaxel induced mechanical allodynia. This activity was attenuated by prior administration of AM251 (4 and 8 mg/kg, i.p.), naltrexone (5 and 10 mg/kg, i.p.) or cyproheptadine (5 or 10 mg/kg, i.p.), but not glibenclamide (20 or 40 mg/kg*, per os*). RI75 (40 mg/kg) reduced the concentrations of tumor necrosis factor (TNF-α) and CXCL-1 in the sciatic nerve, dorsal root ganglia and thalamus and attenuated the histological changes of the sciatic nerve induced by paclitaxel. In RAW 264.7 cells stimulated by lipopolysaccharide, RI75 reduced the concentrations of TNF-α and interleukin-1β (IL-1β). In a model with *Artemia salina L.*, RI75 did not induce toxicity. In the preliminary assessment of systemic toxicity in mice, RI75 (40 or 80 mg/kg, i.p.) did not induce significant hematological or biochemical changes. In an *in vitro* assay, RI75 exhibited marked antioxidant activity. In conclusion, the results demonstrate that RI75, a curcumin analogue, exhibits antinociceptive activity in a model of neuropathic pain induced by paclitaxel. The activity of RI75 is probably associated with the activation of cannabinoidergic, opioidergic and serotonergic mechanisms and the reduction of pro-inflammatory cytokines, as well as neuroprotective and antioxidant activities.

**Keywords:** RI75; curcumin; curcumin analogues; neuropathic pain; paclitaxel; cytokines.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|---|---|
| °C | Grau Celsius |
| % | Porcentagem |
| AIE | Anti-inflamatório esteroide |
| AINE | Anti-inflamatório não esteroide |
| ALT | Alanina aminotransferase |
| ASC | Área sob a curva |
| AST | Aspartato aminotransferase |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| CFA | Adjuvante completo de Freund |
| Cm | Centímetros |
| CMC | Carboximetilcelulose |
| COX | Ciclo-oxigenase |
| DNIQ | Dor neuropática induzida por quimioterápicos |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picrilhidrazil |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| GRD | Gânglios da raiz dorsal |
| ELISA | Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay |
| EROS | Espécies reativas de oxigênio |
| et al. | e outros |
| FAFAR | Faculdade de Farmácia |
| g | Gramas |
| h | Hora |
| i.p. | Intraperitoneal |
| IASP | International Association for the Study of Pain |
| IL | Interleucina |
| KATP | Canais para potássio ATP-dependentes |
| Kg | Quilograma |
| LPS | Lipopolissacarídeo |

| | |
|---|---|
| M | Molar |
| mg | Miligrama |
| min | Minuto |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| MMP | Metaloproteinases |
| n | Número de animais experimentais |
| N | Newton |
| nm | Nanômetro |
| NF-κB | Fator nuclear kappa B |
| Nrf2 | Fator nuclear eritroide 2 |
| NO | Óxido nítrico |
| P | Probabilidade de significância |
| *p.o.* | *per os* |
| PG | Prostaglandina |
| s | Segundo |
| SFB | Soro fetal bovino |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SNRI | Inibidores da recaptação da serotonina-noradrenalina |
| SRB | Sulforodamina B |
| TNF | Fator de necrose tumoral |
| TRP | Receptor de potencial transitório |
| TRPV1 | Receptor vaniloide de potencial transitório tipo 1 |
| UFMG | Universidade Federal de Minas Gerais |
| v | Volume |
| µg | Micrograma |
| µL | Microlitro |

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Dor nociceptiva. ..... 18
Figura 2 Dor inflamatória. ..... 19
Figura 3 Dor disfuncional ..... 20
Figura 4 Dor neuropática. ..... 21
Figura 5 Representação dos locais de ação de alguns agentes quimioterápicos no sistema nervoso periférico. ..... 22
Figura 6 Estrutura química do paclitaxel ..... 23
Figura 7 Microscopia de transmissão do nervo isquiático de camundongos ..... 24
Figura 8 Imagens de microscopia de transmissão mostrando o processo de vacuolização (mitocôndrias atípicas) como consequência do tratamento com paclitaxel. ..... 25
Figura 9 Estrutura química da curcumina. ..... 29
Figura 10 Exemplos de análogos da curcumina utilizados em modelos de inflamação. ..... 32
Figura 11 Derivados tiazólicos ..... **Erro! Indicador não definido.**
Figura 12 Estrutura química do RI75 ..... 33
Figura 13 Efeitos induzidos por RI75, curcumina, pregabalina ou veículo sobre a alodínia mecânica induzida por paclitaxel. ..... 34
Figura 14 Escala temporal da padronização do modelo de dor neuropática induzida por paclitaxel. ..... 41
Figura 15 Escala temporal da avaliação do efeito induzido pelo RI75 sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel. ..... 42
Figura 16 Determinação da massa corporal em função do tempo. ..... 43
Figura 17 Escala temporal da avaliação dos efeitos induzidos pelo RI75, após tratamento prévio com AM251 naltrexona, ciproheptadina ou glibenclamida, sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel. ..... 44
Figura 18 Escala temporal da avaliação do efeito induzido pelo RI75 sobre a concentração de mediadores inflamatórios. ..... 45
Figura 19 Escala temporal da avaliação da citotoxicidade em RAW 264.7 ..... 47
Figura 20 Reação química da redução do DPPH ..... 48
Figura 21 Efeitos induzidos por administrações repetidas de paclitaxel ou veículo sobre o limiar nociceptivo. ..... 51

Figura 22 Efeitos induzidos por RI75, curcumina, pregabalina ou veículo sobre a alodínia mecânica induzida por paclitaxel ..... 53
Figura 23 Efeito induzido pelo RI75 sobre a massa corporal dos animais. ..... 55
Figura 24 Efeito induzido pelo AM251 sobre a atividade antialodínica do RI75 ..... 57
Figura 25 Efeito induzido pela naltrexona sobre a atividade antialodínica do RI75.. 59
Figura 26 Efeito induzido pela ciproheptadina sobre a atividade antialodínica do RI75. ..... 61
Figura 27 Efeito induzido pela glibenclamida sobre a atividade antialodínica do RI75..... 63
Figura 28 Efeitos induzidos por administração única de RI75, curcumina ou veículo sobre as concentrações de CXCL-1 e TNF-α no nervo isquiático, GRD e tálamo em animais sensibilizados com paclitaxel ..... 65
Figura 29 Efeitos induzidos por RI75, curcumina ou veículo sobre as alterações do nervo isquiático induzidas pelo paclitaxel..... 66
Figura 30 Alterações histológicas do nervo isquiático induzidas pelo paclitaxel em animais que receberam administração única de veículo, curcumina ou RI75 ..... 67
Figura 31 Efeitos induzidos por RI75, dexametasona ou veículo sobre as concentrações de TNF-α e IL-1β em células RAW 264.7 estimuladas com LPS..... 69
Figura 32 Dispersão Probit em função da concentração de RI75 ..... 71
Figura 33 Efeito induzido por administração única do RI75 sobre a variação da massa corporal ao longo de 14 dias. ..... 72
Figura 34 Efeito induzido pelo RI75 sobre parâmetros bioquímicos usados para avaliação da toxicidade renal e hepática aguda..... 73
Figura 35 Curva analítica das análises da atividade antioxidante de RI75 e curcumina..... 74
Figura 36 Cromatograma em CLAE do RI75 e curcumina e seus respectivos espectros de absorção..... 75

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO....16
2 REVISÃO DE LITERATURA....17
2.1 Dor....17
2.1.1. Dor nociceptiva....17
2.1.2 Dor inflamatória....18
2.1.3 Dor disfuncional....19
2.1.4 Dor neuropática....20
2.1.5 Dor neuropática induzida por paclitaxel....23
2.2 Manejo da dor neuropática....25
2.2.1 Primeira linha de tratamento....26
2.2.2 Segunda linha de tratamento....27
2.2.3 Terceira linha de tratamento....27
2.2.4 Quarta linha de tratamento....28
2.2.5 Quinta linha de tratamento....28
2.2.6 Sexta linha de tratamento....28
2.3 Curcumina e seus análogos....28
2.4 Derivados tiazólicos....32
3 JUSTIFICATIVA....35
4 OBJETIVO....35
4.1 Objetivos específicos....35
5 MATERIAIS E MÉTODOS....36
5.1 Animais....36

5.2 Drogas, fármacos e reagentes .....36

5.3 Preparo das soluções e suspensões, vias de administração e doses utilizadas 38

5.3.1 RI75, curcumina, dexametasona e pregabalina .....38

5.3.2 Preparo das soluções de naltrexona e ciproheptadina .....38

5.3.3 Preparo da emulsão de AM251 .....39

5.3.4 Preparo da suspensão de glibenclamida .....39

5.3.5 Preparo da suspensão de paclitaxel .....39

5.3.6 Preparo do meio de cultura DMEM .....39

5.3.7 Preparo da solução de LPS .....40

5.4 Avaliação da alodínia mecânica .....40

5.5 Modelo experimental de dor neuropática induzida pelo paclitaxel .....40

5.6 Avaliação dos efeitos induzidos pelo RI75 no modelo de dor neuropática induzida pelo paclitaxel .....41

5.7 Avaliação da variação da massa corporal .....42

5.8 Avaliação dos efeitos induzidos por AM251, naltrexona, ciproheptadina e glibenclamida sobre a atividade do RI75 no modelo experimental de dor neuropática induzida pelo paclitaxel .....43

5.9 Quantificação de citocinas inflamatórias .....44

5.10 Avaliação dos efeitos induzidos pelo RI75 sobre as alterações histológicas do nervo isquiático induzidas pelo paclitaxel .....45

5.11 Avaliação da citotoxicidade e quantificação de citocinas inflamatórias *in vitro*..... .....45

5.12 Toxicidade do RI75 em invertebrado .....47

5.13 Toxicidade aguda do RI75 em camundongos .....47

5.14 Avaliação da atividade antioxidante do RI75.....48

5.15 Análise em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE-DAD).....49

5.16 Análise Estatística.....49

6 RESULTADOS .....50

6.1 Efeito induzido pelo RI75 sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel..... .....50

6.2 Efeito induzido pelo RI75 sobre a massa corporal .....54

6.3 Efeitos induzidos por AM251, naltrexona, ciproheptadina ou glibenclamida sobre a atividade antialodínica do RI75 .....56

6.4 Efeito induzido pelo RI75 sobre a produção de CXCL-1 e TNF-α induzida por paclitaxel .....64

6.5 Efeito do RI75 sobre as alterações histológicas do nervo isquiático induzidas pelo paclitaxel .....65

6.6 Efeitos do RI75 sobre a viabilidade celular e a produção de TNF-α e IL-1β *in vitro*..... .....67

6.7 Toxicidade induzida pelo RI75 em invertebrados.....70

6.8 Toxicidade aguda do RI75 em camundongos .....71

6.9 Atividade antioxidante do RI75.....74

6.10 Perfil cromatográfico preliminar do RI75 .....74

7 DISCUSSÃO.....76

8 CONCLUSÃO.....87

Referências bibliográficas .....88

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo relatório das Nações Unidas (2023), atualmente, a população mundial passa pelo fenômeno global de envelhecimento. Entre os fatores associados a esse fenômeno estão o aumento da expectativa de vida e o acentuado declínio da taxa de fecundidade, os quais contribuem para o aumento do número relativo de idosos na população. Tais fatores são reflexos da promoção à saúde pública e de avanços nas áreas médica, econômica e sociais. De acordo com o último censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, divulgado em 2022, desde 2000 a taxa de fecundidade do país recuou de 2,32 para 1,57 filho por mulher. O estudo demográfico constatou que a população com 60 anos ou mais, chegou a mais de 32 milhões, o que representa 15,6% da população brasileira, um aumento de 56% em relação a 2010. O aumento da população com 65 anos ou mais, combinado com a diminuição da proporção de pessoas com até 14 anos, que foi reduzida de 24,1% para 19,8% no mesmo período, destaca-se o acentuado envelhecimento da população brasileira. A Organização Mundial da Saúde (2022) estima que até 2050, a população mundial de pessoas com 60 anos ou mais dobrará e o número de pessoas com 80 anos ou mais triplicará entre 2020 e 2050 para atingir 426 milhões. Com o aumento da idade, elevam-se as chances do indivíduo desenvolver doenças predispostas em seu perfil genético e associadas ao estilo de vida (GOLDENBERG, 2008). A maior incidência de diabetes *mellitus* e a melhora da sobrevida ao câncer, associadas ao envelhecimento populacional, culminam em mais processos neuropáticos (COLLOCA et al., 2017). Segundo a International *Association for the Study of Pain* (IASP), a dor crônica afeta cerca de 20% da população mundial. No Brasil, a prevalência de dor crônica relacionada a processos neuropáticos entre pacientes que buscam auxílio médico é de 14,5% (UDALL et al., 2019). Uma recente revisão sistemática apresentou dados alarmantes em relação à dor crônica no Brasil, com estimativas de prevalência de 35,7 e 47,3% nas populações adulta e idosa, respectivamente. Ainda, a condição álgica manifesta-se principalmente com intensidade moderada ou grave e com elevado índice de incapacidade e, em geral, é mal controlada (SANTIAGO et al., 2023).

# 2 REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 Dor

A dor é um fenômeno complexo que envolve tanto eventos neurofisiológicos quanto a experiência de sofrimento, que mobiliza o instinto humano de cuidado. A definição da dor foi recentemente modificada pela IASP, para indicar "uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou semelhante à associada a um dano tecidual real ou potencial". Segundo a associação, além de uma experiência individual, a dor é influenciada em diferentes graus por fatores biológicos, psicológicos e sociais. Esse novo conceito passa a validar a incapacidade de comunicação, haja visto que mesmo sem a descrição verbal, seres humanos ou animais sentem dor.

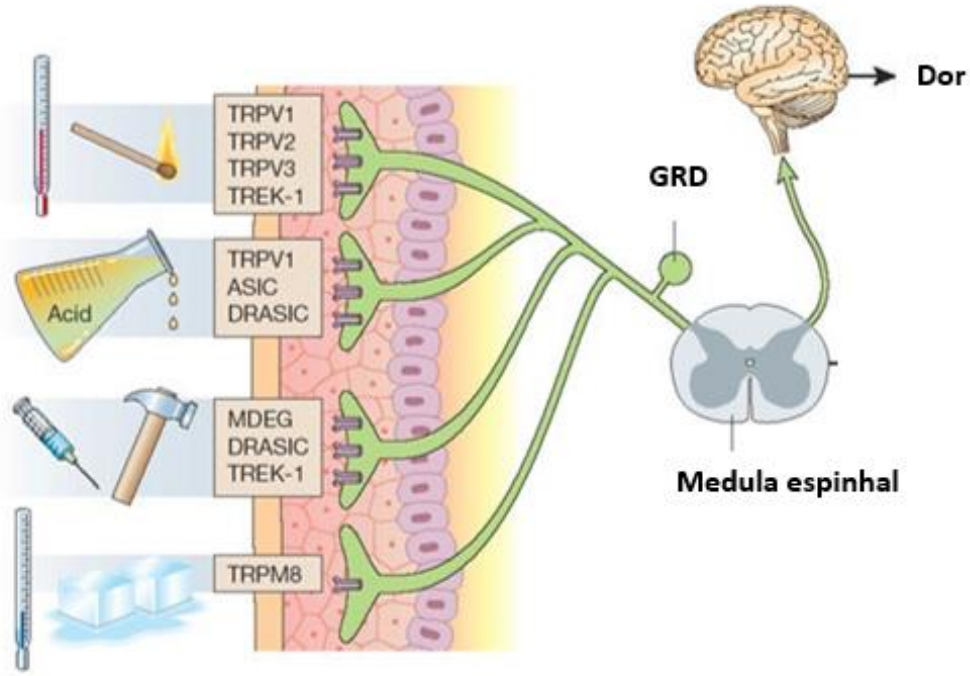
A dor é o sintoma que mais frequentemente leva pacientes a procurar atendimento médico, podendo ser classificada de acordo com sua localização, duração ou intensidade (ORR; SHANK; BLACK, 2017). Woolf (2004; 2010) propôs uma categorização, baseada nos estímulos e mecanismos neuroquímicos envolvidos, que consiste em dor nociceptiva, dor inflamatória, dor disfuncional e dor neuropática.

### 2.1.1. Dor nociceptiva

A dor nociceptiva indica a presença de um estímulo prejudicial e ocorre quando há ativação dos nociceptores (FORNASARI, 2012). Estímulos nocivos, podendo esses serem de natureza química, térmica ou mecânica, ativam os nociceptores. Esses se apresentam como terminações nervosas livres do tipo Aδ e C, sendo classificadas de acordo com seu diâmetro e grau de mielinização. As fibras aferentes do tipo Aδ apresentam velocidade de condução rápida e respondem a estímulos mecânicos e térmicos. As fibras aferentes do tipo C (polimodais) apresentam velocidade de condução lenta e respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos. Os canais do receptor de potencial transitório (TRP) são proteínas de membranas expressas nos nociceptores que, mediante a ativação por estímulos nocivos, se abrem e despolarizam a membrana, gerando potenciais de ação que são propagados de diferentes tecidos para o corno dorsal da medula espinhal ou tronco cerebral (Figura 1). A informação, então, é retransmitida, direta ou indiretamente, para níveis centrais mais elevados,

como o tálamo e córtex cerebral, onde a sensação dolorosa é percebida (DAI, 2016; WOOLF, 2004).

Figura 1- Dor nociceptiva




Fonte: Adaptado de SCHOLZ e WOOLF( 2002).

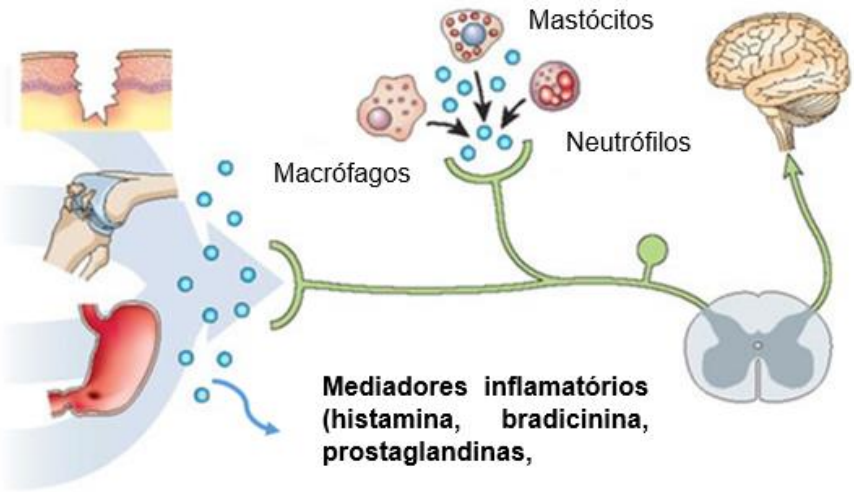
A dor nociceptiva é um sistema de alarme que anuncia a presença de um estímulo potencialmente prejudicial. Essa categoria de dor deve ser controlada apenas em situações clínicas específicas, tais como cirurgias, procedimentos invasivos ou traumas. É importante que a dor nociceptiva não seja suprimida de forma permanente, pois a perda de sua função protetora, inevitavelmente, leva a danos teciduais, incluindo auto-mutilação e úlceras de pressão (WOOLF, 2004).

### 2.1.2 Dor inflamatória

Na presença de traumas, infecções, alérgenos e outras anormalidades, a homeostase é perdida, levando à ocorrência do processo inflamatório como tentativa de restabelecer a normalidade tissular. A reação inflamatória é reconhecida pelos sinais e

sintomas cardinais, como calor, rubor, dor, tumor e perda de função (NATHAN; DING, 2010). Em um processo inflamatório, os nociceptores são ativados por estímulos de menor intensidade e a dor produzida pode ser mais persistente e diferir em qualidade (WOOLF; SALTER, 2000). Assim como a dor nociceptiva, a dor inflamatória aguda é considerada adaptativa, pois contribui para a sobrevivência e proteção do organismo (WOOLF, 2004). A dor inflamatória, categoria mais comum de dor, faz com que um elevado número de pacientes procure auxílio médico. A lesão tecidual estimula células presentes no tecido lesionado ou que migram para o local a liberarem mediadores inflamatórios como, citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (EROS), proteínas cinases e outros fatores. Esses mediadores têm papel importante na indução do edema, sensibilização dos nociceptores e consequente diminuição do limiar nociceptivo e aumento da reatividade neuronal (Figura 2; DAI, 2016; GROSSER et al., 2012).

Figura 2 - Dor inflamatória



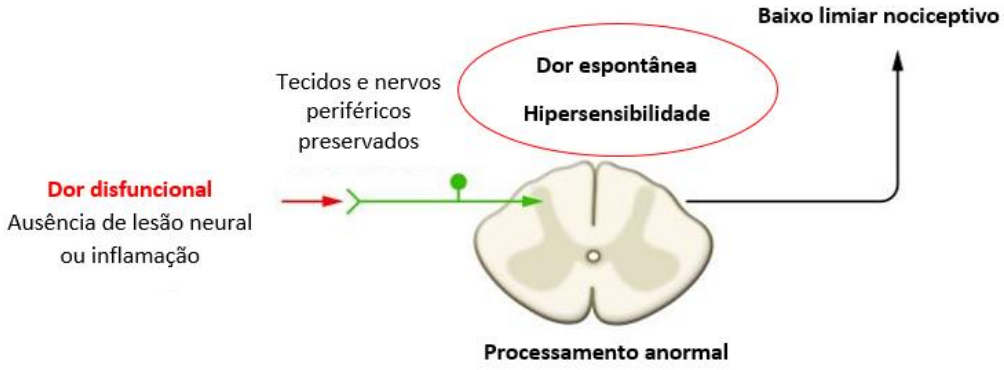

Fonte: Adaptado de SCHOLZ & WOOLF (2002).

### 2.1.3 Dor disfuncional

A dor disfuncional é uma categoria de dor sem função adaptativa e resultante de uma atividade anormal do sistema nervoso. Pacientes com essa categoria de dor não apresentam déficit neurológico ou anormalidade periférica, entretanto uma resposta ou

função anormal do sistema nervoso é deflagrada, desencadeando uma sensibilização elevada dos nociceptores (Figura 3). Condições clínicas como fibromialgia, síndrome do intestino irritável, cistite intersticial e enxaqueca são alguns exemplos de dor disfuncional. Nessas condições, o ponto convergente é a presença de dor pronunciada, mas sem algum estímulo nocivo ou processo inflamatório. A prevalência dessa categoria de dor é razoavelmente alta, sendo de 2-8% para fibromialgia, 7-21% para síndrome do intestino irritável e 0,05-0,5% para a cistite intersticial. A dor disfuncional tem emergido como um problema preocupante do ponto de vista terapêutico e econômico, uma vez que a dor exacerbada compromete o desempenho geral e a qualidade de vida, o que reflete em incapacidade e desemprego (NAGAKURA, 2015; WOOLF, 2004, 2010).

Figura 3 - Dor disfuncional

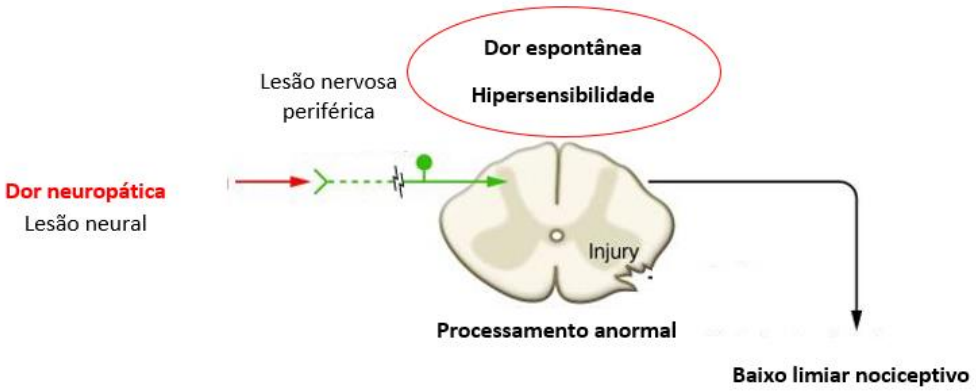



Fonte: Adaptado de WOOLF (2010).

### 2.1.4 Dor neuropática

A dor neuropática é definida como a dor que surge como uma consequência direta de uma lesão ou doença que afeta o sistema nervoso somatossensorial. A dor neuropática não possui caráter adaptativo, sendo iniciada ou causada por uma lesão primária ou disfunção do sistema nervoso resultantes de trauma, infecção, isquemia, câncer ou outras causas, como a quimioterapia (Figura 4; FORNASARI, 2012).

Figura 4 - Dor neuropática



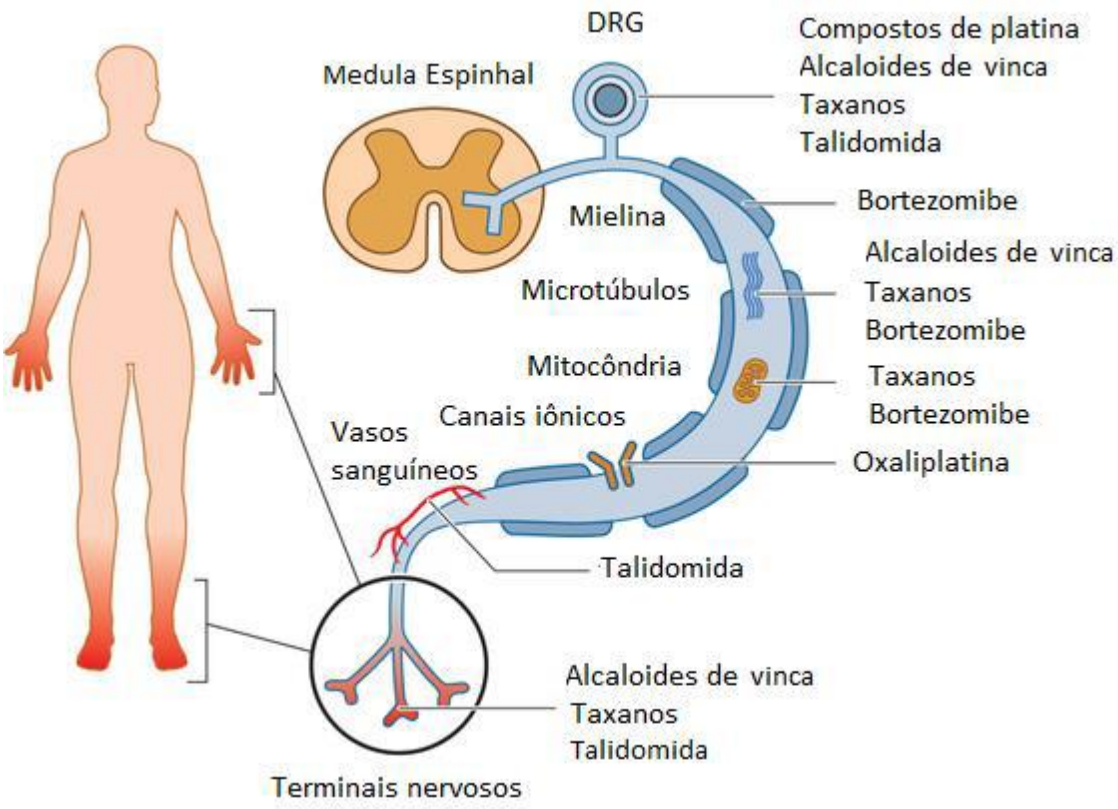

Fonte: Adaptado de WOOLF (2010).

