

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

ADRIANA MARTINS GODIN

**ATIVIDADES DO 2-FTALIMIDOETANOL E DO NITRATO DE 2-FTALIMIDOETILA,
ANÁLOGOS FTALIMÍDICOS DESTITUÍDOS DO ANEL GLUTARIMÍDICO, EM
MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOR E INFLAMAÇÃO**

Belo Horizonte

2014

ADRIANA MARTINS GODIN

**ATIVIDADES DO 2-FTALIMIDOETANOL E DO NITRATO DE 2-FTALIMIDOETILA,
ANÁLOGOS FTALIMÍDICOS DESTITUÍDOS DO ANEL GLUTARIMÍDICO, EM
MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOR E INFLAMAÇÃO**

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

Orientadores: Prof. Dr. Márcio M. Coelho.

Prof. Dr. Renes R. Machado.

Belo Horizonte

2014

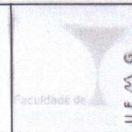
G585a Godin, Adriana Martins.
Atividades do 2-ftalimidoetanol e do nitrato de 2-ftalimidoetila, análogos ftalimídicos destituídos do anel glutarimídico, em modelos experimentais de dor e inflamação / Adriana Martins Godin – 2014.
124 f. : il.

Orientador: Márcio M. Coelho.
Coorientador: Renes R. Machado.

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

1. Agentes antiinflamatórios – Teses. 2. Análogos ftalimídicos – Teses. 3. Dor – Teses. 4. Inflamação – Teses. 5. Edema – Teses. I. Coelho, Márcio de Matos. II. Machado, Renes R. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD 615.1



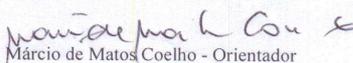
FOLHA DE APROVAÇÃO

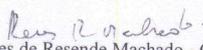
“ATIVIDADES DO 2-FTALIMIDOETANOL E DO NITRATO DE 2-FTALIMIDOETILA, ANÁLOGOS FTALIMÍDICOS DESTITUÍDOS DO ANEL GLUTARIMÍDICO, EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOR E INFLAMAÇÃO”

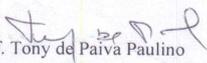
ADRIANA MARTINS GODIN

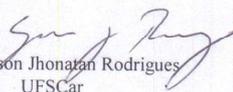
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

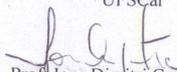
Aprovada em 25 de fevereiro de 2014, pela banca constituída pelos membros:

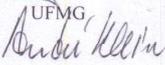

Prof. Márcio de Matos Coelho - Orientador
UFMG


Prof. Renes de Resende Machado - Coorientador
UFMG


Prof. Tony de Paiva Paulino
UFTM


Prof. Gerson Jhonatan Rodrigues
UFSCar


Prof. Igor Dimitri Gama Duarte
UFMG


Prof. André Klein
UFMG

Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2014.

Dedicamos o grau de doutor

Aos meus pais, Ismar Godin e Zélia Martins Godin, e às minhas irmãs,
Juliana M. Godin e Mariana M. Godin.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de ter realizado a graduação e a pós-graduação na Universidade Federal de Minas Gerais.

Aos meus pais, Ismar Godin e Zélia Martins Godin e, à minha irmã, Juliana M. Godin, que, mesmo distantes, sempre se fizeram presentes em todos os momentos. À minha irmã, Mariana M. Godin, pelo companheirismo e grande apoio.

Aos grandes orientadores, Prof. Márcio M. Coelho e Prof. Renes R. Machado, pela orientação, profissionalismo, incentivo e amizade.

Ao Prof. Ângelo de Fátima, pela colaboração para o desenvolvimento dos análogos ftalimídicos. À doutoranda Débora P. Araújo, pelo apoio e síntese dos análogos no Laboratório de Química Orgânica no Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas.

Ao Prof. Flávio A. Amaral, pela colaboração na realização dos protocolos moleculares. Ao Lucas S. Ribeiro e à Daiane Boff pelo auxílio na realização desses protocolos no Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas.

Ao secretário do Programa da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Eduardo Castro, pelo grande profissionalismo e auxílio durante os períodos de mestrado e doutorado.

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

De maneira especial, às colegas do laboratório, Raquel R. Menezes e Ana Mercy Siebra, pela grande ajuda no desenvolvimento do projeto e pela grande amizade.

Aos colegas do laboratório, Ivo Melo, Giovanna Coura, Darly Soares, Júlia Moura e Rafaela Nogueira, pela grande ajuda na realização dos protocolos experimentais e pela amizade durante esses anos. Aos outros colegas, Wallace Ferreira, Marcela

Bini, Tamires Matsui, Carla Ribeiro, Mariana Almeida, Denise Sousa, Iuri Franco, Elias Borges e Raphael Ferreira, pela amizade de sempre.

Aos colegas, Isabela César e Leandro S. Bastos, pelas ideias, profissionalismo e amizade durante os períodos de mestrado e doutorado.

À Andrea E. D. Vieira, sempre presente no laboratório de farmacologia, pela grande amizade durante os períodos de mestrado e doutorado.

Aos demais, que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

À FAPEMIG e À CAPES, pelo apoio financeiro.

*“Sempre que ensinares, ensine também a duvidar do que se ensina.”
José Ortega y Gasset*

RESUMO

O desenvolvimento de diferentes análogos ftalimídicos tem aumentado devido à constatação de que interagem com diferentes alvos moleculares, o que faz com que essas substâncias sejam consideradas candidatos a fármacos úteis no tratamento de pacientes com várias doenças, incluindo aquelas com manifestações inflamatórias e dolorosas. Além disso, a modificação molecular desses análogos de modo a transformá-los em doadores de óxido nítrico (NO), pode resultar em substâncias com maiores atividades anti-inflamatória e antinociceptiva. Assim, propusemos a caracterizar os efeitos induzidos pelo 2-ftalimidoetanol (FTD-OH) e pelo nitrato de 2-ftalimidoetila (FTD-NO), dois análogos ftalimídicos destituídos do anel glutarimídico, em diferentes modelos experimentais de dor e inflamação em camundongos e investigar os possíveis mecanismos que mediarão esses efeitos. O interesse em substâncias destituídas do anel glutarimídico deriva de observações fornecidas por vários estudos indicando que a presença desse grupo funcional está associada a um aumento do risco de ocorrência de teratogênese em ensaios pré-clínicos. Os análogos ftalimídicos FTD-OH e FTD-NO, bem como o fármaco usado para comparação, a talidomida (500 ou 750 mg/kg, *p.o.*, -1 h), inibiram a primeira e a segunda fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído (1,84%, 10 µl, *s.c.*). A maior dose (750 mg/kg, *p.o.*, -1 h) dos análogos ftalimídicos e as duas maiores doses (500 ou 750 mg/kg, *p.o.*, -1 h) da talidomida inibiram a alodínia mecânica induzida por carragenina (300 µg, 20 µl, *i.pl.*). Os análogos FTD-OH e FTD-NO (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, *p.o.*, -1 h), mas não a talidomida, inibiram o edema de pata induzido por formaldeído ou carragenina. O FTD-OH e o FTD-NO (500 mg/kg, *p.o.*, -1 h) reduziram a atividade da mieloperoxidase (MPO) e apenas o FTD-NO (250 ou 500 mg/kg, *p.o.*, -1 h) reduziu as concentrações de TNF- α e CXCL1 na pata dos animais injetados com carragenina. Os análogos FTD-OH e FTD-NO, bem como a talidomida (500 mg/kg, *p.o.*, -1 h), inibiram a alodínia mecânica em modelo de artrite induzida por antígeno (mBSA). Esses dois análogos ftalimídicos apresentaram atividade mais marcante do que a talidomida nesse modelo experimental, pois inibiram também a migração celular e a produção de citocinas induzidas pela mBSA. No modelo de alodínia mecânica induzida por constrição do nervo ciático, foram observadas atividades do FTD-OH, do FTD-NO e da talidomida (500 mg/kg, *p.o.*, -1 h). Em relação à capacidade de aumentar a concentração plasmática de nitrito, uma evidência indireta do estímulo à produção de NO, observou-se que apenas o análogo FTD-NO apresentou essa atividade. Após a demonstração dos efeitos antinociceptivo e antiedematogênico induzidos pelos análogos ftalimídicos FTD-OH e FTD-NO, foi demonstrado que a atividade antiedematogênica envolve mecanismos canabinoidérgicos e opioidérgicos ou a via da guanilato ciclase. A administração prévia do antagonista do receptor CB₁ (AM251; 8 mg/kg, *i.p.* -1,5 h) ou do receptor opioide (naltrexona; 10 mg/kg, *i.p.* -1,5 h) ou do inibidor da enzima guanilato ciclase (ODQ; 8 mg/kg, *p.o.* -1,5 h) atenuou a atividade antiedematogênica dos análogos ftalimídicos FTD-OH e FTD-NO. Concluindo, os resultados demonstraram os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório induzidos por dois análogos ftalimídicos. A caracterização das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do FTD-OH e do FTD-NO indica que os análogos ftalimídicos destituídos do anel glutarimídico representam uma classe de substâncias que podem ser exploradas visando o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de pacientes com condições inflamatórias e dolorosas. Os resultados do presente estudo também podem contribuir para aumentar o interesse na realização de ensaios toxicológicos pré-

clínicos e de ensaios para avaliação de perfis farmacocinéticos dos análogos ftalimídicos, etapas fundamentais para o avanço de pesquisas que teriam como objetivo maior o desenvolvimento de novas alternativas farmacoterapêuticas.

PALAVRAS-CHAVE: análogos ftalimídicos, 2-ftalimidoetanol, nitrato de 2-ftalimidoetila, talidomida, óxido nítrico, inflamação, dor, nocicepção, edema.

ABSTRACT

As phthalimide analogues interact with different molecular targets, there is an increasing interest in the evaluation of their potential as drug candidates in the treatment of patients with various diseases including those with inflammatory and painful manifestations. Furthermore, the development of phthalimide analogues coupled to a nitric oxide (NO) donor may result in drugs with high anti-inflammatory and antinociceptive activities. Thus, we aimed to characterize the effects induced by two phthalimide analogues devoid of the glutarimide moiety, 2-phthalimidethanol (FTD-OH) and 2-phthalimidethyl nitrate (FTD-NO), in experimental models of pain and inflammation in mice and to investigate the underlying mechanisms of action. There is increasing interest in phthalimide analogues devoid of the glutarimide moiety as the presence of this functional group has been shown to be associated with teratogenesis in preclinical assays. The phthalimide analogues, FTD-OH and FTD-NO, and thalidomide, used as a comparator drug, at the doses of 500 or 750 mg/kg (*p.o.*, -1 h), inhibited the first and second phases of the nociceptive response induced by formaldehyde (1.84%, 20 μ l, *s.c.*). Only the highest dose of the phthalimide analogues (750 mg/kg, *p.o.*, -1 h) or the two highest doses (500 or 750 mg/kg, *p.o.*, -1 h) of thalidomide inhibited the mechanical allodynia induced by carrageenan (300 μ g, 20 μ l, *i.pl.*). The two phthalimide analogues FTD-OH and FTD-NO (125, 250, 500 or 750 mg/kg, *p.o.*, -1 h) also inhibited the paw edema induced by carrageenan or formaldehyde. Both phthalimide analogues (500 mg/kg, *p.o.*, -1 h) reduced the activity of myeloperoxidase, but only FTD-NO (250 or 500 mg/kg, *p.o.*, -1 h) reduced the concentrations of TNF- α and CXCL1 in the paw of the animals injected with carrageenan. FTD-OH, FTD-NO and thalidomide (500 mg/kg, *p.o.*, -1 h) inhibited the mechanical allodynia in the model of arthritis induced by antigen (mBSA). The two analogues (500 mg/kg, *p.o.*, -1 h) also inhibited the cell migration and cytokine production induced by mBSA. In the model of mechanical allodynia induced by chronic constriction injury, treatments with both analogues or thalidomide (500 mg/kg, *p.o.*, -1 h) were effective. Regarding the ability to increase the plasma concentration of nitrite, an indirect evidence of the production of NO, it was observed that only the analogue FTD-NO exhibited this activity. In addition, it was demonstrated that the antiedematogenic activity of the phthalimide analogues FTD-OH and FTD-NO involves cannabinoidergic and opioidergic mechanisms and activation of the guanylyl cyclase pathway. Prior administration of the CB₁ (AM251, 8 mg/kg, *i.p.*, -1.5 h) or opioid (naltrexone, 10 mg/kg, *i.p.*, -1.5 h) receptor antagonists or the inhibitor of the enzyme guanylyl cyclase (ODQ, 8 mg/kg, *p.o.*, -1.5 h) attenuated the antiedematogenic activity of the phthalimide analogues. Concluding, the results demonstrated the antinociceptive and anti-inflammatory activities of the phthalimide analogues FTD-OH and FTD-NO. The characterization of these activities indicates that the phthalimide analogues devoid of the glutarimide moiety represent a class that may be explored aiming the development of new drugs to be used in the treatment of patients with inflammatory and painful conditions. These results may also increase the interest in carrying out assays to evaluate the pre-clinical toxicological profiles of these analogues and their pharmacokinetic parameters, essential steps to the advance of research aiming the development of new pharmacotherapeutic alternatives.

KEYWORDS: phthalimide analogues, 2-phthalimidethanol, 2-phthalimidethyl nitrate, thalidomide, inflammation, pain, nociception, edema.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| 1 Estruturas químicas do ácido acetilsalicílico e seus análogos NCX-4016 [acoplado com doador de NO – (nitrooximetil)fenil] e NCX-4017 [não acoplado com doador de NO – (hidroximetil)fenil]..... | 23 |
| 2 Estruturas químicas da ftalimida (A) e da talidomida (B)..... | 24 |
| 3 Estruturas químicas da lenalidomida (A) e da pomalidomida (B)..... | 31 |
| 4 Estruturas químicas de diferentes análogos ftalimídicos..... | 34 |
| 5 Planejamento estrutural de análogos ftalimídicos acoplados com doadores de NO..... | 35 |
| 6 Estruturas químicas dos análogos ftalimídicos (A) 2-ftalimidoetanol (FTD-OH) e (B) nitrato de 2-ftalimidoetila (FTD-NO)..... | 36 |
| 7 Camundongo C57BL/6J..... | 39 |
| 8 Aparato usado para a avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído..... | 46 |
| 9 Aparato usado para a avaliação da alodínia mecânica..... | 47 |
| 10 Aparato usado para a avaliação do edema de pata..... | 48 |
| 11 Aparato usado para a avaliação da atividade motora..... | 49 |
| 12 Constrição do nervo ciático..... | 50 |
| 13 Efeito induzido pela talidomida (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h) sobre o comportamento de lambida induzido por formaldeído..... | 55 |
| 14 Efeito induzido pelo FTD-OH (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h) sobre o comportamento de lambida induzido por formaldeído..... | 56 |
| 15 Efeito induzido pelo FTD-NO (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h) sobre o comportamento de lambida induzido por formaldeído..... | 56 |
| 16 Alodínia mecânica (A) ou edema de pata (B) induzidos por carragenina (100, 200 ou 300 µg/pata). Cursos temporais (A e B) e áreas sob a curva (A.1 e B.1) da alodínia mecânica e do edema de pata..... | 57 |
| 17 Efeito induzido pela talidomida (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva da alodínia mecânica..... | 58 |
| 18 Efeito induzido pelo FTD-OH (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva da alodínia mecânica..... | 59 |
| 19 Efeito induzido pelo FTD-NO (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva da alodínia mecânica..... | 60 |

| | |
|---|----|
| 20 Efeito induzido pela talidomida (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h) sobre o edema de pata induzido por formaldeído. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva do edema de pata..... | 62 |
| 21 Efeito induzido pelo FTD-OH (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h) sobre o edema de pata induzido por formaldeído. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva do edema de pata..... | 63 |
| 22 Efeito induzido pelo FTD-NO (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h) sobre o edema de pata induzido por formaldeído. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva do edema de pata..... | 64 |
| 23 Efeito induzido pela talidomida (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h) sobre o edema de pata induzido por carragenina. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva do edema de pata..... | 65 |
| 24 Efeito induzido pelo FTD-OH (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h) sobre o edema de pata induzido por carragenina. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva do edema de pata..... | 66 |
| 25 Efeito induzido pelo FTD-NO (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h) sobre o edema de pata induzido por carragenina. (A) Curso temporal e (B) área sob a curvado do edema de pata..... | 67 |
| 26 Efeitos induzidos pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO (250 ou 500 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h) sobre a atividade de MPO (A) e as concentrações de TNF- α (B) e CXCL1 (C) na pata de animais injetados com carragenina..... | 69 |
| 27 Efeito induzido pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO (500 mg/kg, <i>p.o.</i> , 1 h antes da injeção intra-articular de mBSA) sobre o número total de células (A), neutrófilos (B) e mononucleares (C) no lavado obtido da cavidade articular e a atividade de MPO no tecido periarticular (D), avaliados 24 h após a injeção intra-articular de mBSA... | 71 |
| 28 Efeito induzido pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO (500 mg/kg, <i>p.o.</i> , 1 h antes da injeção intra-articular de mBSA) sobre as concentrações de TNF- α (A) ou CXCL1 (B) no tecido periarticular avaliadas 24 h após a injeção intra-articular de mBSA..... | 72 |
| 29 Efeito induzido pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO (500 mg/kg, <i>p.o.</i> , 1 h antes da injeção intra-articular de mBSA) sobre a alodínia mecânica avaliada 24 h após a injeção intra-articular de mBSA..... | 73 |
| 30 Alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo ciático..... | 74 |
| 31 Efeito induzido pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO (500 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h) sobre a alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo ciático..... | 74 |
| 32 Efeitos induzidos pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO (500 mg/kg, <i>p.o.</i> , -1 h) sobre a concentração plasmática de nitrito..... | 75 |
| 33 Efeito induzido pelo AM251 (A4 ou A8; 4 ou 8 mg/kg, <i>i.p.</i> - 1,5 h) sobre as atividades antinociceptiva (A) e antiedematogênica (B) do FTD-OH (500 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h) nos modelos de resposta nociceptiva e edema de pata induzidos por formaldeído..... | 77 |
| 34 Efeito induzido pelo AM251 (A4 ou A8; 4 ou 8 mg/kg, <i>i.p.</i> - 1,5 h) sobre as atividades antinociceptiva (A) e antiedematogênica (B) do FTD-NO (500 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h) nos modelos de resposta nociceptiva e edema de pata induzidos por formaldeído..... | 78 |