Lesões ou doenças somatossensoriais podem levar a alterações dos neurônios sensoriais, modificando a função de canais TRP e, consequentemente, desordem na transmissão de sinais sensoriais na medula espinhal e no cérebro, que resulta em hiperexcitabilidade neuronal (COLLOCA et al., 2017). Cerca de 7 a 10% da população geral é acometida por dor neuropática, sendo mais prevalente entre mulheres e idosos (COLLOCA et al., 2017; WRIGHT; RIZZOLO, 2017). A dor neuropática de origem central é resultante principalmente de acidente vascular cerebral e doenças neurodegenerativas e é menos observada na prática clínica (COLLOCA et al., 2017; SMITH et al., 2013; WRIGHT; RIZZOLO, 2017). A dor neuropática também pode ter origem periférica, como na neuralgia diabética, neuralgia do trigêmeo, neuralgia pós-herpética e neuralgia induzida por quimioterápico (WRIGHT; RIZZOLO, 2017). A dor neuropatica periférica é a mais comum na prática clínica, devido às altas taxas de envelhecimento da população global, ao aumento de doenças crônicas e ao tratamento oncológico, situações que afetam as fibras sensoriais (COLLOCA et al., 2017).

Os sintomas da dor neuropática podem ser divididos em positivos e negativos. Os sintomas positivos refletem a hiperatividade do sistema nervoso e incluem ardor, pontada, aperto, parestesias ou sensações semelhantes a choques elétricos (WRIGHT; RIZZOLO, 2017). Esses sintomas estão associados à alodínia, que é a dor decorrente do contato com um estímulo inócuo, ou à hiperalgesia, que é a dor exacerbada resultante do contato com um estímulo originalmente nocivo (IASP, 2024). Os sintomas negativos

refletem a perda da função do sistema nervoso, logo não são dolorosos e são caracterizados por fraqueza muscular, perda de reflexos tendinosos profundos e sensação ausente ou prejudicada à luz, toque, picada, vibração e temperatura (COLLOCA et al., 2017; WRIGHT & RIZZOLO, 2017). Comumente, pacientes com dor neuropática apresentam quadros concomitantes de ansiedade e depressão, o que diminui ainda mais a qualidade de vida (COLLOCA et al., 2017). A dor neuropática induzida por quimioterápicos (DNIQ) é uma reação adversa grave que pode acometer até 80% de pacientes tratados com antineoplásicos e é a principal razão da interrupção do tratamento, visto que, frequentemente, seus sintomas são incapacitantes e diminuem a qualidade de vida (CAROZZI; CANTA; CHIORAZZI, 2015; SISIGNANO et al., 2014). Os quimioterápicos mais comuns para o desenvolvimento da DNIQ são paclitaxel, oxaliplatina, cisplatina, bortezomibe e vincristina (Figura 5; COLVIN, 2019).

Figura 5 - Representação dos locais de ação de alguns agentes quimioterápicos no sistema nervoso periférico

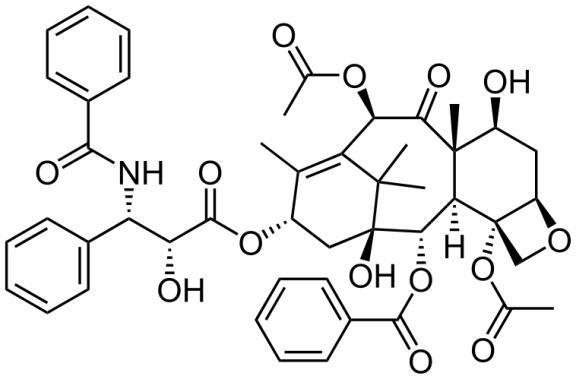



Fonte: Adaptado de PARK et al. (2013).

### 2.1.5 Dor neuropática induzida por paclitaxel

O paclitaxel (Figura 6) é um antineoplásico extraído da planta *Taxus brevifolia* e utilizado no manejo de tumores sólidos como câncer de mama, ovário e pulmão (MARUPUDI et al., 2007). O paclitaxel se liga aos microtúbulos, impedindo a divisão celular e, consequentemente, leva à morte celular (CAROZZI; CANTA; CHIORAZZI, 2015).

Figura 6 - Estrutura química do paclitaxel

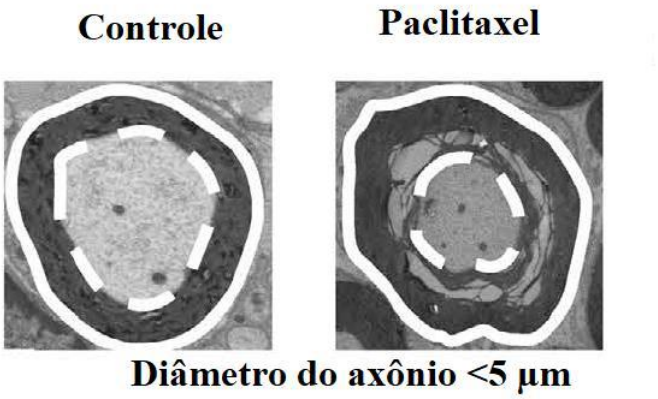



Fonte: Wikipedia

No entanto, o uso desse antineoplásico está associado ao desenvolvimento da DNIQ, observada em mais da metade dos pacientes em uso dessa terapia (NYROP et al., 2019). Os sintomas mais comuns incluem dor, formigamento, dormência e sensibilidade ao frio. Esse sintomas são observados, principalmente, nas mãos e pés, por uma distribuição conhecida como “luva e meia” (STAFF et al., 2020), e estão relacionados com a degeneração de axônios distais (ARGYRIOU et al., 2008). A neurotoxicidade é uma das principais reações adversas associadas ao uso do paclitaxel e acomete, principalmente, os neurônios dos gânglios da raiz dorsal (GRD). Esse processo é atribuído à interrupção da função dos microtúbulos neurais, gerando alteração no transporte axonal e, consequentemente, alteração da excitabilidade e sobrevivência dos neurônios sensoriais (JAGGI; SINGH, 2012). O paclitaxel é capaz de induzir degeneração axonal e desmielinização dos nervos isquiáticos (Figura 7), bem como alterar a estrutura e a permeabilidade de mitocôndrias presentes nas fibras nociceptivas de camundongos (Figura 8; CHEN et al., 2017). Isso acontece em decorrência da abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial,

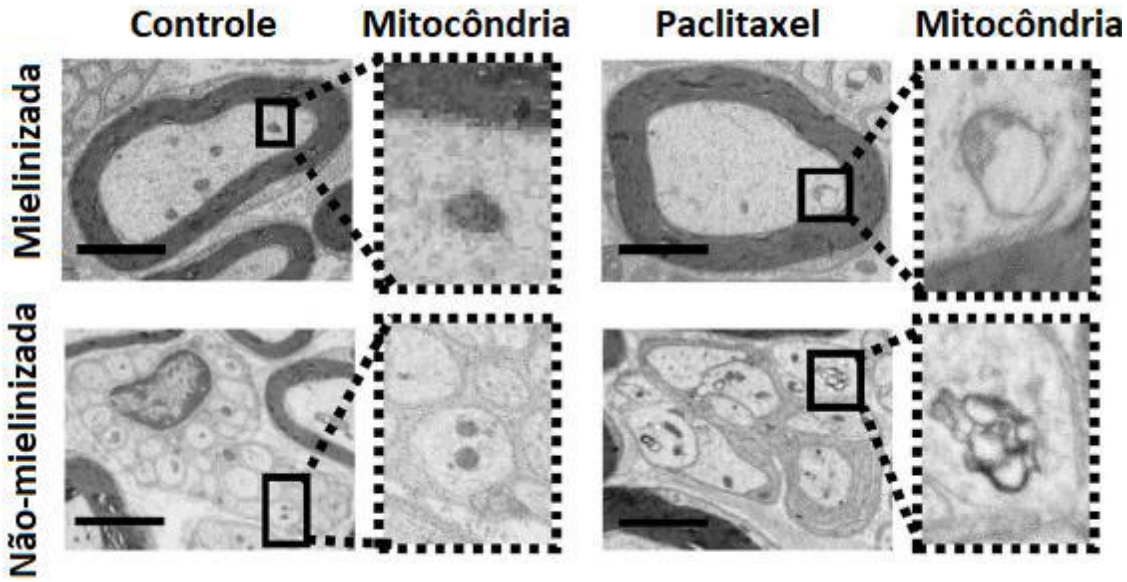
ocasionando perda do potencial de membrana da mitocôndria. Consequentemente, aumenta-se a produção de EROS e a liberação de $Ca^{2+}$ e reduzem-se as concentrações de trifosfato de adenosina (ATP). Ocorre, então, um fenômeno descrito como vacuolização da mitocôndria, seguido da perda da funcionalidade mitocondrial em axônios de neurônios sensoriais. Como as mitocôndrias são responsáveis pela regulação intracelular de $Ca^{2+}$, a alteração da sua permeabilidade é, então, responsável pelo aumento da propagação de sinais de $Ca^{2+}$ e aumento da excitabilidade das fibras nociceptivas. A mitotoxicidade é a causa primária da dor neuropática induzida pelo paclitaxel (CAROZZI; CANTA; CHIORAZZI, 2015; SISIGNANO et al., 2014).

Figura 7 Microscopia de transmissão do nervo isquiático de camundongos, mostrando a degeneração axonal causada pelo tratamento com paclitaxel. A linha tracejada branca mostra o axônio e o círculo branco mostra a circunferência da mielina.




Fonte: Adaptado de CHEN et al. (2017)

Figura 8 - Imagens de microscopia de transmissão mostrando o processo de vacuolização (mitocôndrias atípicas) como consequência do tratamento com paclitaxel.




Fonte: Adaptado de CHEN et al. (2017).

O aumento da produção de EROS via danos mitocondriais pode sensibilizar os transdutores do tipo TRP, como TRPA1 e TRPM8, aumentando a sensibilidade a estímulos diversos (BOYETTE-DAVIS; WALTERS; DOUGHERTY, 2015; SISIGNANO et al., 2014). Ademais, o paclitaxel causa um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF)-α, interleucina (IL)-6 e IL-1β e uma diminuição da produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10. Esse processo leva à atração e ativação de células imunes, ao desenvolvimento de neuroinflamação e à alodínia mecânica (SISIGNANO et al., 2014; ZAJĄCZKOWSKA et al., 2019).

## 2.2 Manejo da dor neuropática

Em geral, o manejo da dor neuropática baseia-se apenas no alívio da dor. O desenvolvimento de novos tratamentos é dificultado pela limitação de modelos pré-clínicos, diversidade de condições fisiopatológicas e etiológicas que culminam no processo neuropático, predisposição genética e diferenças étnicas encontrados na clínica (ALLES; SMITH, 2018). Ainda, o diagnóstico é dificultado devido à subjetividade

dos sinais e sintomas. Até o momento, não há medicamentos aprovados para prevenção ou alívio da DNIQ em grandes ensaios clínicos randomizados e controlados por placebo (CHEN et al., 2017). Em geral, pacientes com dor neuropática não são responsivos a analgésicos não opioides, anti-inflamatórios esteroides ou analgésicos opioides (COLLOCA et al., 2017). Um relatório recente recategorizou as linhas de tratamento visando ao alívio da dor neuropática, baseadas em diretrizes internacionais e recomendações médicas. Abordagem multidisciplinar e tratamentos não farmacológicos devem ser adotados como medidas complementares, pois induzem resultados satisfatórios na prática clínica (BATES et al., 2019).

### 2.2.1 Primeira linha de tratamento

Os antidepressivos e anticonvulsivantes são o grupo de fármacos para os quais há evidências mais fortes de sua eficácia no manejo da dor neuropática. Entre os antidepressivos mais indicados estão os antidepressivos tricíclicos, como a amitriptilina e nortriptilina, e os inibidores da recaptação da serotonina-noradrenalina (SNRI), como a duloxetina e a venlafaxina (COLLOCA et al., 2017; MURNION, 2018). O emprego desses fármacos para o alívio da dor baseia-se, principalmente, na ação sobre os controles inibitórios descendentes (vias noradrenérgica e serotoninérgica) por meio do aumento da disponibilidade de noradrenalina e/ou serotonina (COLLOCA et al., 2017; GILRON; BARON; JENSEN, 2015; ZILLIOX, 2017). O uso de antidepressivos tricíclicos é indicado principalmente no manejo da dor neuropática associada ao diabetes, quimioterápicos e herpes zoster. As reações adversas mais observadas são a sonolência e eventos anticolinérgicos, que incluem boca seca, visão turva, constipação, retenção urinária e hipotensão postural (COLLOCA et al., 2017; ZILLIOX, 2017). Os SNRI são indicados, principalmente, para o manejo da DNIQ e dor neuropática associada ao diabetes e podem ocasionar náusea, constipação, dor abdominal e sudorese (ZILLIOX, 2017). Os anticonvulsivantes indicados para manejo de dor neuropática são gabapentina e pregabalina. Esses fármacos modulam os canais para $Ca^{2+}$ dependentes de voltagem, diminuindo a liberação de neurotransmissores excitatórios. Em geral, são bem tolerados e induzem poucas reações adversas, como sedação e vertigem (ZILLIOX, 2017). As reações adversas induzidas por antidepressivos ou anticonvulsivantes são pronunciadas, principalmente, em idosos, que

representam a população mais vulnerável à dor neuropática e, comumente, estão expostos à polifarmárcia. Dessa forma, o tratamento tópico com lidocaína é encorajado. A lidocaína, ao inibir canais para $Na^+$ sensíveis à voltagem, atenua as descargas neuronais ectópicas. Apesar de apresentar um alto custo e exibir evidência clinica moderada, os adesivos de lidocaína possuem um bom perfil de segurança em idosos, sendo recomendados principalmente para processos neuropáticos periféricos, como a neuropatia pós-herpética (BATES et al., 2019; COLLOCA et al., 2017; MURNION, 2018).

### 2.2.2 Segunda linha de tratamento

Quando a monoterapia não promove a analgesia esperada, combinações farmacoterapêuticas devem ser consideradas como segunda linha de tratamento. O uso de tramadol associado a uma opção farmacêutica da primeira linha de tratamento é encorajado mediante minuciosa avaliação do risco-benefício ao paciente (BATES et al., 2019). A associação de gabapentina e analgésico opioide induz um efeito de maior magnitude quando comparado àquele induzido pelo anticonvulsivante em monoterapia (CHAPARRO et al., 2013). O tramadol atua como agonista opioidérgico central e como inibidor da recaptação da norepinefrina e da serotonina. A prescrição desse fármaco deve ser evitada para pacientes com histórico de abuso de substância ou para idosos em uso de antidepressivos (COLLOCA et al., 2017; ZILLIOX, 2017).

### 2.2.3 Terceira linha de tratamento

Para pacientes refratários que não obtiveram êxito com a primeira ou segunda de linha, recomendam-se práticas intervencionistas como injeções epidurais, bloqueio simpático, adesiólise, radiofrequência pulsada ou, ainda, desnervação por radiofrequência. Outro tipo de fármaco tópico, como o adesivo de capsaicina 8%, pode ser indicado para dor neuropática focal. A capsaicina ativa canais catiônicos TRPV1 em fibras nociceptivas, levando à dessensibilização e desfuncionalização do receptor. O uso de adesivos ou formulações cremosas à base de capsaicina está associado ao aparecimento de erupções cutâneas, eritema, prurido e desconforto local (BATES et al., 2019; COLLOCA et al., 2017).

### 2.2.4 Quarta linha de tratamento

Relatórios internacionais recomendam a neuroestimulação como quarta estratégia terapêutica (BATES et al., 2019). Apesar dessa intervenção apresentar evidências fracas, sua aplicação induz melhores efeitos quando comparados aqueles induzidos pelas terapias convencionais (LAMER et al., 2019). Uma das técnicas mais comuns de neuroestimulação consiste na implantação de um dispositivo gerador de impulsos elétricos e um eletrodo, no espaço peridural, que estimula eletricamente as fibras nervosas da medula espinhal, levando a uma leve sensação de parestesia (LAMER; DEER; HAYEK, 2016).

### 2.2.5 Quinta linha de tratamento

Antes considerados terceira linha de tratamento, os analgésicos opioides vêm sendo empregados como últimas alternativas farmacoterapêuticas para o alívio da dor neuropática. Vale ressaltar que, antes de iniciar o tratamento com analgésicos opioides, é necessário que o paciente seja submetido a uma técnica de neuroestimulação. O baixo perfil de segurança e poucos dados a longo prazo desencorajam o uso dessa classe de fármacos (BATES et al., 2019; GILRON; BARON; JENSEN, 2015).

### 2.2.6 Sexta linha de tratamento

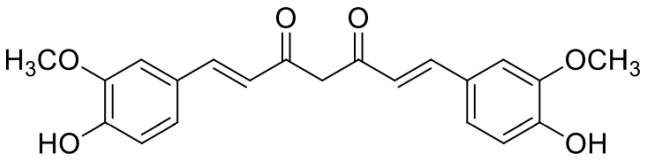
A liberação vetorizada de fármacos analgésicos como morfina e ziconotida, apesar de fornecer uma evidência inconclusiva, compõe mais uma opção para o manejo da dor neuropática refratária. A administração intratecal impede o efeito de primeira passagem e permite que o fármaco ultrapasse a barreira hematoencefálica, o que possibilita diminuir a dose do fármaco. Pacientes com dores neuropáticas localizadas são responsivos ao tratamento (BATES et al., 2019).

## 2.3 Curcumina e seus análogos

A curcumina é o componente majoritário do rizoma da cúrcuma (*Curcuma longa*), também conhecida como açafrão da Índia. A curcumina é um composto amarelo e é formada por dois anéis fenólicos unidos por uma dicetona insaturada (Figura 9). A cúrcuma é amplamente empregada na medicina tradicional e propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral, cicatrizante, antioxidante e neuroprotetoras,

entre outras, têm sido descritas (AGGARWAL; HARIKUMAR, 2009; GUPTA et al., 2012; SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

Figura 9 - Estrutura química da curcumina.




Fonte: Wikipédia

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram a atividade anti-inflamatória da curcumina. Em macrófagos murinos estimulados por lipopolissacarideo (LPS), a curcumina inibiu a expressão de mRNA para IL1-β, IL-6, TNF-α e ciclooxigenase (COX)-2 (CHEN et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2013). A curcumina, administrada por via intravenosa em ratos, reduziu a expressão gênica da enzima óxido nítrico (NO) sintase induzida e da produção de TNF-α e IL-6 estimuladas por LPS (BOYANAPALLI et al., 2018). Em modelo experimental de artrite reumatoide induzida por colágeno, a administração *per os* (*p.o.*) de curcumina, durante três semanas após a indução da artrite, diminuiu o edema de pata, o infiltrado inflamatório, a hiperplasia sinovial e a produção de IL-1β, TNF-α e das metaloproteinases MMP-1 e MMP-3 (DAI et al., 2018). Em camundongos, a administração intraperitoneal (i.p.) de curcumina, reduziu o edema de pata induzido por carragenina (JURENKA, 2009).

Além do efeito anti-inflamatório, a curcumina induz efeito em modelos experimentais de dor neuropática. Em um modelo experimental de dor neuropática induzida por vincristina, a administração repetida de curcumina diminuiu a hiperalgesia e a alodínia térmicas, com redução do estresse oxidativo e concentração de $Ca^{2+}$ (BABU; PRASANTH; BALAJI, 2015). A administração diária de curcumina reduziu a alodínia mecânica e ao frio em camundongos submetidos a secção nervosa, sendo que esses resultados foram relacionados com a redução das concentrações de IL-1β decorrente da inibição da sinalização JAK2-STAT3 (LIU et al., 2016). No modelo de constrição crônica, a atividade antinociceptiva induzida pela curcumina foi associada à regulação negativa da expressão gênica do fator neurotrófico derivado do cérebro e da COX-2,

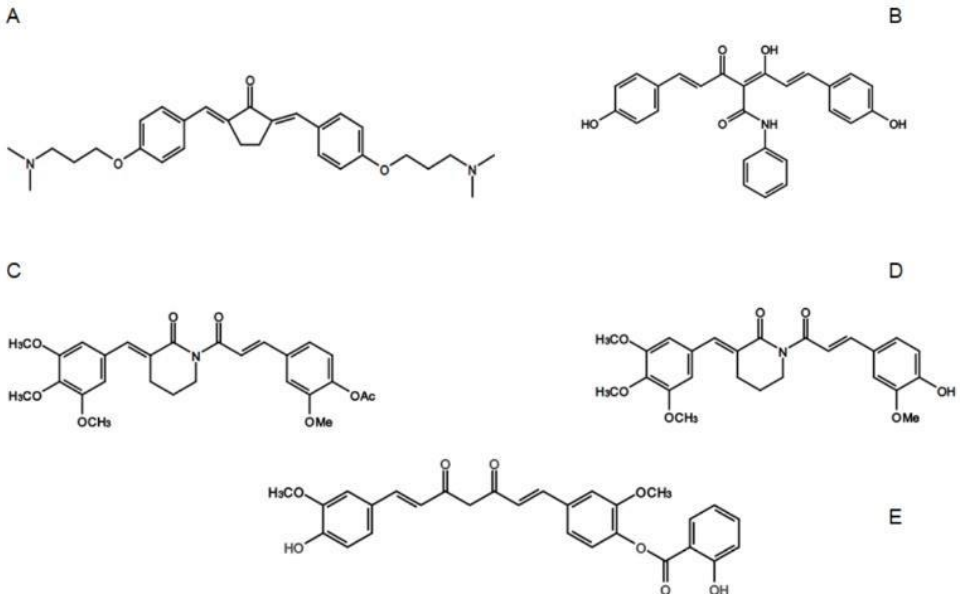
consideradas moléculas pró-nociceptivas (ZHU et al., 2014). Ainda, a curcumina reduziu a dor neuropática induzida por álcool (KANDHARE et al., 2012) e estreptozotocina (SHARMA et al., 2006). Foi comprovado que a curcumina inibe fatores de transcrição nuclear, como NF-κB e AP-1, suprimindo a produção de citocinas e quimiocinas envolvidas na resposta inflamatória, tais como TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-17, IL-23 e MCP-1 (AGGARWAL; HARIKUMAR, 2009; GAO et al., 2022; KARIMIAN et al., 2017; PRASAD; TYAGI; AGGARWAL, 2014; SUETH-SANTIAGO et al., 2015). Atividades neuroprotetoras são atribuídas à curcumina em modelos de doenças neurodegenerativas (ABRAHAMS et al., 2019; ZBARSKY et al., 2005). Tais atividades comumente estão associadas ao efeito antioxidante induzido por esse polifenol, que é capaz de capturar radicais livres e EROS, atuando contra o estresse oxidativo (ANAND et al., 2008).

Apesar das atividades altamente promissoras da curcumina que a tornam um candidato a fármaco no manejo de pacientes com quadros álgicos, sua baixa biodisponibilidade compromete sua eficácia (AGGARWAL; HARIKUMAR, 2009; PRASAD; TYAGI; AGGARWAL, 2014). Desse modo, acontecem pesquisas que visam ao desenvolvimento e à avaliação das atividades de análogos da curcumina, os quais apresentam uma ampla possibilidade de aplicações terapêuticas. Alguns análogos da curcumina apresentam atividades biológicas importantes, semelhantes ou mesmo superiores àquelas da curcumina, o que justifica o crescente interesse nessa linha de investigação (KHAN et al., 2012; SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

A atividade de análogos da curcumina (Figura 10) foi demonstrada em diferentes modelos experimentais, incluindo resposta nociceptiva induzida por formaldeído, edema de pata induzido por carragenina, contorção abdominal induzida por ácido acético, periodontite induzida por LPS e associada ao diabetes, atrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA) e lesão pulmonar aguda induzida por LPS (ELBURKI et al., 2017; QIAN et al., 2019; WANG et al., 2012; ZHANG et al., 2019). Alguns ensaios pré-clínicos investigaram os possíveis mecanismos de ação que poderiam ajudar a compreender as atividades acima descritas. Diversos análogos da curcumina, como derivados carbonílicos, piperidínicos e da diarilpentadienona, inibem a atividade de NF-κB e a produção de mediadores inflamatórios como TNF-α, IL-6, IL-1β,

prostaglandina (PG)E2 e NO (BISWAS et al., 2019; JOSEPH et al., 2018; WANG et al., 2017; XIE et al., 2017; ZHANG et al., 2014). Cores et al. (2021) projetaram e sintetizaram uma série de análogos da curcumina, para os quais foram observadas atividades neuroprotetoras e anti-inflamatórias decorrentes da modulação de Nrf2 e redução de nitrito, respectivamente.

Figura 10 - Exemplos de análogos da curcumina utilizados em modelos de inflamação. (A) A13 ((2E, 5E) -2,5-bis (4- (3-(dimetilamino) -propoxi) benzilideno) ciclopentanona. (B) CMC 1.24 (4-fenilaminocarbonil bis-desmetoxi curcumina. (C) 2-Metoxi-4-{( E )- 3-oxo-3 -[( E ) -2-oxo-3- (3,4,5-trimetoxibenzilideno) piperidina-1-il] prop-1-en-1 acetato de -il} fenil. (D) 5a28 (( E ) -1 - [( E ) -3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) acrilo] -3- (3,4,5-trimetoxibenzilideno) piperidin-2-ona. (E) FM0807 (salicilato de curcumina monoéster)

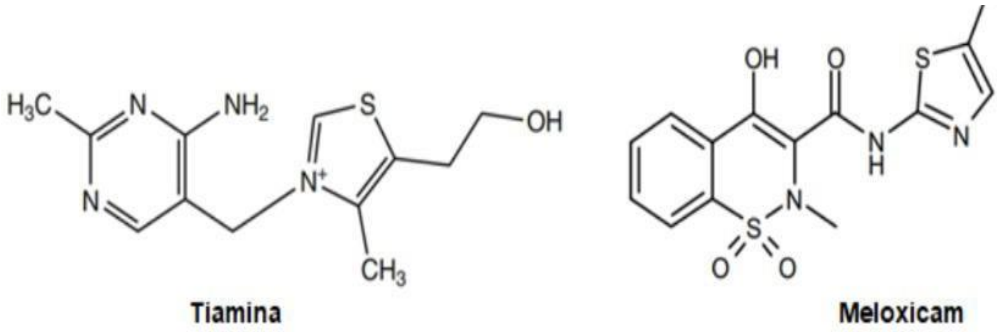



Fonte: WANG et al. (2012). ZHANG et al. (2012). QIAN et al. (2019). ZHANG et al., 2019).

## 2.4 Derivados tiazólicos

Os tiazóis são membros dos heterociclos azólicos, entre os quais estão os imidazóis e oxazóis, que possuem uma coloração amarelo claro. Os derivados tiazólicos apresentam diversas atividades biológicas, como anti-inflamatória, antioxidante, analgésica, antimicrobiana, antimalárica, anticâncer, antialérgica, anti-hipertensiva e antipsicótica, e estão presentes em quase vinte medicamentos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) (KASHYAP et al., 2012; PETROU; FESATIDOU; GERONIKAKI, 2021). O meloxicam e a tiamina são exemplos de fármacos com atividades anti-inflamatória e analgésica e que apresentam grupamentos heterociclos tiazólicos (Figura 11). Atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de derivados tiazólicos foram demonstradas em modelos de granuloma e edema de pata induzidos por carragenina (HOLLA et al., 2003; KUMAR; RAJPUT; BHATI, 2007) ou formalina (KALKHAMBKAR et al., 2007) e em modelo de dor neuropática induzida por paclitaxel (BRAGA et al., 2020).

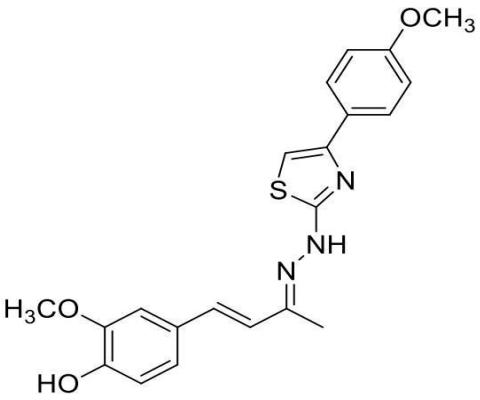
Figura 11 - Derivados tiazólicos.