| | |
|--|-----------|
| 35 Efeito induzido pelo AM630 (B4 ou B8; 4 ou 8 mg/kg, i.p. - 1,5 h) sobre as atividades antinociceptiva (A) e antiedematogênica (B) do FTD-OH (500 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h) nos modelos de resposta nociceptiva e edema de pata induzidos por formaldeído..... | 79 |
| 36 Efeito induzido pelo AM630 (B4 ou B8; 4 ou 8 mg/kg, i.p. - 1,5 h) sobre as atividades antinociceptiva (A) e antiedematogênica (B) do FTD-NO (500 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h) nos modelos de resposta nociceptiva e edema de pata induzidos por formaldeído..... | 80 |
| 37 Efeito induzido pela naltrexona (N5 ou N10; 5 ou 10 mg/kg, i.p. - 1,5 h) sobre sobre as atividades antinociceptiva (A) e antiedematogênica (B) do FTD-OH (500 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h) nos modelos de resposta nociceptiva e edema de pata induzidos por formaldeído..... | 82 |
| 38 Efeito induzido pela naltrexona (N5 ou N10; 5 ou 10 mg/kg, i.p. - 1,5 h) sobre sobre as atividades antinociceptiva (A) e antiedematogênica (B) do FTD-NO (500 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h) nos modelos de resposta nociceptiva e edema de pata induzidos por formaldeído..... | 83 |
| 39 Efeito induzido pelo ODQ (O4 ou O8; 4 ou 8 mg/kg, i.p. - 2 h) sobre as atividades antinociceptiva (A) e antiedematogênica (B) do FTD-OH (500 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h) nos modelos de resposta nociceptiva e edema de pata induzidos por formaldeído..... | 85 |
| 40 Efeito induzido pelo ODQ (O4 ou O8; 4 ou 8 mg/kg, <i>p.o.</i> - 2,0 h) sobre as atividades antinociceptiva (A) e antiedematogênica (B) do FTD-NO (500 mg/kg, <i>p.o.</i> , - 1 h) nos modelos de resposta nociceptiva e edema de pata induzidos por formaldeído..... | 86 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------------|--|
| AIES | Anti-inflamatórios esteroides |
| AINEs | Anti-inflamatórios não esteroides |
| AM251 | Antagonista de receptores canabinoides CB ₁ |
| AM630 | Antagonista de receptores canabinoides CB ₂ |
| AP-1 | Proteína ativadora-1 |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| FGFb | Fator de crescimento básico de fibroblasto |
| BSA | Albumina de soro bovino |
| CFA | Adjuvante completo de Freund |
| CMC | Carboximetilcelulose |
| COX | Ciclo-oxigenase |
| CRPS | Síndrome de dor regional complexa |
| CSF | Fator estimulador de colônia |
| CXCL1 | <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i> |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| ENH | Eritema nodoso hansênico |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FTD-OH | 2-ftalimidoetanol |
| FTD-NO | Nitrato de 2-ftalimidoetila |
| GMPc | Guanosina monofosfato cíclico |
| IL | Interleucina |
| IFN | Interferon |
| iNOS | Óxido nítrico sintase induzível |
| i.p. | intraperitoneal |
| i.pl. | intraplantar |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| mBSA | Albumina de soro bovino metilada |
| MPO | Mieloperoxidase |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| NF-kB | Fator nuclear kappa B |
| NO | Óxido nítrico |
| ODQ | 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona. |
| PBMC | Células mononucleares de sangue periférico |
| PBS | Tampão fosfato salina |
| PG | Prostaglandina |
| <i>p.o.</i> | <i>per os</i> |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| TGFβ | Fator de crescimento transformante beta |
| TNF | Fator de necrose tumoral |
| TRP | Receptores de potencial transitório |
| VEGF | Fator de crescimento vascular endotelial |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 1.1 Inflamação e dor..... | 17 |
| 1.2 Fármacos anti-inflamatórios e analgésicos..... | 19 |
| 1.3 Acoplamento de doadores de óxido nítrico (NO) aos fármacos anti-inflamatórios e analgésicos | 20 |
| 1.4 Talidomida como candidata a fármaco analgésico..... | 23 |
| 1.5 Novos análogos ftalimídicos como candidatos a fármacos analgésicos | 30 |
| 2 JUSTIFICATIVA..... | 37 |
| 3 OBJETIVO GERAL..... | 38 |
| 3.1 Objetivos específicos..... | 38 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 39 |
| 4.1 Animais experimentais..... | 39 |
| 4.2 Drogas, veículos e reagentes..... | 39 |
| 4.3 Preparo das soluções, suspensões e emulsões e doses usadas..... | 42 |
| 4.4 Resposta nociceptiva induzida por formaldeído..... | 45 |
| 4.5 Alodínia mecânica induzida por carragenina..... | 46 |
| 4.6 Edema de pata induzido por formaldeído ou carragenina..... | 47 |
| 4.7 Atividade motora na haste girante..... | 48 |
| 4.8 Alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo ciático..... | 49 |
| 4.9 Artrite induzida por antígeno (mBSA e CFA)..... | 50 |
| 4.10 Contagens total e diferencial dos leucócitos..... | 51 |
| 4.11 Atividade da MPO e concentrações do TNF-α ou da CXCL1..... | 51 |
| 4.12 Concentração de nitrito (NO₂)..... | 53 |
| 4.13 Análise estatística..... | 54 |
| 5 RESULTADOS..... | 55 |
| 5.1 Efeitos induzidos pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído..... | 55 |
| 5.2 Alodínia mecânica e edema de pata induzidos por carragenina..... | 57 |
| 5.3 Efeitos induzidos pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina..... | 58 |
| 5.4 Efeitos induzidos pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO sobre a atividade motora dos animais..... | 61 |
| 5.5 Efeitos induzidos pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO sobre o edema induzido por formaldeído ou carragenina..... | 62 |

| | |
|--|-----|
| 5.6 Efeitos induzidos pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO sobre a atividade de MPO e as concentrações de TNF- α e CXCL1 na pata de animais injetados com carragenina..... | 68 |
| 5.7 Efeitos induzidos pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO sobre a migração celular, a produção de citocinas e a alodínia mecânica em modelo de artrite induzida por antígeno (mBSA e CFA)..... | 70 |
| 5.8 Efeito induzido pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO sobre a alodínia mecânica induzida por constrição do nervo ciático..... | 73 |
| 5.9 Efeitos induzidos pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO sobre as concentrações plasmáticas de nitrito..... | 75 |
| 5.10 Efeitos induzidos pelos antagonistas canabinoides AM251 e AM630 sobre as atividades antinociceptiva e antiedematogênica dos análogos FTD-OH e FTD-NO nos modelos de resposta nociceptiva e edema de pata induzidos por formaldeído..... | 76 |
| 5.11 Efeito induzido pela naltrexona sobre as atividades antinociceptiva e antiedematogênica dos análogos FTD-OH e FTD-NO nos modelos de resposta nociceptiva e edema de pata induzidos por formaldeído..... | 81 |
| 5.12 Efeito induzido pelo ODQ sobre as atividades antinociceptiva e antiedematogênica dos análogos FTD-OH e FTD-NO nos modelos de resposta nociceptiva e edema de pata induzidos por formaldeído..... | 84 |
| 5.13 Síntese dos resultados..... | 87 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 90 |
| 6.1 Análogos ftalimídicos como candidatos a fármacos..... | 90 |
| 6.2 Atividade antinociceptiva da talidomida e dos análogos FTD-OH e FTD-NO..... | 91 |
| 6.3 Atividade antiedematogênica dos análogos FTD-OH e FTD-NO..... | 98 |
| 6.4 Perspectivas..... | 101 |
| 6.5 Limitações..... | 102 |
| 6.6 Conclusões..... | 102 |
| 7 REFERÊNCIAS..... | 104 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação e dor

Vários estímulos exógenos e endógenos podem causar lesão celular, o que desencadeia uma reação complexa chamada inflamação. Embora os sinais da inflamação tenham sido descritos em alguns papiros egípcios de 3000 a.C., Celsus, escritor romano do primeiro século d.C., foi o primeiro a citar os quatro sinais e sintomas da inflamação: *rubor*, *tumor*, *calor* e *dolor* (eritema, edema, calor e dor). Posteriormente, Virchow adicionou outra alteração, a *functio laesa* (perda de função) (Collins, 1999).

A inflamação é reconhecida como um processo que ocorre no tecido conjuntivo vascularizado, envolvendo os leitos capilares, o plasma, as células circulantes, os neurônios sensoriais e os constituintes celulares e extracelulares desse tecido. Esse processo tem como objetivo destruir, diluir ou isolar o agente lesivo e, também, induzir uma série de eventos que contribuem para a cicatrização e reconstituição do tecido lesado. Entretanto, essa cascata de eventos pode prolongar e induzir lesão tecidual pela liberação exarcebada de enzimas, mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (Tracey, 2002; Collins, 1999).

A inflamação pode se manifestar como um processo agudo ou crônico. A inflamação aguda tem duração relativamente curta, de minutos, horas ou alguns dias, e suas principais características são o aumento do fluxo sanguíneo, resultando em eritema, seguido pelo extravasamento de plasma e de proteínas plasmáticas, que contribuem para o desenvolvimento do edema. A migração celular, outro fenômeno marcante, ocorre como resultado da produção local de vários mediadores inflamatórios com atividade quimiotática e de alterações das proteínas de membrana do endotélio vascular. Na fase inicial da inflamação, os neutrófilos são particularmente prevalentes. A inflamação crônica é de longa duração e está associada à presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual (Ryan & Majno, 1977; Rote, 1998; Sherwood & Toliver-Kinsky, 2004).

Vários mediadores inflamatórios, como bradicinina, prostaglandinas (PGs), leucotrienos, serotonina, histamina, substância P, tromboxanos, fator de ativação plaquetária, adenosina, ATP, prótons e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio atuam no desenvolvimento da resposta inflamatória. As citocinas são um grupo diversificado de peptídeos e glicopeptídeos que coordenam e ativam as respostas das células do sistema imune. As citocinas são secretadas por diferentes células em resposta a uma variedade de estímulos e induzem efeitos característicos sobre o crescimento, a motilidade, a diferenciação e a função das células alvo. Essas substâncias também atuam em vários processos como cicatrização, hematopoese e angiogênese. Uma determinada citocina pode ser secretada individualmente ou como parte de uma resposta coordenada, juntamente com outras citocinas não relacionadas. Além disso, uma citocina pode induzir a expressão de outras citocinas ou mediadores, induzindo, assim, uma cascata de efeitos biológicos que amplificam a resposta inflamatória e influenciam a sua evolução (Collins, 1999; Sherwood & Toliver-Kinsky, 2004). Interleucinas (ILs), interferons (IFNs), fatores estimuladores de colônia (CSFs), quimiocinas e o fator de crescimento transformante beta (TGF β) fazem parte desse grupo.

Além dessas citocinas, destacam-se os fatores de necrose tumoral (TNFs), mediadores que exercem um papel fundamental nas inflamações aguda e crônica e no desenvolvimento de desordens autoimunes e câncer. Entre os diversos tipos de TNF, destacam-se o TNF- α e o TNF- β , produzidos principalmente por macrófagos e linfócitos T, respectivamente (Tansey & Szymkowski, 2009). As interações dos TNFs com seus receptores, TNFR1 ou TNFR2, podem resultar na ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) e da proteína ativadora-1 (AP-1), responsáveis pela transcrição de genes para citocinas inflamatórias diversas. Além de estimularem a produção de vários mediadores inflamatórios, os TNFs podem induzir apoptose, formação de espécies reativas de oxigênio e necrose celular (Chu, 2013).

Os mediadores inflamatórios também induzem a ativação ou a sensibilização de neurônios sensoriais, o que pode resultar em dor, alodínia ou hiperalgesia. A dor é definida pela *International Association for the Study of Pain* como uma experiência desagradável que envolve aspectos sensoriais e emocionais, geralmente associada a uma lesão real ou potencial. A alodínia é a dor induzida por estímulos que, em condições normais, não provocam dor, enquanto a hiperalgesia é a dor mais intensa

induzida por um estímulo que originalmente é doloroso (Collins, 1999; Julius & Basbaum, 2001).

A dor é uma das modalidades sensoriais resultante da integração de vários níveis neurais, compreendendo, na maioria dos casos, a detecção do estímulo na periferia e o processamento em áreas superiores do sistema nervoso central (SNC). Existem quatro categorias principais de dor. A dor nociceptiva é induzida por estímulos nocivos de naturezas térmica, química ou mecânica que ativam diretamente os neurônios sensoriais de diâmetro médio e levemente mielinizados, denominados nociceptores A δ , e os neurônios sensoriais de menor diâmetro e não mielinizados, denominados de nociceptores C. A dor inflamatória está associada à produção de vários mediadores inflamatórios, como citocinas, eicosanoides, serotonina, histamina, substância P e adenosina, que ativam ou sensibilizam os nociceptores, levando a alterações funcionais de neurônios do SNC. Entre esses mediadores, destaca-se o TNF- α que está envolvido na sinalização nociceptiva e hiperexcitabilidade neural (Leung & Cahill, 2010; George *et al.*, 1999; Schfers *et al.*, 2003; Sacerdote *et al.*, 2008). A dor neuropática decorre de lesões ou disfunção do SNC ou de nervos. Condições como síndrome do túnel do carpo, lesão da medula espinhal ou acidente vascular cerebral podem causar dor neuropática, que é caracterizada por uma combinação de comprometimentos neurológicos e dor. A dor funcional está vinculada com o funcionamento e/ou reatividade anormal do sistema nervoso e pode ser exemplificada pela cefaleia tensional (Julius & Basbaum, 2001; Scholz & Woolf, 2002).

1.2 Fármacos anti-inflamatórios e analgésicos

Alguns sinais e sintomas da inflamação aguda, como dor e edema, podem causar desconforto aos pacientes. A resposta inflamatória crônica também pode resultar em dor e edema, bem como em outras complicações indesejáveis devido à destruição tecidual. Nesses casos, as intervenções farmacoterapêuticas mais comuns envolvem o uso de fármacos que reduzem o processo inflamatório por meio da inibição da produção, da liberação ou da ação de mediadores inflamatórios ou

mesmo que induzem a produção de fatores endógenos com propriedades anti-inflamatórias.

Anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) (Livingston 2000; Papich, 2000; Vane, 1971) apresentam grande eficácia como agentes analgésicos e antiedematogênicos. Por outro lado, os anti-inflamatórios esteroides (AIEs), por apresentar atividade anti-inflamatória mais ampla do que aquela apresentada pelos AINEs, são utilizados por pacientes com doenças inflamatórias crônicas, principalmente de origem auto-imune (Barnes & Adcock 1993). Além dos AINEs, úteis para o alívio da dor, outra classe farmacológica muito usada é a dos analgésicos opioides (Papich, 2000).

Entretanto, para diversas condições dolorosas, esses fármacos são ineficazes e, por isso, alguns fármacos, originalmente aprovados para outras finalidades terapêuticas, têm sido usados para o alívio da dor associada ou não a condições inflamatórias. Antidepressivos tricíclicos, exemplificados pela amitriptilina, têm sido usados na profilaxia de enxaqueca, fibromialgia, neuropatia diabética e lombalgia persistente (Chan *et al.*, 2009). Anticonvulsivantes (carbamazepina, fenitoína, gabapentina, topiramato), agonistas alfa-2 adrenérgicos (clonidina) e antagonistas de receptores NMDA (cetamina) também têm sido usados para o alívio de dores neuropáticas (Brower, 2000; Kamibayashi & Maze, 2000; Park & Moon, 2010).

1.3 Acoplamento de doadores de óxido nítrico (NO) aos fármacos anti-inflamatórios e analgésicos

O NO é uma molécula simples que exerce várias funções fisiológicas e não fisiológicas. Presente em quase todas as células, o NO desempenha diferentes atividades como controle do tônus vascular, neurotransmissão, indução da expressão gênica de fatores de transcrição, regulação da função imunológica e da apoptose (Coleman, 2001; Korhonen *et al.*, 2005; Nagy *et al.*, 2007).

Existem diferentes mecanismos moleculares que medeiam as atividades biológicas do NO. Primeiro, o NO regula a atividade de diversas enzimas, por meio da reação com os metais de transição, como ferro, cobre e zinco, presentes nos grupos

prostéticos dessas proteínas. A principal sinalização mediada pelo NO ocorre por meio da ativação da enzima citosólica guanilato ciclase, resultando na formação de GMP cíclico (GMPc). Segundo, o NO é capaz de modificar os resíduos de cisteína por meio de uma reação de S-nitrosilação. Essa modificação pode alterar as atividades de diversas proteínas envolvidas na regulação celular. Terceiro, o NO reage rapidamente com o ânion superóxido (O_2^-), resultando na formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), um forte oxidante capaz de modificar proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Gow *et al.*, 2004; Korhonen *et al.*, 2005).

É importante mencionar que o NO exibe atividades opostas, que podem ser dependentes da sua concentração local, da sua reatividade com as outras moléculas e do seu local de ação (Coleman, 2001). Por exemplo, o NO pode induzir efeitos oxidante ou antioxidante em lesões vasculares (Patel *et al.*, 2000), facilitação ou inibição do processamento periférico da resposta nociceptiva (Duarte *et al.*, 1992; Duarte & Ferreira, 1992; Prado *et al.*, 2002; Hancock *et al.*, 2008), efeitos inflamatórios ou anti-inflamatórios em modelos experimentais (Coleman *et al.*, 2001; Korhonen *et al.*, 2005; Abramson *et al.*, 2008) e, ainda, facilitação ou inibição da apoptose (Taylor *et al.*, 2003).

O NO pode exercer sinalizações importantes na regulação da resposta imunológica como a inibição do NF- κ B (Matthews *et al.*, 1996), resultando na diminuição da síntese de mediadores inflamatórios. Vários estudos demonstraram o efeito inibitório induzido pelo NO sobre a ativação do NF- κ B induzida por IL-1 β (Katsuyama *et al.*, 1998; Rosa *et al.*, 2008), TNF- α (Peng *et al.*, 1995; Reynaert *et al.*, 2004) ou lipopolissacarídeo (LPS) (de la Torre *et al.*, 1999). Em relação aos efeitos induzidos pelo NO sobre a regulação direta da síntese do TNF- α , há resultados opostos provenientes de estudos *in vitro* nos quais foram utilizadas diferentes linhagens celulares. Eigler *et al.* (1995) e Huang *et al.* (1998) demonstraram a inibição e o aumento, respectivamente, da síntese dessa citocina induzida por NO. Também, há descrição de efeitos opostos induzidos pelo NO sobre a síntese de outras citocinas. Por exemplo, foi demonstrado que o NO inibe e aumenta a síntese da IL-12 e do TNF- α , respectivamente, em macrófagos estimulados por LPS e IFN- γ (Huang *et al.*, 1998).

O NO também regula a atividade dos neutrófilos. Estudos *in vitro* demonstraram que o NO inibe a degranulação e a formação de fatores quimiotáticos e de espécies reativas em neutrófilos ativados (Clancy *et al.*, 1992; Moilanen *et al.*, 1993). O NO também regula o recrutamento dessas células para o foco inflamatório por meio da diminuição do rolamento e da adesão no endotélio vascular e da inibição da produção das moléculas de adesão (Kosonen *et al.*, 2000; Lefer *et al.*, 1999; Lindemann *et al.*, 2000).

A partir do conhecimento das atividades biológicas do NO, algumas linhas de pesquisa focaram na modulação dessas atividades, por meio do aumento ou da inibição da sua formação. A inibição da produção de NO é uma estratégia que pode contribuir para atenuação de vários parâmetros inflamatórios, uma vez que é comum observar um aumento da expressão do gene da iNOS e da produção de NO em sítios inflamatórios. Essa molécula está envolvida na imunidade inata como um agente citotóxico em processos infecciosos e está presente em altas concentrações nos tecidos de pacientes com artrite reumatoide ou asma. Assim, a identificação de inibidores seletivos para essa enzima poderia prevenir o excesso da liberação de NO nos tecidos alvos e, conseqüentemente, atenuar sinais e sintomas da inflamação (Korhonen *et al.*, 2005; Nagy *et al.*, 2007; Coleman, 2001).

Por outro lado, considerando que em algumas doenças a produção de NO está reduzida, outras abordagens tiveram como objetivo fornecer um suplemento desse mediador por meio do uso de substâncias acopladas com um agrupamento doador de NO. Duas classes de fármacos conhecidos e amplamente usados, às quais têm sido acoplados doadores de NO, são os AINEs e AIEs. Entre os fármacos acoplados a doadores de NO podem ser mencionados o ácido acetilsalicílico (Fiorucci *et al.*, 2000; Turnbull *et al.*, 2008), o paracetamol (Romero-Sandoval *et al.*, 2007), o naproxeno (Young *et al.*, 2005) e a prednisolona (Tallet *et al.*, 2002). Esses fármacos acoplados a doadores de NO demonstraram melhor perfil farmacológico, seja por meio do aumento da eficácia terapêutica ou da redução da ocorrência de reações adversas (Keeble & Moore, 2002; Fiorucci, 2001; Miller & Megson, 2007).

Por exemplo, Fiorucci *et al.* (2000) demonstraram que a sustância NCX-4016, resultado do acoplamento de um doador de NO ao ácido acetilsalicílico, inibe a

produção de citocinas inflamatórias. O NCX-4016 inibe a produção das citocinas IL-1 β , IL-8, IL-12, IL-18, IFN- γ e TNF- α por monócitos estimulados por LPS. O ácido acetilsalicílico e o análogo hidroxilado NCX-4017 não apresentam essa atividade (**Figura 1**). Testes *in vitro* demonstraram que a substância NCX-4016, mas não o ácido acetilsalicílico e o NCX-4017, libera NO e a formação de GMPc intracelular, efeitos essenciais para explicar as diferentes atividades dessas três substâncias. Além disso, diferentemente do NCX-4016, o NCX-4017 diminui a viabilidade celular e, em determinadas concentrações, induz morte celular. É interessante observar que a substituição do doador de NO pela hidroxila resultou em uma substância citotóxica e sem atividade farmacológica de interesse.

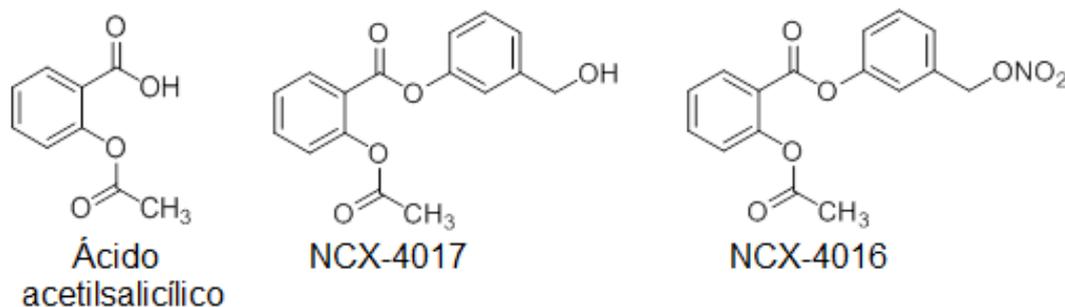


Figura 1 - Estruturas químicas do ácido acetilsalicílico e seus análogos NCX-4017 [não acoplado com doador de NO – (hidroximetil)fenil] e NCX-4016 [acoplado com doador de NO – (nitroximetil)fenil]. Fonte: Fiorucci *et al.*, 2000.