Fonte: Wikipédia

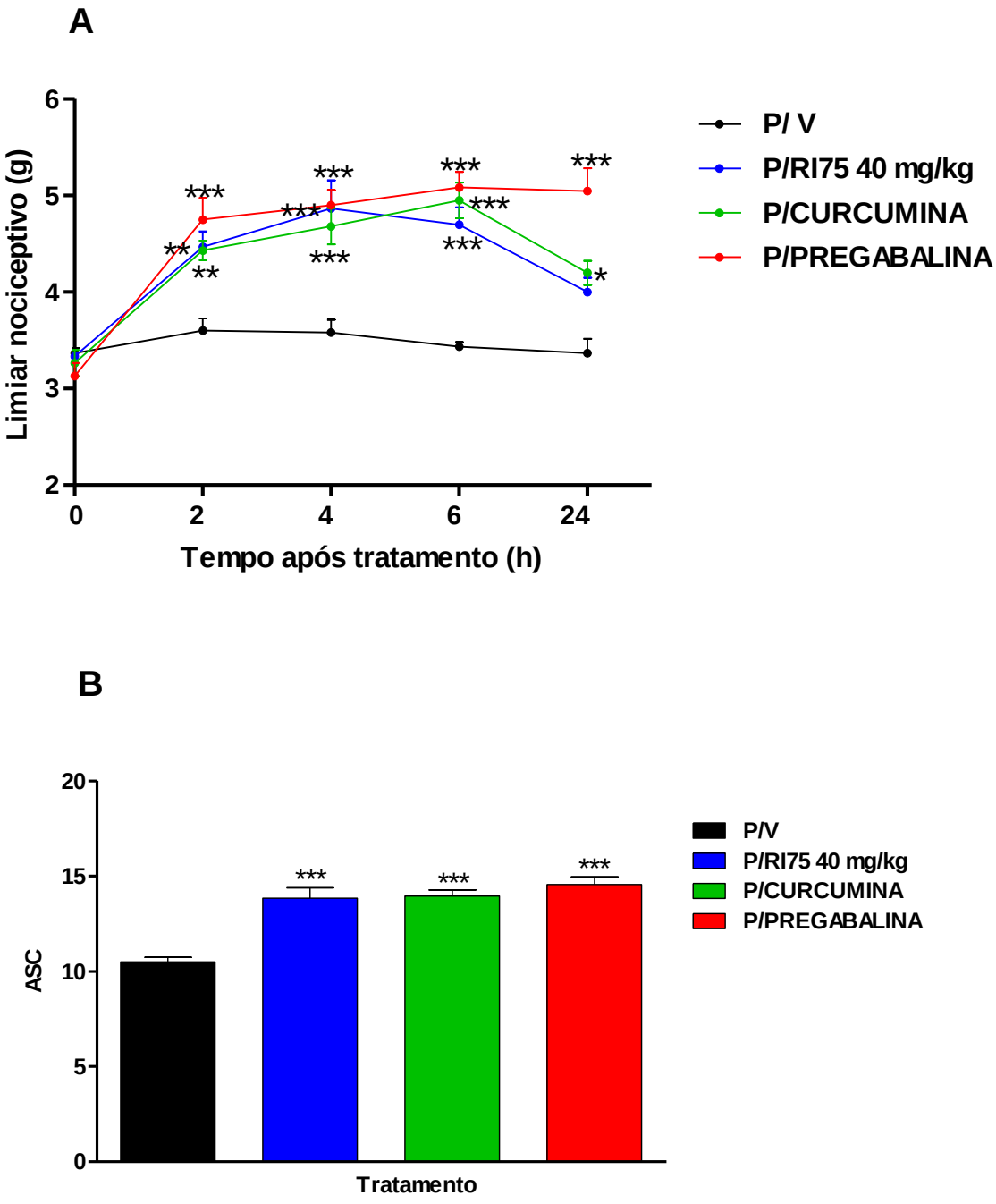
Lino et al. (2018) sintetizaram e avaliaram a atividade antifúngica de uma série de derivados tiazólicos. Entre os derivados sintetizados está o composto (2E,3E)-3-buten- 2-ona-4-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-(4-(4-metoxifenil)- 2-tiazolil) hidrazona (RI75; Figura 12), um análogo da curcumina, que possui uma porção hidrazino-tiazólico. O RI75 é um sólido alaranjado, de massa molar de 395,1304 g/mol, com rendimento de 82%.

Figura 12 - Estrutura química do RI75




Em estudo anterior, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o tratamento de camundongos sensibilizados com paclitaxel com o RI75, no 14º dia após o início da sensibilização, resultou em aumento do limiar nociceptivo (Figura 13). Ainda, demostramos que esse análogo da curcumina induz efeitos antinociceptivo e antiedematogênico em modelos experimentais de dor e edema inflamatório induzidos por carragenina, provavelmente, relacionados com mecanismos opioidérgicos e serotoninérgicos e inibição da produção e/ou ação de mediadores inflamatórios e do recrutamento de neutrófilos (COSTA et al., 2022).

Figura 13 - Efeitos induzidos por RI75 (40 mg/kg, i.p.), curcumina (40 mg/kg, i.p.), pregabalina (30 mg/kg, i.p.) ou veículo (CMC 0,5%, 10 mL/kg, i.p.) sobre a alodínia mecânica induzida por paclitaxel (2 mg/kg.dia, i.p.). V = veículo. P= paclitaxel. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva. *, ** e *** indicam diferenças estatisticamente signif icativas em relação ao grupo controle ($p<0,05$, $p<0,01$ e $p<0,001$, respectivamente). n=6.




Fonte: Costa et al. (2022)

# 3 JUSTIFICATIVA

A DNIQ está associada a grandes problemas sociais, emocionais e físicos enfrentados pelos pacientes submetidos à quimioterapia. A farmacoterapia disponível apresenta eficácia reduzida e, muitas vezes, segurança inadequada. Visando à redução dessas limitações, plantas medicinais se apresentam como fontes importantes para a identificação de novas substâncias biologicamente ativas e que podem se tornar novas alternativas para o tratamento de pacientes com diversas condições patológicas (CASTILHO & BRAGA, 2011). Assim, estudos têm sido desenvolvidos a fim de avaliar a atividade da curcumina, um importante componente da cúrcuma, devido às suas propriedades neuroprotetoras, anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante, entre outras. Entretanto, a baixa biodisponibilidade da curcumina compromete sua eficácia. Diante das diversas propriedades biológicas da curcumina, a síntese de análogos estruturais torna-se importante no contexto do desenvolvimento de novos candidatos a fármacos. Dessa maneira, a investigação e a caracterização das atividades neuroprotetoras e mecanismos subjacentes, bem como a avaliação toxicológica e caracterização química do RI75, um análogo da curcumina, podem contribuir para a identificação de uma nova abordagem terapêutica eficaz e segura para a prevenção e alívio da DNIQ.

# 4 OBJETIVO

Avaliar as atividades do RI75 em modelo experimental de DNIQ e os possíveis mecanismos que medeiam essas atividades, assim como avaliar, preliminarmente, a toxidade *in vitro* e *in vivo.*

## 4.1 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos induzidos pelo RI75 no modelo experimental de dor neuropática induzida pelo paclitaxel;
- Avaliar o papel dos receptores canabinoidérgicos, opioidérgicos, serotoninérgicos e canais e para potássio ATP-dependentes (KATP) na atividade do RI75 no modelo de DNIQ;

- Avaliar os efeitos induzidos pelo RI75 sobre a produção de citocinas inflamatórias em modelos *in vivo* e *in vitro*;
- Avaliar o efeito induzido pelo RI75 sobre as alterações histológicas do nervo isquiático induzidas pelo paclitaxel;
- Avaliar parâmetros toxicológicos preliminares do RI75;
- Avaliar o potencial antioxidante do RI75;
- Avaliar de forma preliminar o perfil do RI75 por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a Detector de Arranjo de Diodos (DAD) e a estabilidade do RI75 em solução.

# 5 MATERIAIS E MÉTODOS

## 5.1 Animais

Para os experimentos de DNIQ, foram utilizados camundongos Swiss machos (25-30 g), e para os experimentos de toxicidade aguda, camundongos Swiss fêmeas (18-25 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 ± 1 °C, a qual corresponde à zona de termoneutralidade para roedores (GORDON, 1990). Ração e água foram fornecidas *ad libitum*. Os animais foram ambientados na sala de experimentação por pelo menos dois dias antes da realização dos experimentos. Após esse período, os animais foram anestesiados com uma injeção i.p. de uma solução contendo cetamina (90 mg/kg) e xilazina (9 mg/kg) e submetidos à eutanásia por deslocamento cervical ou em câmara de $CO_2$. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG protocolos 224/2021 e 18/2024).

## 5.2 Drogas, fármacos e reagentes

- 2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH, Sigma Aldrich, EUA) - Composto radicalar.
- Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA; Sigma-Aldrich, EUA) - Reagente para preparo da solução de extração de citocinas e anticoagulante.

- Ácido sulfúrico (Merck, Alemanha) - Reagente para preparo da solução de parada da 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.
- AM251 (Tocris, EUA) - Antagonista canabinoidérgico CB1.
- Aprotinina (Sigma-Aldrich, EUA) - Reagente para preparo de solução de extração de citocinas.
- Cloreto de benzalcônio (Sigma-Aldrich, EUA) - Reagente para preparo de solução de extração de citocinas.
- Cloreto de sódio 0,9% p/v injetável (Equiplex, Brasil) – Veículo.
- 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.
- Curcumina (Sigma-Aldrich, EUA) - Composto avaliado nos modelos de neuropatia.
- Dimetilsulfóxido (DMSO; Neon, Brasil) - Veículo para preparo das soluções.
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Cultilab, Brasil) - Meio de cultura.
- Formaldeído (Synth, Brasil) - Reagente fixador para amostras teciduais.
- Fosfato de dexametasona (Sigma-Aldrich, USA) - Anti-inflamatório esteroide.
- Fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF; Sigma-Aldrich, EUA) - Reagente para preparo da solução de extração de citocinas.
- Glibenclamida (Sigma-Aldrich, EUA) - Bloqueador de canais KATP.
- Lipopolissacarídeo (Sigma-Aldrich, EUA) - Estímulo inflamatório.
- Ortofenilenodiamina (Sigma-Aldrich, EUA) - Reagente para preparo da solução do substrato no ensaio de ELISA.
- Paclitaxel (Sigma-Aldrich, EUA) - Fármaco antineoplásico.
- Peróxido de hidrogênio (Synth, Brasil) - Reagente para preparo da solução do substrato no ensaio de ELISA.
- Pregabalina (Medley, Brasil) - Fármaco anticonvulsivante.
- Pen Strep (Life Technologies Corporation) - Reagente utilizado no cultivo celular.

- RI75 - (Laboratório de Química Farmacêutica, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, UFMG) - Análogo da curcumina avaliado no modelo de neuropatia.
- Rutina (Sigma-Aldrich, EUA) - Flavonóide antioxidante.
- Salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,2 - Reagente utilizado no ensaio de ELISA.
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, EUA) - Reagente utilizado no ensaio de ELISA.
- Tween 80 (Neon- Brasil) - Veículo para preparo das soluções.

As demais substâncias utilizadas apresentavam grau reagente, sem purificação adicional.

## 5.3 Preparo das soluções e suspensões, vias de administração e doses utilizadas

### 5.3.1 RI75, curcumina, dexametasona e pregabalina

Para os experimentos *in vivo*, as suspensões de RI75, curcumina e pregabalina foram preparadas em solução de Tween 80 1% em cloreto de sódio 0,9% p/v injetável. Foram utilizadas doses de 10, 20, 40 e 80 mg/kg do RI75, 40 mg/kg da curcumina e 30 mg/kg da pregabalina, administradas por via i.p., em volume de 10 mL/kg. Para os testes *in vitro,* as soluções de RI75, curcumina e dexametasona foram preparadas em DMSO 2% em meio de cultura DMEM suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10%. Para a análise da atividade antioxidante, o RI75 foi solubilizado em metanol com diluições sucessivas até concentração de trabalho no mesmo diluente. Para a análise cromatográfica e avaliação de estabilidade em solução, o RI75 foi dissolvido em DMSO 2% e, posteriormente, diluído em cloreto de sódio 0,9% p/v.

### 5.3.2 Preparo das soluções de naltrexona e ciproheptadina

As soluções de naltrexona e ciproheptadina foram preparadas em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v injetável, imediatamente antes da administração. As doses de naltrexona e ciproheptadina foram 5 e 10 mg/kg. Esses antagonistas foram administrados por via i.p. em volume de 4 mL/kg.

### 5.3.3 Preparo da emulsão de AM251

A emulsão de AM251 foi preparada em cremofor 5% e álcool etílico 5% acrescentados em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v, imediatamente antes da administração. O antagonista foi administrado por via i.p. nas doses de 4 e 8 mg/kg, em volume de 4 mL/kg.

### 5.3.4 Preparo da suspensão de glibenclamida

A suspensão de glibenclamida foi preparada em suspensão de CMC 0,5% p/v em cloreto de sódio 0,9% p/v, imediatamente antes da administração. As doses de glibenclamida foram 20 e 40 mg/kg. A suspensão foi administrada *p.o.,* em volume de 8 mL/kg.

### 5.3.5 Preparo da suspensão de paclitaxel

O paclitaxel foi devidamente pesado em capela de fluxo laminar, em ocasião anterior ao preparo das suspensões, seguindo as normas preconizadas para o manuseio de agentes antineoplásicos, como uso de capote, luvas de látex e máscara. A suspensão de paclitaxel foi preparada em solução de cloreto de sódio 0,9% p/v injetável imediatamente antes de cada administração. O paclitaxel foi administrado por via i.p. em volume de 2 mL/kg. A dose padronizada foi de 2 mg/kg, sendo realizadas quatro injeções (dose cumulativa de 8 mg/kg).

### 5.3.6 Preparo do meio de cultura DMEM

A solução estoque de meio celular foi preparada dissolvendo o DMEM em 800 mL de água ultrapura, 2 g de bicarbonato de sódio e 10 mL de solução antimicrobiana. Após a completa dissolução, o pH foi ajustado para a uma faixa entre 7,2-7,4 e, por fim, completou-se o volume para 1 L. Para a manutenção geral das células, essa solução foi enriquecida com 10% (v/v) de SFB. Para a etapa de carenciamento, uma solução de meio de cultura empobrecida foi preparada com 1% (v/v) de SFB.

### 5.3.7 Preparo da solução de LPS

A solução de LPS foi preparada em meio de cutura DMEM suplementado a 10% com SFB, imediatamente antes da adição às células RAW 264.7. A concentração utilizada foi 1 µg/100 mL de meio.

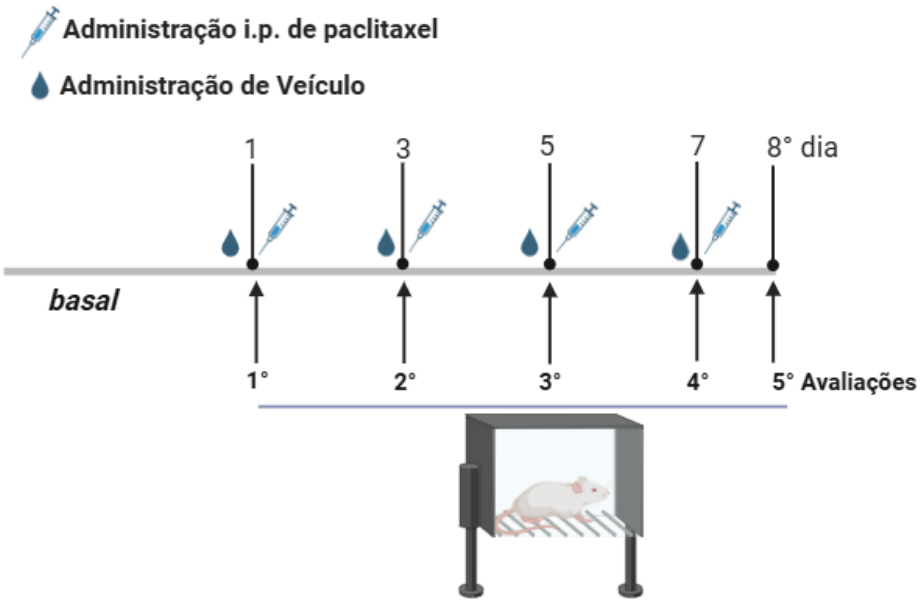
## 5.4 Avaliação da alodínia mecânica

A alodínia mecânica foi medida por meio do uso de um analgesímetro digital (Modelo EFF 301, Insight, Brasil). 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 ao aparato experimental, diariamente, aproximadamente 60 min por dia, durante dois dias antes dos experimentos. Um transdutor de força manual (faixa: 0,1 a 1000 g, ou, aproximadamente, 0,1 a 10 N), equipado com uma ponta de polietileno (0,5 mm de diâmetro), foi gradualmente pressionado sobre a superfície plantar da pata direita posterior até que o animal retirasse a pata. O valor indicando a pressão que fez com que o animal removesse a pata foi registrado automaticamente. O limiar de retirada da pata foi determinado pela média de cinco avaliações em intervalos de 20 s, descartando-se o maior e o menor valor e calculando-se o limiar nociceptivo como a média dos três valores restantes. No dia do experimento, o limiar de retirada da pata de cada animal foi determinado e a divisão dos grupos experimentais foi feita de maneira que as massas corporais dos animais e limiares dos diferentes grupos fossem semelhantes.

## 5.5 Modelo experimental de dor neuropática induzida pelo paclitaxel

Os camundongos receberam injeções i.p. da solução de paclitaxel em cloreto de sódio 0,9%, na dose 2 mg/kg, em volume de 2 mL/kg (dose cumulativa de 8 mg/kg). Foram realizadas quatro injeções i.p. em dias alternados (dias 1, 3, 5 e 7). O grupo controle foi submetido ao mesmo procedimento, porém com injeções de cloreto de sódio estéril (Figura 14).

Figura 14 - Escala temporal da padronização do modelo de dor neuropática induzida por paclitaxel

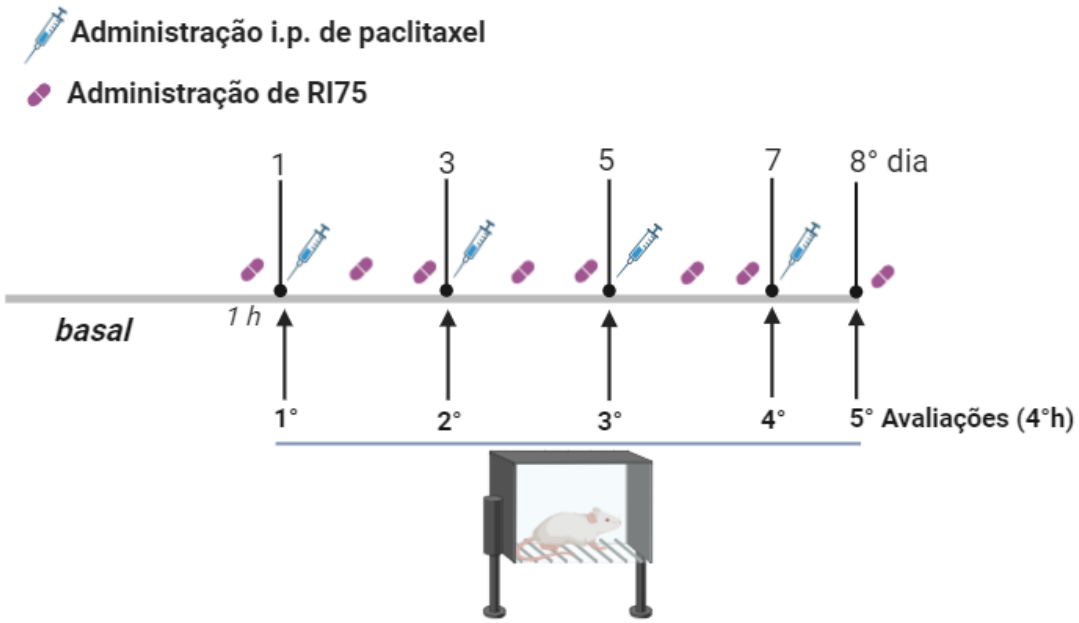



Fonte: Elaboração própria.

### 5.6 Avaliação dos efeitos induzidos pelo RI75 no modelo de dor neuropática induzida pelo paclitaxel

Os animais receberam uma dose diária de RI75 (10, 20 ou 40 mg/kg, 10 mL/kg em Tween 80 1%) ou curcumina (40 mg/kg, 10 mL/kg em Tween 80 1%), por via i.p., 1 h antes da administração da primeira dose de paclitaxel e durante todo período avaliado. Grupos controles receberam injeções de pregabalina (30 mg/kg, 10 mL/kg em Tween 80 1%) ou veículo pelo mesmo período de tempo. A alodínia mecânica foi avaliada nos dias 1, 3, 5, 7 e 8 após a primeira administração de paclitaxel, na 4ª h após a administração dos compostos (Figura 15).

Figura 15 - Escala temporal da avaliação do efeito induzido pelo RI75 sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel.

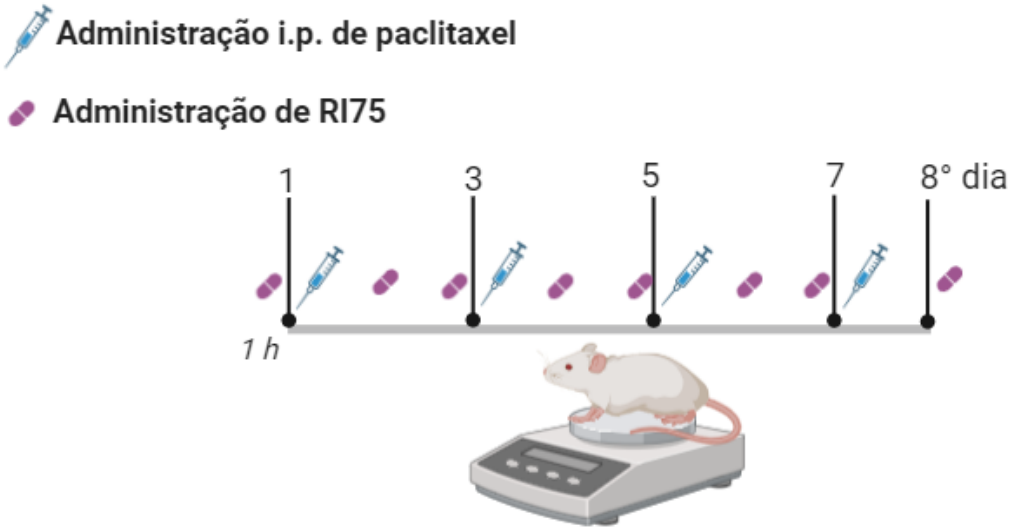



Fonte: Elaboração própia.

### 5.7 Avaliação da variação da massa corporal

Para investigar o efeito induzido pelo RI75 sobre a variação da massa corporal no modelo experimental de dor neuropática induzida pelo paclitaxel, os animais foram tratados de acordo com o protocolo descrito na seção 5.6, utilizando a maior dose do análogo. A massa corporal de cada camundongo foi determinada diariamente, antes de cada administração dos compostos (Figura 16).

Figura 16 - Determinação da massa corporal em função do tempo.

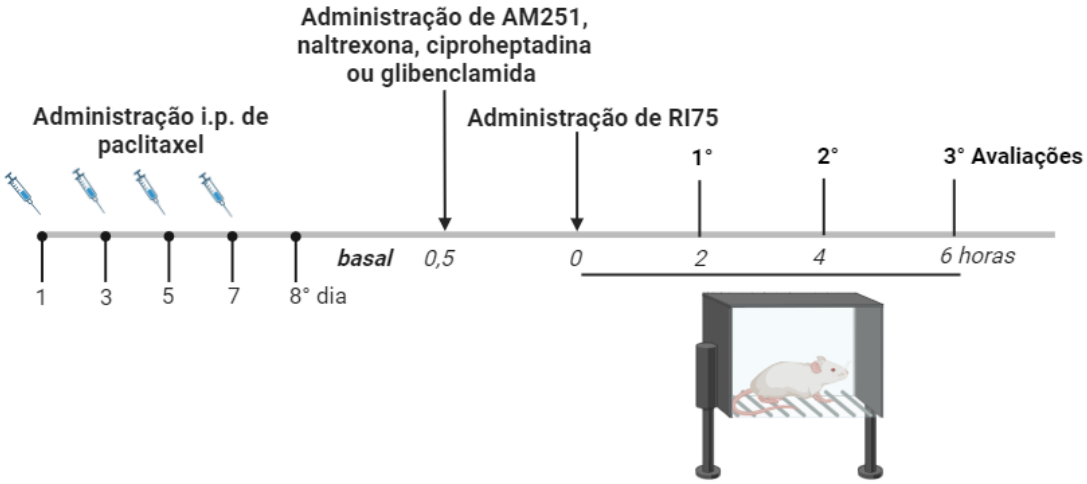



Fonte: Elaboração própia.

## 5.8 Avaliação dos efeitos induzidos por AM251, naltrexona, ciproheptadina e glibenclamida sobre a atividade do RI75 no modelo experimental de dor neuropática induzida pelo paclitaxel

Com o objetivo de avaliar os possíveis mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva do RI75 no modelo experimental de dor neuropática induzida pelo paclitaxel, foram utilizados antagonistas canabinoidérgico (AM251), opioidérgico (naltrexona) e serotoninérgico (ciproheptadina) e um bloqueador de canais KATP (glibenclamida). O AM251 (4 e 8 mg/kg, i.p.), a naltrexona (5 e 10 mg/kg, i.p.), a ciproheptadina (5 e 10 mg/kg, i.p.) e a glibenclamida (20 e 40 mg/kg, *po.*) foram administradas 30 min antes da administração do RI75 (40 mg/kg, i.p.) (Figura 17). A alodínia mecânica foi avaliada 2, 4 e 6 h após administração do análogo da curcumina.

Figura 17 - Escala temporal da avaliação dos efeitos induzidos pelo RI75, após tratamento prévio com AM251 naltrexona, ciproheptadina ou glibenclamida, sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel.

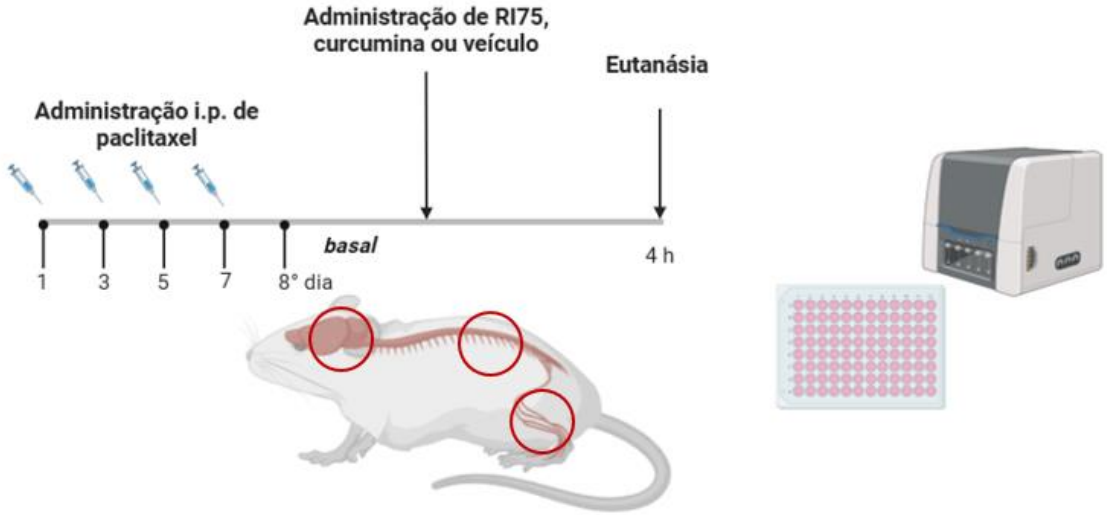



Fonte: Elaboração própia.