1.4 Talidomida como candidata a fármaco analgésico

Outra classe de substâncias que tem sido muito investigada em diferentes condições dolorosas e inflamatórias é derivada da ftalimida (**Figura 2**). Efeitos marcantes induzidos por substâncias ftalimídicas sobre várias vias bioquímicas importantes para o processamento nociceptivo e para o desenvolvimento da resposta inflamatória foram amplamente demonstrados em vários ensaios farmacológicos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*. Ao longo do tempo, a talidomida (N-ftalimidoglutaramida) destacou-se entre as várias substâncias ftalimídicas devido às suas inúmeras atividades biológicas (Sharma *et al.*, 2010).

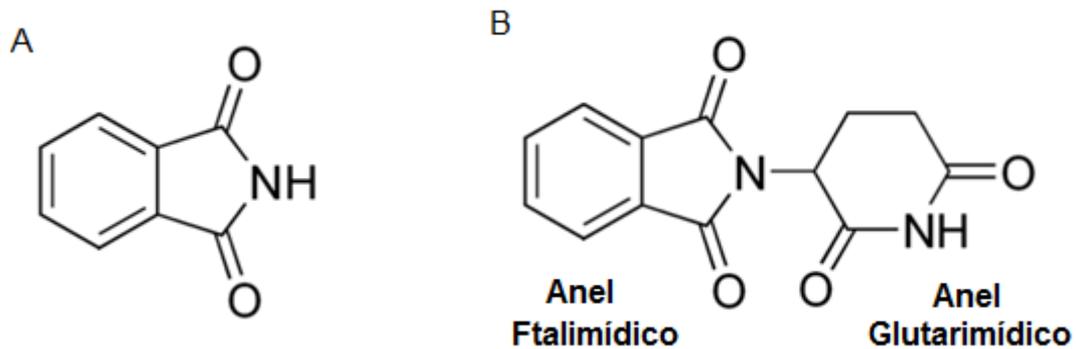


Figura 2 - Estruturas químicas da ftalimida (A) e da talidomida (B).

A talidomida foi desenvolvida na década de 1950 pelo laboratório alemão *Chemie Grünenthal* visando o tratamento de pacientes com epilepsia, uma vez que a sua estrutura química se assemelhava àquela dos barbitúricos (Brynner & Stephens, 2001; Hashimoto, 2002). Após a realização de ensaios pré-clínicos que mostraram a falta de eficácia em modelos experimentais de epilepsia, mostrou-se ser um sedativo seguro. Ensaios limitados realizados em roedores mostraram que a talidomida não apresentava toxicidade. Em função dessas evidências, ensaios clínicos foram iniciados na Alemanha, uma vez que não havia uma regulamentação rígida pelas agências de fiscalização para a aprovação e o acompanhamento desses ensaios (Brynner & Stephens, 2001; Gaudillière & Volker, 2012).

Em 1957, a talidomida passou a ser comercializada como um sedativo e hipnótico. Considerada um fármaco seguro, uma vez que o risco de morte decorrente do uso de dose excessiva era muito menos provável do que aquele associado ao uso dos barbitúricos, passou a ser usada na Europa, Austrália, Ásia e América do Sul. A talidomida também passou a ser usada amplamente como antiemético por mulheres grávidas. Nos Estados Unidos, a talidomida não foi aprovada pela agência regulatória Food and Drug Administration (FDA), devido a indícios de neurotoxicidade diagnosticados em alguns pacientes (Fullerton & Kremer, 1961; Brynner & Stephens, 2001).

Após quatro anos de comercialização da talidomida em vários países, William McBride (Austrália) e Widukind Lenz (Alemanha) descreveram o aparecimento de

malformações em recém-nascidos cujas mães foram expostas à talidomida durante a gravidez (Lenz, 1962; McBride, 1961). Em outros países, inúmeros médicos confirmaram o relato desses dois investigadores. No final de 1961, a talidomida foi retirada do mercado devido a sua associação com a ocorrência de malformações em recém-nascidos (Pliess, 1962; Sommers, 1962; Speirs, 1962; Ward, 1962). Na época, não havia uma compreensão adequada sobre estudos toxicológicos em animais. Após algumas investigações, foi constatada que a avaliação dos riscos de teratogenicidade em ensaios toxicológicos realizados apenas em roedores fornecia resultados que proporcionavam uma falsa ideia de segurança. Vários estudos demonstraram teratogenicidade evidente induzida pela talidomida em coelhos, mas não em ratos ou camundongos (Felisati & Knapp, 1962; Fratta *et al.*, 1965; King & Kendrick, 1962; Schumacher *et al.*, 1968; Vickers *et al.*, 1967). A partir desse grave episódio, as agências regulatórias foram reorganizadas com novas leis e normas mais rígidas e responsáveis para a aprovação de ensaios pré-clínicos e clínicos de candidatos a fármacos (Brynnner & Stephens, 2001; Gaudillière & Volker, 2012).

Apesar da retirada da talidomida do mercado, investigações sobre a sua atividade farmacológica continuaram a ocorrer. Inicialmente, de forma inesperada, o médico israelense Jacob Sheskin relatou a eficácia da talidomida no tratamento de um paciente com eritema nodoso hansênico (ENH) (Sheskin, 1965). A talidomida promoveu a cicatrização das lesões de pele e reduziu a febre e a insônia (Pearson & Vedagiri, 1969; Sheskin, 1965; Waters, 1971). A partir dessa descoberta, a Organização Mundial da Saúde (OMS) coordenou um estudo com milhares de pacientes com ENH. Os resultados mostraram que, após algumas semanas de tratamento com a talidomida, houve completa remissão da doença na maioria dos pacientes (Iyer *et al.*, 1971). Posteriormente, foi demonstrada a eficácia da talidomida no tratamento de pacientes com síndrome de Behçet (Hamza 1986; Mascaro *et al.*, 1979), doença do enxerto contra hospedeiro após o transplante de medula óssea (Lim *et al.*, 1988; McCarthy *et al.*, 1989) ou com a síndrome da imunodeficiência adquirida apresentando úlceras orais (Jacobson *et al.*, 1997; Youle *et al.*, 1989) ou desnutrição (Reyes-Teran *et al.*, 1996).

Em 1998, o FDA aprovou a utilização da talidomida para o tratamento de pacientes com ENH após maiores investigações dos efeitos induzidos pela talidomida sobre o

sistema imunológico (Sampaio *et al.*, 1993) e o desenvolvimento de um Sistema de Educação e Segurança de Prescrição da Talidomida (STEPS) (Nightingale, 1998; Zeldis *et al.*, 1999). Após 40 anos, houve a reintrodução da talidomida na farmacoterapia com novos usos, novas pesquisas clínicas e acompanhamento rígido do seu perfil de segurança pelas agências regulatórias (FDA 1).

As propriedades imunossupressoras da talidomida foram úteis para justificar o seu uso no tratamento de pacientes com diversas doenças para as quais há poucas opções de tratamento. Vários estudos demonstraram a eficácia da talidomida no tratamento de pacientes com artrite reumatoide (Gutierrez-Rodriguez, 1984), lúpus eritematoso sistêmico (Atra & Sato, 1993; Stevens *et al.*, 1997), tuberculose (Tramontana *et al.*, 1995) e doença de Crohn (Fishman *et al.*, 1999; Wettstein & Meagher, 1997). Nos últimos anos, também foi demonstrada a eficácia da talidomida para o tratamento de pacientes com mieloma múltiplo (Juliusson *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2004a; Singhal *et al.*, 1999). A partir dessas evidências, começou a ser investigada a eficácia da talidomida no tratamento de pacientes com câncer renal (Stebbing *et al.*, 2001; Eisen *et al.*, 2000), câncer de próstata metastático (Macpherson *et al.*, 2003) e melanoma metastático (Pawlak & Legha, 2004; Reiriz *et al.*, 2004). Em 2006, o FDA aprovou a utilização da talidomida em combinação com dexametasona para o tratamento de pacientes recém-diagnosticados com mieloma múltiplo (FDA 2; Rajkumar *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2003). As principais reações adversas induzidas pela talidomida foram sonolência, constipação, lesões eritematosas, neuropatia periférica e trombose venosa, que ocorreram de forma dose-dependente (Ghobrial & Rajkumar, 2003).

A eficácia da talidomida para o tratamento de pacientes com diferentes doenças estimulou investigações sobre os mecanismos de ação que explicassem as suas atividades imunossupressora e anti-inflamatória. O primeiro efeito induzido pela talidomida a ser demonstrado foi a inibição da síntese de TNF- α por meio da degradação do seu mRNA em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) estimuladas por LPS (Moreira *et al.*, 1993; Sampaio *et al.*, 1991). Os benefícios conferidos pela talidomida durante tratamento dos pacientes com desordens autoimunes foram, inicialmente, atribuídos à redução das concentrações de TNF- α (Sampaio *et al.*, 1993; Matthews & McCoy, 2003).

Entretanto, os efeitos imunomodulatórios induzidos pela talidomida são variáveis, dependendo do tipo de célula ativada ou do estímulo aplicado. Além da capacidade de inibição da produção de TNF- α por cultura de PBMC estimulada por LPS (Sampaio *et al.*, 1991; Moreira *et al.*, 1993), a talidomida aumenta as concentrações de TNF- α e de outras citocinas como IL-2, IL-12 e IFN- γ quando essas células são estimuladas por anticorpos anti-CD3 (Corral *et al.*, 1999; Haslett *et al.*, 1998; Marriott *et al.*, 2002). Em cultura de células leucêmicas HL-60, a estimulação por ácido ocadáico ou acetato de tetradecanoilforbol induz aumento de produção de TNF- α . A produção dessa citocina estimulada por ácido ocadáico ou acetato de tetradecanoilforbol pode ser inibida ou aumentada, respectivamente, pela talidomida (Hashimoto, 2002). Nishimura *et al.* (1994) também demonstraram que talidomida aumenta a produção de TNF- α por outras linhagens de células leucêmicas. Outros estudos *in vitro* mostraram a inibição ou o aumento das concentrações de TNF- α induzidas pela talidomida em diferentes células mononucleares estimuladas por LPS (Shannon & Sandoval, 1996).

Os efeitos opostos induzidos pela talidomida, especificamente sobre a produção de TNF- α , podem influenciar o quadro clínico apresentado pelo paciente, dependendo do estado da doença, da variação de ativação do sistema imunológico e das vias de sinalização presentes. Por exemplo, Sampaio *et al.* (1993) demonstraram a diminuição das concentrações plasmáticas de TNF- α em pacientes com ENH tratados com a talidomida, enquanto Jacobson *et al.* (1997) demonstraram efeito oposto em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida. Nesse último estudo, houve aumento na produção do RNA viral no grupo de pacientes tratados com o fármaco após quatro semanas, um efeito que pode estar relacionado com a maior replicação do vírus em células infectadas induzida por TNF- α (Poli *et al.*, 1990). Em relação aos sinais e sintomas dos pacientes, houve uma melhora no quadro clínico com a cicatrização das úlceras aftosas e alívio da dor (Jacobson *et al.*, 1997). Outra atividade demonstrada para a talidomida foi a coestimulação de linfócitos T e maiores proliferação e citotoxicidade dessas células (Haslett *et al.*, 1998). Essa atividade mostrou-se importante para o aumento da resposta imunológica a antígenos tumorais durante o tratamento de pacientes com câncer.

As atividades da talidomida não se restringem à modulação da produção de TNF- α . Alguns estudos demonstraram a sua capacidade de inibir a ativação de NF- κ B (Jin *et al.*, 2002; Keifer *et al.*, 2001; Lv *et al.*, 2007; Majumdar *et al.*, 2001). Esse fator de transcrição é um alvo molecular interessante a ser explorado em estudos visando o desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios, uma vez que está envolvido na gênese de várias desordens inflamatórias e dolorosas (Didonato *et al.*, 2012; Niederberger & Geisslinger, 2008; Tak & Firestein, 2001). NF- κ B regula a transcrição de genes que codificam vários mediadores e enzimas com papel importante no processo inflamatório, incluindo citocinas, quimiocinas, óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclo-oxigenase-2 (COX-2), fatores de adesão e proteínas envolvidas em apoptose celular (Pahl, 1999).

Payvandi *et al.* (2004) também demonstraram que a talidomida inibe a expressão do gene que codifica a enzima COX-2. Esse efeito é importante, uma vez que o aumento da expressão do gene que codifica COX-2 ocorre em várias desordens inflamatórias e neoplásicas (Williams *et al.*, 1999; Greene *et al.*, 2011), incluindo câncer de pulmões (Khuri *et al.*, 2001), cérebro e pescoço (Zweifel *et al.*, 2002) e processos de angiogênese (Sengupta *et al.*, 2003; Tsujii *et al.*, 1998), bem como em processos dolorosos associados a neuropatias (Kellogg & Pop-Busui, 2005; Ma & Eisenach, 2003) e dor inflamatória (Samad *et al.*, 2001). A talidomida também diminui a expressão de genes que codificam moléculas de adesão como as E- e L-selectinas e a VCAM-1, responsáveis pelo recrutamento de leucócitos para a área de inflamação, uma atividade que também pode contribuir para a atenuação da resposta inflamatória. Entretanto, os efeitos induzidos pela talidomida são mais complexos, uma vez que, além da inibição da produção dessas moléculas, foi demonstrado o aumento da produção da molécula de adesão ICAM-1, indicando que o fármaco pode modular a migração de leucócitos (Geitz *et al.*, 1996).

Outros estudos demonstraram a atividade antiangiogênica da talidomida, independentemente do seu efeito imunomodulatório. A talidomida inibe a angiogênese induzida pelo fator de crescimento básico de fibroblasto (FGFb) ou pelo fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (D'Amato *et al.*, 1994; Kenyon *et al.*, 1997; Kruse *et al.*, 1998). Essas observações aumentaram o interesse dos pesquisadores em investigar os potenciais benefícios do fármaco no tratamento de

pacientes com câncer (Kumar *et al.*, 2002; 2004b; Richardson *et al.*, 2002a), uma vez que a angiogênese está envolvida no desenvolvimento de tumores (Folkman, 1974). Entretanto, alguns estudos clínicos não encontraram uma correlação entre as alterações na produção dos fatores angiogênicos e a evolução clínica dos pacientes tratados com a talidomida (Baidas *et al.*, 2000; Reiriz *et al.*, 2004; Pinter *et al.*, 2008; Young *et al.*, 2012).

Além da eficácia analgésica da talidomida observada em pacientes com ENH ou distúrbios autoimunes (Matthews & McCoy, 2003), essa atividade foi observada em pacientes com mieloma múltiplo que apresentavam a síndrome de dor regional complexa (CRPS), conhecida como distrofia simpática reflexa. Os sinais e sintomas mais comuns dessa síndrome são dor, alodínia, edema, disfunção autonômica e movimentos desordenados (Schwartzman *et al.*, 2009). O tratamento com a talidomida resultou no alívio da dor, o que contribuiu para a redução do uso de analgésicos tradicionais por alguns pacientes (Rajkumar *et al.*, 2001; Schwartzman *et al.*, 2003).

Após as investigações da atividade imunomodulatória da talidomida, alguns estudos avaliaram o efeito induzido por esse fármaco em modelos experimentais de dor neuropática, uma vez que a atividade supracitada poderia diminuir a neuroinflamação e, conseqüentemente, induzir efeito antinociceptivo. George *et al.* (2000) e Sommer *et al.* (1998a) demonstraram a atenuação da hiperalgesia térmica e da alodínia mecânica induzidas por constrição do nervo ciático em animais tratados com a talidomida. A atenuação da alodínia e da hiperalgesia induzida pela talidomida observada no estudo de George *et al.* (2000) foi associada à redução e ao aumento das concentrações de TNF- α e de IL-10 endoneuriais, respectivamente, e a um aumento do conteúdo de met-enkefalina no corno dorsal da medula espinhal. Andrade *et al.* (2012), por sua vez, demonstraram que a talidomida reduz as hipersensibilidades térmica e mecânica em animais com constrição do nervo ciático, associada à redução da produção de TNF- α e da expressão do gene para o receptor TNFR1 na medula espinhal.

Seguindo a descoberta das atividades imunomodulatória, anti-inflamatória, antinociceptiva e antiangiogênica da talidomida, a síntese de análogos ftalimídicos

que apresentem maior atividade farmacológica e melhor perfil de segurança tem sido apresentada como um objetivo importante.

1.5 Novos análogos ftalimídicos como candidatos a fármacos analgésicos

Ao longo das duas últimas décadas, diferentes grupos de pesquisa sintetizaram várias substâncias que foram coletivamente chamadas de análogos da talidomida, embora algumas apresentem diferenças estruturais muito marcantes em relação ao fármaco original (Corral & Kaplan, 1999; Hashimoto 2002; 2008; Muller *et al.*, 1996). Em alguns casos, as substâncias sintetizadas apresentam estruturas caracterizadas pela presença dos anéis ftalimídico e glutarimídico, com várias substituições, o que determina maior semelhança estrutural em relação à talidomida. Entretanto, em outros casos, a semelhança estrutural com a talidomida é muito reduzida, uma vez que as substâncias sintetizadas contém apenas um dos anéis, com substituições diversas. O objetivo maior desses estudos foi a obtenção de substâncias com maior atividade imunomodulatória e melhor perfil de segurança.

Inicialmente, uma série de substâncias substituídas foram planejadas e sintetizadas, resultando em análogos mais potentes que a talidomida em relação à inibição da produção de TNF- α (Corral *et al.*, 1996; 1999; Muller *et al.*, 1999). Após a realização de ensaios pré-clínicos, nos quais foram avaliados os perfis farmacológicos, incluindo farmacocinético, e toxicológico, foram identificadas duas substâncias, CC-5013 (lenalidomida) e CC-4047 (pomalidomida) (**Figura 3**), com grande potencial para o tratamento de pacientes com câncer. Vários ensaios clínicos avaliaram os efeitos induzidos pela lenalidomida e pela pomalidomida, de forma isolada ou associada a outros fármacos, em pacientes com mieloma múltiplo (Bartlett *et al.*, 2004; Dimopoulos *et al.*, 2007; Lacy *et al.*, 2009; Richardson *et al.*, 2002b; 2013; Schey *et al.*, 2004).

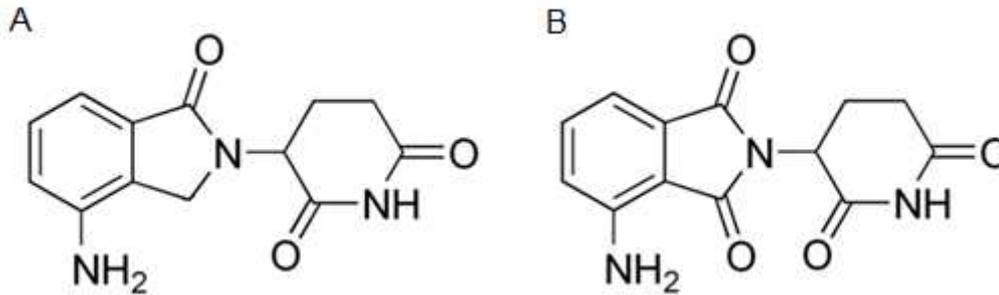


Figura 3 - Estruturas químicas da lenalidomida (A) e da pomalidomida (B).

Em 2005, o FDA aprovou a utilização da lenalidomida para o tratamento de pacientes com síndrome mielodisplásica associada à deleção do cromossomo 5q (FDA 3). Um ano depois, o FDA aprovou a utilização da lenalidomida em combinação com dexametasona para o tratamento de pacientes com mieloma múltiplo que não responderam a tratamentos prévios (FDA 4). É importante mencionar que as seguranças da talidomida e da lenalidomida no tratamento de pacientes com doenças crônicas têm sido continuamente monitoradas pelas agências regulatórias. Em 2011, o FDA divulgou um alerta sobre os resultados de ensaios clínicos realizados com pacientes que estavam sendo tratados com lenalidomida e apresentaram risco aumentado de desenvolvimento de novos tipos de câncer. A agência regulatória vem revisando toda informação disponível sobre o tema e recomenda cautela na interpretação dos resultados. Entretanto, documento divulgado pelo FDA indica que, após análise dos resultados disponíveis, os benefícios do fármaco continuam superiores aos riscos potenciais detectados nos ensaios clínicos (FDA 5). Em 2012, o FDA informou que a bula do medicamento Revlimid® (lenalidomida) foi modificada de forma a incluir as informações sobre o risco do desenvolvimento de leucemia mieloide aguda, síndromes mielodisplásicas e linfoma de Hodgkin associado ao seu uso. O guia de medicação ao paciente também está sendo atualizado para informar sobre esse possível risco (Dimopoulos *et al.*, 2012; FDA 6; Yang *et al.*, 2012). Em 2013, o FDA também aprovou a utilização da pomalidomida para o tratamento de pacientes com mieloma múltiplo avançado que não tiveram melhora do quadro clínico após o tratamento com outros fármacos antineoplásicos (FDA 7).