### 5.9 Quantificação de citocinas inflamatórias

Para investigar o efeito induzido pelo RI75 sobre a produção de citocinas inflamatórias no modelo experimental de DNIQ, os animais foram sensibilizados com o paclitaxel de acordo com o protocolo descrito na seção 5.5. No 8° dia após a sensibilização com o quimioterápico, os animais foram tratados com RI75 (40 mg/kg), curcumina (40 mg/kg) ou veículo (Tween 80 1%, 10 mL/kg) por via i.p. Após 4 h da administração dos compostos, os animais foram eutanasiados e amostras de nervo isquiático, tálamo e GRD (L3 a L5) foram removidas (Figura 18). Os tecidos foram pesados e homogeneizados em devidas soluções e, posteriormente, submetidos à centrifugação (10.000 rpm) durante 15 min a 4 °C. As concentrações de CXCL-1 e TNF-α foram avaliadas pelo método de imunoensaio (ELISA), a 490 nm, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante (kits DuoSet, R&D Systems, EUA).

Figura 18 - Escala temporal da avaliação do efeito induzido pelo RI75 sobre a concentração de mediadores inflamatórios.




Fonte: Elaboração própria.

### 5.10 Avaliação dos efeitos induzidos pelo RI75 sobre as alterações histológicas do nervo isquiático induzidas pelo paclitaxel

Os camundongos foram sensibilizados, tratados e eutanasiados, conforme descrito na seção anterior. Uma secção de aproximadamente 5 mm do nervo isquiático direito foi dissecada em sua saída da medula espinhal e fixada em solução de formaldeído tamponada com fosfato a 4% por 48 h. Posteriormente, cortes transversais e longitudinais de 5 µm foram obtidos e corados usando hematoxilina e eosina. As amostras foram, então, avaliadas, empregando um sistema de pontuação adaptado (TAWFIK et al., 2018). Os nervos isquiáticos foram avaliados quanto a (1) edema, (2) mielinopatia/axonopatia (degeneração e retração axonal) e (3) dano morfológico ao perineuro/epineuro, com pontuações atribuídas como 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderado) e 3 (grave), levando a uma pontuação máxima possível de 9.

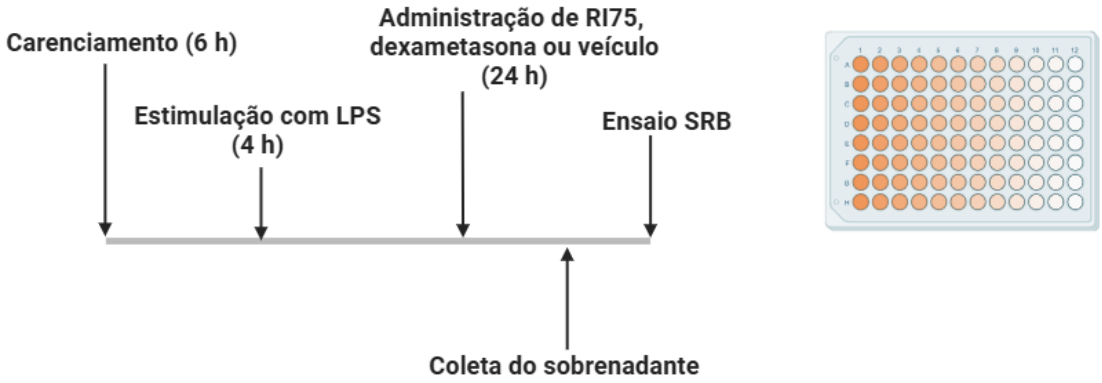
### 5.11 Avaliação da citotoxicidade e quantificação de citocinas inflamatórias *in vitro*

Para análises *in vitro*, a linhagem celular de macrófagos RAW 264.7 foi, inicialmente, semeada em placas de 96 poços ($1x10^4$ células/poço) em meio de cultura

DMEM suplementado com 10% (v/v) de SFB e incubadas a 37°C e 5% $CO_2$. A cultura de células RAW 264.7 foi submetida à etapa de carenciamento, por meio da adição de DMEM suplementado com SFB 1% por 6 h. Posteriormente, foram estimuladas com LPS de *E. coli* por 4 h. Em seguida, as células foram expostas a concentrações seriadas de RI75 (0,2-125 µM), veículo (DMSO 2% diluído em DMEM suplementado) ou dexametasona 0,1 µM, por 24 h (Figura 19). Após esse período, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -70 °C para posterior quantificação das citocinas inflamatórias TNF-α e IL-1β por meio de um imunoensaio (ELISA), usando comprimento de onda de 450 nm e seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante (kits DuoSet, R&D Systems, EUA).

Após a remoção do sobrenadante, 100 µL de ácido tricloroacético 10% (v/v) foram adicionados a cada poço da placa de cultura e incubados a 4 °C durante 60 min para a fixação das células. Em seguida, as placas foram cuidadosamente lavadas com água ultrapura e, após secagem completa à temperatura ambiente, 100 µL de solução de sulforodamina B (SRB) a 0,057% (p/v) foram adicionados em cada poço e as placas foram mantidas a temperatura ambiente durante 30 min. A seguir, as placas foram submetidas a lavagens com ácido acético 1% (v/v) e, novamente, mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 100 µL de solução Tris Base a 10 mM e pH 10,5. O ensaio baseia-se na capacidade da SRB de se ligar a componentes proteicos de células que foram fixadas em placas de cultura pelo ácido. A SRB é um corante rosa, que possui dois grupos sulfônicos que se ligam a resíduos de aminoácidos básicos sob condições ácidas suaves e se dissociam sob condições básicas. Como a ligação da SRB é estequiométrica, a quantidade de corante extraído das células coradas é diretamente proporcional à massa celular. A leitura da absorbância foi realizada em um leitor de microplacas (Versamax Genius®, MA-EUA) a 510 nm e a porcentagem da inibição do crescimento celular calculada em relação à absorbância das células mantidas somente em meio de cultura.

Figura 19 - Escala temporal da avaliação da citotoxicidade em RAW 264.7




Fonte: Elaboração própia.

### 5.12 Toxicidade do RI75 em invertebrado

Em recipiente plástico foram solubilizados 22 g de sal marinho em 1 L de água com o pH ajustado para 8,0. A solução permaneceu em aquário com aeração constante durante todo o experimento. Nessa solução, foram deixados por três dias, cistos de *Artemia salina* L., após eclosão, foram separadas manualmente em grupos de 10 indivíduos. Posteriormente, solução de RI75 em concentrações variadas (19,5; 50; 250; 500; 750; 1000 e 1250 µg/mL) foi colocada em contato com o crustáceo durante 24 h.

### 5.13 Toxicidade aguda do RI75 em camundongos

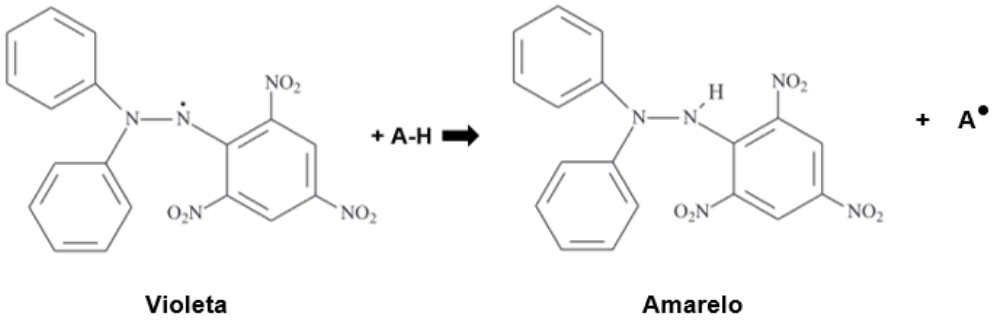
Dose única do RI75 (40 ou 80 mg/kg) ou veículo foi administrada por via i.p. em camundongos fêmeas. Após os tratamentos, os animais foram observados durante 14 dias e foram avaliadas modificações comportamentais e clínicas, massa corporal, morbidade e mortalidade. A variação de massa foi calculada de acordo com a massa inicial de cada animal. Após 14 dias, os animais foram anestesiados com mistura de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) e o sangue foi coletado por punção do plexo braquial em tubos contendo anticoagulante (EDTA). Parâmetros hematológicos como hemoglobina, hematócrito (HCT), glóbulos vermelhos (RBC), leucócitos totais (leucócitos) e linfócitos foram avaliados para cada grupo. A função renal foi avaliada por meio da determinação das concentrações da uréia e creatinina. A função hepática foi

avaliada por meio da determinação das atividades da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).

### 5.14 Avaliação da atividade antioxidante do RI75

Com o intuito de avaliar uma potencial atividade antioxidante do RI75, uma solução estoque (100 µg/mL) do RI75 foi preparada em metanol. Por meio de diluições sucessivas, utilizando o mesmo diluente, foram preparadas 11 concentrações equidistantes da amostra, que variaram entre 5 a 15 µg/mL. Processo similar foi adotado para a curcumina, sendo a faixa analisada de 1 a 10 µg/mL. Para a realização do ensaio, 100 µL da solução de RI75 ou curcumina foram colocadas em contato com 40 µL de uma solução metanólica de 300 µM de DPPH, em microplaca de 96 poços, protegida da luz por 30 min. A molécula de DDPH possui um radical livre. Ao sofrer redução por uma molécula antioxidante, o DDPH tem sua coloração violeta modificada para amarela (Figura 20).

Figura 20 - Reação química da redução do DPPH.




Fonte: Google Imagens (2024)

Decorrido o tempo, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm. Realizou-se, conjuntamente, a leitura das amostras, soluções de branco amostral (metanol), controle negativo (metanol e DPPH) e controle positivo (rutina). O experimento foi realizado em triplicata. Após finalização do teste, a atividade antioxidante foi calculada segundo a fórmula 1:

*Fórmula 1.* Fórmula para cálculo da atividade antioxidante

$$\text{Atividade antioxidante (\%)}: \frac{\text{AbsAm} - \text{AbsCN}}{\text{AbsCN}}$$

Onde:

AbsAm = Absorbância da amostra subtraída de seu branco

AbsCN = Absorbância do controle negativo subtraída de seu branco

Posteriormente, curvas analíticas foram calculadas para determinação dos respectivos IC50.

### 5.15 Análise em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE-DAD)

Para obter o perfil cromatográfico das amostras, foi usado método previamente descrito (CHAUHAN; SINGH; AGRAWALA, 1999). Para isso, amostras de RI75 e curcumina foram solubilizadas em cloreto de sódio 0,9% com 2% de DMSO, de forma a se obter uma concentração de 500 µg/mL. Posteriormente, duas diluições sucessivas, a 100 µg/mL e 10 µg/mL, foram realizadas utilizando metanol como diluente. Ambas as amostras a 10 µg/mL, foram filtradas através de membrana de PVDF de 0,45 µm. Posteriormente, 10 µL de cada amostra foram injetadas, separadamente, em um cromatógrafo (Shimadzu LC-20A Prominence) acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos (Shimadzu SPD-20A).

A avaliação ocorreu com uma coluna C-18 (150 mm × 3,9 mm × 5 µm), em modo isocrático de eluição, utilizando mistura de metanol: água ultrapurificada (70:30). A taxa de fluxo para o método cromatográfico foi de 1,0 mL/min, com os dados do cromatograma registrados em 425 nm e adquiridos no software Shimadzu Lab Solutions®. Para o estudo de estabilidade do RI75 em solução, foi feita avaliação em triplicata, nos tempos 0, 6, 12,18, 24, 30, 48, 72, 96, 120 e 600 h, com anotação das integrações das áreas cromatográficas dos picos correspondentes aos compostos avaliados.

### 5.16 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. Os resultados referentes à quantificação de citocinas e de área sob a curva (ASC) foram analisados por meio da análise de variância simples de uma via (ANOVA), seguido pelo teste de

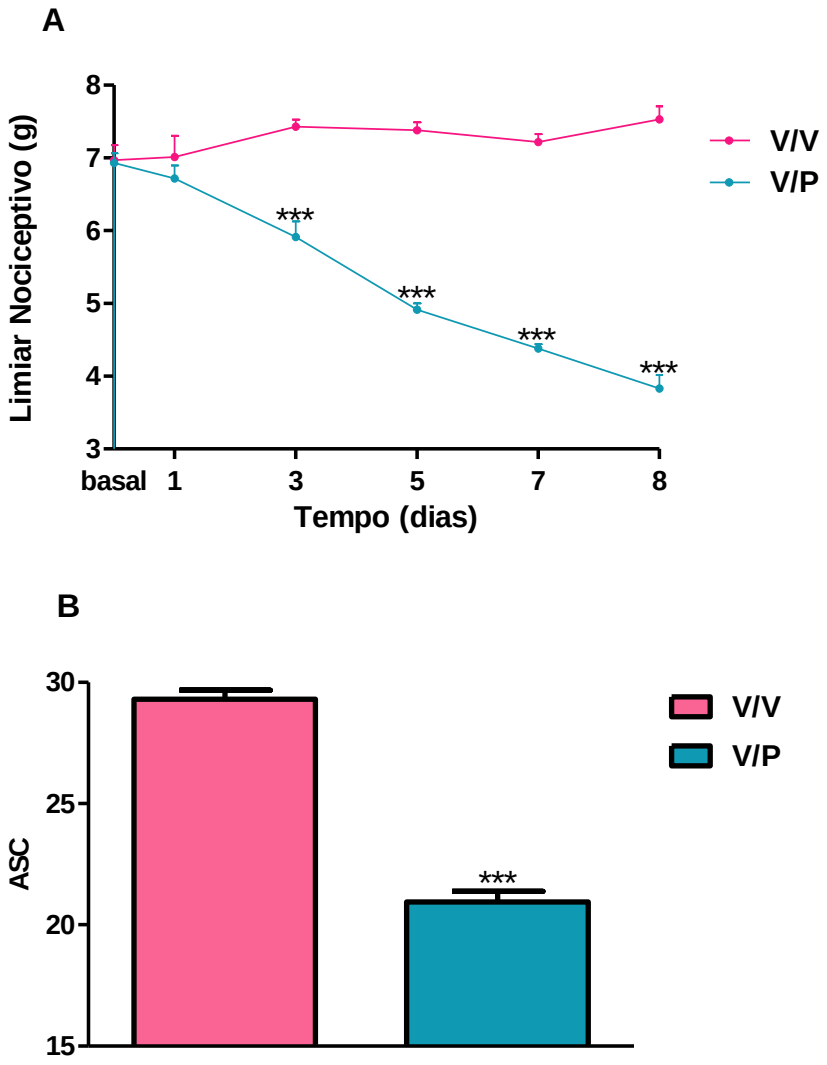
Newman- Keuls. Os resultados de alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel e massa corporal foram analisados por meio de análise de variância de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni. Adotou-se um nível de significância de 5%. As diferenças foram avaliadas usando análise de variância unidirecional ou bidirecional seguida por teste de Newman-Keuls, Bonferroni ou Tukey. Um valor de $p<0,05$ foi considerado significativo. O valor de IC50 no ensaio de letalidade foi calculado por meio da análise Probit, com a homocedasticidade dos dados verificada por meio da análise Person. Foram utilizados os softwares Graph Prism 8.0 e IBM SPSS Statistics v.20.

# 6 RESULTADOS

## 6.1 Efeito induzido pelo RI75 sobre a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel

Inicialmente, realizamos a padronização do modelo experimental de dor neuropática induzida pelo paclitaxel. O limiar para retirada da pata foi avaliado a cada dois dias, durante oito dias, após a primeira administração do paclitaxel (2 mg/kg.dia, i.p.). A alodínia mecânica se estabeleceu dois dias após a primeira administração do paclitaxel e se manteve durante todo o período avaliado. O limiar nociceptivo foi reduzido de 6,93 ± 0,13 g para 3,83 ± 0,18 g no 8° dia no grupo que recebeu paclitaxel. Os animais do grupo controle (veículo) não apresentaram alterações significativas do limiar nociceptivo (Figura 21).

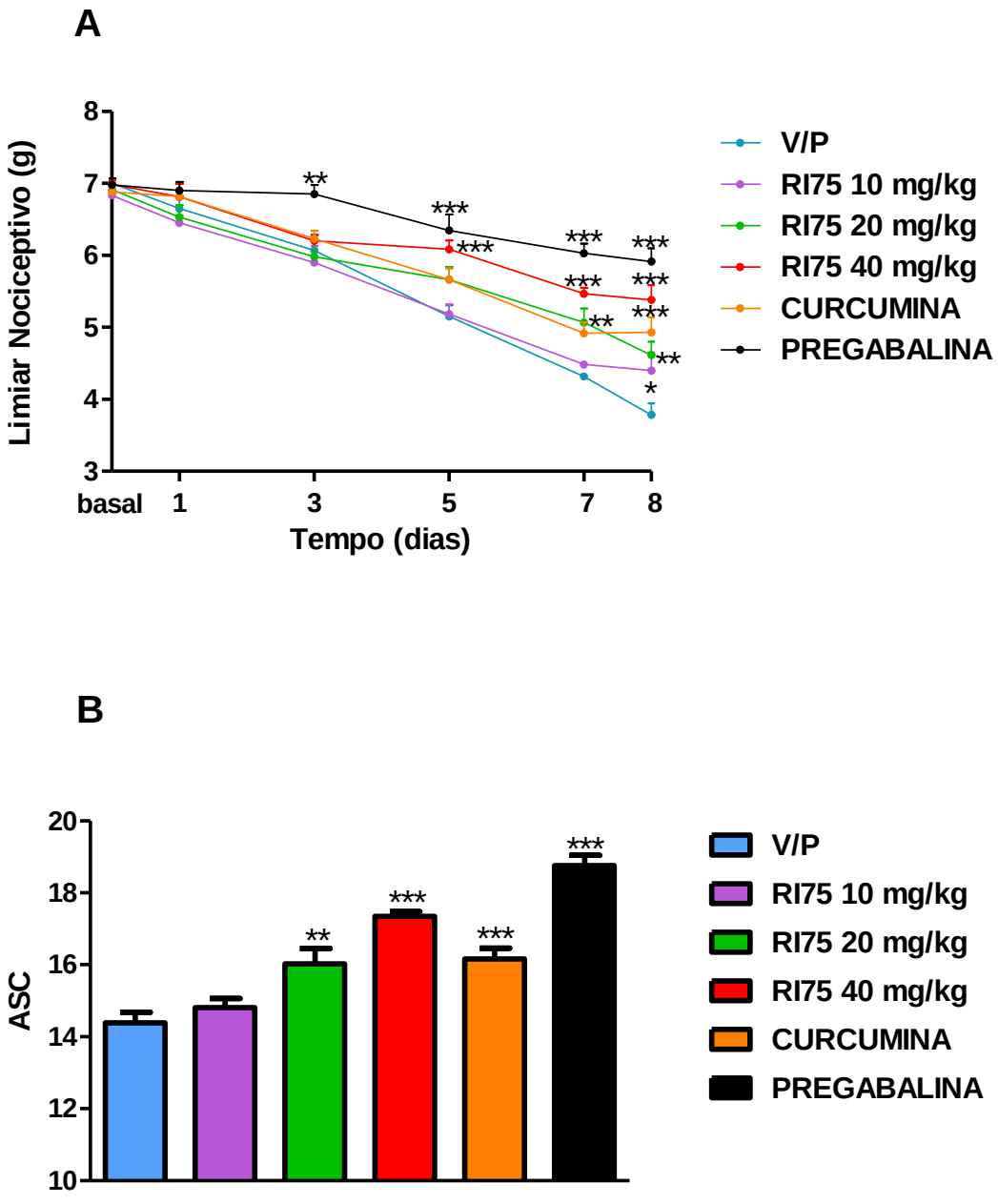
Figura 21 - Efeitos induzidos por administrações repetidas de paclitaxel (2 mg/kg.dia, dose cumulativa 8 mg/kg, i.p.) ou veículo (cloreto de sódio 0,9%, 2 mL/kg, i.p.) sobre o limiar nociceptivo. V = veículo. P= paclitaxel. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva (ASC). *** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo V/V (p<0,001). n=6.




Em próximo protocolo experimental, RI75 (10, 20 e 40 mg/kg) e curcumina (40 mg/kg) foram administrados i.p., diariamente, 1 h antes da administração do paclitaxel. O

RI75, na dose de 40 mg/kg, atenuou significativamente a alodínia mecânica no 5° (RI75 40 mg/kg = 6,08 ± 0,12 g; V/P = 5,15 ± 0,16 g), 7° (RI75 40 mg/kg = 5, 47 ± 0,08 g; V/P = 4,32 ± 0,04) e 8° (RI75 40 mg/kg = 5,38 ± 0,20 g; V/P = 3,78 ± 0,16 g) dia após a primeira administração do paclitaxel. O tratamento com pregabalina (30 mg/kg, i.p.) induziu o efeito antinociceptivo a partir da segunda administração do quimioterápico (3° = 6,85 ± 0,13 g; 5° = 6,35 ± 0,22; 7° = 6,03 ± 0,13 g e 8° dia = 5,92 ± 0,18 g) (Figura 22 A). Uma avaliação global indicou aumento significativo do limiar nociceptivo nos grupos pré-tratados com RI75 nas doses de 20 e 40 mg/kg, curcumina ou pregabalina, quando comparados com o grupo controle (V/P = 14, 39 ± 0,28 g; RI75 20 mg/kg = 16,03 ± 0,42 g; RI75 40 mg/kg = 17,34 ± 0,14 g; curcumina = 16,17 ± 0,29 g; pregabalina = 18,77 ± 0,28 g). A menor dose do RI75 não induziu efeito antinociceptivo (Figura 22 B).

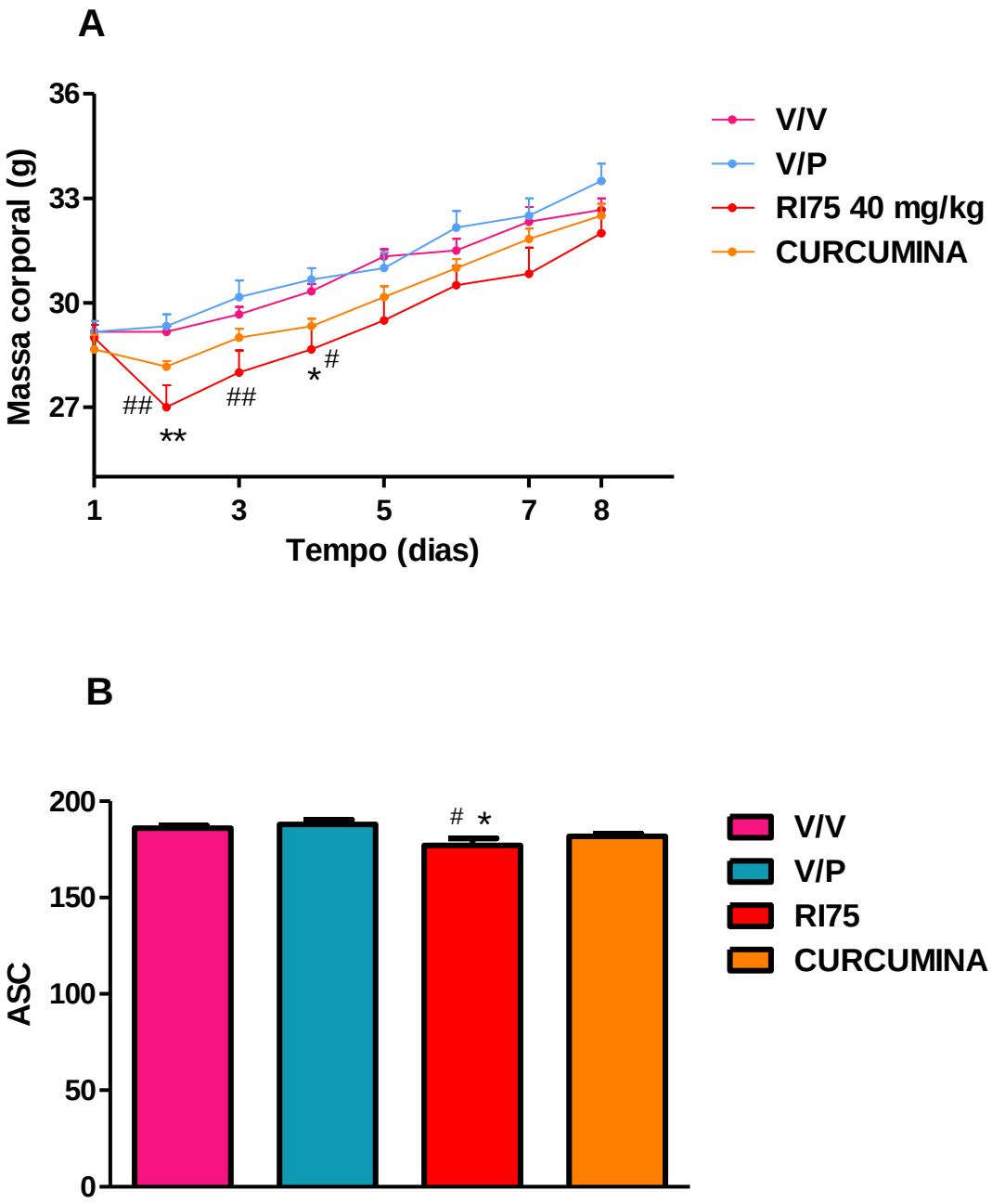
*Figura 22 - - Efeitos induzidos por RI75 (10, 20 e 40 mg/kg, i.p.), curcumina (40 mg/kg, i.p.), pregabalina (30 mg/kg, i.p.) ou veículo (Tween 80 1%, 10 mL/kg, i.p.) sobre a alodínia mecânica induzida por paclitaxel (2 mg/kg.dia, i.p.). V = veículo. P= paclitaxel. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva (ASC). *, ** e *** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (p<0,05, p<0,01 e p<0,001, respectivamente). n=6.*



## 6.2 Efeito induzido pelo RI75 sobre a massa corporal

Foram avaliados os efeitos induzidos pelo RI75 sobre a massa corporal dos animais sensibilizados com paclitaxel. Observamos que os animais que receberam doses diárias de RI75 (40 mg/kg, i.p.), apresentaram ligeira redução da massa corporal (RI75 40 mg, 1° = 29,00 ± 0,36 g, 2° = 27,00 ± 0,63 g; 3° = 28,00 ± 0,63 g; 4° = 28.67 ± 0,67 g, 5° = 29,50 ± 0,67 g; 6° = 30,50 ± 0,56 g; 7° = 30,83 ± 0,75 g e 8° dia = 32,0 ± 0,68 g), quando comparados aos animais dos grupos controle ou curcumina. No entanto, a diferença não foi mantida e no 8° dia, todos os grupos exibiram massas corporais médias similares (Figura 23 A). Uma avaliação global também indicou redução da massa corporal induzida pelo análogo de curcumina (V/V = 186,1 ± 1,33 g; V/P = 187,9 ± 2,53 g; RI75 = 177,0 ± 3,79 g; curcumina = 181,7 ± 1,38 g) (Figura 23 B).

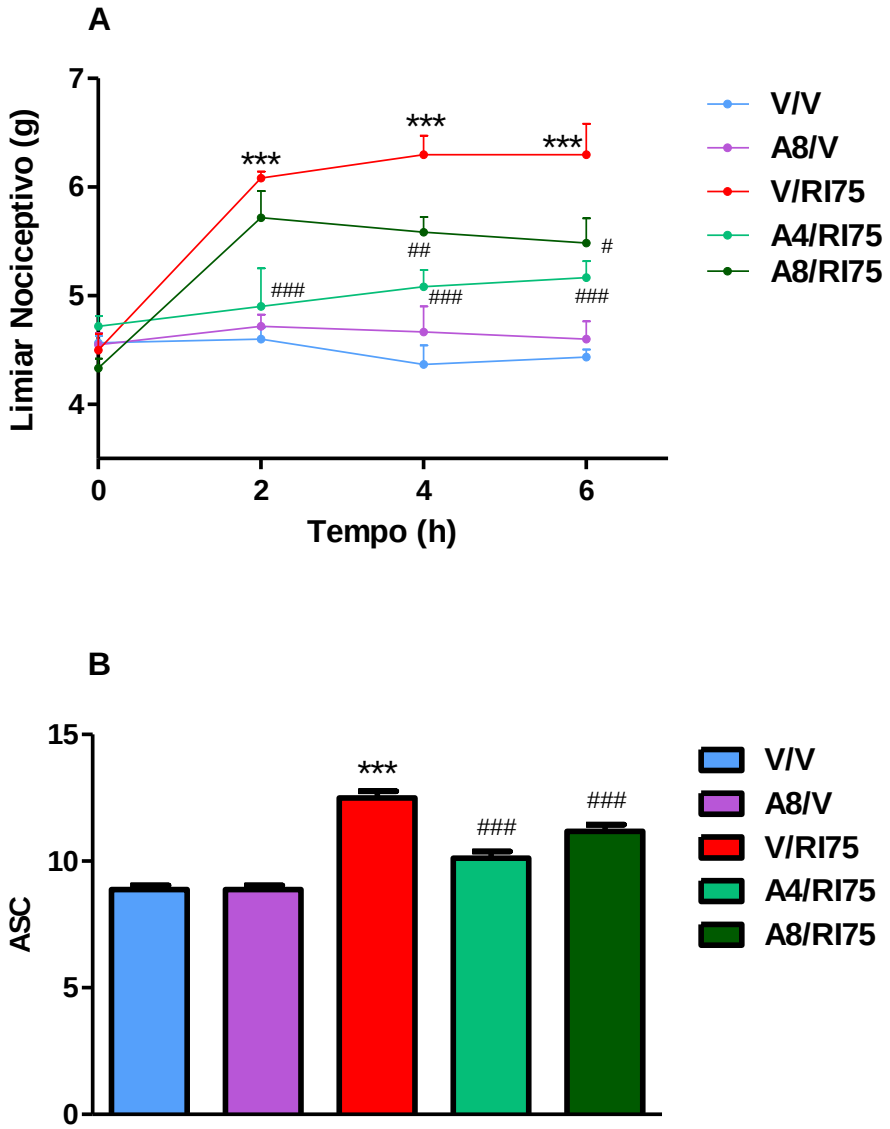
Figura 23 - Efeitos induzidos pelo RI75 (40 mg/kg, i.p.) e curcumina sobre a massa corporal dos animais. V = veículo. (A) *Curso temporal e (B) área sob a curva (ASC). * e ** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (p<0,05 e p<0,01, respectivamente). # e ## indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo V/P (p<0,005, p<0,01). n=6.*



### 6.3 Efeitos induzidos por AM251, naltrexona, ciproheptadina ou glibenclamida sobre a atividade antialodínica do RI75

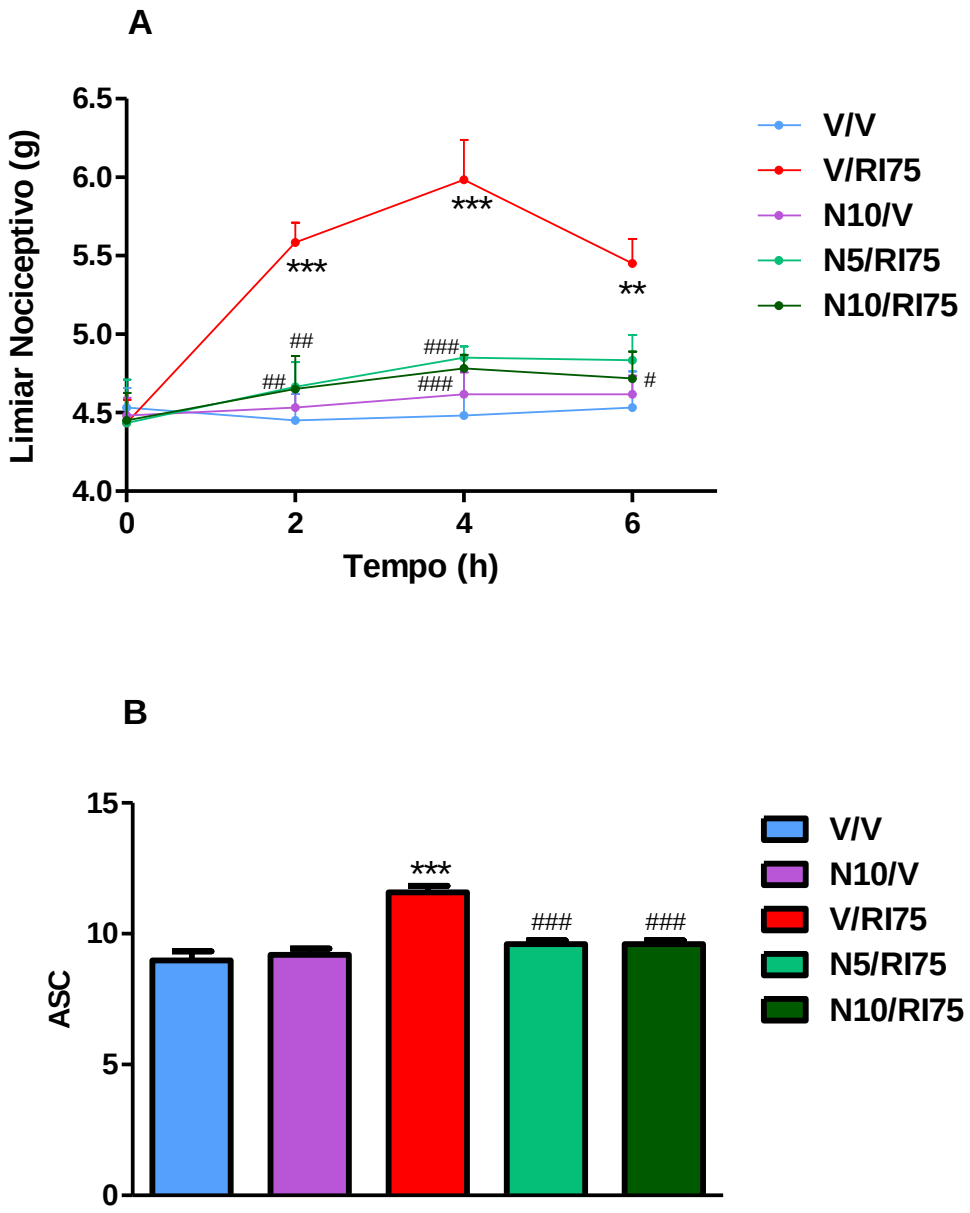
Tendo sido demonstrada a atividade antialodínica do RI75 (40 mg/kg), investigamos os possíveis mecanismos envolvidos nessa atividade. Para isso, foram avaliados os efeitos induzidos por AM251, naltrexona, ciproheptadina ou glibenclamida sobre a atividade antialodínica do RI75. O AM251 (8 mg/kg), administrado isoladamente, não atenuou a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel. No entanto, o RI75 aumentou o limiar nociceptivo dos animais. A atividade induzida pelo análogo de curcumina foi atenuada pela administração prévia do antagonista canabinoidérgico nas doses de 4 e 8 mg/kg (V/V = 4,37 ± 0,061 g; A8/V = 4,67 ± 0,23 g; V/RI75 = 6,30 ± 0,17 g; A4/RI75 = 5,08 ± 0,15 g e A8/RI75 = 5,58 ± 0,14 g, 4 h) (Figura 24 A). Uma avaliação global indicou que o efeito induzido pela maior dose (8 mg) do AM251 não foi superior àquele induzido pela menor dose (4 mg) do antagonista (Figura 24 B).

Figura 24 - Efeito induzido pelo AM251 (4 ou 8 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antialodínica do RI75 (40 mg/kg, i.p.). O AM251 foi administrado 30 min antes do RI75. V = veículo. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva (ASC). *** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (p<0,001). #, ## e ### indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo V/RI75 (p<0,05, p<0,01 e p<0,001). n=6.



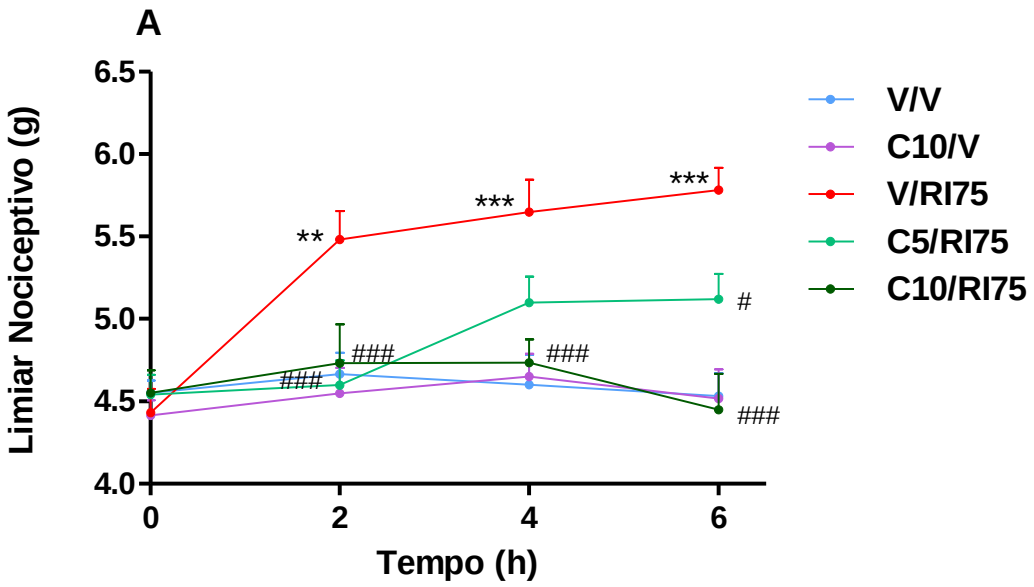
A naltrexona, administrada isoladamente na dose de 10 mg/kg, não alterou a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel. Essa resposta foi inibida pelo tratamento com RI75. A atividade antialodínica do RI75 foi atenuada pela administração prévia de naltrexona nas doses de 5 e 10 mg/kg (V/V = 4,48 ± 0,30 g; RI75/V = 5,98 ± 0,25 g; N5/RI75 = 4,85 ± 0,07 g; N10/RI75 = 4,78 ± 0,08, 4 h) (Figura 25 A). Uma avaliação global também indicou atenuação da atividade antialodínica do RI75 pelo pré-tratamento com naltrexona em ambas doses (Figura 25 B).

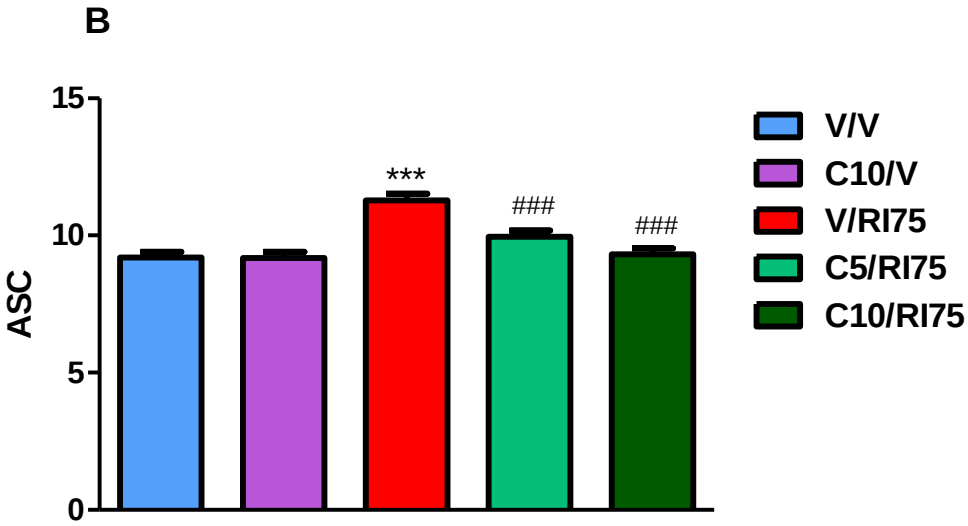
Figura 25 - Efeito induzido pela naltrexona (N; 5 ou 10 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antialodínica do RI75 (40 mg/kg, i.p.). A naltrexona foi administrada 30 min antes do RI75. V = veículo. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva (ASC). ** e *** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (p<0,01 e p<0,001, respectivamente). ,#, ## e ### indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo V/RI75 (p<0,05, p<0,01 e p<0,001, respectivamente). n=6.



A ciproheptadina, administrada isoladamente, não induziu efeito sobre o limiar nociceptivo dos animais. O RI75 atenuou a alodínia mecânica induzida pelo paclitaxel. A administração prévia da ciproheptadina atenuou o efeito induzido pelo RI75 (V/V = 4,60 ± 0,18 g; C 10/V = 4,65 ± 0,14; V/RI75 = 5,67 ± 0,19 g; C5/RI75 = 5,10 ± 0,16 g; C10/V = 4,73 ± 0,14, 4 h) (Figura 26 A). Uma avaliação global também indicou atenuação da atividade antialodínica do RI75 pelo pré-tratamento com ciproheptadina em ambas doses (Figura 26 B).

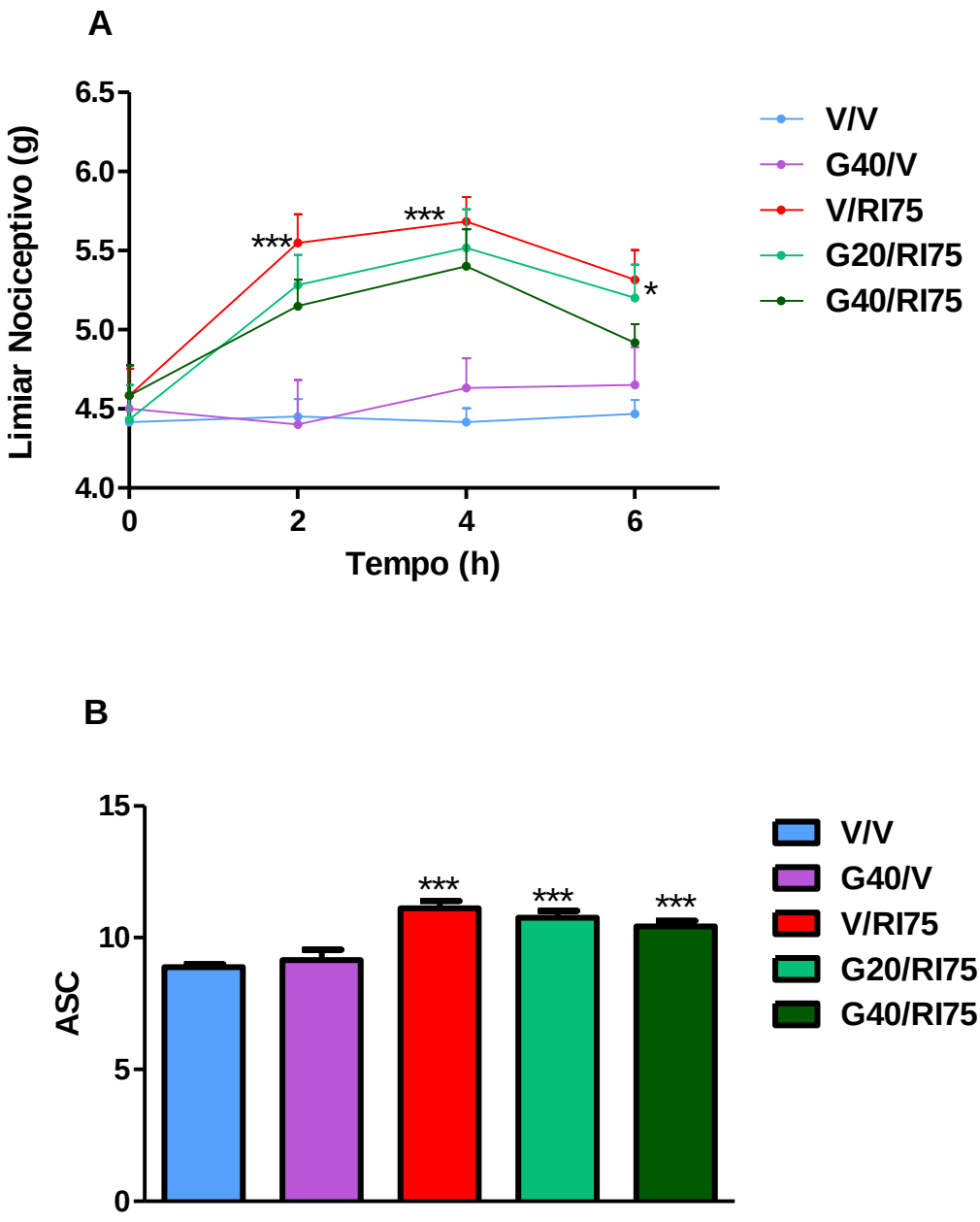
Figura 26 - Efeito induzido pela ciproheptadina (5 ou 10 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antialodínica do RI75 (40 mg/kg, i.p.). A ciproheptadina foi administrada 30 min antes do RI75. V = veículo. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva (ASC). ** e *** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (p<0,01 e p<0,001, respectivamente). # e ### indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo V/RI75 (p<0,05 e p<0,001, respectivamente). n=6.



A glibenclamida, administrada isoladamente na dose de 40 mg/kg, não alterou a alodínia mecânica. Essa resposta foi inibida pelo tratamento com RI75. A atividade antialodínica do RI75 não foi atenuada pela administração prévia de glibenclamida, nas doses de 20 e 40 mg/kg (Figura 27).

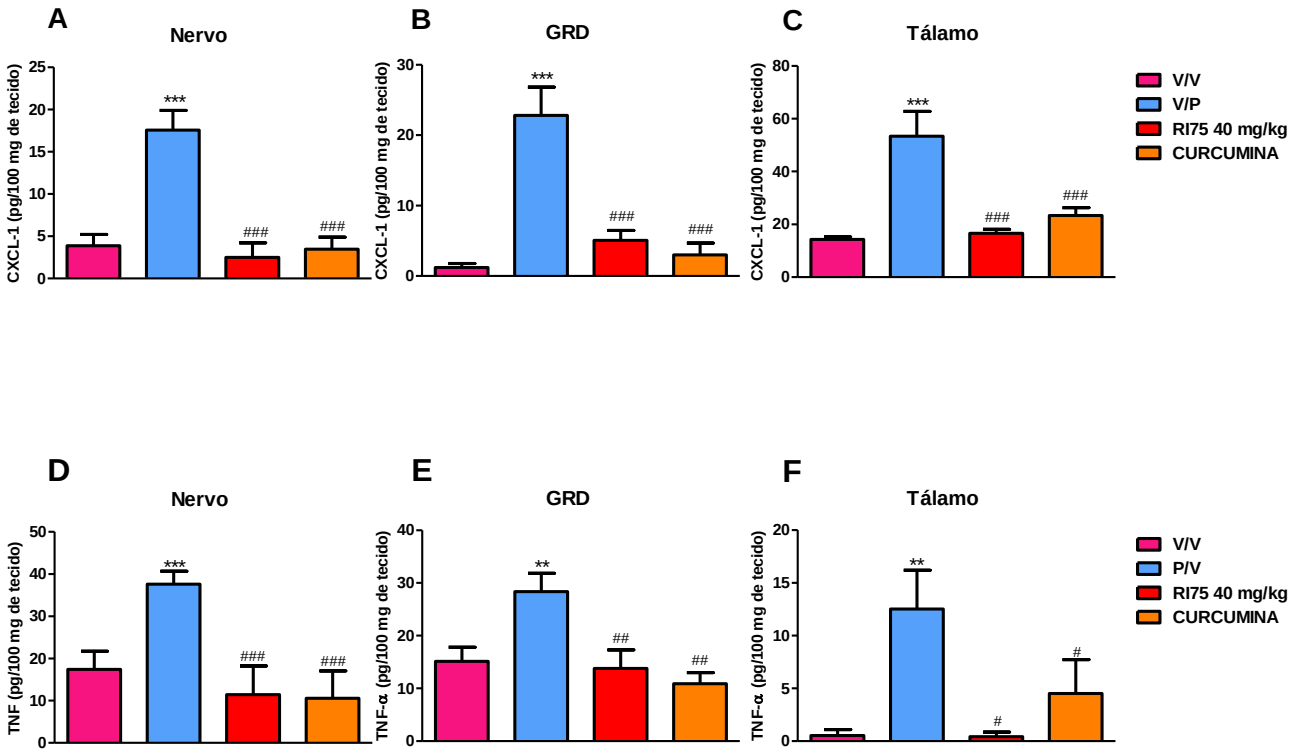
Figura 27 - Efeito induzido pela glibenclamida (20 ou 40 mg/kg, i.p.) sobre a atividade antialodínica do RI75 (40 mg/kg, i.p.). A glibenclamida foi administrada 30 min antes do RI75. V = veículo. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva (ASC). * e *** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (p<0,05 e p<0,001). n=6.



### 6.4 Efeito induzido pelo RI75 sobre a produção de CXCL-1 e TNF-α induzida por paclitaxel

Concentrações aumentadas de CXCL-1 no nervo isquiático (17,56 ± 2,34 pg/100 mg; Figura 28 A), GRD (22,81 ± 4,03 pg/100 mg; Figura 28 B) e tálamo (53,38 ± 9,36 pg/100 mg; Figura 28 C) foram observadas oito dias após a primeira administração de paclitaxel. Ao mesmo tempo, também foram observadas concentrações aumentadas de TNF-α no nervo isquiático (37,62 ± 3,08 pg/100 mg; Figura 28 D), GRD (28,34 ± 3,52 pg/100 mg; Figura 28 E) e tálamo (12,52 ± 3,68 pg/100 mg; Figura 28F). Administração única do RI75 (40 mg/kg, ip) reduziu as concentrações de CXCL-1 (nervo isquiático, 2,50 ± 1,72 pg/100 mg, Figura 28 A; GRD, 5,06 ± 1,40 pg/100 mg, Figura 28 B; tálamo, 16,66 ± 1,51 pg/100 mg, Figura 28 C) e TNF-α (nervo isquiático, 11,44 ± 6,80 pg/100 mg, Figura 28 D, GRD, 13,78 ± 3,54 pg/100 mg, Figura 28 E, tálamo, 0,43 ± 0,42 pg/100 mg, Figura 28 F), avaliadas 4 h após a administração do composto. A curcumina, usada como controle, também reduziu as concentrações de CXCL-1 (nervo isquiático, 3,47 ± 1,43 pg/100 mg, Figura 28 A; GRD, 3,00 ± 1,68 pg/100 mg, Figura 28 B; tálamo, 23,40 ± 2,88 pg/100 mg, Figura 28 C) e TNF-α (nervo isquiático, 10,56 ± 6,50 pg/100 mg, Figura 28 D; GRD, 10,88 ± 2,14 pg/100 mg, Figura 28 E; e tálamo, 4,528 ± 3,20 pg/100 mg, Figura 28 F).

Figura 28 - Efeitos induzidos por administração única de RI75 (40 mg/kg, i.p.), curcumina (40 mg/kg, i.p.) ou veículo (1% Tween 80, 10 mL/kg, i.p.) sobre as concentrações de CXCL-1 e TNF-α no nervo isquiático, GRD e tálamo em animais sensibilizados com paclitaxel (2 mg/kg.dia, i.p.; dose cumulativa= 8 mg/kg). As concentrações de CXCL-1 e TNF-α foram determinadas 4 h após a administração dos compostos, no 8° dia após a primeira administração de paclitaxel. V=veículo, P=paclitaxel. ** e *** indicam diferenças significativas em relação ao grupo veículo (p<0,01 e p<0,001, respectivamente). #, ## e ### indicam diferenças significativas em relação ao grupo paclitaxel (p<0,05, p<0,01 e p<0,001, respectivamente). n=6.




## 6.5 Efeito do RI75 sobre as alterações histológicas do nervo isquiático induzidas pelo paclitaxel

A análise histopatológica do nervo isquiático de camundongos tratados com paclitaxel revelou alterações morfológicas significativas, incluindo desorganização e espessamento do epineuro e perineuro e axônios retraídos e posicionados excentricamente. Além disso, houve aumento do espaço correspondente à mielina,

indicando alterações degenerativas e perda axonal, e presença de edema. Contudo, o tratamento com RI75 ou curcumina atenuou essas alterações, resultando em uma pontuação histológica reduzida (Figura 29). Ainda, fibras nervosas apresentaram características saudáveis, com axônios posicionados centralmente e presença limitada de alterações degenerativas (Figura 30).

Figura 29 - Efeitos induzidos por RI75 (40 mg/kg, i.p.), curcumina (40 mg/kg, i.p.) ou veículo (1% Tween 80, 10 mL/kg, i.p.) sobre as alterações do nervo isquiático induzidas pelo paclitaxel, representados por escores histológicos. *** indica diferença significativa em relação ao grupo veículo ($p<0,001$). # indica diferença significativa em relação ao grupo paclitaxel ($p<0,05$).

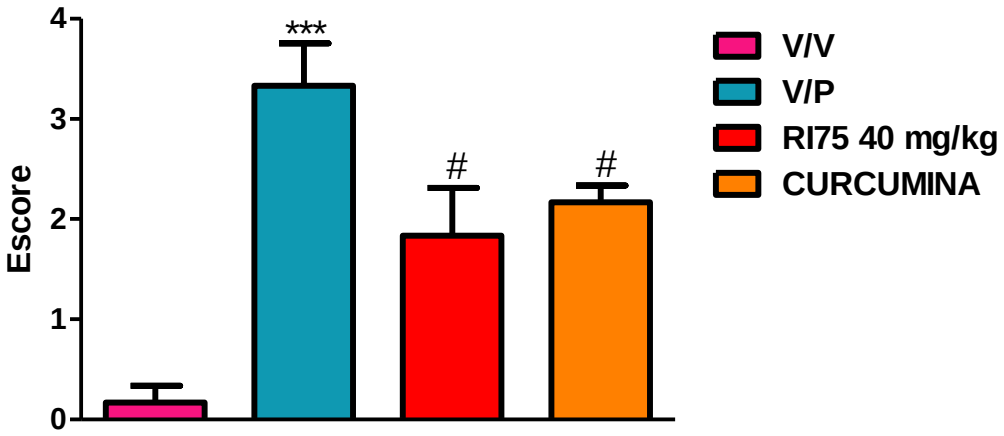
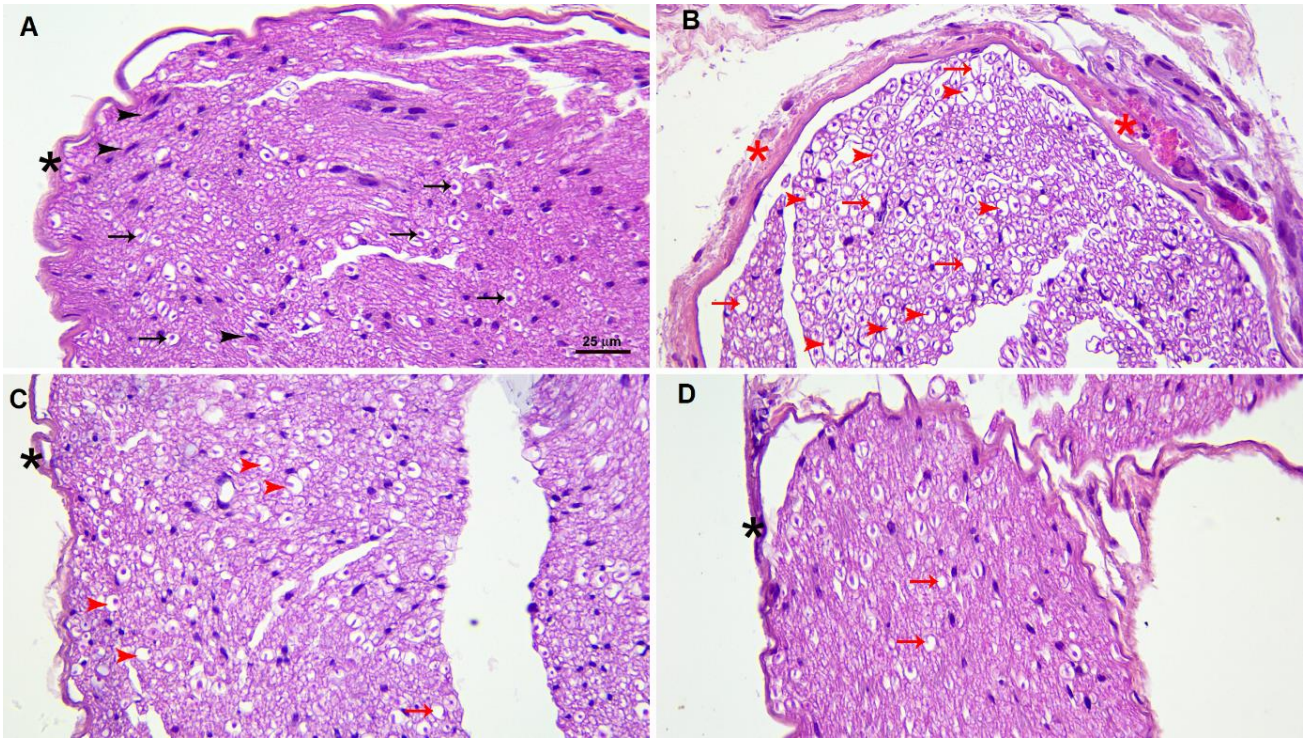


Figura 30 - Alterações histológicas do nervo isquiático induzidas pelo paclitaxel em animais que receberam administração única de (B) veículo (1% Tween 80, 10 mL/kg, i.p.), (C) curcumina (40 mg/kg, i.p.) ou (D) RI75 (40 mg/kg). (A) indica aspecto morfológico de nervo isquiático de animal que não foi tratado com paclitaxel. Astericos representam o tecido conjuntivo do perineuro. Setas representam as fibras nervosas caracterizadas pela presença de axônios centralizados e envolvidos por área mais clara, correspondente à mielina. Cabeças de seta representam os núcleos de células de Schwann. Aumento: 400 x.