Tendo em vista que a talidomida interage com vários alvos moleculares, foram feitas modificações no anel ftalimídico, visando obter substâncias que interagem com alvos específicos e com maiores atividades imunomodulatória e antiangiogênica (Dredge *et al.*, 2002; Hideshima *et al.*, 2000; Marriott *et al.*, 2002). A rápida expansão das pesquisas sobre análogos ftalimídicos é indicativa da grande expectativa de que essas substâncias representem promissores candidatos a fármacos para o tratamento de pacientes com diversas condições inflamatórias e dolorosas, entre outras.

Vários ensaios pré-clínicos demonstraram que alguns desses análogos ftalimídicos apresentam atividade inibitória sobre a produção de TNF- α (de Almeida *et al.*, 2007; Chaulet *et al.*, 2011; Mazzoccoli *et al.* 2012; Miyachi *et al.*, 1997a; b; Stewart *et al.*, 2007; 2010; Teubert *et al.*, 1998). Outros análogos desenvolvidos apresentam atividades diversas entre as quais podem ser mencionadas a inibição das enzimas COX (Noguchi *et al.*, 2002; Sano *et al.*, 2004; Suizu *et al.*, 2003) e iNOS (Noguchi *et al.*, 2004; Shimazawa *et al.*, 2004), bem como da angiogênese (Noguchi *et al.*, 2005; Sano *et al.*, 2006). Alguns análogos ftalimídicos também inibem a polimerização da tubulina, o que lhes confere o perfil de agentes antimetabólicos (Iguchi *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2006; Yanagawa *et al.*, 2006). As estruturas químicas de vários análogos ftalimidicos que foram avaliados em ensaios pré-clínicos estão indicadas na **Figura 4**.

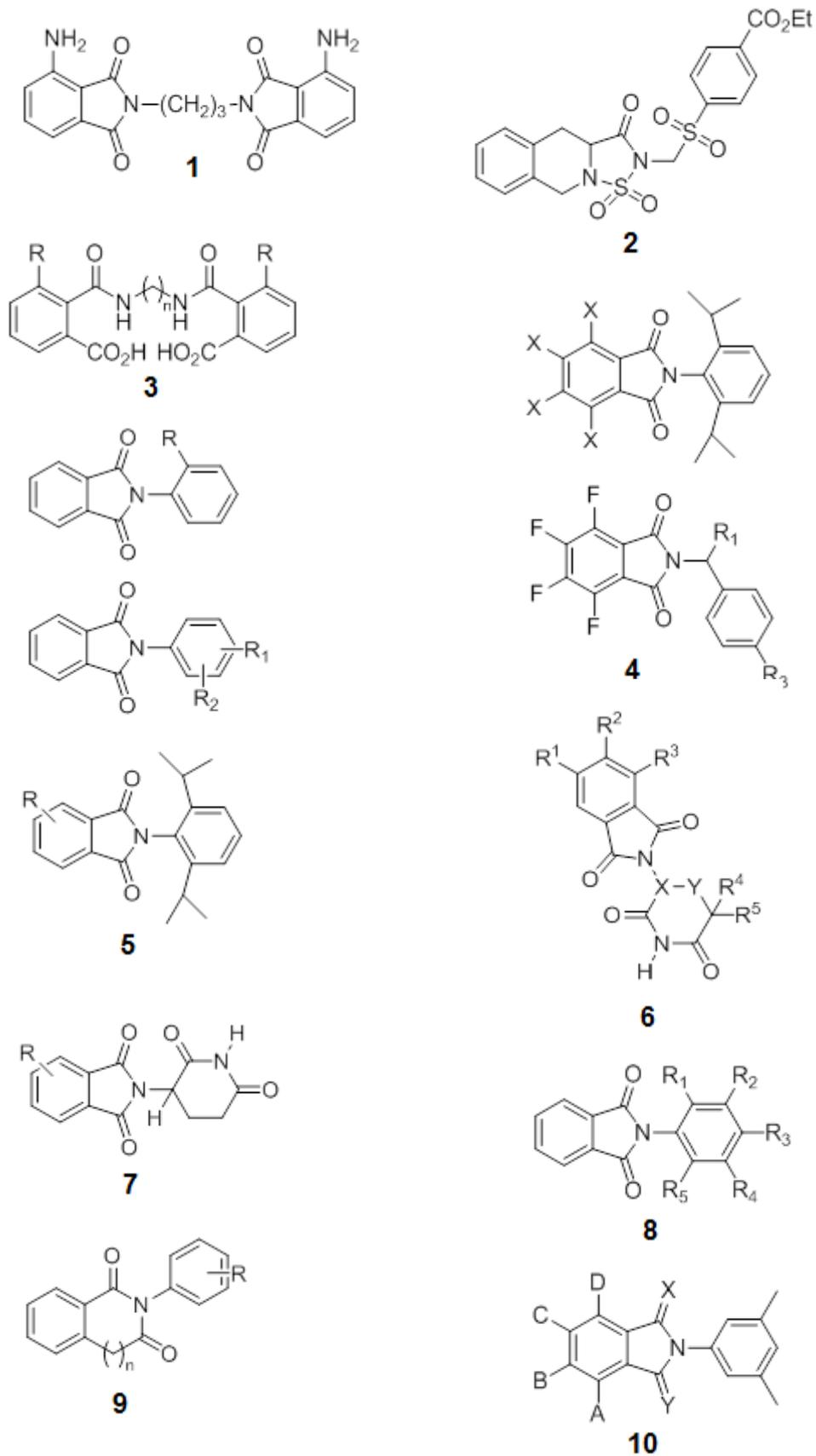


Figura 4 - Estruturas químicas de diferentes análogos ftalimídicos (continua).

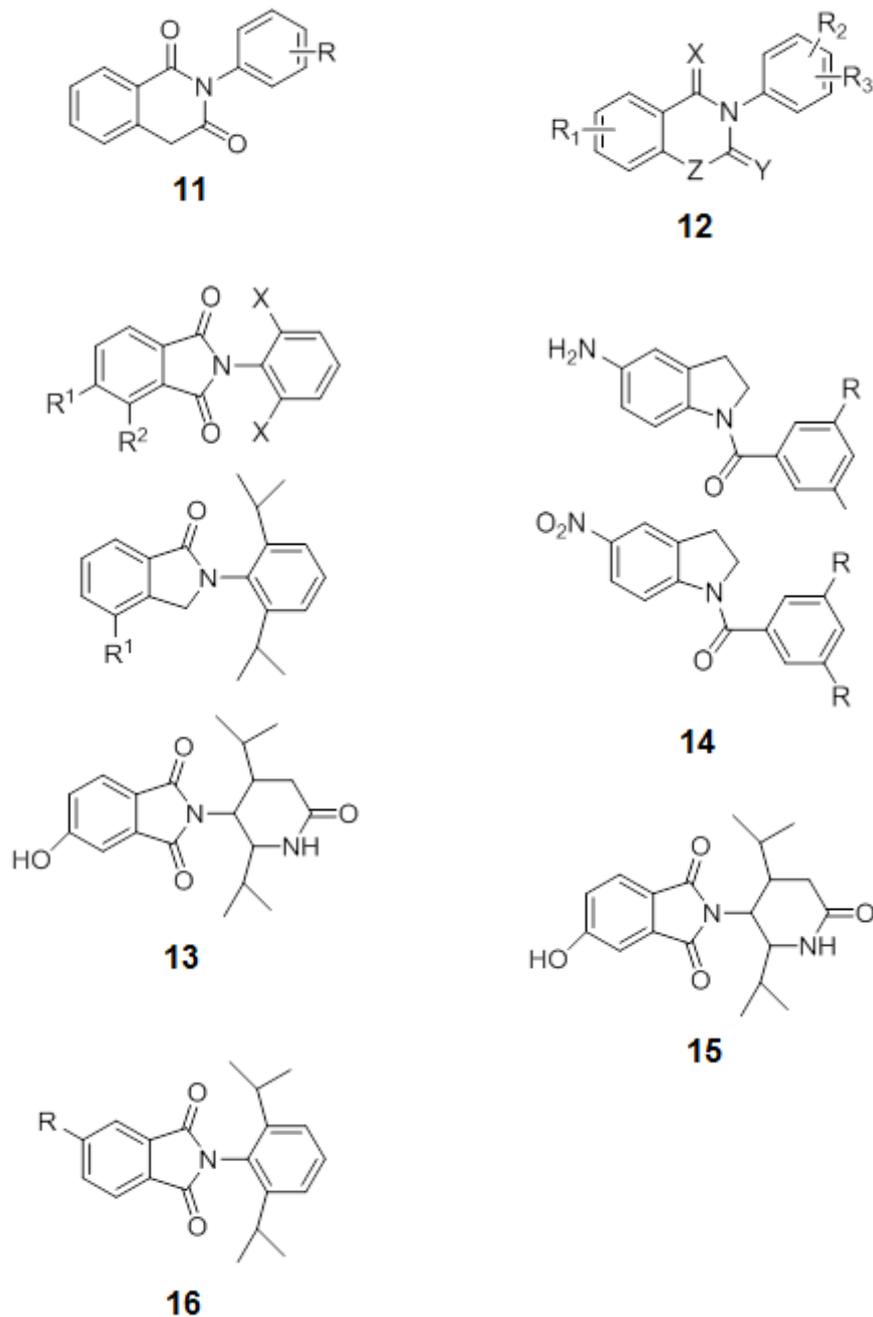


Figura 4 - Estruturas químicas de diferentes análogos fthalimídicos (final). Fonte: 1. de Almeida *et al.*, 2007; 2. Chaulet *et al.*, 2011; 3. Mazzoccoli *et al.*, 2012; 4. Miyachi *et al.*, 1997a; 5. Miyachi *et al.*, 1997b; 6. Stewart *et al.*, 2007; 2010; 7. Teubert *et al.*, 1998; 8. Noguchi *et al.*, 2002; 9. Sano *et al.*, 2004; 10. Suizu *et al.*, 2003; 11. Noguchi *et al.*, 2004; 12. Shimazawa *et al.*, 2004; 13. Noguchi *et al.*, 2005; 14. Sano *et al.*, 2006; 15. Iguchi *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2006; 16. Yanagawa *et al.*, 2006.

Outra estratégia para a produção de novos análogos ftalimídicos envolve o acoplamento de doadores de NO. Por exemplo, Wang *et al.* (2009) sintetizaram uma série de análogos ftalimídicos acoplados a doadores de NO que apresentaram atividade citotóxica em diferentes linhagens de células cancerígenas. Dos Santos *et al.* (2011) também sintetizaram uma série de análogos acoplados a doadores de NO (**Figura 5**). Essas novas substâncias apresentaram atividade antinociceptiva no modelo de constrição abdominal induzida por ácido acético e atividade anti-inflamatória nos modelos de edema de orelha induzida por capsaicina e de peritonite induzido por tioglicolato em camundongos.

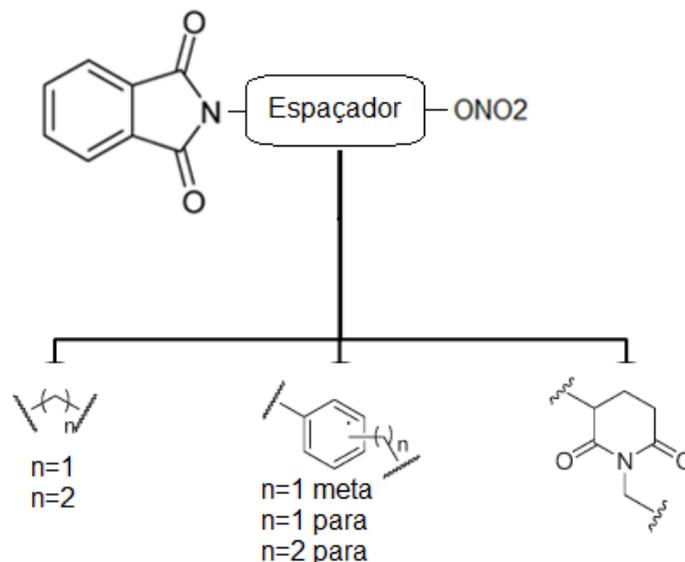


Figura 5 - Planejamento estrutural de análogos ftalimídicos acoplados a doadores de NO.
Fonte: dos Santos *et al.*, 2011.

Uma vez que os análogos ftalimídicos representam objeto de grande interesse de químicos farmacêuticos, a continuidade das investigações nessa área é plenamente justificada. No presente estudo, propusemos a caracterizar os efeitos induzidos por dois análogos ftalimídicos destituídos do anel glutarimídico, o 2-ftalimidoetanol (FTD-OH) e o nitrato de 2-ftalimidoetila (FTD-NO) (**Figura 6**), em diferentes modelos experimentais de dor e inflamação.

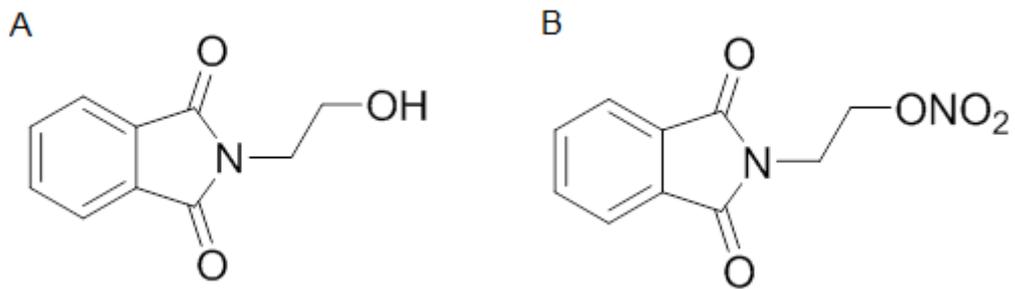


Figura 6 - Estruturas químicas dos análogos ftalimídicos (A) 2-ftalimidoetanol (FTD-OH) e (B) nitrato de 2-ftalimidoetila (FTD-NO).

2 JUSTIFICATIVA

A modificação das estruturas químicas de fármacos conhecidos é um procedimento comum na pesquisa que tem como objetivo o desenvolvimento de novos fármacos. A síntese dessas moléculas modificadas geralmente representa um desafio menor para os químicos e é possível obter moléculas com melhor perfil farmacológico, caracterizado por maior eficácia terapêutica, melhor perfil de segurança ou ambos. Tendo em vista que alguns fármacos que contém o grupo ftalimídico, entre os quais a talidomida, a lenalidomida e a pomalidomida, apresentam atividades anti-inflamatória e analgésica, a investigação das atividades de novos análogos ftalimídicos em modelos experimentais de dor e inflamação representa objeto de interesse atual. Vale ressaltar que os análogos FTD-OH e FTD-NO apresentam estruturas químicas mais simples quando comparados com outros análogos ftalimídicos em investigação (Chaulet *et al.* 2011; Mazzoccoli *et al.* 2012; Miyachi *et al.*, 1997a; Stewart *et al.*, 2007; 2010; Sano *et al.*, 2004; Noguchi *et al.*, 2004) e com a própria talidomida, uma vez que são destituídos do anel glutarimídico. O interesse em substâncias destituídas do anel glutarimídico também deriva de observações fornecidas por vários estudos indicando que a presença desse grupo funcional está associada a um aumento do risco de ocorrência de teratogênese em ensaios pré-clínicos (D'Amato *et al.*, 1994; Huang and McBride, 1997; Joussem *et al.*, 1999; Lepper *et al.*, 2004). Outro aspecto que também tem sido bastante investigado nos últimos anos é a consequência da introdução de grupos doadores de NO sobre a atividade de fármacos anti-inflamatórios. Essa modificação molecular geralmente resulta no aumento da atividade farmacológica e do perfil de segurança da nova substância, uma observação que justifica o interesse na avaliação das atividades de análogos ftalimídicos acoplados a doadores de NO. Assim, a determinação dos perfis farmacológicos do FTD-OH e do FTD-NO representa uma etapa inicial de uma investigação mais ampla que pode resultar na introdução de novos análogos ftalimídicos no tratamento de pacientes com condições inflamatórias ou dolorosas.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos induzidos por dois análogos ftalimídicos destituídos do grupo glutarimídico, FTD-OH e FTD-NO, em diferentes modelos experimentais de inflamação e dor e estabelecer possíveis mecanismos bioquímicos e celulares que poderiam mediar esses efeitos.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos induzidos pelo FTD-OH e pelo FTD-NO em modelos experimentais de inflamação e de dores nociceptiva, inflamatória e neuropática.
- Avaliar os efeitos induzidos pelo FTD-OH e pelo FTD-NO sobre a migração celular e a produção de NO e mediadores inflamatórios, de forma a definir possíveis mecanismos bioquímicos e celulares que poderiam mediar esses efeitos nos modelos experimentais de inflamação e dor.
- Avaliar se os efeitos induzidos pelo FTD-OH e pelo FTD-NO em modelos experimentais de inflamação e dor são mediados pelos sistemas canabinoidérgico, opioidérgico ou pela ativação da via da guanilato ciclase-GMPc.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Foram usados camundongos C57BL/6J (8-9 semanas) machos (**Figura 7**). Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 h e ração e água foram fornecidas *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados em sala com temperatura ambiente de 27 ± 1 °C, correspondente à zona de termoneutralidade para roedores (Gordon, 1990). Os animais foram ambientados na sala de experimentação por pelo menos três dias antes da condução dos experimentos. Após o término dos experimentos, os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂. Os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações para avaliação de dor experimental em animais (Zimmermann, 1983). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA - UFMG, protocolo 48/2011).



Figura 7 - Camundongo C57BL/6J.

4.2 Drogas, veículos e reagentes

➤ **Substâncias avaliadas:**

• **FTD-OH (2-ftalimidoetanol):**

Nome químico (IUPAC): [2-(2-hidroxietil)isoindolina-1,3-diona].

Laboratório de síntese: GEQOB - Departamento de Química, UFMG

Função: Análogo ftalimídico avaliado nos modelos experimentais de dor e inflamação.

- **FTD-NO (nitrate de 2-ftalimidoetila):**

Nome químico (IUPAC): [2-(1,3-dioxoisoindolina-2-il)etilnitrate].

Laboratório de síntese: GEQOB - Departamento de Química, UFMG

Função: Análogo ftalimídico avaliado nos modelos experimentais de dor e inflamação.

- **Talidomida (N-ftalimidoglutaramida)**

Nome químico (IUPAC): [(RS)-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1H-isoindol-1,3(2H)-diona]

Empresa: Funed, Brasil

Função: Fármaco avaliado nos modelos experimentais de dor e inflamação.

➤ **Fármaco usado como controle positivo**

- **Fenobarbital**

Nome químico (IUPAC): 5-etil-5-fenilpirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona.

Empresa: Aventis Pharma, Brasil

Função: Controle positivo no modelo experimental para avaliação da atividade motora (haste girante).

➤ **Antagonistas**

- **AM251**

Nome químico (IUPAC): 1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N-1-piperidinil-1H-pirazol-3-carboxamida.

Empresa: Tocris, EUA

Função: Antagonista de receptores canabínicos CB₁.

- **AM630**

Nome químico (IUPAC): 6-iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1H-indol-3-il](4-etoxifenil)metanona.

Empresa: Tocris, EUA

Função: Antagonista de receptores canabínicos CB₂.

- **Naltrexona**

Nome químico (IUPAC): 17-(ciclopropilmetil)-4,5-epoxi-3,14-dihidroximorfinan-6-ona.

Empresa: Tocris, EUA

Função: Antagonista não seletivo de receptores opioides.

- **ODQ**

Nome químico (IUPAC): 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona.

Empresa: Sigma, EUA

Função: Inibidor da enzima guanilato ciclase.

➤ **Anestésicos**

- **Cloridrato de xilazina (2%) e cloridrato de cetamina (10%)**

Empresa: Synthec, Brasil

Função: Fármacos sedativo/miorrelaxante e anestésico, respectivamente.

Associação de fármacos usada para a indução de anestesia precedendo a cirurgia de constrição do nervo ciático ou a indução de artrite induzida por antígeno.

➤ **Estímulos inflamatórios**

- **Albumina de soro bovino metilada (mBSA) e adjuvante completo de Freund (CFA)**

Empresa: Sigma, EUA

Função: Estímulo usado para a indução da inflamação articular no modelo experimental de artrite induzida por antígeno.

- **Carragenina λ tipo IV**

Empresa: Sigma, EUA

Função: Estímulo inflamatório usado para a indução da alodínia mecânica e do edema de pata.

- **Formaldeído 37%**

Empresa: Sigma, EUA

Função: Estímulo nociceptivo.

➤ **Veículos**

- **Carboximetilcelulose (CMC)**

Empresa: Sigma, EUA

Função: Polímero usado para o preparo das suspensões da talidomida, dos análogos ftalímídicos FTD-OH e FTD-NO e do fenobarbital.

- **Cloreto de sódio (NaCl) 0,9 % p/v não injetável**

Empresa: Sanobiol, Brasil

Função: Veículo usado para o preparo das suspensões de CMC.

- **NaCl 0,9 % p/v injetável**

Empresa: EquiPLEX, Brasil

Função: Veículo usado para o preparo das soluções ou suspensões de estímulos nociceptivo ou inflamatório.