### 6.6 Efeitos do RI75 sobre a viabilidade celular e a produção de TNF-α e IL-1β *in vitro*

O estudo de citotoxicidade foi realizado frente a linhagem de macrófagos RAW 264.7. Células previamente estimuladas por LPS foram expostas a concentrações variadas do RI75 (0,2 -125 µM), por 24 h. Posteriormente, a viabilidade foi avaliada usando o ensaio com a SRB. Metade da concentração inibitória (IC50) para RI75 foi

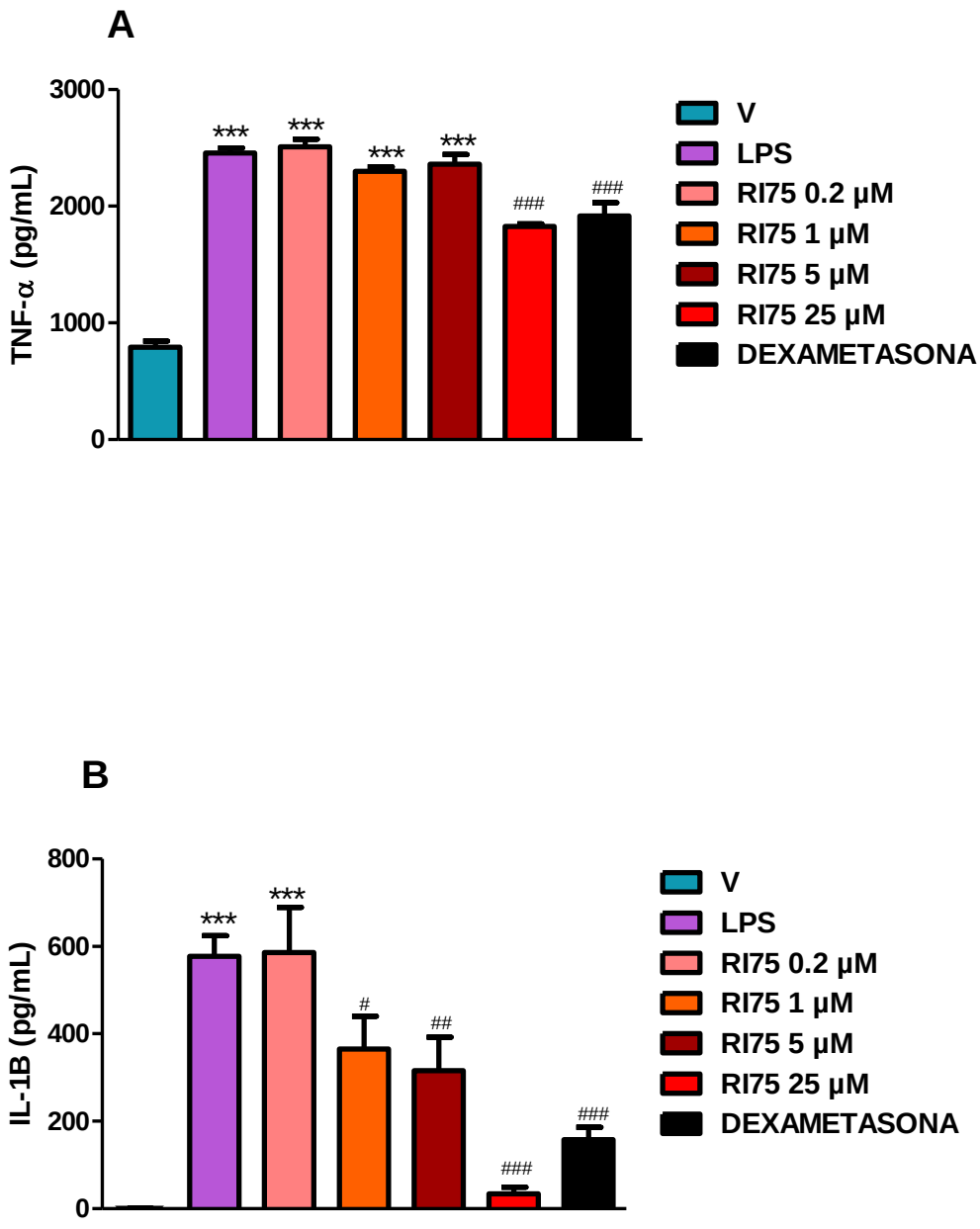
obtida e é mostrada na Tabela 1. Como o veículo e a dexametasona não induziram citotoxicidade, não foi possível calcular um valor de IC50 para tais grupos.

Tabela 1 IC50 de RI75 contra RAW 264.7

| **Células** | **RI75 (µM)** |
|---|---|
| RAW 264.7 | 64,26 ± 5,95 |

Após o período de tratamento com RI75 (0,2-25 µM), o sobrenadante foi submetido à análise das concentrações de TNF-α e IL-1β. A concentração mais elevada do RI75 reduziu a concentração de TNF-α (V = 792,4 ± 52,14 pg/mL, LPS = 2456 ± 43,84 pg/mL, RI75 0,2 µM = 2509 ± 64,13 pg/mL, RI75 1 µM = 2299 ± 39,72 pg/mL, RI75 5 µM = 2361 ± 83,62 pg/mL, RI75 25 µM = 1827 ± 21,18 pg/mL e dexametasona= 1916 ± 114,4 mL) (Figura 31 A). Em contrapartida, as concentrações de 1, 5 e 25 µM do RI75 atenuaram a concentração de IL-1β (V = 0,9852 ± 0,98 pg/mL, LPS = 576,9 ± 47,17 pg/mL, RI75 0,2 µM = 585,8 ± 103,0 pg/mL, RI75 1 µM = 365,3 ± 75,06 pg/mL, RI75 5 µM = 315,4 ± 76,91 pg/mL, RI75 25 µM = 34,14 ± 15,75 pg/mL e dexametasona= 158,4 ± 28,26 pg/mL) (Figura 31 B).

Figura 31 - Efeitos induzidos por RI75 (0,2, 1, 5 e 25 µM), dexametasona (0,1 µM) ou veículo sobre as concentrações de TNF-α (A) e IL-1β (B) em células RAW 264.7 estimuladas com LPS. V=veículo. *** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (p<0,001). #, ## e ### indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo LPS (p<0,05, p<0,01 e p<0,001, respectivamente).



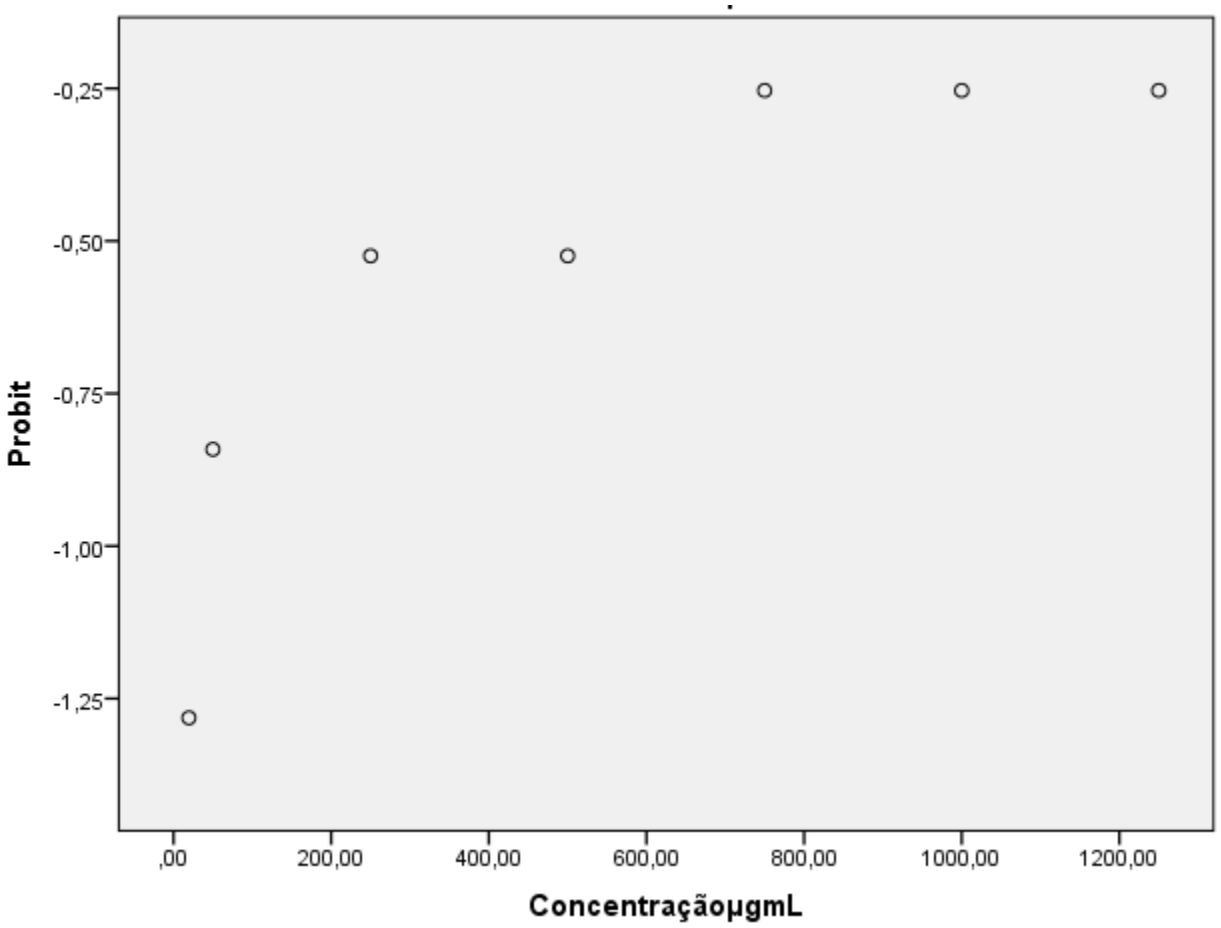
### 6.7 Toxicidade induzida pelo RI75 em invertebrados

O teste de toxicidade em *Artemia salina L.* foi realizado na faixa de concentração de 19,5 - 1250 µg/mL de RI75. Em nenhuma das concentrações avaliadas houve letalidade superior a 50% (Tabela 2). A concentração de 1250 µg/mL foi a última sem a presença de precipitados que pudessem interferir na análise, o que impossibilitou o aumento da concentração. O valor de DL50 estipulado foi 1411,621 µg/mL. O gráfico de dispersão Probit pode ser visto em função da concentração (Figura 32). Embora importante, o método não permitiu calcular o intervalo de confiança, pois exigiria que alguns dos valores ultrapassassem 50% de mortalidade.

Tabela 2 Toxicidade do RI75 (19.5 – 1250 µg/mL) em *Artemia salina* L. expressa em % de letalidade

| RI75 (µg/mL) | % de Letalidade (Replicata 1) | % de Letalidade (Replicata 2) |
|---|---|---|
| 19.5 | 10 | 20 |
| 50 | 20 | 40 |
| 250 | 30 | 30 |
| 500 | 30 | 40 |
| 750 | 40 | 30 |
| 1000 | 40 | 50 |
| 1250 | 40 | 50 |

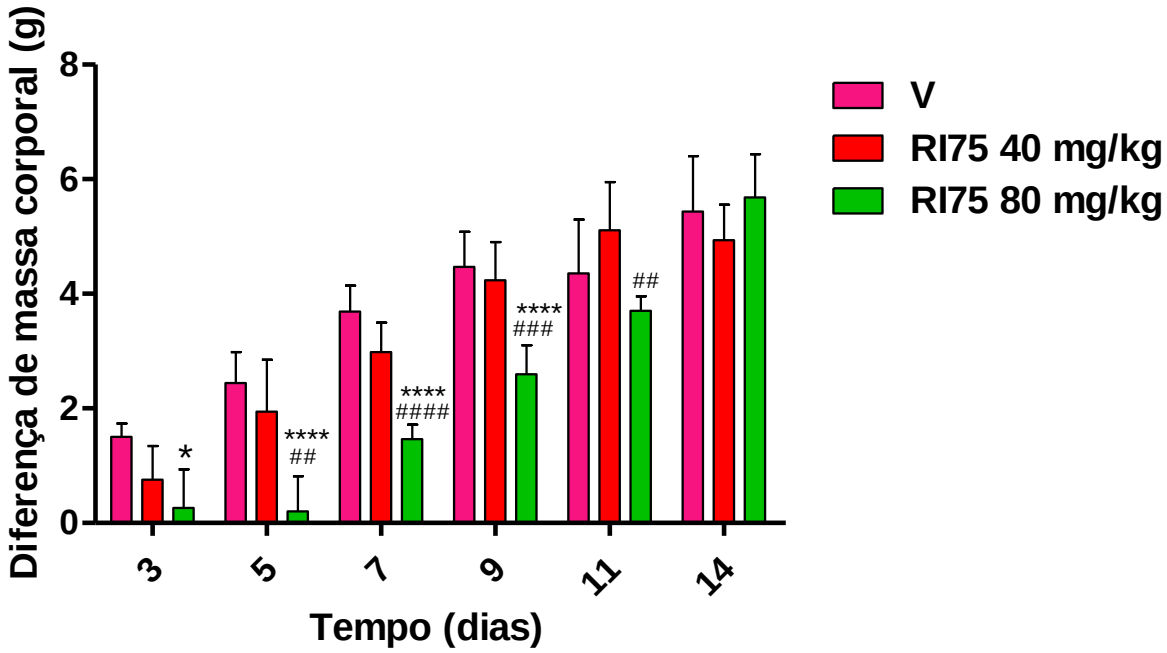
Figura 32 - Dispersão Probit em função da concentração de RI75




## 6.8 Toxicidade aguda do RI75 em camundongos

A variação da massa corporal é mostrada na Figura 33. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com veículo e RI75 (40 mg/kg). Entretanto, o grupo tratado com RI75 (80 mg/kg) teve redução da massa corporal nos dias 3, 5, 7 e 9 em relação ao grupo tratado com veículo e, nos dias 5, 7, 9 e 11, em relação ao grupo tratado com RI75 (40 mg/kg). Ao final do experimento, os animais recuperaram o ganho de massa e as massas corporais foram semelhantes em todos os grupos experimentais.

Figura 33- Efeito induzido pela administração única do RI75 (40 ou 80 mg/kg) sobre a variação da massa corporal ao longo de 14 dias. V= veiculo. * e **** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (p<0.05 e p<0.001, respectivamente). ##, ### e #### indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo RI75 40 mg/kg (p<0,01, p<0,001 e p<0,0001 respectivamente). n= 6.

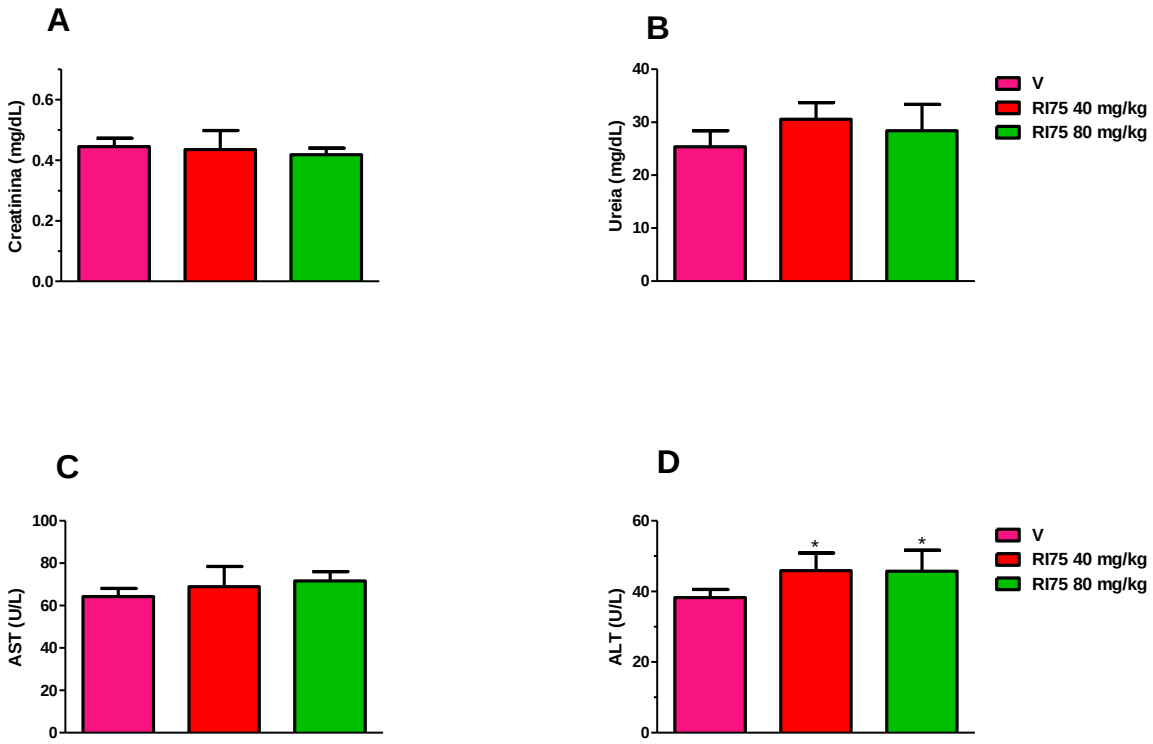



Sinais de toxicidade, como prostração, incoordenação motora, piloereção ou morte, não foram observados no período de 14 dias após a administração do RI75. Em virtude dos tratamentos não ocasionarem mortalidade, ao fim do período de observação, realizou-se a eutanásia. Não foram detectadas alterações macroscópicas significativas dos órgãos avaliados. Parâmetros hematológicos, como eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, leucócitos e linfócitos (Tabela 3) e parâmetros bioquímicos, como creatinina sérica (Figura 34 A), uréia (Figura 34 B) e atividade da AST (Figura 34 C), também não foram alteradas. Apenas um aumento de baixa magnitude da atividade da ALT, aproximadamente 1,5 vezes maior que a do grupo controle, foi observada 14 dias após administração única do RI75 (Figura 34 D).

Tabela 3 Parâmetros hematológicos avaliados após tratamento com RI75 ou veículo

| Parâmetros | Veículo | RI75 40mg/kg | RI75 80mg/kg |
|---|---|---|---|
| Eritrócitos (cel/mm$^3$ x10$^3$) | 6,3 ± 0,3 | 6,0 ± 0,6 | 5,5 ± 0,7 |
| Hemoglobina (g/dL) | 13,3 ± 0,8 | 12,3 ± 1,6 | 11,1 ± 1,9 |
| Hematócrito | 33,4 ± 1,5 | 31,8 ± 3,6 | 29,3 ± 4,0 |
| Leucócitos (cel/mm$^3$ x10$^3$) | 4,2 ± 0,9 | 3,6 ± 0,9 | 3,4 ± 0,6 |
| Linfócitos(cel/mm$^3$x10$^3$) | 1,9 ± 0,5 | 1,6 ± 0,3 | 1,5 ± 0,3 |

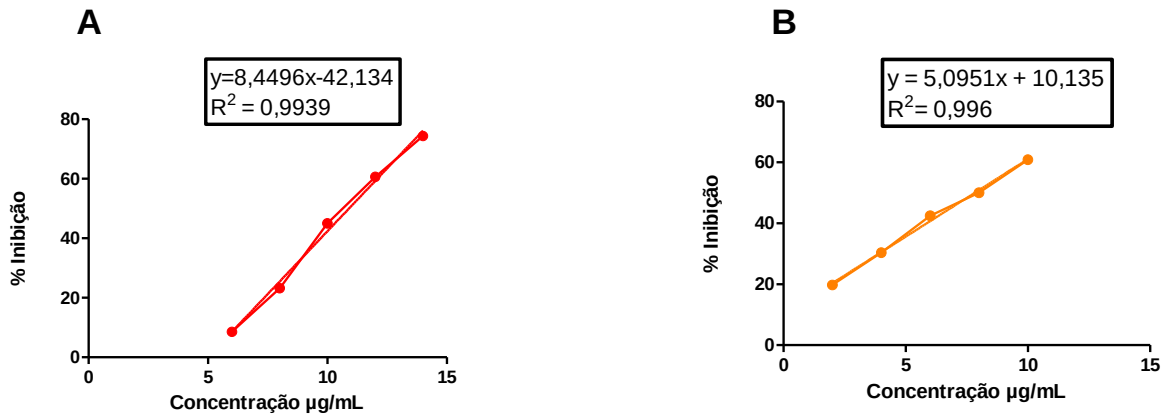
*Figura 34* - Efeito induzido pelo RI75 (40 ou 80 mg/kg) sobre parâmetros bioquímicos usados para avaliação da toxicidade renal e hepática aguda. V= veículo. (A) Creatinina, (B) ureia, (C) AST, (D) ALT. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (p<0,05). n=6.



## 6.9 Atividade antioxidante do RI75

Na Figura 35, estão representadas as curvas analíticas das amostras de RI75 e curcumina em triplicata. A curva obtida para RI75 (Figura 35 A) foi y=8,4496x-42,134; $R^2$= 0,9939 (IC50= 10,90 µg/mL). Para a curcumina (Figura 35 B), a curva obtida foi y = 5,0951x + 10,135; $R^2$= 0,996 (IC50= 7,82 µg/mL). Por meio do $R^2$, coeficiente de determinação, é possível observar que as maiores concentrações de RI75 e curcumina, induziram respostas proporcionais em relação à atividade antioxidade. O resultado obtido, sugere que o RI75 induz efeito antioxidante, assim como a curcumina.

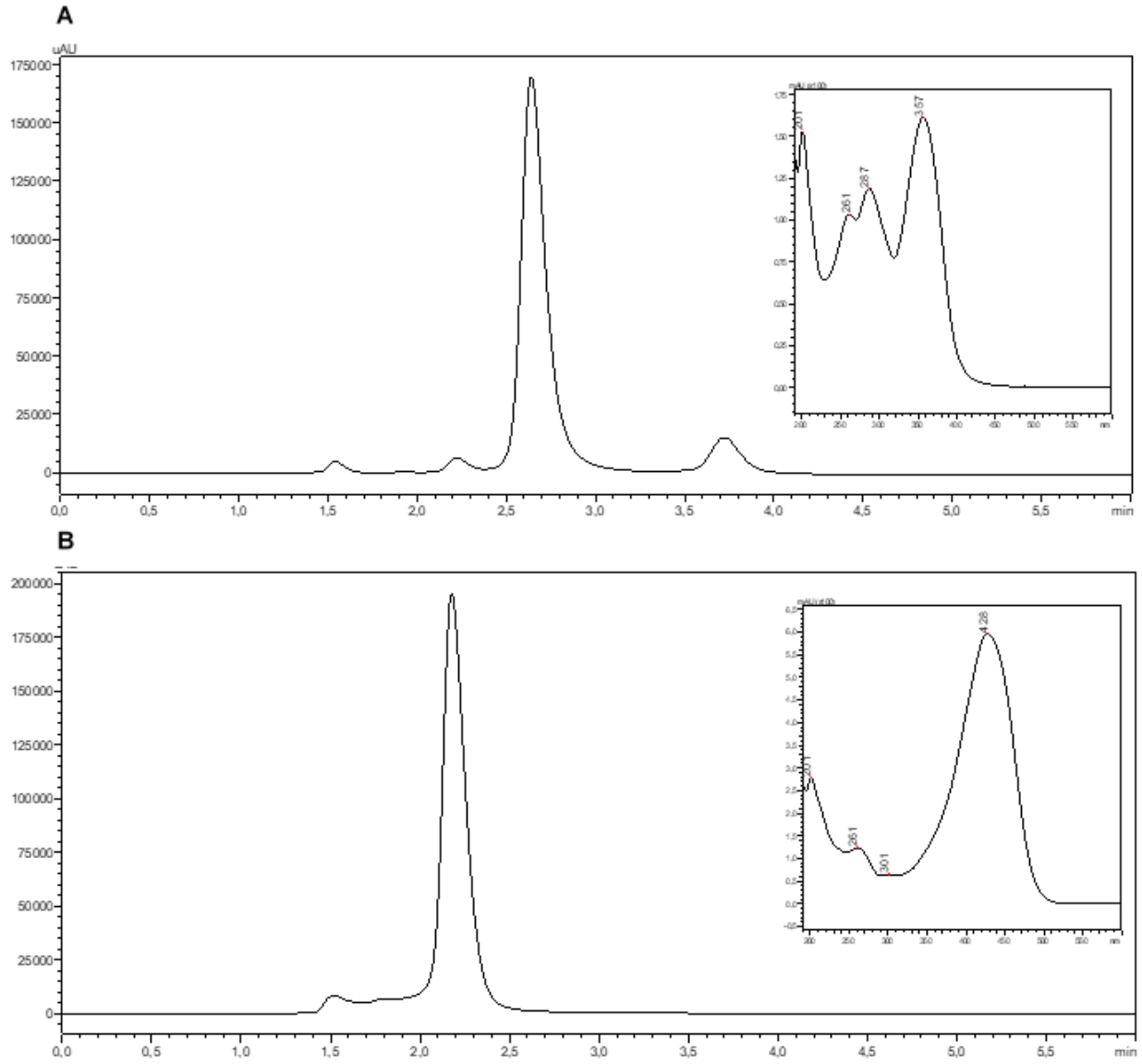
Figura 35 - Curva analítica das análises da atividade antioxidante de RI75 (A) e curcumina (B)




## 6.10 Perfil cromatográfico preliminar do RI75

Os perfis cromatográficos do RI75 e da curcumina podem ser visualizados na Figura 36. É possível observar os picos de absorção característicos da curcumina - $\lambda_{425}$ = 261,301,428 (VARDHINI et al., 2023). Para o RI75, os picos de absorção foram $\lambda_{425}$ = 261,287,357.

Figura 36 - Cromatograma em CLAE do RI75 (A) e curcumina (B) e seus respectivos espectros de absorção




Para a avaliação preliminar da estabilidade das soluções submetidas ao cromatograma, as amostras preparadas foram injetadas em diferentes tempos (6 a 600 h), conforme apresentado na Tabela 4. Não houve diferenças significativas ao longo do período avaliado, considerando a variabilidade instrumental, indicando a estabilidade do RI75 frente as condições de preparo amostral.

Tabela 4 Teores de RI75 e curcumina avaliados por HPLC, em 370 nm, em função da área inicial cromatográfica (T0)

| Tempo (h) | RI75 | Curcumina |
|---|---|---|
| **6** | 100,29 ± 0,15 | 100,14 ± 0,10 |
| **12** | 100,47 ± 0,11 | 99,41 ± 0,05 |
| **18** | 100,20 ± 0,14 | 99,99 ± 0,01 |
| **24** | 99,96 ± 0,14 | 99,89 ± 0,07 |
| **30** | 99,42 ± 0,17 | 100,04 ± 0,11 |
| **48** | 100,45 ± 0,13 | 100,08 ± 0,12 |
| **72** | 98,45 ± 0,05 | 99,52 ± 0,10 |
| **96** | 97,40 ± 0,07 | 99,90 ± 0,18 |
| **120** | 97,54 ± 0,16 | 99,93 ± 0,14 |
| **600** | 97,64 ± 0,59 | 98,63 ± 0,18 |

## 7 DISCUSSÃO

A eficácia reduzida e a segurança inadequada de muitos fármacos utilizados como analgésicos representam uma grande limitação da farmacoterapia atualmente disponível e instigam a busca por novas terapias para pacientes com condições álgicas. Nesse contexto, as plantas medicinais constituem uma fonte potencial para a descoberta de novas substâncias biologicamente ativas e uma alternativa terapêutica para o tratamento de pacientes com diversas condições patológicas (CASTILHO & BRAGA, 2011).

A curcumina é um importante componente da cúrcuma, uma planta empregada na medicina tradicional, principalmente pelas suas propriedades anti-inflamatória, analgésica, antioxidante e antimicrobiana. Entretanto, devido à baixa biodisponibilidade, a atividade da curcumina não é robusta (SUETH-SANTIAGO et al., 2015). Tendo em vista essa limitação, abordagens como síntese de análogos estruturais e uso de nanopartículas, lipossomas ou micelas são realizadas na tentativa de obter moléculas ou formulações com melhores características biofarmacêuticas e efeitos biológicos de maior magnitude (ANAND et al., 2007; GUPTA et al., 2012). Numerosos estudos demonstraram que análogos da curcumina apresentam atividade em diversos modelos de inflamação e

dor. Liang et al. (2008), após observarem que a porção β-dicetona presente na molécula da curcumina contribui para sua má absorção e metabolismo rápido, projetaram análogos monocarbonílicos da curcumina visando à exclusão do grupo metileno e um grupo carbonil e a obtenção de moléculas mais estáveis. Tais análogos, em modelo de inflamação *in vitro* em células J774A.1 estimuladas por LPS, foram capazes de atenuar as concentrações de IL-6 e TNF-α. Resultado similar foi obtido para outra série de análogos monocarbonílicos em células RAW 264.7 sensibilizadas por LPS (ZHAO et al., 2010). Um análogo da curcumina, derivado de diarilpentanoides, teve seu efeito antinociceptivo envolvendo mecanismos centrais e periféricos comprovado em modelos de contorção abdominal, placa quente e formaldeído (KAMARUDIN et al., 2018).

Recentemente, fornecemos resultados preliminares indicando que o RI75, análogo da curcumina, atenuou a alodinia mecânica induzida pelo paclitaxel, um modelo bem conhecido de DNIQ (COSTA et al., 2022). No presente estudo, confirmamos a atividade do RI75 no modelo experimental de alodinia mecânica induzida pelo paclitaxel e sugerimos a redução da produção de citocinas inflamatórias, a ativação das vias opioidérgica, canabinoidérgica e serotoninérgica/histaminérgica e as atividades neuroprotetora e antioxidante como possíveis mecanismos subjacentes a essa atividade. Ainda, resultados preliminares demonstram que o RI75 pode ser considerado seguro e estável nas condições amostrais.

O modelo experimental de DNIQ utilizado nesse estudo é amplamente empregado na avaliação da atividade antinociceptiva de diferentes compostos. Administrações repetidas de paclitaxel induziram uma redução acentuada e duradoura do limiar nociceptivo, confirmando, assim, os resultados de muitos estudos pré-clínicos (BACALHAU; COSTA-PEREIRA; TAVARES, 2023; STAFF et al., 2020). Administrações diárias de RI75 aumentaram o limiar nociceptivo dos animais sensibilizados pelo paclitaxel. Análogos naturais como a tetrahidrocurcumina também induzem efeito antinociceptivo em animais apresentando neuropatia periférica induzida por quimioterápico (GREESHMA; PRASANTH; BALAJI, 2015). Limcharoen et al. (2021), demonstraram que a CurDDG, um pró-fármaco curcuminoide, atenuou a alodínia mecânica e a hiperalgesia térmica em camundongos submetidos à constrição do nervo isquiático. Ainda, análogos sintéticos, como J147 (N - (2,4-dimetilfenil) -2,2,2-trifluoro- N -

[(E)-(3-metoxifenil) metilidenamino] acetamida) e o B14 (1E, 4E)-1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona), atenuaram a expressão de marcadores neuroinflamatórios como TNF-α e IL-1β induzida por estreptozotocina e câncer ósseo, respectivamente, aumentando o limiar nociceptivo dos animais (DAUGHERTY et al., 2018; XU et al., 2019). Nossos resultados com a curcumina corroboram resultados de estudos anteriores, os quais demostraram que a curcumina induz efeito antinociceptivo em modelos de dor neuropática induzida por vincristina (BABU; PRASANTH; BALAJI, 2015), oxaliplatina (ZHANG et al., 2020) ou lesão por constrição crônica (LIU et al., 2016; ZHU et al., 2014), álcool (KANDHARE et al., 2012) e estreptozotocina (SHARMA et al., 2006). A pregabalina, fármaco amplamente utilizado no manejo da DNIQ, também apresentou atividade marcante. A atividade do RI75 em modelo de dor neuropática representa um resultado de grande interesse quando se vislumbra o desenvolvimento de um novo fármaco, uma vez que há poucas alternativas farmacoterapêuticas para o alívio dessa categoria de dor.

O paclitaxel, quando administrado em dose cumulativa de 8 mg/kg induz sensibilização em modelo de dor neuropática sem alterar parâmetros como massa corporal e coordenação motora (TOMA et al., 2017). Dessa forma, avaliamos o efeito induzido pelo RI75 (40 mg/kg) sobre o ganho de massa corporal quando administrado diariamente em animais sensibilizados por paclitaxel. No primeiro dia após iniciar o tratamento com o RI75, notou-se redução da massa dos animais, que se manteve até o terceiro de dia. Ao final do experimento, o ganho de massa foi recuperado. Uma série de derivados da curcumina tiveram atividades descritas em modelos pré-clínicos de obesidade superiores à da curcumina, modulando aspectos clínicos como adipogênese, metabolismo lipídico, resistência à insulina, esteatose hepática, lipotoxicidade, inflamação, estresse oxidativo, e dislipidemia (MOETLEDIWA et al., 2023). Uma revisão realizada por Gupta et al. (2012) compilou dados acerca da atividade da curcumina em modelos murinos de obesidade e diabetes, que resultaram em redução no ganho de massa corporal, supressão da angiogênese do tecido adiposo; efeito anti-hiperglicêmico e melhora da resistência à insulina. Entretanto, em um estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, pacientes obesos, suplementados com curcumina (1 g/dia) durante um mês, não tiveram melhora do perfil lipídico geral, bem como da massa e

índice de massa corporal, apesar das concentrações séricas de triglicerídeos serem diminuídas (MOHAMMADI et al., 2013).

Visando à investigação do papel dos receptores canabinoidérgicos, opioidérgicos e serotoninérgicos e também dos canais KATP na atividade do RI75 no modelo de neuropatia induzida por paclitaxel, foram utilizadas as seguintes ferramentas farmacológicas: AM251, naltrexona, ciproheptadina e glibenclamida.

O sistema endocanabinoide é composto por receptores acoplados à proteína G (CB1 e CB2) e os canabinoides endógenos. Os receptores CB1 estão localizados predominantemente em neurônios do SNC e periferia. Sua ativação inibe a liberação de neurotransmissores excitatórios, modulando o efluxo de $K^+$, diminuindo o potencial de ação e inibindo o processamento nociceptivo. Por outro lado, os receptores CB2 são encontrados, majoritariamente, em células imunológicas (BURSTON; WOODHAMS, 2014; GUINDON; HOHMANN, 2009). Em nosso estudo, o AM251, um antagonista de receptores CB1 (GATLEY et al., 1996), atenuou a atividade antinociceptiva do RI75. Também, foi demonstrado que AM251 inibe a atividade da curcumina no modelo de dor inflamatória induzida pela carragenina (AGUIAR et al., 2022). Em conjunto, estes resultados sugerem a participação do sistema endocanabinoide na atividade antinociceptiva do RI75.

Não está claro como isso ocorre, mas estudo anterior demonstrou que administrações repetidas de curcumina aumentaram a liberação de N-araquidoniletanolamina e 2-araquidonilglicerol, endocanabinoides que se ligam aos receptores $CB_1$, em algumas regiões cerebrais de ratos (HASSANZADEH; HASSANZADEH, 2012). Assim, a liberação de endocanabinoides, após tratamento com curcumina ou seus análogos, pode ser sugerida como um mecanismo potencial que medeia a atividade antialodínica desses compostos.

O sistema opioidérgico endógeno consiste de peptídeos e seus receptores, que estão amplamente distribuídos no SNC e em tecidos periféricos. A interação desses peptídeos com os receptores em neurônios pré-sinápticos reduz a liberação de neurotransmissores, como glutamato, inibindo a propagação do potencial de ação, ou seja, inibe a transmissão do sinal nociceptivo, diminuindo a sensação dolorosa (BENARROCH, 2012). A naltrexona, um antagonista não seletivo de receptores

opioidérgicos (TOLJAN; VROOMAN, 2018), foi utilizada para investigar se a via opioidérgica poderia mediar a atividade antinociceptiva do RI75. A administração prévia de naltrexona inibiu a atividade antinociceptiva do RI75, indicando que essa atividade depende, em parte, da ativação de vias opioidérgicas. Entretanto, não está claro se RI75 interage diretamente com receptores opioidérgicos ou estimula a liberação de peptídeos endógenos, ações que poderiam contribuir para sua atividade antinociceptiva.

O envolvimento das vias opioidérgicas na atividade da curcumina e análogos também foi demonstrado por outros autores. A atividade da curcumina nos modelos de alodinia mecânica induzida por lesão constritiva crônica (ZHAO et al., 2012), carragenina (AGUIAR et al., 2022), estreptozotocina (BANAFSHE et al., 2014) ou câncer ósseo (ZHAO et al., 2021) em camundongos, foi revertida por diferentes antagonistas opioidérgicos. Além disso, a atividade de um análogo da curcumina, 2,6-bis-(4-hidroxi-3-metoxibenzilideno)ciclohexanona, em modelos de nocicepção induzida por estímulos químico e térmico em roedores, foi atenuada pela naloxona (MING-TATT et al., 2012). A ativação das vias opioidérgicas como mecanismo subjacente à atividade antialodínica exibida pela curcumina, RI75 e outros análogos da curcumina pode ser sugerida após todos esses resultados.

Adicionalmente, é importante mencionar que nos neurônios primários do GRD, a curcumina regulou positivamente a expressão de proopiomelanocortina e aumentou a liberação dos peptídeos opioides β-endorfina e encefalina (ZHAO et al., 2021). Esses autores também demonstraram que o pré-tratamento com anti-soro para β-endorfina ou encefalina atenuou a atividade antialodínica da curcumina em um modelo de dor desencadeada por câncer ósseo. Assim, o aumento da liberação de peptídeos opioides endógenos pode ser sugerido como um mecanismo que medeia a atividade antialodínica da curcumina e seus análogos.

A serotonina (5-HT), uma monoamina amplamente distribuída na periferia e no SNC, possui ações complexas no processamento e modulação da dor. A nível periférico, possui atividade hiperalgésica, enquanto a nível central, suas ações resultam em inibição do processamento nociceptivo (SOMMER, 2010; VIGUIER et al., 2013). Na medula espinhal, os receptores serotoninérgicos estão presentes em neurônios aferentes primários, de projeção e nos interneurônios excitatórios e inibitórios, o que torna a ação

serotoninérgica complexa. Assim, o bloqueio ou depleção da 5-HT espinhal pode aumentar a nocicepção. Ademais, a 5-HT inibe a liberação de glutamato pelos nociceptores e interage com diferentes subtipos de receptores presentes nos neurônios das camadas mais externas do corno dorsal, induzindo a abertura de canais para $K^+$ e fechamento de canais para $Ca^{2+}$ por inibição da adenilato ciclase, gerando hiperpolarização e, consequentemente, diminuição da transmissão sináptica (SOMMER, 2010). A ciproheptadina, um antagonista de receptores serotoninérgicos, quando administrada previamente, atenuou a atividade do RI75 no modelo de neuropatia. Em um modelo de dor visceral, a administração prévia de ciproheptadina ou metisergida reverteu o efeito antinociceptivo da curcumina, de modo a aumentar significativamente as contorções abdominais induzidas por ácido acético (MOTAGHINEJAD et al., 2015; PARK et al., 2012). Embora a ciproheptadina não seja um antagonista serotoninérgico seletivo (GRAUDINS; STEARMAN; CHAN, 1998), esses resultados levam à sugestão de que a ativação de vias serotoninérgicas possa contribuir para a atividade antinociceptiva do RI75.

Desse modo, nossos resultados corroboram estudo anterior, no qual observamos que a atividade antinociceptiva do RI75 em modelo de dor inflamatória induzida por carragenina está relacionada com a ativação de mecanismos opioidérgicos e serotoninérgicos (COSTA et al., 2022).

A ativação de canais KATP pode causar uma hiperpolarização dos terminais periféricos de neurônios aferentes, diminuindo a propagação do potencial de ação e inibindo o processamento nociceptivo (TSANTOULAS; MCMAHON, 2014). Entretanto, a glibenclamida, um bloqueador de canais KATP (ASHCROFT; GRIBBLE, 2000), não alterou a atividade antinociceptiva do RI75, sugerindo que a ativação desses canais não seja relevante para a atividade desse análogo de curcumina. .

A fim de avaliar o efeito do RI75 sobre o processo inflamatório induzido pelo paclitaxel, concentrações de citocinas inflamatórias foram determinadas em amostras de vários tecidos. O nervo isquiático, maior nervo dos mamíferos, origina-se no plexo lombosacral. O potencial de ação, gerado após ativação de nociceptores por estímulos nocivos diversos, é conduzido ao longo de nervos até a medula espinhal ou tronco cerebral (GIUFFRE; BLACK; JEANMONOD, 2024). Os GRD, por sua vez, são estruturas

altamente complexas localizadas próximas à medula espinhal. Nos GRD estão os corpos celulares de neurônios sensoriais primários, que contém as fibras sensoriais responsáveis por conduzir sinais sensoriais da periferia ao SNC (BERGER et al., 2021). O tálamo, por sua vez, é a principal estrutura de projeção da via espinotalâmica e está envolvido no processamento da informação nociceptiva antes da transmissão para o córtex cerebral (AB AZIZ; AHMAD, 2006). Em virtude da participação dessas estruturas no processamento nociceptivo, amostras de nervo isquiático, GRD e tálamo foram dissecadas para a determinação das concentrações de citocinas. A inflamação induzida pelo paclitaxel, em parte, é decorrente do aumento da expressão citocinas como IL-1β, IL-6, IL-8 e TNF-α, e quimiocinas, tais como CXCL1, CXCL12, CX3CL1 (KLEIN; LEHMANN, 2021; SISIGNANO et al., 2014). Em nosso estudo, a administração de paclitaxel aumentou as concentrações dos mediadores inflamatórios CXCL-1 e TNF-α. Pesquisas apontam que o quimioterápico acumula-se nos nervos e GRD, após permear a barreira hematoneural (CAVALETTI et al., 2001), e aumenta o número de macrófagos ativados (PETERS et al., 2007; ZHANG et al., 2016), fonte potencial de TNF-α e CXCL-1 (SISIGNANO et al., 2014). O aumento das concentrações de mediadores inflamatórios no tálamo também parece estar envolvido no desenvolvimento de diferentes condições dolorosas, incluindo a dor neuropática (HESS et al., 2011; VANIA et al., 2006). Esse aumento pode estar relacionado com maior ativação de células microgliais no tálamo, o que contribui para a hiperexcitabilidade neuronal (BANATI et al., 2001). O tratamento com RI75 ou curcumina reduziu as concentrações de CXCL-1 e TNF-α nas amostras avaliadas. Greeshma et al. (2015) observaram que a tetrahidrocurcumina atenuou a concentração de TNF-α no nervo isquiático, em modelo de dor neuropática induzida por vincristina em ratos. A redução de mediadores inflamatórios foi observada para a formulação à base de curcumina em diferentes estudos de neuropatias (BASU; MAIER; BASU, 2021; KANDHARE et al., 2012; LIMCHAROEN et al., 2021; SAFFARPOUR et al., 2021). Outros estudos demonstraram que a inibição da produção de TNF-α também pode ser um mecanismo subjacente aos efeitos inibitórios da pentoxifilina (BOYETTE-DAVIS; WALTERS; DOUGHERTY, 2015), da rapamicina (HUNG; LIM; DOSHI, 2017) e de um agonista dos receptores para adenosina (JANES et al., 2014) sobre a sensibilização induzida pelo paclitaxel. Além disso, em um modelo de lesão por constrição crônica de

nervo espinhal, a inibição de CXCL-1 pela administração intratecal de um anticorpo neutralizante atenuou a alodinia mecânica e a hiperalgesia térmica (UEDA et al., 2018).

Em próxima etapa do presente estudo, investigamos os efeitos do RI75 em células de macrófagos RAW 264.7. As células de macrófagos RAW 264.7 são originárias de uma linhagem celular transformada pelo vírus da leucemia Abelson derivado de camundongos BALB/c. Essa linhagem celular é sensível ao LPS e exibe ativação do receptor Toll-like-4 (TLR-4). O LPS, presente em bactérias gram-negativas, interage com receptores TLR-4 e desencadeia respostas inflamatórias. Assim, a estimulação dessas células com LPS é um modelo experimental amplamente utilizado para avaliar efeitos anti-inflamatórios de vários compostos (FACCHIN et al., 2022). A estimulação com LPS reduziu a viabilidade celular, bem como, aumentou os níveis de citocinas inflamatórias. Uma vez que concentrações de RI75 superiores a 64,26 µM foram citotóxicas, concentrações até 25 µM foram usadas no teste imunoenzimático, afim de garantir que a redução no número de células não interferisse no resultado. Corroborando com o resultado anterior, o RI75 também reduziu a produção das citocinas inflamatórias pelas células RAW 264.7. O tratamento com RI75 reduziu a produção de IL1-β nas concentrações de 1, 5 e 25 µM. Entretanto, apenas a concentração mais elevada atenuou a produção de TNF-α. Esse resultado demonstra que o RI75, assim como descrito para a curcumina, diminui a produção de mediadores inflamatórios. Abe et al. (1999) observaram que a curcumina inibe a produção de IL-8, MIP-1α, MCP-1, IL-1β e TNF-α por cultura celular de monócitos do sangue periférico humano e macrófagos alveolares estimulados por PMA ou LPS. Em culturas de células RAW 264.7 estimuladas com LPS de *Porphyromonas gingivalis*, o pré-tratamento com 20 ou 30 µM de curcumina reduziu a expressão gênica de TNF-α e IL-1β. Uma redução significativa na produção de TNF foi observada com as concentrações de 10, 20 e 30 µM, enquanto apenas as concentrações de 20 e 30 µM reduziram a produção de IL-1β (CHEN et al., 2008). Em suma, como as citocinas inflamatórias desempenham um papel crítico na gênese da DNIQ (HUNG; LIM; DOSHI, 2017), a inibição de sua produção pode ser um mecanismo importante que medeia as atividades antialodínicas do RI75 e da curcumina.

Concentrações aumentadas de citocinas nas estruturas do sistema nervoso periférico e central (RAMESH; MACLEAN; PHILIPP, 2013; WIESELER-FRANK; MAIER;

WATKINS, 2005) podem contribuir para o desenvolvimento de alterações fenotípicas neuronais subjacentes à sensibilização induzida pelo paclitaxel. A análise do nervo isquiático de camundongos tratados com paclitaxel demonstrou degeneração axonal grave, perda da integridade da mielina, redução da densidade das fibras e do número de axônios (BOEHMERLE et al., 2014; HUEHNCHEN et al., 2020; SCRIPTURE; FIGG; SPARREBOOM, 2006; TOMA et al., 2017). No presente estudo, a neurotoxicidade do paclitaxel foi caracterizada por alterações morfológicas marcantes do nervo isquiático, como desorganização e espessamento do epineuro e perineuro e axônios retraídos posicionados excentricamente. Alterações degenerativas, perda axonal e edema também foram evidentes. Em contrapartida, nos animais tratados com única dose de RI75 ou curcumina, foi observada redução parcial dessas alterações, indicando alterações degenerativas limitadas. Yardim et al. (2021) também observaram uma diminuição acentuada na vacuolização e degeneração neuronal do nervo isquiático de ratos sensibilizados com paclitaxel e tratados com curcumina. Assim, a redução da neurotoxicidade do paclitaxel pode ser sugerida como um mecanismo adicional que medeia a atividade antialodínica do RI75.

A fim de se obter informações preliminares sobre a segurança do RI75, ensaios de toxicidade foram conduzidos. O ensaio de letalidade de artêmia é comumente empregado como um método preliminar para a análise da toxicidade de compostos naturais ou sintéticos (FREIRES et al., 2023). Meyer et al. (1982) estabeleceram os critérios para a classificação de toxicidade: amostras que apresentam CL50 < 1000 µg/mL são consideradas tóxicas e aquelas com CL50 > 1000 µg/mL não são consideradas tóxicas. O RI75 apresentou uma CL50 estimada > 1000 µg/mL, sendo, portanto, classificado como não tóxico. No modelo de toxicidade aguda em camundongos, observamos que o grupo tratado com RI75 80 mg/kg apresentou ligeira redução no ganho de massa corporal até o 9° dia de observação. Entretanto, tal redução foi reversível, sendo que, ao final do experimento, os animais desse grupo apresentaram massa corporal média equiparável às dos demais grupos. A variação da massa corporal é uma informação importante quando se busca avaliar a toxicidade de algum composto, haja visto que variações da massa corporal de modo diferente do esperado pode ser sinal do desenvolvimento de doenças e alterações tanto centrais como periféricas (SUCKOW et

al., 2006). A administração de RI75, em qualquer uma das doses, não induziu alterações comportamentais, nefrotoxicidade ou óbito. Apesar de ser observado um discreto aumento da atividade da ALT nos grupos tratados com RI75, essa elevação não prediz lesão hepática (JOHNSTON, 1999). Além disso, a atividade da AST permaneceu inalterada, sugerindo um perfil seguro para as duas doses testadas. O resultado preliminar encontrado para RI75 condiz com o perfil da curcumina, que é reconhecida pela FDA como uma substância, geralmente, segura. Estudos em roedores não mostraram toxicidade ou mortalidade observada com a curcumina, administrada em doses de 0,1 a 5 g/kg por até 14 dias. A segurança da curcumina também foi relatada em ensaios clínicos em voluntários saudáveis, nos quais diferentes doses do composto, 100 a 12.000 mg, administradas em intervalos de tempo variados, induziram poucos ou nenhum efeito adverso (DENISON et al., 2023). Assim, os resultados preliminares obtidos sugerem que RI75 pode ser considerado seguro nas doses testadas.

A curcumina é reconhecida por sua atividade antioxidante pronunciada. Acredita-se que tal efeito aconteça em virtude da molécula inibir radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e radical óxido nítrico, bem como aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, como catalase, superóxido dismutase, glutationa peroxidase e heme oxigenase-1 (PULIDO-MORAN et al., 2016). Considerando o exposto, avaliamos o potencial antioxidante do RI75 por meio do ensaio de DPPH, descrito por Manzocco et al. (1998). Esse método, considerado de fácil execução, reprodutível e preciso, é amplamente empregado para avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais e substâncias puras (ALVES et al., 2010). Simirgiotis et al. (2016) adotaram critérios para a classificação da atividade antioxidante de compostos. Assim, amostras que apresentam $IC50 \leq 50$ µg/mL têm alta atividade antioxidante, enquanto amostras com $50$ µg/mL $< IC50 \leq 100$ µg/mL têm atividade antioxidante moderada. Por outro lado, amostras com $IC50 > 200$ µg/mL não têm atividade antioxidante relevante. Uma faixa de concentrações do análogo foi avaliada e determinou-se que a concentração de RI75 necessária para eliminar 50% dos radicais livres do DPPH foi 10,90 µg/mL. O RI75 foi, portanto, considerado um composto com alta capacidade antioxidante. Em nossos estudos, a mesma análise foi empregada para curcumina e o valor encontrado para IC50 foi menor que 50 µg/mL, confirmando que esse composto também apresenta alta

atividade antioxidante. Resultado semelhante foi encontrado no estudo conduzido por Sökmen e Khan (2016), sendo o valor de IC50 = 8,4 µg/mL. Uma recente revisão sistemática (DEHZAD et al., 2023), demonstrou que a suplementação de curcumina em adultos aumentou significativamente a capacidade antioxidante total e reduziu concentrações de malondialdeído e atividade da enzima superóxido dismutase, reforçando as evidências existentes com relação ao seu papel potencial no equilíbrio oxidativo do organismo. Shih et al. (2007) avaliaram a atividade antioxidante de compostos hidrazino-tiazólicos e concluíram que a presença do grupo N-H na porção hidrazino é importante para a atividade, em razão da possibilidade de formação de um radical nessa posição. Dessa forma, acredita-se que, ao reagir com EROS, neutralizando-as, o RI75 impede que fatores de transcrição sejam ativados, diminuindo a expressão de genes importantes para processos inflamatórios e neuropáticos.

A análise de substâncias inéditas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a um Detector de Arranjo de Diodos (DAD) é de extrema importância para a pesquisa científica e indústria farmacêutica. Essa combinação de técnicas oferece alta sensibilidade e especificidade na detecção e quantificação de compostos, de modo a viabilizar a identificação precisa de novos compostos químicos e a avaliação de sua pureza e concentração (KANU, 2021). A CLAE é um método robusto e versátil, capaz de separar misturas complexas, enquanto o DAD fornece um espectro UV-Vis detalhado, possibilitando a análise simultânea de múltiplos comprimentos de onda. Essa abordagem é essencial para a descoberta de novos fármacos, controle de qualidade de produtos farmacêuticos e investigação de substâncias bioativas em amostras naturais, contribuindo, significativamente, para o avanço da ciência e para a segurança dos consumidores (DONG et al., 2021). Por meio da técnica empregada, foi possível observar, pela primeira vez, os máximos de absorção do RI75, que indicam um deslocamento hipsocrômico, possivelmente, atribuído às modificações estruturais realizadas na molécula. Os máximos de absorção para curcumina foram semelhantes aos encontrados na literatura (VARDHINI et al., 2023), ratificando nossos resultados. Ademais, é possível observar contaminantes em ambas as amostras, os quais podem ser frutos de degradação ou de produtos intermediários da síntese, de difícil purificação, os quais precisam ser melhor elucidados futuramente por técnicas espectrométricas.

Embora o estudo da estabilidade de novas moléculas seja importante tendo em vista que a formação de produtos de degradação pode comprometer a eficácia e segurança, o que leva à necessidade da investigação de excipientes estabilizantes em formulações futuras a serem preparadas (POIRIER-LARABIE; SEGURA; GAGNON, 2016), é importante ressaltar que o estudo foi realizado a fim de determinar a estabilidade do RI75 em solução, por um período de 600 h. Em todas as amostras, nenhum pico indicativo de produto de degradação foi observado.

Os resultados do presente estudo indicam uma boa perspectiva da investigação do composto RI75 como um candidato a fármaco para o manejo de condições neuropáticas. Porém, a translação desses resultados pré-clínicos para ensaios clínicos é uma limitação, tendo em vista a diferença entre o elevado número de substâncias que são desenhadas e sintetizadas que apresentam atividade em modelos de dor e inflamação durante estudo pré-clínico e o número real de fármacos analgésicos e anti-inflamatórios que são aprovados por órgãos reguladores. Em estudos futuros, pretendemos expandir nossa investigação, avaliando a atividade do composto RI75 em outros modelos experimentais e os mecanismos envolvidos, bem como o seu perfil farmacocinético.