- **Dimetilsulfóxido (DMSO)**

Empresa: Synthec, Brasil

Função: Veículo usado para o preparo da solução de ODQ.

- **Cremofor**

Empresa: Sigma, EUA

Função: Emulsificante usado para o preparo das emulsões de AM251 ou AM630.

- **Álcool etílico**

Empresa: Synthec, Brasil

Função: Veículo usado para o preparo das emulsões de AM251 ou AM630.

4.3 Preparo das soluções, suspensões e emulsões e doses usadas

➤ **Análogos ftalímídicos FTD-OH e FTD-NO, talidomida e fenobarbital**

As suspensões de FTD-OH, FTD-NO, talidomida e fenobarbital foram preparadas em suspensão de CMC 0,5% p/v em solução de NaCl 0,9% p/v, imediatamente antes de cada administração. A administração foi realizada *per os* (p.o.) em volume de 12 ml/kg. As doses de talidomida e FTD-OH usadas nos protocolos experimentais foram equimolares às doses de 125, 250, 500 ou 750 mg/kg de FTD-NO. A dose do

fenobarbital foi 40 mg/kg.

➤ **Estímulos inflamatórios**

• **Formaldeído**

A solução de formaldeído foi preparada em solução de NaCl 0,9% p/v na concentração de 1,84%, imediatamente antes de cada experimento.

• **Carragenina**

As suspensões de carragenina foram preparadas em solução de NaCl 0,9% p/v nas concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5%.

• **mBSA**

A emulsão de mBSA foi preparada em mistura de CFA e tampão fosfato salina (PBS; proporção 1:1) na concentração de 0,25%. As soluções de mBSA 0,1 ou 3% foram preparadas em PBS.

➤ **Antagonistas de receptores/canais iônicos e inibidores enzimáticos**

• **AM251 e AM630**

As emulsões de AM251 e AM630 foram preparadas em cremofor 5% e álcool etílico 5% acrescentadas em solução de NaCl 0,9% p/v. A administração foi realizada por via intraperitoneal (i.p.) em volume de 4 ml/kg. As doses usadas foram 4 e 8 mg/kg. A administração ocorreu 30 min antes da administração dos análogos ftalimídicos FTD-OH e FTD-NO.

• **Naltrexona**

A solução de naltrexona foi preparada em solução de NaCl 0,9% p/v. A administração foi realizada por via i.p. em volume de 4 ml/kg. As doses usadas foram 5 e 10 mg/kg. A administração ocorreu 30 min antes da administração dos análogos ftalimídicos FTD-OH e FTD-NO.

• **ODQ**

A solução de ODQ foi preparada em DMSO 4% acrescentada em solução de NaCl 0,9% p/v. A administração foi realizada por via i.p. em volume de 4 ml/kg. As doses usadas foram 4 e 8 mg/kg. A administração ocorreu 30 min antes da administração dos análogos ftalimídicos FTD-OH e FTD-NO.

➤ **Soluções usadas nos ensaios para a determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) e das concentrações de TNF- α ou CXCL1**

• **Solução de extração de citocinas:**

Reagentes: 2,34 g de NaCl; 50 μ l de tween 20; 500 mg de BSA; 4,48 mg de cloreto de benzalcônio; 37,2 mg de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA); 2 μ l de aprotinina; 1,7 mg de fluoreto de fenilmetilsufonila (dissolvido em 100 μ l de DMSO). Os reagentes foram dissolvidos em 100 ml de PBS 1.

• **Solução tampão fosfato 1 (PBS 1):**

Reagentes: 8 g de NaCl; 0,2 g de cloreto de potássio (KCl) e 2,89 g de fosfato de sódio bibásico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$). Os reagentes foram dissolvidos em 1000 ml de água destilada.

• **Solução tampão fosfato 2 (PBS 2):**

Reagentes: 7,8 g de fosfato de sódio tribásico (Na_3PO_4) e 5 g de brometo de hexa-1,6-bisdeciltrimetilamônio (HETAB). O Na_3PO_4 foi dissolvido em 1000 ml de água destilada e o pH ajustado para 5,4. Após essa etapa, foi acrescentado o HETAB.

• **Solução tampão fosfato 3 (PBS 3):**

Reagentes: 12 g de NaCl; 0,302 g de KCl; 1,725 g fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4); 0,306 g fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4). Os reagentes foram dissolvidos em 1500 ml de água destilada e o pH ajustado para 7,4.

• **Solução de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB):**

Reagente: 3,845 mg de TMB dissolvido em 1 ml de DMSO.

• **Solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2):**

Reagente: H_2O_2 0,002% em PBS 2.

• **Solução tampão de lavagem:**

Reagente: Tween 20 0,1% em PBS 3.

• **Solução tampão de bloqueio (BSA 1%):**

Reagente: 200 mg de BSA dissolvidos em 20 ml de PBS 3.

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

Reagente: 40 mg de BSA dissolvidos em 40 ml de PBS 3.

- **Solução tampão citrato:**

Reagentes: 13,41 g de NaH_2PO_4 e 5,19 g de ácido cítrico. Os reagentes foram dissolvidos em 1000 ml de água destilada e o pH ajustado para 5,0.

- **Solução do substrato (ortofenilenodiamina - OPD):**

Reagentes: 4 mg de ortofenilenodiamina (OPD) e 2 μl de H_2O_2 30%. Os reagentes foram dissolvidos em 10 ml de solução tampão citrato.

- **Solução STOP:**

Reagente: Ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 1 M)

4.4 Resposta nociceptiva induzida por formaldeído

No dia do experimento, os animais foram colocados sob funis de vidro (18 cm de diâmetro e 14 cm de altura) cerca de 10 min antes da administração de formaldeído, para ambientação (**Figura 8**). A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que as massas corporais médias dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes. Foram injetados 10 μl da solução de formaldeído por via intraplantar (i.pl.) na pata posterior direita dos camundongos. A duração do comportamento de lambida após a injeção i.pl. de formaldeído foi determinada nos períodos de 0-5 min e de 15-30 min, que correspondem à primeira e à segunda fase da resposta nociceptiva, respectivamente. Nesse modelo, o controle da temperatura ambiente (27-28 °C) é importante, pois a segunda fase da resposta nociceptiva é bastante reduzida quando o experimento é realizado em temperatura inferior a 23 °C (Tjolsen *et al.*, 1992). Os resultados foram expressos como a duração do comportamento de lambida da pata injetada, durante a primeira e a segunda fase da resposta nociceptiva. Os análogos ftalimídicos FTD-OH e FTD-NO ou a talidomida foram administrados 1 h antes da injeção de formaldeído.

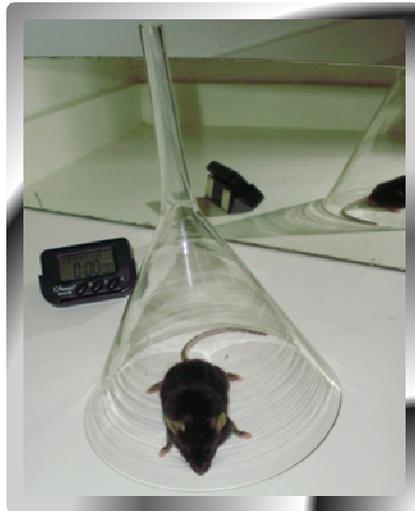


Figura 8 - Aparato usado para a avaliação da resposta nociceptiva induzida por formaldeído.

4.5 Alodínia mecânica induzida por carragenina

A alodínia mecânica foi avaliada por meio do uso de um analgesímetro digital (Modelo EFF 301, Insight Ltda., Ribeirão Preto, Brasil). Esse equipamento é composto por um transdutor de força (faixa: 0,1 a 1000 g, ou aproximadamente 0,1 a 10 N) no qual se acopla uma ponteira de polietileno (0,5 mm de diâmetro) para a determinação do limiar de retirada de pata do animal (**Figura 9**). Nos quatro dias que antecederam os experimentos, os animais foram ambientados durante 1 h por dia em compartimentos de acrílico dispostos sobre um suporte que possui como base uma tela metálica. No dia de avaliação experimental, o transdutor de força foi aplicado perpendicularmente ao centro da superfície plantar da pata posterior direita do animal, gradualmente de baixo para cima, e o valor do limiar de retirada da pata (expresso em gramas) indicado no visor digital do aparelho foi registrado. Foram aplicados cinco estímulos, em intervalos aproximados de 30 s, na pata de cada animal e os limiares de retirada registrados. Os limiares extremos foram eliminados e a média dos três limiares intermediários foi determinada. A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que os limiares basais médios dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes. Para a escolha da concentração ideal da suspensão de carragenina nos protocolos experimentais de alodínia mecânica, foram injetados 20 μ l dessas suspensões (0,5, 1,0 ou 1,5% correspondentes a 100,

200 ou 300 μg de carragenina, respectivamente) por via i.pl. na pata posterior direita dos camundongos. Os análogos ftalimídicos FTD-OH e FTD-NO ou a talidomida foram administrados 1 h antes da administração de 300 μg de carragenina (20 μl da suspensão 1,5%) e os animais foram avaliados em diferentes tempos após a injeção do estímulo inflamatório.

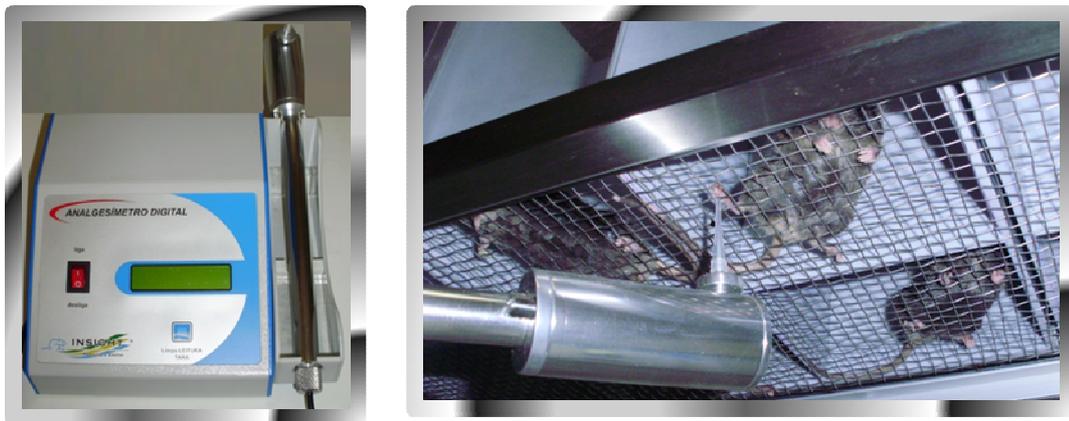


Figura 9 - Aparato usado para a avaliação da alodínia mecânica.

4.6 Edema de pata induzido por formaldeído ou carragenina

Para a avaliação do volume de pata, foi usado o pletismômetro (Modelo 7140, Ugo Basile, Itália). Esse aparelho contém uma célula cilíndrica para a medida do volume de pata, preenchida com uma solução de baixa concentração eletrolítica, conectada a outra célula, dentro da qual existe um eletrodo (**Figura 10**). Um sistema de vasos comunicantes faz com que o deslocamento da solução eletrolítica na célula onde a pata do animal é mergulhada resulte em um deslocamento da solução na célula que contém o eletrodo. Após ter sido calibrado, o aparelho converte o deslocamento do líquido em volume, que é indicado em um visor digital. Quando a pata do animal é introduzida na célula de medida até a articulação tíbio-tarsal, um pedal é pressionado pelo experimentador, que fixa, dessa forma, o valor do volume observado. A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que os volumes basais médios dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes.

Os edemas de pata induzidos por formaldeído ou carragenina foram avaliados logo após a avaliação do comportamento de lambida de pata ou da alodínia mecânica, respectivamente. O edema induzido por formaldeído foi avaliado 0,5, 1,5 e 2,5 h após a injeção do estímulo. O edema induzido por carragenina foi avaliado 2, 4, 6 h após a injeção do estímulo. As medições foram feitas em triplicata, sendo o resultado final obtido pela média dos dois valores mais próximos.



Figura 10 - Aparato usado para a avaliação do edema de pata.

4.7 Atividade motora na haste girante

A atividade motora foi avaliada na haste girante (2,3 cm de diâmetro, 14 rpm; **Figura 11**), de acordo com o procedimento proposto por Vaz *et al.* (1996), que representa uma modificação daquele originalmente descrito por Dunham & Miya (1957). Nos três dias que antecederam os experimentos, os animais foram treinados no aparato durante 120 s. No dia do experimento, os animais foram colocados sobre a haste e o tempo basal de permanência foi determinado. O tempo de corte foi de 120 s. A divisão dos grupos para posterior tratamento foi feita de forma que os tempos basais médios dos diferentes grupos experimentais fossem semelhantes. Os análogos ftalimídicos FTD-OH e FTD-NO, a talidomida ou o controle positivo fenobarbital foram administrados 1 h antes da avaliação da atividade motora.



Figura 11- Aparato usado para a avaliação da atividade motora.

4.8 Alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo ciático

O procedimento cirúrgico de constrição do nervo ciático em ratos foi baseado na técnica descrita por Bennett e Xie (1988), com pequenas modificações propostas por Motta *et al.* (2011). A constrição do nervo ciático de camundongos foi realizada de maneira semelhante, com poucas modificações. Os animais foram anestesiados com uma associação de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), administrada por via i.p. Após uma incisão na região do bíceps femoral, previamente tricotomizada e higienizada com iodopolividona 10% m/v, uma porção do nervo ciático foi exposta. Foram feitas três ligaduras com fio categute cromado número 5.0, com espaço de aproximadamente 1 mm entre elas (**Figura 12**). A força de constrição foi exercida de forma a não impedir a circulação sanguínea pela vasculatura superficial epineural. Um grupo controle foi composto por animais submetidos a uma falsa cirurgia, na qual o nervo foi visualizado, mas não constringido (falso-operados). O curso temporal da alodínia mecânica após a constrição de nervo ciático foi avaliado por meio do analgesímetro digital. Esse equipamento é composto por um transdutor de força (faixa: 0,1 a 1000 g, ou aproximadamente 0,1 a 10 N) no qual se acopla uma ponteira de polietileno (0,5 mm de diâmetro) para a determinação do limiar de retirada de pata do animal (**Figura 9**). Os análogos ftalimídicos FTD-OH e FTD-NO ou a talidomida foram administrados 1 h antes das avaliações da alodínia mecânica, 21 dias após a cirurgia.

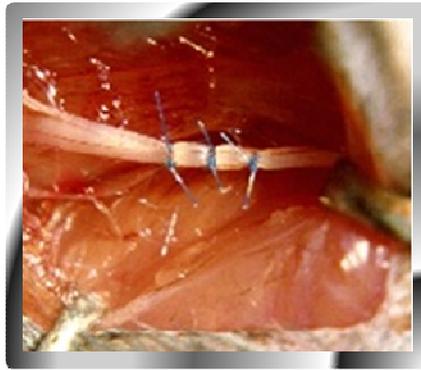


Figura 12 - Constrição do nervo ciático.

4.9 Artrite induzida por antígeno (mBSA e CFA)

No primeiro dia, os camundongos foram sensibilizados com o antígeno mBSA. Foram injetados 200 μ l (500 μ g de mBSA) da emulsão mBSA em mistura de CFA e PBS 0,25% pela via intradérmica na base da cauda dos camundongos. No 15° dia, os análogos ftalimídicos FTD-OH e FTD-NO ou a talidomida foram administrados *p.o.* Após 1 h, foram injetados 10 μ l (10 μ g de mBSA) da emulsão mBSA em PBS 0,1% pela via intra-articular (articulação fêmur-tibial do joelho direito) em cada camundongo. No 16° dia, a alodínia mecânica foi avaliada por meio do uso de um analgesímetro digital (**Figura 9**). Esse equipamento é composto por um transdutor de força (faixa: 0,1 a 1000 g, ou aproximadamente 0,1 a 10 N) no qual se acopla uma ponteira de polietileno (4,15 mm de diâmetro) para a determinação do limiar do movimento articular da pata do animal (Coelho *et al.*, 2008; Guerrero *et al.*, 2006). Após a determinação da alodínia mecânica, os camundongos foram submetidos à eutanásia (deslocamento cervical). Em seguida, a cavidade articular foi lavada duas vezes com 5 μ l (2 x 5 μ l = 10 μ l) de mBSA 3%. O volume retirado foi de 5 μ l em cada lavagem, totalizando 10 μ l, que foi acrescentada em 90 μ l de mBSA 3%. O lavado articular obtido foi utilizado para a contagem total e diferencial de leucócitos. O tecido periarticular foi removido e armazenado a -70 °C para a determinação da atividade da MPO e das concentrações de TNF- α ou CXCL1.

4.10 Contagem total e diferencial dos leucócitos no lavado articular

Para a determinação do número total de leucócitos, uma alíquota de 20 µl do lavado articular foi diluída três vezes em solução de lise de hemácias Turk e a contagem foi feita em câmara de Neubauer. A partir da alíquota remanescente (80 µl) do lavado articular, foram acrescentados 50 µl de mBSA 3% e citocentrifugação para confeccionar as lâminas da contagem diferencial. As lâminas foram coradas em corante panótico (Laborclin®, Paraná) e a contagem diferencial de células (mononucleares e neutrófilos) foi feita em microscópio óptico em aumento de 100 vezes. Foram contadas 100 células por meio de um contador diferencial mecânico (Benfer®, São Paulo). A porcentagem dos tipos celulares investigados foi baseada na contagem total por meio de uma regra de três simples. O número de células foi determinado considerando o valor obtido multiplicado pela diluição e pelo fator de correção da câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos como número de neutrófilos ou mononucleares x 10³/cavidade articular.

4.11 Atividade da MPO e concentrações do TNF-α ou da CXCL1

- **Preparo das amostras**

A atividade da MPO correlaciona-se com o recrutamento de neutrófilos nos tecidos em condições inflamatórias aguda e crônica. Os materiais usados para a análise foram o tecido da pata direita posterior, coletado 4 h após administração i.pl. de carragenina, e o tecido periarticular, coletado 24 h após a administração intra-articular de mBSA. Os análogos ftalimídicos FTD-OH e FTD-NO ou a talidomida foram administrados *p.o.*, 1 h antes da injeção dos estímulos inflamatórios.

Os tecidos foram coletados, suas massas determinadas e armazenados a -70 °C. Posteriormente, os tecidos foram descongelados e processados em homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, EUA) com o acréscimo da solução de extração de citocinas. Para cada 100 mg de tecido foi usado 1 ml dessa solução. O homogeneizado foi centrifugado por 10 min a 10.000 rpm em temperatura de 4 °C. O sobrenadante resultante foi recolhido para a

determinação das concentrações do TNF- α e da CXCL1. O sedimento do homogeneizado foi usado para a determinação da atividade da MPO.

- **Atividade da MPO**

Ao sedimento resultante, foi adicionado 1,9 ml da solução de tampão fosfato 2 (PBS 2) para cada 100 mg de tecido. Uma nova homogeneização foi realizada e o homogenato foi armazenado a -70 °C até a realização do ensaio. Os homogenatos foram inicialmente descongelados em temperatura ambiente e novamente congelados em nitrogênio líquido. Em seguida, foram descongelados em água corrente. Os congelamentos e descongelamentos foram repetidos por três vezes. Após esses ciclos, os homogenatos foram centrifugados por 10 min a 10.000 rpm a 4 °C e os sobrenadantes obtidos foram diluídos (1:3) em PBS 2. O ensaio foi realizado em placa de microtitulação de 96 poços. Nos primeiros dois poços, foram adicionados 25 μ l de PBS 2 (branco). Nos outros poços, foram adicionados, em duplicata, 25 μ l dos sobrenadantes diluídos.

Após o preenchimento da placa com todas as amostras, foram adicionados 25 μ l da solução de 3,3',5,5',-tetrametilbenzidina (TMB) em cada poço e a placa foi incubada a 37 °C por 5 min. Após esse intervalo, foram adicionados 100 μ l da solução de H₂O₂ em cada poço e a placa foi incubada novamente a 37 °C por 5 min. Para finalizar, foram adicionados 100 μ l de H₂SO₄ em cada poço. A atividade da MPO foi calculada de acordo com a alteração da densidade óptica (D.O.), avaliada em leitor de ELISA, usando comprimento de onda de 450 nm. Os valores obtidos foram normalizados em função de uma curva padrão de neutrófilos *versus* D.O., previamente preparada, e os resultados foram expressos em unidades relativas.

- **Concentrações do TNF- α e da CXCL1**

Os sobrenadantes resultantes da homogeneização e da centrifugação das amostras foram recolhidos e armazenados a -70 °C. As concentrações do TNF- α e da CXCL1 foram determinadas de acordo com as instruções do fabricante R&D Systems. O ensaio foi realizado em placa de microtitulação de 96 poços. O anticorpo de captura foi diluído em solução tampão fosfato 3 (PBS 3) e foram adicionados 100 μ l dessa solução em cada poço. A placa foi mantida na geladeira (4 °C) durante 12 h.