## 8 CONCLUSÃO

Em conclusão, demonstramos que o RI75 apresenta atividade antinociceptiva em modelo de dor neuropática induzida pelo paclitaxel. Essa atividade está, provavelmente, associada com a ativação de mecanismos canabinoidérgicos, opioidérgicos e serotoninérgicos e redução da produção de citocinas inflamatórias, assim como atividades neuroprotetora e antioxidante. O RI75 também apresentou bom perfil de segurança nos testes avaliados. Por fim, avaliações preliminares contribuiram para caracterizar o perfil cromatográfico da molécula.

## Referências bibliográficas


AB AZIZ, C. B.; AHMAD, A. H. The role of the thalamus in modulating pain. **The Malaysian Journal of Medical Sciences : MJMS**, v. 13, n. 2, p. 11–18, jul. 2006.

ABE, Y.; HASHIMOTO, S.; HORIE, T. Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. **Pharmacological Research**, v. 39, n. 1, p. 41–47, 1 jan. 1999.

ABRAHAMS, S. et al. Antioxidant effects of curcumin in models of neurodegeneration, aging, oxidative and nitrosative stress: A review. **Neuroscience**, v. 406, p. 1–21, 15 maio 2019.

AGGARWAL, B. B.; HARIKUMAR, K. B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Directed Issue: Epigenetics and Disease. v. 41, n. 1, p. 40–59, 1 jan. 2009.

AGUIAR, D. D. et al. Curcumin induces peripheral antinociception by opioidergic and cannabinoidergic mechanism: Pharmacological evidence. **Life Sciences**, v. 293, p. 120279, 15 mar. 2022.

ALLES, S. R. A.; SMITH, P. A. Etiology and pharmacology of neuropathic pain. **Pharmacological Reviews**, v. 70, n. 2, p. 315–347, 1 abr. 2018.

ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202–2210, 2010.

ANAND, P. et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807–818, 1 dez. 2007.

ANAND, P. et al. Biological activities of curcumin and its analogues (congeners) made by man and mother nature. **Biochemical Pharmacology**, Special Issue: Apoptosis World 2008. v. 76, n. 11, p. 1590–1611, 1 dez. 2008.

ARGYRIOU, A. A. et al. Peripheral nerve damage associated with administration of taxanes in patients with cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 66, n. 3, p. 218–228, 1 jun. 2008.

ASHCROFT, F. M.; GRIBBLE, F. M. Tissue-specific effects of sulfonylureas: Lessons from studies of cloned KATP channels. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 14, n. 4, p. 192–196, 1 jul. 2000.

BABU, A.; PRASANTH, K. G.; BALAJI, B. Effect of curcumin in mice model of vincristine-induced neuropathy. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 6, p. 838–848, 3 jun. 2015.

BACALHAU, C.; COSTA-PEREIRA, J. T.; TAVARES, I. Preclinical research in paclitaxel-induced neuropathic pain: a systematic review. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, p. 1264668, 18 dez. 2023.

BANAFSHE, H. R. et al. Effect of curcumin on diabetic peripheral neuropathic pain: Possible involvement of opioid system. **European Journal of Pharmacology**, v. 723, p. 202–206, 15 jan. 2014.

BANATI, R. B. et al. Long-term trans-synaptic glial responses in the human thalamus after peripheral nerve injury. **NeuroReport**, v. 12, n. 16, p. 3439, 16 nov. 2001.

BASU, P.; MAIER, C.; BASU, A. Effects of curcumin and its different formulations in preclinical and clinical studies of peripheral neuropathic and postoperative pain: a comprehensive review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4666, 28 abr. 2021.

BATES, D. et al. A comprehensive algorithm for management of neuropathic pain. **Pain Medicine: The Official Journal of the American Academy of Pain Medicine**, v. 20, n. Suppl 1, p. S2–S12, jun. 2019.

BENARROCH, E. E. Endogenous opioid systems. **Neurology**, v. 79, n. 8, p. 807–814, 21 ago. 2012.

BERGER, A. A. et al. Dorsal root ganglion (drg) and chronic pain. **Anesthesiology and Pain Medicine**, v. 11, n. 2, p. e113020, 28 mar. 2021.

BISWAS, S. et al. Curcumin analogs reduce stress and inflammation indices in experimental models of diabetes. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 887, 18 dez. 2019.

BOEHMERLE, W. et al. Electrophysiological, behavioral and histological characterization of paclitaxel, cisplatin, vincristine and bortezomib-induced neuropathy in C57Bl/6 mice. **Scientific Reports**, v. 4, p. 6370, 18 set. 2014.

BOYANAPALLI, S. S. S. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin in regulating anti-inflammatory and epigenetic gene expression. **Biopharmaceutics & drug disposition**, v. 39, n. 6, p. 289–297, jun. 2018.

BOYETTE-DAVIS, J. A.; WALTERS, E. T.; DOUGHERTY, P. M. Mechanisms involved in the development of chemotherapy-induced neuropathy. **Pain management**, v. 5, n. 4, p. 285–296, 2015.

BRAGA, A. V. et al. Thiamine, riboflavin, and nicotinamide inhibit paclitaxel-induced allodynia by reducing TNF-α and CXCL-1 in dorsal root ganglia and thalamus and activating ATP-sensitive potassium channels. **Inflammopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 201–213, fev. 2020.

BURSTON, J. J.; WOODHAMS, S. G. Endocannabinoid system and pain: an introduction. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 73, n. 1, p. 106–117, fev. 2014.

CAROZZI, V. A.; CANTA, A.; CHIORAZZI, A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms? **Neuroscience Letters**, Neurobiology of Peripheral Neuropathy: Current Progress. v. 596, p. 90–107, 2 jun. 2015.

CAVALETTI, G. et al. Distribution of paclitaxel within the nervous system of the rat after repeated intravenous administration. **Journal of the Peripheral Nervous System**, v. 6, n. 1, p. 61–61, mar. 2001.

CHAPARRO, L. E. et al. Pharmacotherapy for the prevention of chronic pain after surgery in adults. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2013, n. 7, p. CD008307, 24 jul. 2013.

CHAUHAN, S. K.; SINGH, B. P.; AGRAWALA, S. Estimation of curcuminoids in curcuma longa by HPLC and spectrophotometric methods. v. 61, n. 1, p. 58–60, 1999.

CHEN, D. et al. Anti-Inflammatory activity of curcumin in macrophages stimulated by lipopolysaccharides from *Porphyromonas gingivalis*. **Pharmacology**, v. 82, n. 4, p. 264–269, 2008.

CHEN, Y.-F. et al. Minoxidil is a potential neuroprotective drug for paclitaxel-induced peripheral neuropathy. **Scientific Reports**, v. 7, p. 45366, 28 mar. 2017.

COLLOCA, L. et al. Neuropathic pain. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 1–19, 16 fev. 2017.

COLVIN, L. A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN): where are we now? **Pain**, v. 160, n. Suppl 1, p. S1–S10, maio 2019.

CORES, Á. et al. Curcumin-piperlongumine hybrids with a multitarget profile elicit neuroprotection in in vitro models of oxidative stress and hyperphosphorylation. **Antioxidants**, v. 11, n. 1, p. 28, 24 dez. 2021.

COSTA, S. O. A. M. et al. RI75, a curcumin analogue, inhibits tumor necrosis factor-α and interleukin-6 production and exhibits antiallodynic and antiedematogenic activities in mice. **Inflammopharmacology**, v. 30, n. 2, p. 505–515, abr. 2022.

DAI, Q. et al. Curcumin alleviates rheumatoid arthritis-induced inflammation and synovial hyperplasia by targeting mTOR pathway in rats. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 4095–4105, 3 dez. 2018.

DAI, Y. TRPs and pain. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, n. 3, p. 277–291, 1 maio 2016.

DAUGHERTY, D. J. et al. A novel curcumin derivative for the treatment of diabetic neuropathy. **Neuropharmacology**, v. 129, p. 26–35, fev. 2018.

DEHZAD, M. J. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of curcumin/turmeric supplementation in adults: a grade-assessed systematic review and dose–response meta-analysis of randomized controlled trials. **Cytokine**, v. 164, p. 156144, 1 abr. 2023.

DENISON, H. J. et al. Review: the chemistry, toxicity and antibacterial activity of curcumin and its analogues. **Planta Medica**, 28 set. 2023.

DONG, M.-Y. et al. Simultaneous and rapid screening and determination of twelve azo dyes illegally added into food products by using chemometrics-assisted HPLC-DAD strategy. **Microchemical Journal**, v. 171, p. 106775, 1 dez. 2021.

ELBURKI, M. S. et al. A chemically modified curcumin (cmc 2.24) inhibits nuclear factor κb activation and inflammatory bone loss in murine models of lps-induced experimental periodontitis and diabetes-associated natural periodontitis. **Inflammation**, v. 40, n. 4, p. 1436–1449, 1 ago. 2017.

FACCHIN, B. M. et al. Inflammatory biomarkers on an LPS-induced RAW 264.7 cell model: a systematic review and meta-analysis. **Inflammation Research**, v. 71, n. 7, p. 741–758, 1 ago. 2022.

FORNASARI, D. Pain mechanisms in patients with chronic pain. **Clinical Drug Investigation**, v. 32, n. 1, p. 45–52, 1 fev. 2012.

FREIRES, I. A. et al. Progress and promise of alternative animal and non-animal methods in biomedical research. **Archives of Toxicology**, v. 97, n. 9, p. 2329–2342, 1 set. 2023.

GAO, J. et al. Curcumin treatment attenuates cisplatin-induced gastric mucosal inflammation and apoptosis through the NF- κ B and MAPKs signaling pathway. **Human & Experimental Toxicology**, v. 41, p. 09603271221128738, 1 jan. 2022.

GATLEY, S. J. et al. 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 307, n. 3, p. 331–338, 4 jul. 1996.

GILRON, I.; BARON, R.; JENSEN, T. neuropathic pain: principles of diagnosis and treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 4, p. 532–545, 1 abr. 2015.

GIUFFRE, B. A.; BLACK, A. C.; JEANMONOD, R. Anatomy, sciatic nerve **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiology & Behavior**, v. 47, n. 5, p. 963–991, 1 maio 1990.

GRAUDINS, A.; STEARMAN, A.; CHAN, B. Treatment of the serotonin syndrome with cyproheptadine. **Journal of Emergency Medicine**, v. 16, n. 4, p. 615–619, 1 jul. 1998.

GREESHMA, N.; PRASANTH, K. G.; BALAJI, B. Tetrahydrocurcumin exerts protective effect on vincristine induced neuropathy: behavioral, biochemical, neurophysiological and histological evidence. **Chemico-Biological Interactions**, v. 238, p. 118–128, 5 ago. 2015.

GUIMARÃES, M. R. et al. Curcumin abrogates LPS-induced proinflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. Evidence for novel mechanisms involving SOCS-1, -3 and p38 MAPK. **Archives of oral biology**, v. 58, n. 10, p. 1309–1317, out. 2013.

GUINDON, J.; HOHMANN, A. G. The endocannabinoid system and pain. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 8, n. 6, p. 403–421, dez. 2009.

GUPTA, S. C. et al. Discovery of curcumin, a component of the golden spice, and its miraculous biological activities. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 39, n. 3, p. 283–299, mar. 2012.

HASSANZADEH, P.; HASSANZADEH, A. The CB1 receptor-mediated endocannabinoid signaling and ngf: the novel targets of curcumin. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 5, p. 1112–1120, 1 maio 2012.

HESS, A. et al. Blockade of TNF-α rapidly inhibits pain responses in the central nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 9, p. 3731–3736, 1 mar. 2011.

HOLLA, B. S. et al. Synthesis of some new 2,4-disubstituted thiazoles as possible antibacterial and anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 313–318, 1 mar. 2003.

HUEHNCHEN, P. et al. Blockade of IL-6 signaling prevents paclitaxel-induced neuropathy in C57Bl/6 mice. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 22 jan. 2020.

HUNG, A. L.; LIM, M.; DOSHI, T. L. Targeting cytokines for treatment of neuropathic pain. **Scandinavian journal of pain**, v. 17, p. 287–293, out. 2017.

IASP: IASP Terminology – Pain Terms. Disponível em: https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/. Acesso em out. de 2024

JAGGI, A. S.; SINGH, N. Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy. **Toxicology**, v. 291, n. 1, p. 1–9, 27 jan. 2012.

JANES, K. et al. A3 adenosine receptor agonist prevents the development of paclitaxel-induced neuropathic pain by modulating spinal glial-restricted redox-dependent signaling pathways. **Pain**, v. 155, n. 12, p. 2560–2567, dez. 2014.

JOHNSTON, D. E. Special considerations in interpreting liver function tests. **American Family Physician**, v. 59, n. 8, p. 2223–2230, 15 abr. 1999.

JOSEPH, A. I. et al. Stability and anti-inflammatory activity of the reduction-resistant curcumin analog, 2,6-dimethyl-curcumin. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 16, n. 17, p. 3273–3281, 2 maio 2018.

JURENKA, J. S. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of Curcuma longa: a review of preclinical and clinical research. **Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic**, v. 14, n. 2, p. 141–153, jun. 2009.

KALKHAMBKAR, R. G. et al. Synthesis of novel triheterocyclic thiazoles as anti-inflammatory and analgesic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 10, p. 1272–1276, 1 out. 2007.

KAMARUDIN, N. et al. Analgesic Effect of 5-(3,4-ihydroxyphenyl)-3-hydroxy-1-(2-hydroxyphenyl)penta-2,4-dien-1-one in experimental animal models of nociception. **Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, v. 23, n. 9, p. 2099, 21 ago. 2018.

KANDHARE, A. D. et al. Therapeutic role of curcumin in prevention of biochemical and behavioral aberration induced by alcoholic neuropathy in laboratory animals. **Neuroscience Letters**, v. 511, n. 1, p. 18–22, 5 mar. 2012.

KANU, A. B. Recent developments in sample preparation techniques combined with high-performance liquid chromatography: A critical review. **Journal of Chromatography A**, v. 1654, p. 462444, 27 set. 2021.

KARIMIAN, M. S. et al. Curcumin as a natural regulator of monocyte chemoattractant protein-1. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 33, p. 55–63, 1 fev. 2017.

KASHYAP, S. J. et al. Thiazoles: having diverse biological activities. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, n. 8, p. 2123–2132, 1 ago. 2012.

KHAN, M. A. et al. Synthesis and anti-inflammatory properties of some aromatic and heterocyclic aromatic curcuminoids. **Bioorganic Chemistry**, v. 40, p. 30–38, 1 fev. 2012.

KLEIN, I.; LEHMANN, H. C. Pathomechanisms of paclitaxel-induced peripheral neuropathy. **Toxics**, v. 9, n. 10, p. 229, 22 set. 2021.

KUMAR, A.; RAJPUT, C. S.; BHATI, S. K. Synthesis of 3-[4′-(*p*-chlorophenyl)-thiazol-2′-yl]-2-[(substituted azetidinone/thiazolidinone)-aminomethyl]-6-bromoquinazolin-4-ones as anti-inflammatory agent. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 8, p. 3089–3096, 15 abr. 2007.

LAMER, T. J. et al. Spinal stimulation for the treatment of intractable spine and limb pain: a systematic review of RCTS and meta-analysis. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 94, n. 8, p. 1475–1487, 1 ago. 2019.

LAMER, T. J.; DEER, T. R.; HAYEK, S. M. Advanced innovations for pain. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 91, n. 2, p. 246–258, fev. 2016.

LIMCHAROEN, T. et al. Improved antiallodynic, antihyperalgesic and anti-inflammatory response achieved through potential prodrug of curcumin, curcumin diethyl diglutarate in a mouse model of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 899, p. 174008, 15 maio 2021.

LINO, C. I. et al. Synthesis, molecular modeling studies and evaluation of antifungal activity of a novel series of thiazole derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 151, p. 248–260, 10 maio 2018.

LIU, S. et al. Curcumin ameliorates neuropathic pain by down-regulating spinal IL-1β via suppressing astroglial NALP1 inflammasome and JAK2-STAT3 signalling. **Scientific Reports**, v. 6, p. 28956, 6 jul. 2016.

MANZOCCO, L.; ANESE, M.; NICOLI, M. C. Antioxidant Properties of Tea Extracts as Affected by Processing. **LWT - Food Science and Technology**, v. 31, n. 7, p. 694–698, 1 nov. 1998.

MARUPUDI, N. I. et al. Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 6, n. 5, p. 609–621, 1 set. 2007.

MEYER, B. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 05, p. 31–34, maio 1982.

MING-TATT, L. et al. Antinociceptive activity of a synthetic curcuminoid analogue, 2,6-bis-(4-hydroxy-3-methoxybenzylidene)cyclohexanone, on nociception-induced models in mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 3, p. 275–282, 2012.

MOETLEDIWA, M. T. et al. Therapeutic effects of curcumin derivatives against obesity and associated metabolic complications: a review of in vitro and in vivo studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 18, p. 14366, 21 set. 2023.

MOHAMMADI, A. et al. Effects of supplementation with curcuminoids on dyslipidemia in obese patients: a randomized crossover trial. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 3, p. 374–379, 2013.

MOTAGHINEJAD, M. et al. Attenuation of morphine withdrawal syndrome by various dosages of curcumin in comparison with clonidine in mouse: possible mechanism. **Iranian Journal of Medical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 125–132, mar. 2015.

MURNION, B. P. Neuropathic pain: current definition and review of drug treatment. **Australian Prescriber**, v. 41, n. 3, p. 60–63, jun. 2018.

NAGAKURA, Y. Challenges in drug discovery for overcoming 'dysfunctional pain': an emerging category of chronic pain. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 10, n. 10, p. 1043–1045, 3 out. 2015.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 871–882, 19 mar. 2010.

NYROP, K. A. et al. Patient-reported toxicities during chemotherapy regimens in current clinical practice for early breast cancer. **The Oncologist**, v. 24, n. 6, p. 762–771, jun. 2019.

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**, Pain Management. v. 29, n. 4, p. 407–418, 1 dez. 2017.

PARK, S. B. et al. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity: A critical analysis. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 63, n. 6, p. 419–437, 2013.

PARK, S.-H. et al. Antinociceptive profiles and mechanisms of orally administered curcumin in various pain models. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 57–61, fev. 2012.

PETERS, C. M. et al. An evolving cellular pathology occurs in dorsal root ganglia, peripheral nerve and spinal cord following intravenous administration of paclitaxel in the rat. **Brain research**, v. 1168, p. 46–59, 7 set. 2007.

PETROU, A.; FESATIDOU, M.; GERONIKAKI, A. Thiazole ring—a biologically active scaffold. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 3166, 25 maio 2021.

POIRIER-LARABIE, S.; SEGURA, P. A.; GAGNON, C. Degradation of the pharmaceuticals diclofenac and sulfamethoxazole and their transformation products under controlled environmental conditions. **Science of The Total Environment**, v. 557–558, p. 257–267, 1 jul. 2016.

PRASAD, S.; TYAGI, A. K.; AGGARWAL, B. B. Recent Developments in Delivery, Bioavailability, Absorption and Metabolism of Curcumin: the Golden Pigment from Golden Spice. **Cancer Research and Treatment : Official Journal of Korean Cancer Association**, v. 46, n. 1, p. 2, jan. 2014.

PULIDO-MORAN, M. et al. Curcumin and Health. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 264, 25 fev. 2016.

QIAN, J. et al. Design and synthesis novel di-carbonyl analogs of curcumin (DACs) act as potent anti-inflammatory agents against LPS-induced acute lung injury (ALI). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 167, p. 414–425, 1 abr. 2019.

RAMESH, G.; MACLEAN, A. G.; PHILIPP, M. T. Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 480739, 2013.

SAFFARPOUR, S. et al. Chronic nanocurcumin treatment ameliorates pain-related behavior, improves spatial memory, and reduces hippocampal levels of IL-1β and TNFα in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. **Psychopharmacology**, v. 238, n. 3, p. 877–886, 1 mar. 2021.

SANTIAGO, B. V. M. et al. Prevalence of chronic pain in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **Clinics**, v. 78, p. 100209, 16 maio 2023.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 11, p. 1062–1067, nov. 2002.

SCRIPTURE, C. D.; FIGG, W. D.; SPARREBOOM, A. Peripheral neuropathy induced by paclitaxel: recent insights and future perspectives. **Current Neuropharmacology**, v. 4, n. 2, p. 165–172, abr. 2006.

SHARMA, S. et al. Curcumin attenuates thermal hyperalgesia in a diabetic mouse model of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 536, n. 3, p. 256–261, 1 maio 2006.

SHIH, M.-H.; SU, Y.-S.; WU, C.-L. Syntheses of aromatic substituted hydrazino-thiazole derivatives to clarify structural characterization and antioxidant activity between 3-arylsydnonyl and aryl substituted hydrazino-thiazoles. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 8, p. 1126–1135, 2007.

SIMIRGIOTIS, M. J. et al. High resolution metabolite fingerprinting of the resin of *Baccharis tola* Phil. from the Atacama Desert and its antioxidant capacities. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 368–375, 30 dez. 2016.

SISIGNANO, M. et al. Mechanism-based treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathic pain. **Nature Reviews Neurology**, v. 10, n. 12, p. 694–707, dez. 2014.

SMITH, B. H. et al. Neuropathic pain: a pathway for care developed by the British Pain Society. **British Journal of Anaesthesia**, v. 111, n. 1, p. 73–79, 1 jul. 2013.

SÖKMEN, M.; KHAN, M. A. The antioxidant activity of some curcuminoids and chalcones. **Inflammopharmacology**, v. 24, p. 81, 17 maio 2016.

SOMMER, C. CHAPTER 3.11 - Serotonin in pain and pain control. Em: MÜLLER, C. P.; JACOBS, B. L. (Eds.). **Handbook of Behavioral Neuroscience**. Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin. [s.l.] Elsevier, 2010. v. 21p. 457–471.

STAFF, N. P. et al. Pathogenesis of paclitaxel-induced peripheral neuropathy: A current review of in vitro and in vivo findings using rodent and human model systems. **Experimental neurology**, v. 324, p. 113121, fev. 2020.

SUETH-SANTIAGO, V. et al. Curcumin, the golden powder from turmeric: insights into chemical and biological activities. **Química Nova**, v. 38, p. 538–552, maio 2015.

TAWFIK, M. K. et al. Neuroprotective effect of duloxetine in a mouse model of diabetic neuropathy: Role of glia suppressing mechanisms. **Life Sciences**, v. 205, p. 113–124, 15 jul. 2018.

TOLJAN, K.; VROOMAN, B. Low-dose naltrexone (LDN)—review of therapeutic utilization. **Medical Sciences**, v. 6, n. 4, p. 82, 21 set. 2018.

TOMA, W. et al. Effects of paclitaxel on the development of neuropathy and affective behaviors in the mouse. **Neuropharmacology**, v. 117, p. 305–315, 1 maio 2017.

TSANTOULAS, C.; MCMAHON, S. B. Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 3, p. 146–158, mar. 2014.

UDALL, M. et al. Epidemiology of physician-diagnosed neuropathic pain in Brazil. **Journal of Pain Research**, v. Volume 12, p. 243–253, jan. 2019.

UEDA, H. et al. Involvement of lysophosphatidic acid–induced astrocyte activation underlying the maintenance of partial sciatic nerve injury–induced neuropathic pain. **Pain**, v. 159, n. 11, p. 2170–2178, nov. 2018.

VANIA, A. A. et al. Expression of IL-1β in supraspinal brain regions in rats with neuropathic pain. **Neuroscience letters**, v. 407, n. 2, p. 176–181, 23 out. 2006.

VARDHINI, N. M. et al. Purification and characterization of pure curcumin, desmethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin from North-East India *Lakadong turmeric* (*Curcuma longa*). **Journal of Chromatography A**, v. 1708, p. 464358, 11 out. 2023.

VIGUIER, F. et al. Multiple roles of serotonin in pain control mechanisms —Implications of 5-HT7 and other 5-HT receptor types. **European Journal of Pharmacology**, Pharmacology of Pain. v. 716, n. 1, p. 8–16, 15 set. 2013.

WANG, Y. et al. A novel synthetic mono-carbonyl analogue of curcumin, A13, exhibits anti-inflammatory effects in vivo by inhibition of inflammatory mediators. **Inflammation**, v. 35, n. 2, p. 594–604, 1 abr. 2012.

WANG, Z. S. et al. Diarylpentadienone derivatives (curcumin analogues): Synthesis and anti-inflammatory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 8, p. 1803–1807, 15 abr. 2017.

WIESELER-FRANK, J.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. Central Proinflammatory Cytokines and Pain Enhancement. **Neurosignals**, v. 14, n. 4, p. 166–174, 13 out. 2005.

WOOLF, C. J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. **Annals of Internal Medicine**, v. 140, n. 6, p. 441–451, 16 mar. 2004.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3742–3744, 1 nov. 2010.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1765–1768, 9 jun. 2000.

WRIGHT, M. E.; RIZZOLO, D. An update on the pharmacologic management and treatment of neuropathic pain. **JAAPA**, v. 30, n. 3, p. 13, mar. 2017.

XIE, Z. et al. Synthesis and evaluation of anti-inflammatory N-substituted 3,5-bis(2-(trifluoromethyl)benzylidene)piperidin-4-ones. **ChemMedChem**, v. 12, n. 4, p. 327–336, 20 fev. 2017.

XU, M. et al. B14 ameliorates bone cancer pain through downregulating spinal interleukin-1β via suppressing neuron JAK2/STAT3 pathway. **Molecular Pain**, v. 15, 2019.

YARDIM, A. et al. Protective effects of curcumin against paclitaxel-induced spinal cord and sciatic nerve injuries in rats. **Neurochemical Research**, v. 46, n. 2, p. 379–395, 1 fev. 2021.

ZAJĄCZKOWSKA, R. et al. Mechanisms of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 6, p. 1451, 22 mar. 2019.

ZBARSKY, V. et al. Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and naringenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. **Free Radical Research**, v. 39, n. 10, p. 1119–1125, 1 jan. 2005.

ZHANG, H. et al. Dorsal root ganglion infiltration by macrophages contributes to paclitaxel chemotherapy induced peripheral neuropathy. **The journal of pain : official journal of the American Pain Society**, v. 17, n. 7, p. 775–786, jul. 2016.

ZHANG, N. et al. FM0807 decelerates experimental arthritis progression by inhibiting inflammatory responses and joint destruction via modulating NF-κB and MAPK pathways. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 9, p. BSR20182263, 3 set. 2019.

ZHANG, X. et al. Curcumin alleviates oxaliplatin-induced peripheral neuropathic pain through inhibiting oxidative stress-mediated activation of nf-κb and mitigating inflammation. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 43, n. 2, p. 348–355, 1 fev. 2020.

ZHANG, Y. et al. Synthesis and evaluation of a series of novel asymmetrical curcumin analogs for the treatment of inflammation. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 7287–7307, 4 jun. 2014.

ZHAO, C. et al. Synthesis of mono-carbonyl analogues of curcumin and their effects on inhibition of cytokine release in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 7, p. 2388–2393, 1 abr. 2010.

ZHAO, G. et al. Curcumin exerts antinociceptive effects in cancer-induced bone pain via an endogenous opioid mechanism. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, p. 696861, 3 set. 2021.

ZHAO, X. et al. Curcumin exerts antinociceptive effects in a mouse model of neuropathic pain: Descending monoamine system and opioid receptors are differentially involved. **Neuropharmacology**, Post-Traumatic Stress Disorder. v. 62, n. 2, p. 843–854, 1 fev. 2012.

ZHU, X. et al. Curcumin alleviates neuropathic pain by inhibiting p300/cbp histone acetyltransferase activity-regulated expression of BDNF and COX-2 in a rat model. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e91303, 6 mar. 2014.

ZILLIOX, L. A. Neuropathic pain. **Continuum (Minneapolis, Minn.)**, v. 23, n. 2, Selected Topics in Outpatient Neurology, p. 512–532, abr. 2017.