Após esse período, a placa foi lavada com tampão de lavagem e bloqueada com tampão de bloqueio (BSA 1%). Após 1 h, a placa foi lavada novamente e foram adicionados 100 µl do TNF- α ou da CXCL1 (duplicata), em diluição seriada, correspondentes à curva-padrão, nas duas primeiras colunas da placa. Nos outros poços, foram adicionados 100 µl dos sobrenadantes diluídos (1:3) em BSA 0,1% e nos últimos dois poços, foram adicionados 100 µl de PBS 3 (branco). A placa foi mantida na geladeira (4 °C) durante 12 h.

Em seguida, a placa foi lavada e foram adicionados 100 µl do anticorpo de detecção em cada poço e, durante 2 h, a placa foi mantida no agitador para microplaca de ELISA. Após esse período, a placa foi lavada e foram adicionados 100 µl do revelador estreptavidina em cada poço e, durante 20 min, a placa foi mantida novamente no agitador. Por último, foram adicionados 100 µl da solução do substrato (OPD) em cada poço. A reação foi monitorada de acordo com o aparecimento de coloração amarelada (5 a 15 min) e foi interrompida com a adição de 50 µl de H₂SO₄. A leitura foi feita no leitor de ELISA, usando comprimento de onda de 490 nm. Os resultados foram expressos em quantidade do TNF- α ou da CXCL1 presente no tecido (pg/100 mg de tecido).

4.12 Concentração de nitrito (NO₂⁻)

Após 1 h da administração dos análogos ftalimídicos FTD-OH e FTD-NO, da talidomida ou do veículo, os camundongos foram anestesiados com uma associação em dose fixa de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) por via i.p. Em seguida, o sangue de cada animal foi coletado pela artéria abdominal em tubos heparinizados. O plasma de cada amostra foi obtido após a centrifugação por 10 min a 10.000 rpm a 4 °C e armazenado a -70 °C até o momento da análise. O procedimento para a determinação da concentração de nitrito foi baseado na reação de Griess (sulfanilamida 1%; N-1-naftil-etil-enediamina 0,1%; ácido fosfórico 2,5%) (Sun *et al.*, 2003).

O ensaio foi realizado em placa de microtitulação de 96 poços. Nos primeiros poços, foram adicionados, em duplicata, 100 µl de BSA 8% acrescentadas em 100 µl do

reagente de Griess (branco 1) e 100 µl do plasma branco acrescentadas em 100 µl do reagente de Griess (branco 2). Nos outros poços, foram adicionados, em duplicata, 100 µl das amostras de plasma acrescentadas em 100 µl do reagente de Griess. A placa foi incubada em temperatura ambiente por 10 min, protegida da luz. A leitura foi feita no leitor de ELISA, usando comprimento de onda de 540 nm. Os valores obtidos foram expressos em µM de nitrito em função de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂) previamente preparada.

4.13 Análise estatística

Análise de variância em duas vias, seguida do teste Bonferroni, foi usada para avaliar os resultados na forma de curso temporal. Quando apropriado, análise de variância de uma via foi usada, seguida do teste Newmann-Keuls. Valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos em comparações entre médias. O programa GraphPad Prism®5.0 (San Diego, CA, USA) foi usado para tais análises.

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos induzidos pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO sobre a resposta nociceptiva induzida por formaldeído

A injeção i.pl. de formaldeído induziu resposta nociceptiva caracterizada por lambida e flexão da pata injetada, bem como comportamento nocifensivo evidenciado pela manutenção da pata injetada fora de contato com a superfície. As durações do comportamento de lambida, o parâmetro avaliado como resposta nociceptiva, nas primeira (0-5 min) e segunda (15-30 min) fases foram 50 e 160 s, respectivamente. A talidomida, nas doses de 500 ou 750 mg/kg, inibiu a primeira fase da resposta nociceptiva. A segunda fase dessa resposta foi inibida apenas pela maior dose (Figura 13). Os análogos ftalimídicos FTD-OH e FTD-NO também inibiram a resposta nociceptiva. As doses de 500 ou 750 mg/kg inibiram as duas fases da resposta nociceptiva induzida por formaldeído (Figuras 14 e 15).

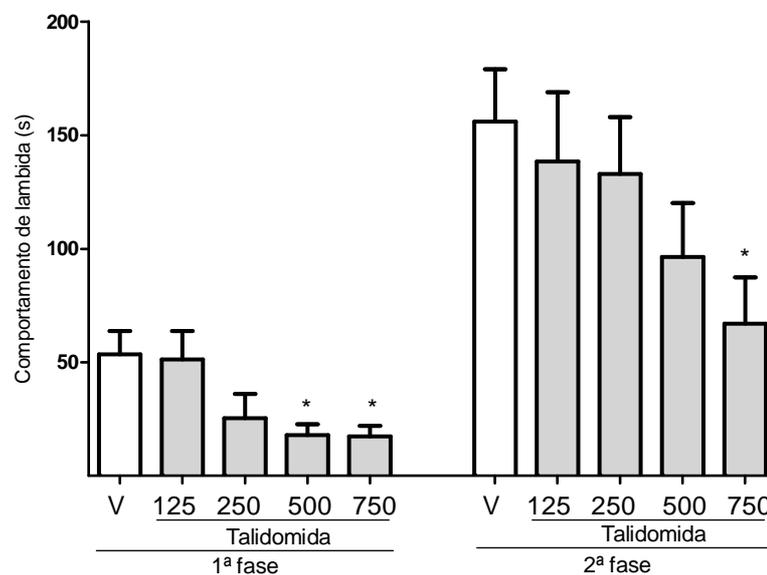


Figura 13 - Efeito induzido pela talidomida (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, *p.o.*, - 1 h) sobre o comportamento de lambida induzido por formaldeído. V = veículo. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$), $n=8$.

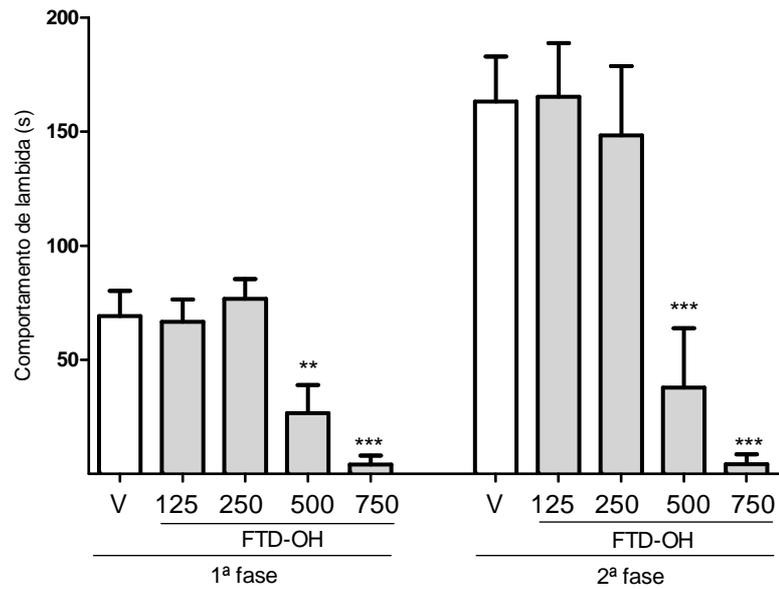


Figura 14 - Efeito induzido pelo FTD-OH (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, *p.o.*, - 1 h) sobre o comportamento de lambida induzido por formaldeído. V = veículo. ** e *** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente), $n = 8$.

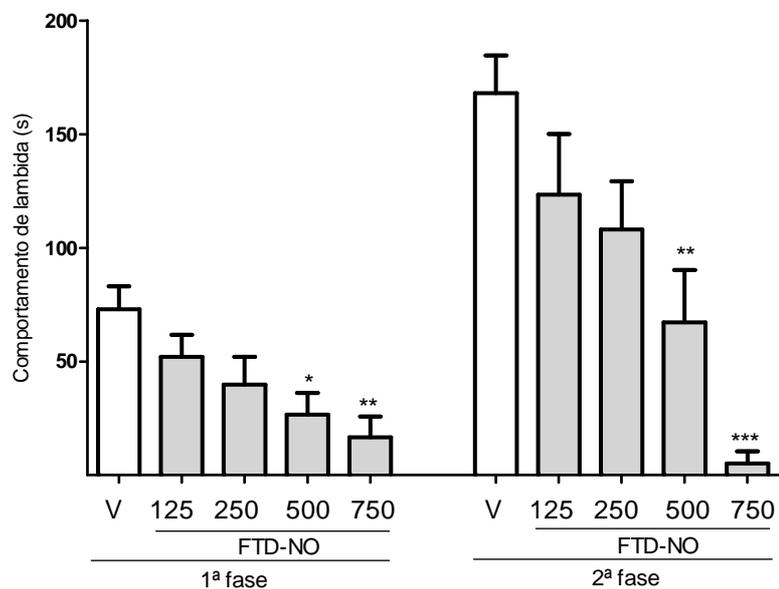


Figura 15 - Efeito induzido pelo FTD-NO (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, *p.o.*, - 1 h) sobre o comportamento de lambida induzido por formaldeído. V = veículo. *, ** e *** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente), $n = 8$.

5.2 Alodinia mecânica e edema de pata induzidos por carragenina

Inicialmente, com o objetivo de determinar a dose de carragenina a ser usada em experimentos posteriores, foram avaliados a alodinia mecânica e o edema de pata induzidos pela injeção i.p.l. de diferentes doses desse estímulo inflamatório. A redução do limiar nociceptivo, caracterizando a alodinia mecânica, foi induzida por carragenina. As doses de 100, 200 ou 300 μg diminuíram o limiar nociceptivo, em extensões muito semelhantes (**Figura 16A**). Entretanto, a carragenina induziu edema de pata de forma dose-dependente (**Figura 16B**). A dose de 300 μg de carragenina, que induziu alodinia marcante e edema de maior magnitude e mais duradouro, foi usada em experimentos posteriores nos quais foram investigados os efeitos induzidos pela talidomida e pelos análogos ftalimídicos.

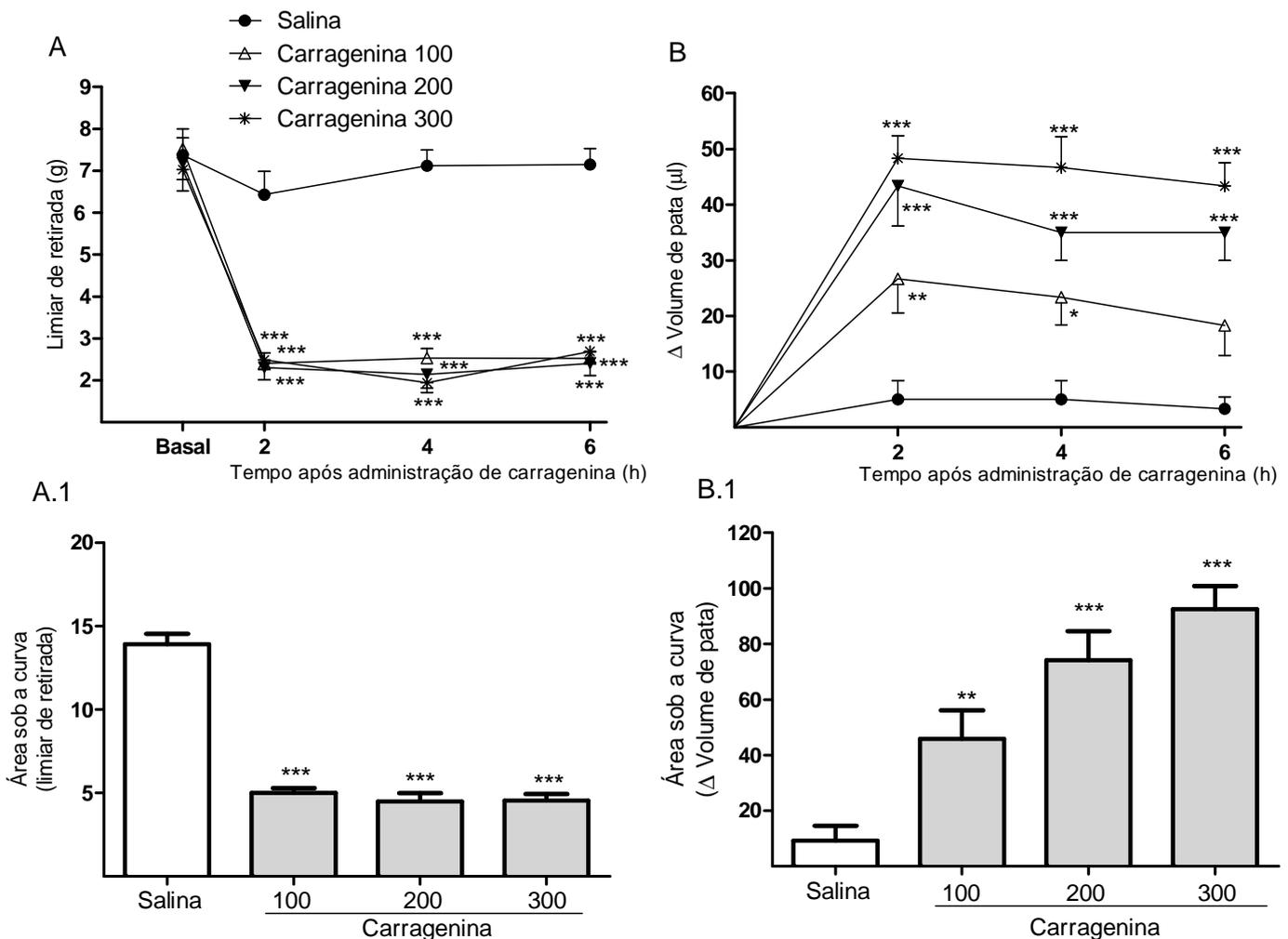


Figura 16 – Alodinia mecânica (A) ou edema de pata (B) induzido por carragenina (100, 200 ou 300 μg /pata). Cursos temporais (A e B) e áreas sob a curva (A.1 e B.1) da alodinia mecânica e do edema de pata. *, ** e *** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo salina ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente), $n = 8$.

5.3 Efeitos induzidos pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina

A talidomida, nas doses de 500 ou 750 mg/kg, inibiu a alodínia mecânica induzida pela carragenina nas avaliações realizadas na 2^a, na 4^a e na 6^a hora (**Figura 17**). Em relação aos análogos ftalimídicos FTD-OH e FTD-NO, apenas a maior dose (750 mg/kg) inibiu a alodínia mecânica, sendo que essa inibição foi observada na 2^a e na 4^a hora após a injeção de carragenina (**Figura 18 e 19**).

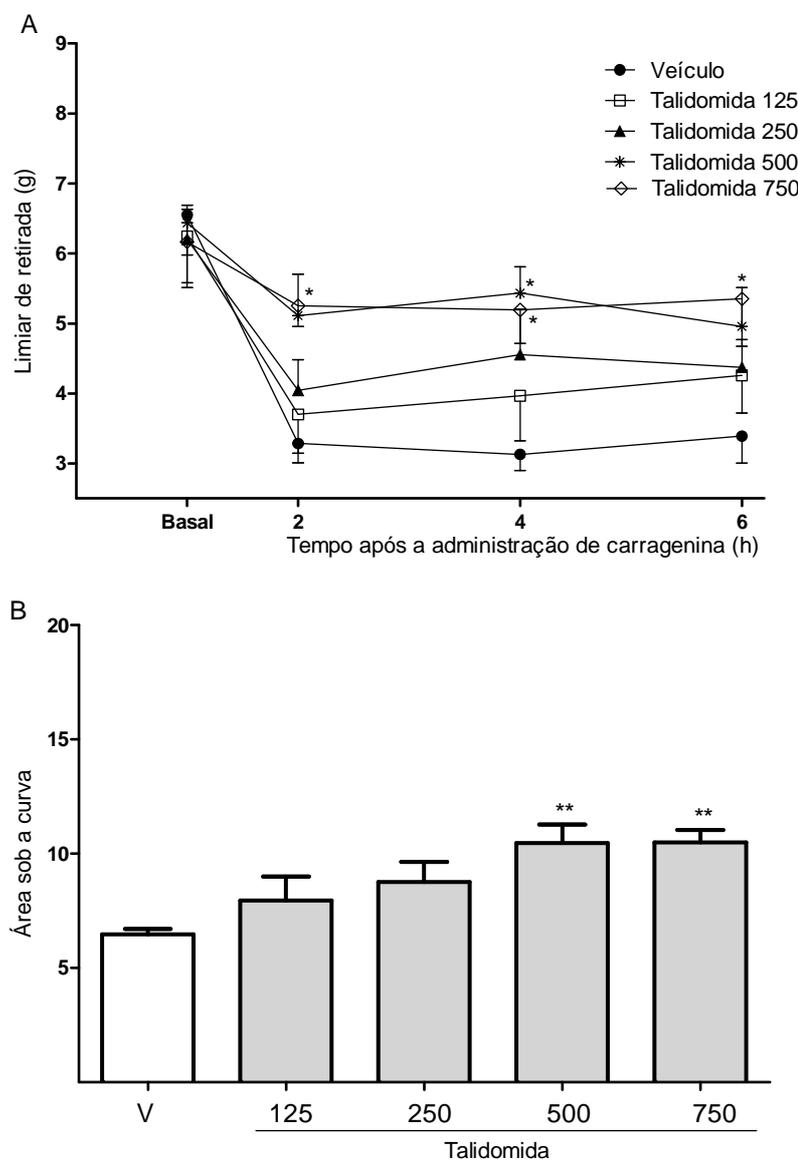


Figura 17 - Efeito induzido pela talidomida (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, *p.o.*, - 1 h) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva da alodínia mecânica. V = veículo. * e ** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente), $n = 8$.

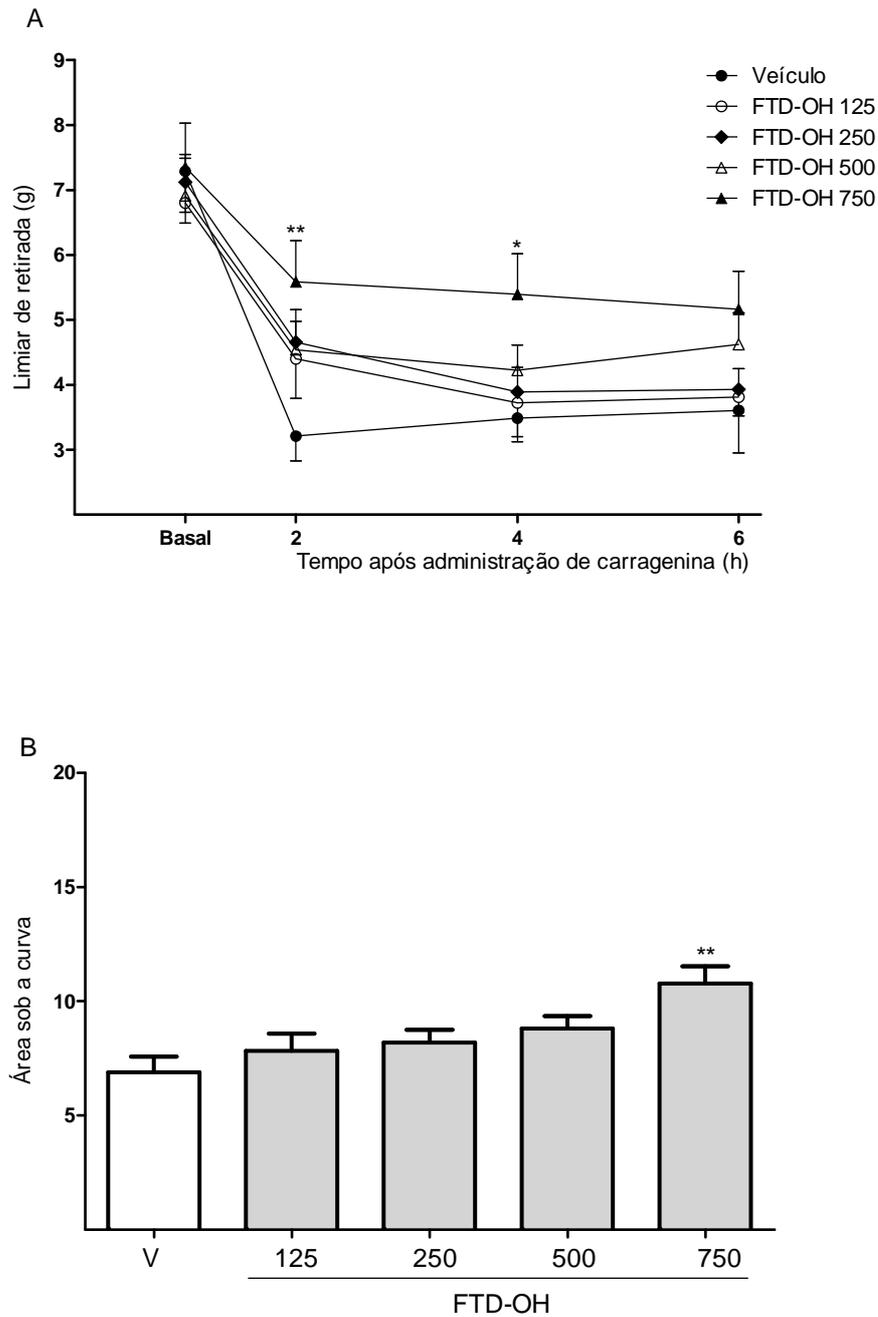


Figura 18 - Efeito induzido pelo FTD-OH (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, *p.o.*, - 1 h) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva da alodínia mecânica. V = veículo. * e ** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente), $n = 8$.

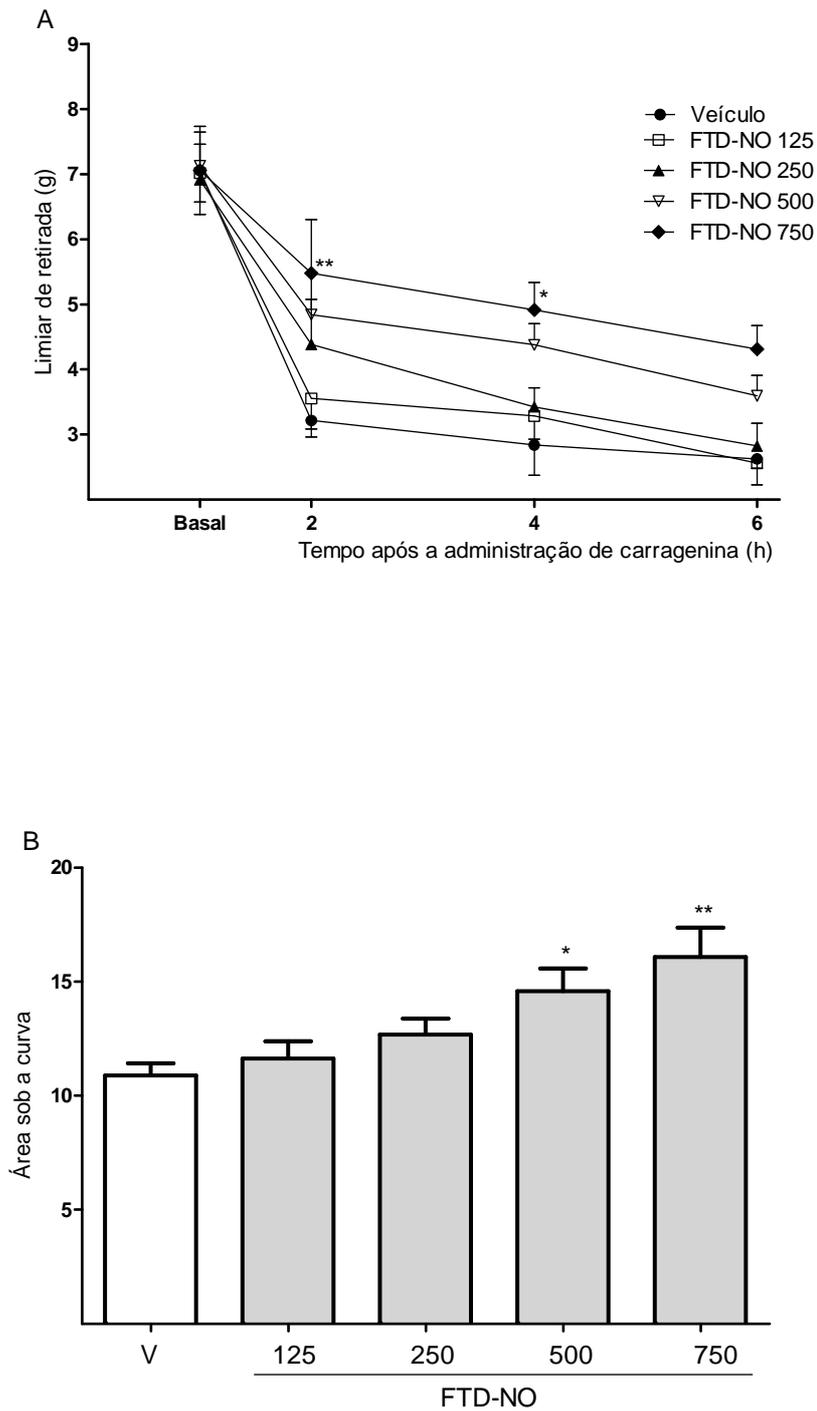


Figura 19 - Efeito induzido pelo FTD-NO (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, *p.o.*, - 1 h) sobre a alodínia mecânica induzida por carragenina. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva da alodínia mecânica. V = veículo. * e ** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente), $n = 8$.

5.4 Efeitos induzidos pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO sobre a atividade motora dos animais avaliada na haste girante

Com o objetivo de validar os resultados obtidos nos protocolos de nocicepção, foram avaliados os efeitos induzidos pela talidomida ou pelos análogos ftalimídicos sobre a atividade motora dos animais. A talidomida e o FTD-NO não alteraram o tempo de permanência dos animais na haste girante. Entretanto, esse tempo foi reduzido pela maior dose (750 mg/kg) do FTD-OH e pelo fenobarbital (40 mg/kg), usado como controle positivo nesse protocolo (**Tabela 1**). Assim, em relação ao FTD-OH só podem ser considerados efeitos antinociceptivos genuínos aqueles induzidos pelas doses de 500 mg/kg ou inferiores.

Tabela 1 - Efeitos induzidos pela talidomida, pelos análogos FTD-OH e FTD-NO (500 ou 750 mg/kg, *p.o.*, -1 h) ou pelo fenobarbital (40 mg/kg, *p.o.*, -1 h) sobre o tempo de permanência dos camundongos na haste girante. V = veículo.

| Tratamento | Tempo de permanência (s) | |
|-----------------|--------------------------|-------------------|
| | Basal | Após 1 h |
| Veículo | 120±0 | 120±0 |
| Talidomida 500 | 120±0 | 119±1 |
| Talidomida 750 | 119±1 | 117±2 |
| FTD-OH 500 | 120±0 | 115±3 |
| FTD-OH 750 | 120±0 | 45±9 ^a |
| FTD-NO 500 | 119±1 | 117±2 |
| FTD-NO 750 | 120±0 | 112±8 |
| Fenobarbital 40 | 119±1 | 17±3 ^a |

^a indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,001$), $n = 8$.

5.5 Efeitos induzidos pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO sobre o edema induzido por formaldeído ou carragenina

Os efeitos induzidos pela talidomida ou pelos análogos ftalimídicos sobre o edema induzido por formaldeído ou carragenina foram avaliados logo após a avaliação dos efeitos induzidos por essas substâncias sobre a resposta nociceptiva induzida por esses estímulos inflamatórios. Os análogos ftalimídicos (**Figuras 21 e 22**), mas não a talidomida (**Figura 20**), inibiram o edema de pata induzido por formaldeído.

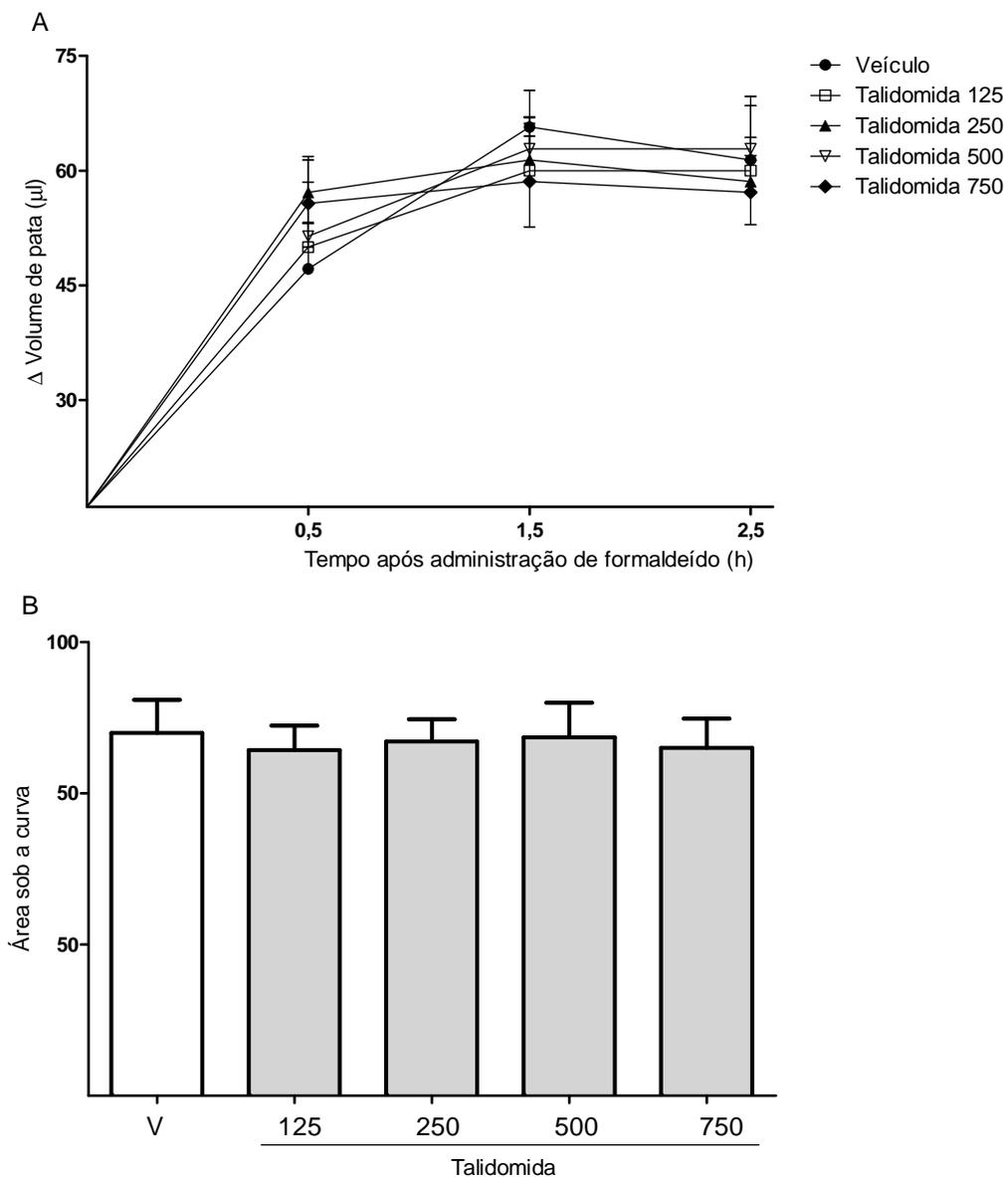


Figura 20 - Efeito induzido pela talidomida (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, *p.o.*, - 1 h) sobre o edema de pata induzido por formaldeído. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva do edema de pata. V = veículo, n=8.

A inibição do edema pela FTD-OH foi observada 0,5 hora (doses de 500 e 750 mg/kg) e 1,5 hora (todas as doses), mas não 2,5 horas (**Figura 21**). A inibição do edema pelo FTD-NO também foi observada 0,5 hora (todas as doses) e 1,5 hora (dose de 750 mg/kg), mas não 2,5 horas (**Figura 22**).

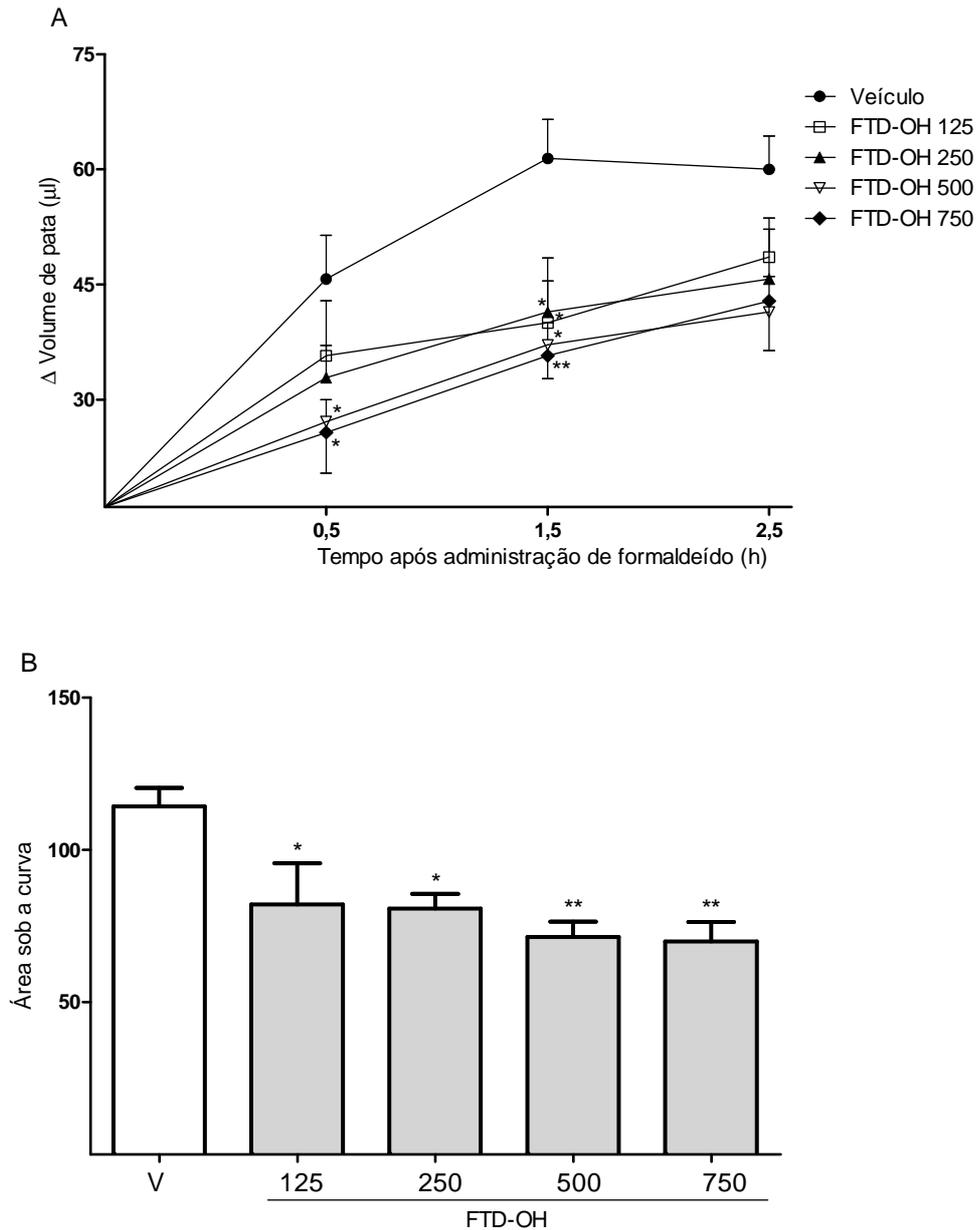


Figura 21 - Efeito induzido pelo FTD-OH (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, *p.o.*, - 1 h) sobre o edema de pata induzido por formaldeído. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva do edema de pata. V = veículo. * e ** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente), $n=8$.

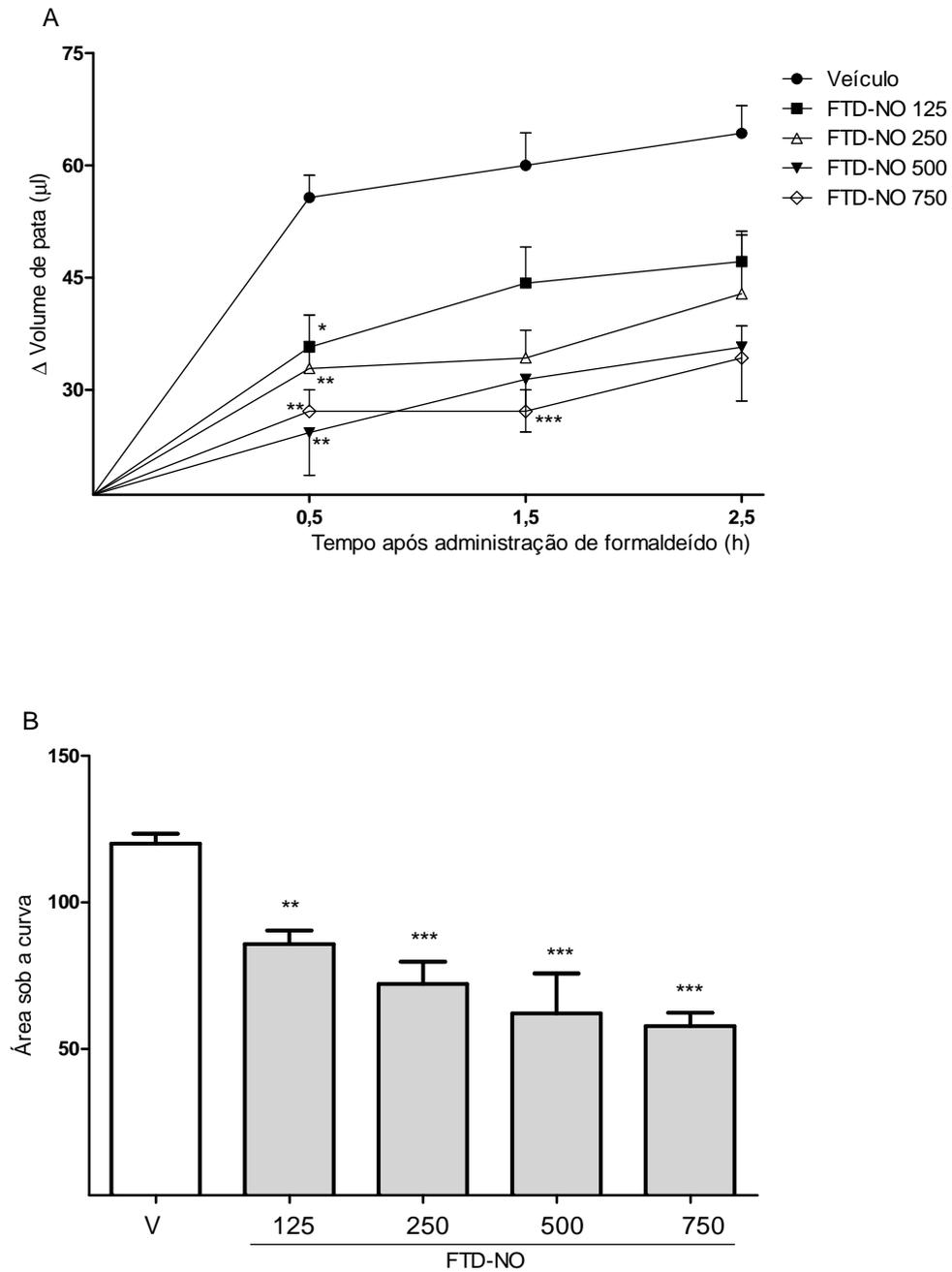


Figura 22 - Efeito induzido pelo FTD-NO (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, *p.o.*, - 1 h) sobre o edema de pata induzido por formaldeído. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva do edema de pata. V = veículo. *, ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente), $n=8$.

De forma semelhante ao que foi observado no modelo de edema de pata induzido por formaldeído, os análogos ftalimídicos (**Figuras 24 e 25**), mas não a talidomida (**Figura 23**), inibiram o edema de pata induzido por carragenina. A inibição do edema pelo FTD-OH ocorreu na 4^a e na 6^a hora (doses de 500 e 750 mg/kg) (**Figura 24**). A inibição do edema pelo FTD-NO foi observada na 2^a hora (todas as doses), na 4^a hora (doses de 250, 500 e 750 mg/kg) e na 6^a hora (doses de 500 e 750 mg/kg) (**Figura 25**).

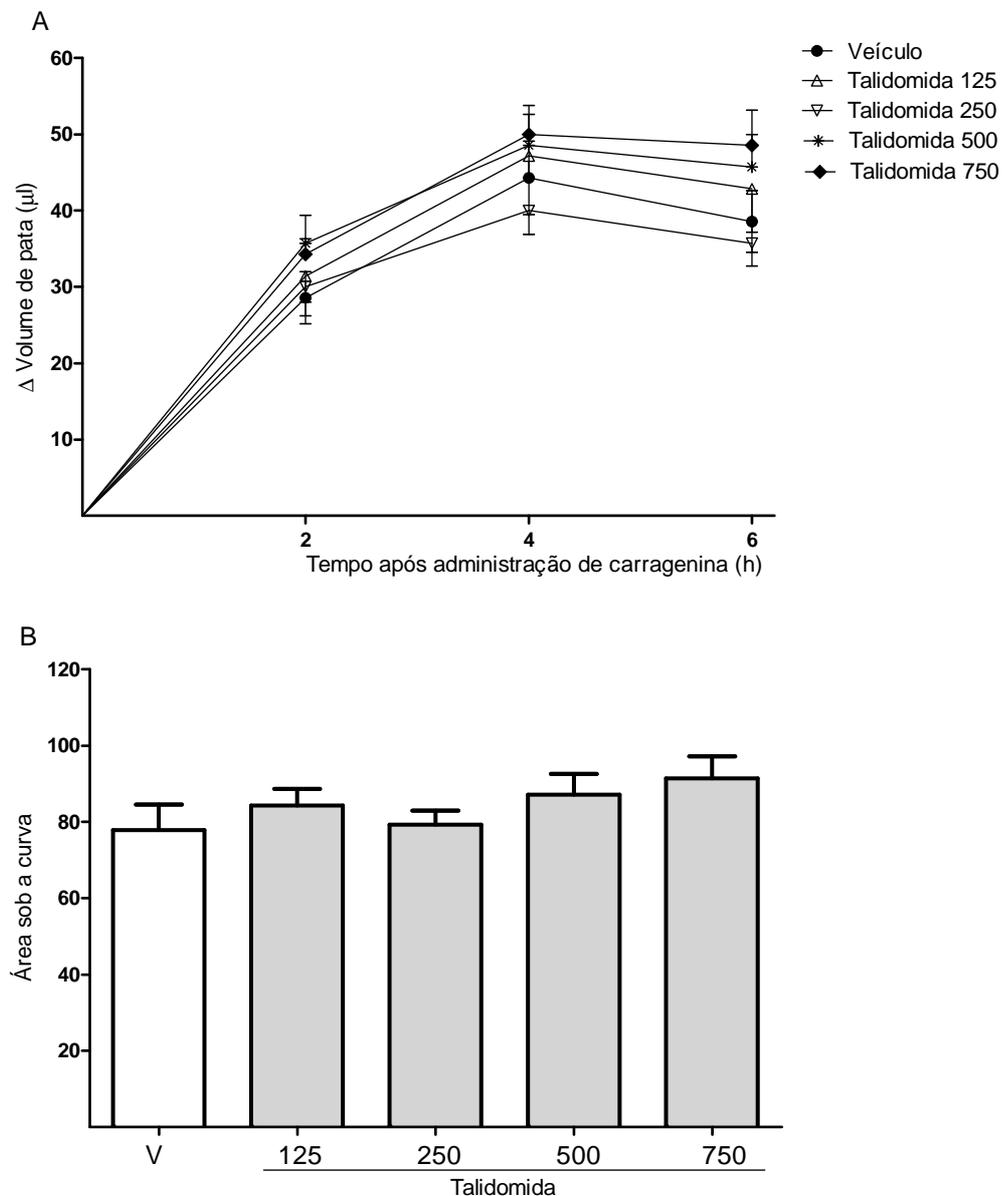


Figura 23 - Efeito induzido pela talidomida (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, *p.o.*, - 1 h) sobre o edema de pata induzido por carragenina. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva do edema de pata. V = veículo, n=8.

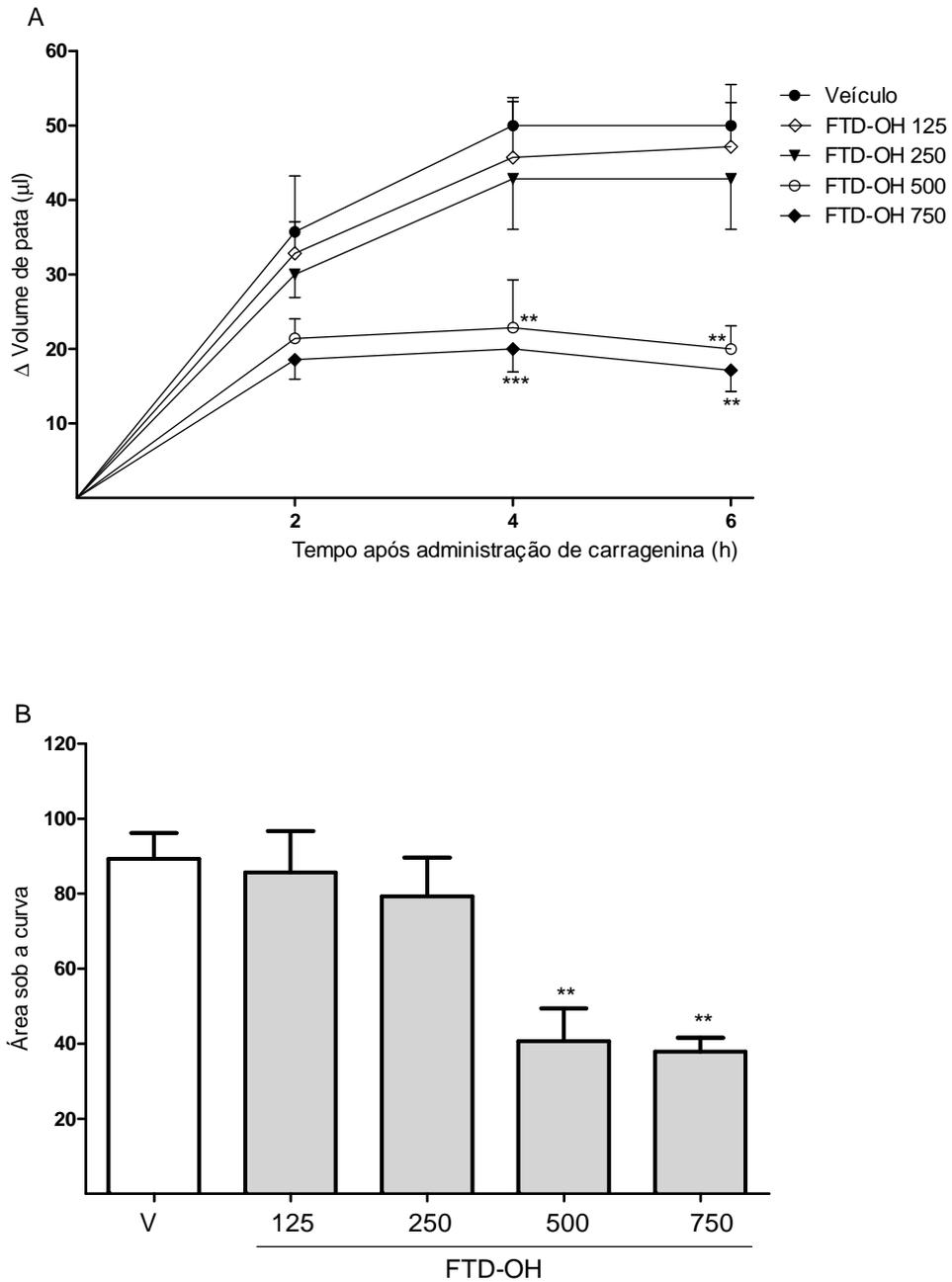


Figura 24 - Efeito induzido pelo FTD-OH (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, *p.o.*, - 1 h) sobre o edema de pata induzido por carragenina. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva do edema de pata. V = veículo. ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente), $n = 8$.

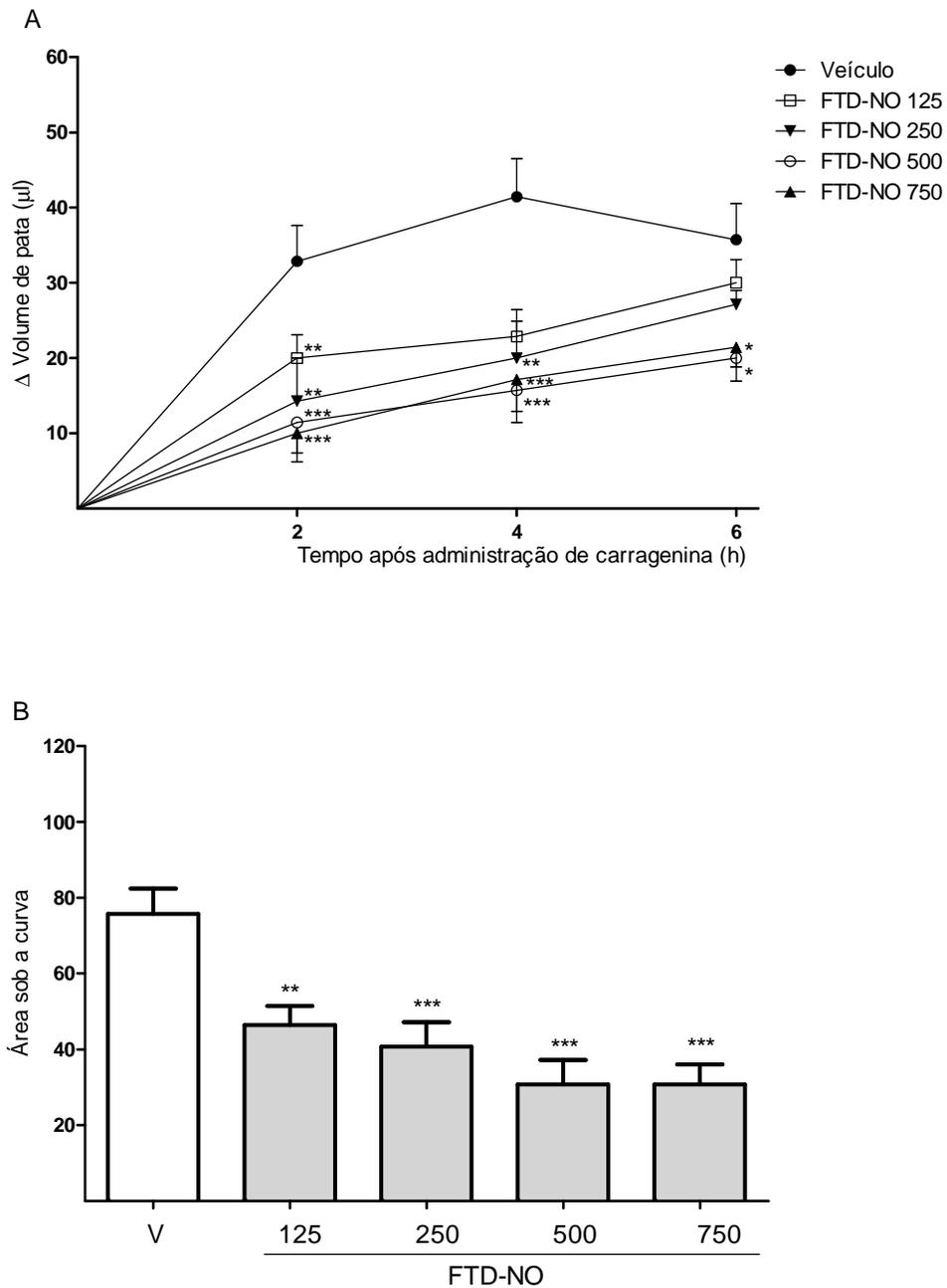


Figura 25 - Efeito induzido pelo FTD-NO (125, 250, 500 ou 750 mg/kg, *p.o.*, - 1 h) sobre o edema de pata induzido por carragenina. (A) Curso temporal e (B) área sob a curva do edema de pata. V = veículo. *, ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente), $n = 8$.

5.6 Efeitos induzidos pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO sobre a atividade de MPO e a produção de citocinas na pata de animais injetados com carragenina

Quatro horas após a injeção i.pl. de carragenina (300 µg), houve um aumento da atividade da MPO e das concentrações do TNF-α e da CXCL1 na pata dos animais. O tratamento prévio (-1 h) dos animais com talidomida (250 ou 500 mg/kg) não alterou o efeito induzido pela carragenina sobre esses parâmetros (**Figura 26**). Em relação aos análogos ftalimídicos, ambas as doses de FTD-OH não alteraram as concentrações de TNF-α e CXCL1 na pata dos animais injetados com carragenina. Apenas a maior dose (500 mg/kg) desse análogo reduziu a atividade da MPO. Por outro lado, o análogo ftalimídico FTD-NO apresentou atividade mais marcante, uma vez que a maior dose (500 mg/kg) reduziu a atividade da MPO e as duas doses (250 ou 500 mg/kg) reduziram as concentrações de TNF-α e CXCL1 na pata dos animais injetados com carragenina (**Figura 26**).

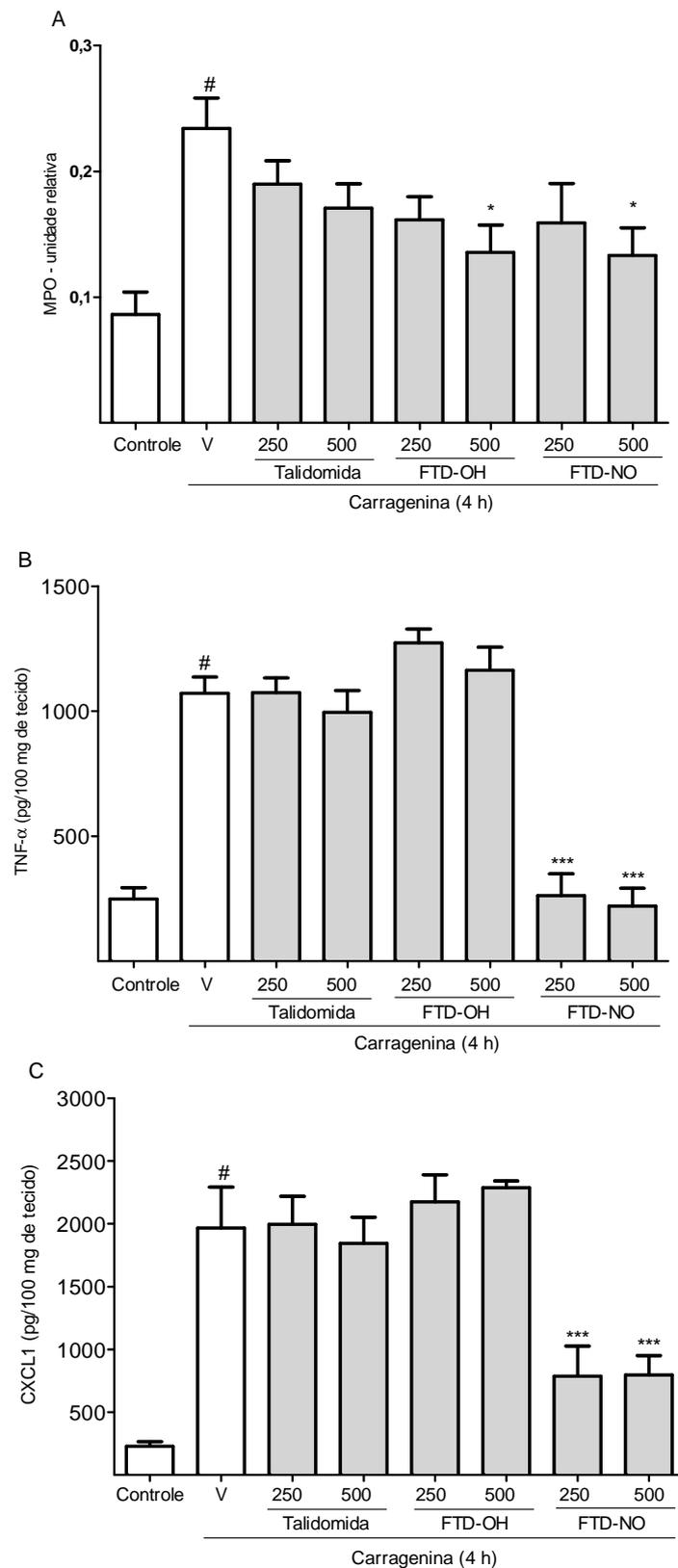


Figura 26 - Efeitos induzidos pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO (250 ou 500 mg/kg, *p.o.*, - 1 h) sobre a atividade de MPO (A) e as concentrações de TNF- α (B) e CXCL1 (C) na pata de animais injetados com carragenina. V = veículo. * e *** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,001$), $n = 8$.

5.7 Efeitos induzidos pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO sobre a migração celular, a produção de citocinas e a alodínia mecânica em modelo de artrite induzida por antígeno (mBSA)

A injeção intra-articular de mBSA nos camundongos previamente sensibilizados com esse antígeno induziu um aumento do número de neutrófilos e mononucleares no lavado obtido da cavidade articular e da atividade da MPO no tecido periarticular avaliados 24 h após. A injeção intra-articular desse antígeno também induziu aumento das concentrações de CXCL1 e TNF- α no tecido periarticular e alodínia mecânica. O tratamento dos animais com talidomida (500 mg/kg), administrada 1 h antes da injeção intra-articular de mBSA, embora tenha atenuado a alodínia mecânica (**Figura 29**), não alterou a migração celular e a produção de citocinas (**Figuras 27 e 28**). Os análogos ftalimídicos FTD-OH e FTD-NO (500 mg/kg), por sua vez, apresentaram atividade mais marcante do que a talidomida nesse modelo experimental, pois inibiram a migração celular, a produção de citocinas e a alodínia mecânica induzidas pela mBSA (**Figuras 27, 28 e 29**).

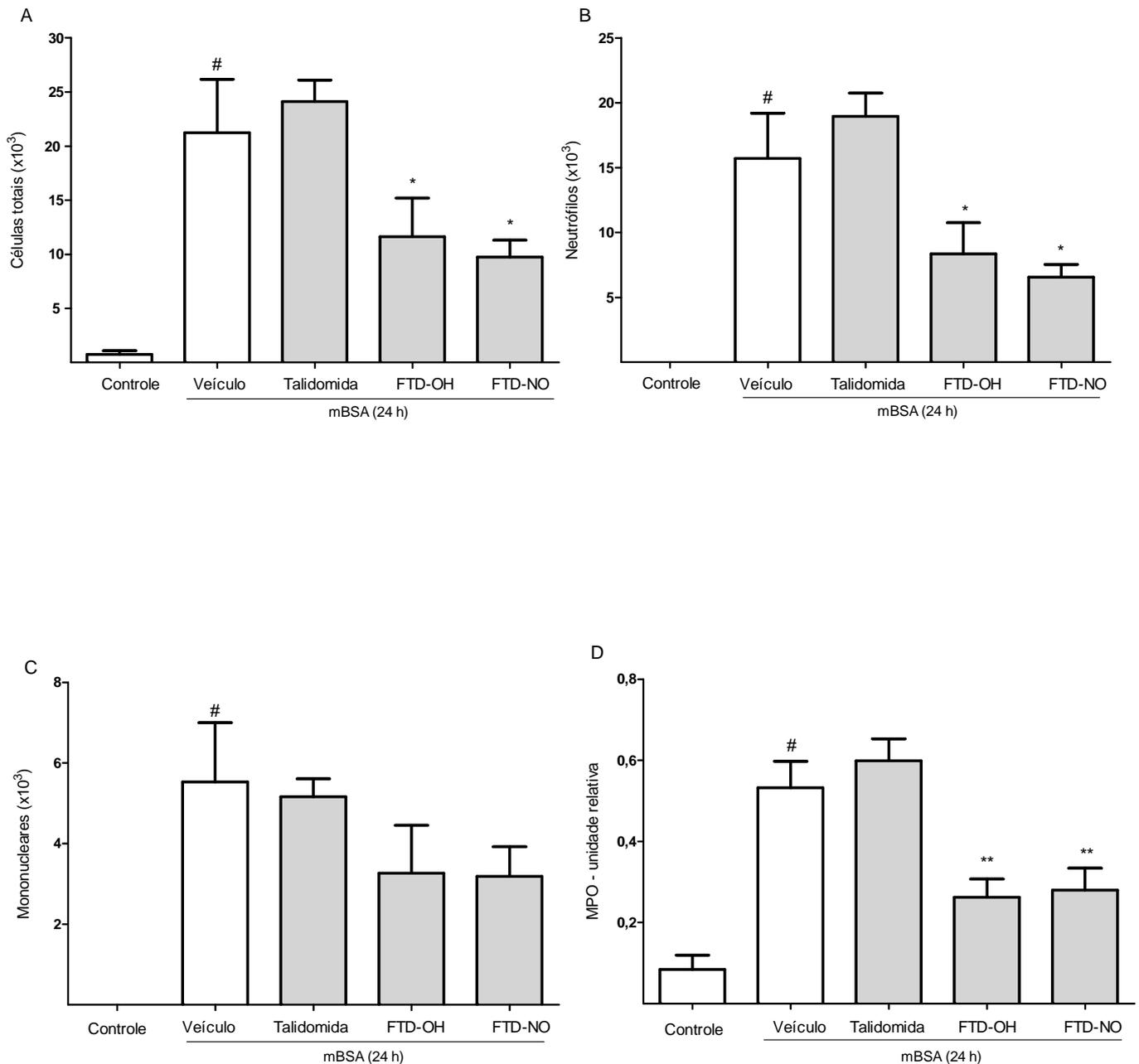


Figura 27 – Efeito induzido pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO (500 mg/kg, *p.o.*, 1 h antes da injeção intra-articular de mBSA) sobre o número total de células (A), neutrófilos (B) e mononucleares (C) no lavado obtido da cavidade articular e sobre a atividade de MPO no tecido periarticular (D) avaliados 24 h após a injeção intra-articular de mBSA. * e ** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$). # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,01$), $n = 6$.

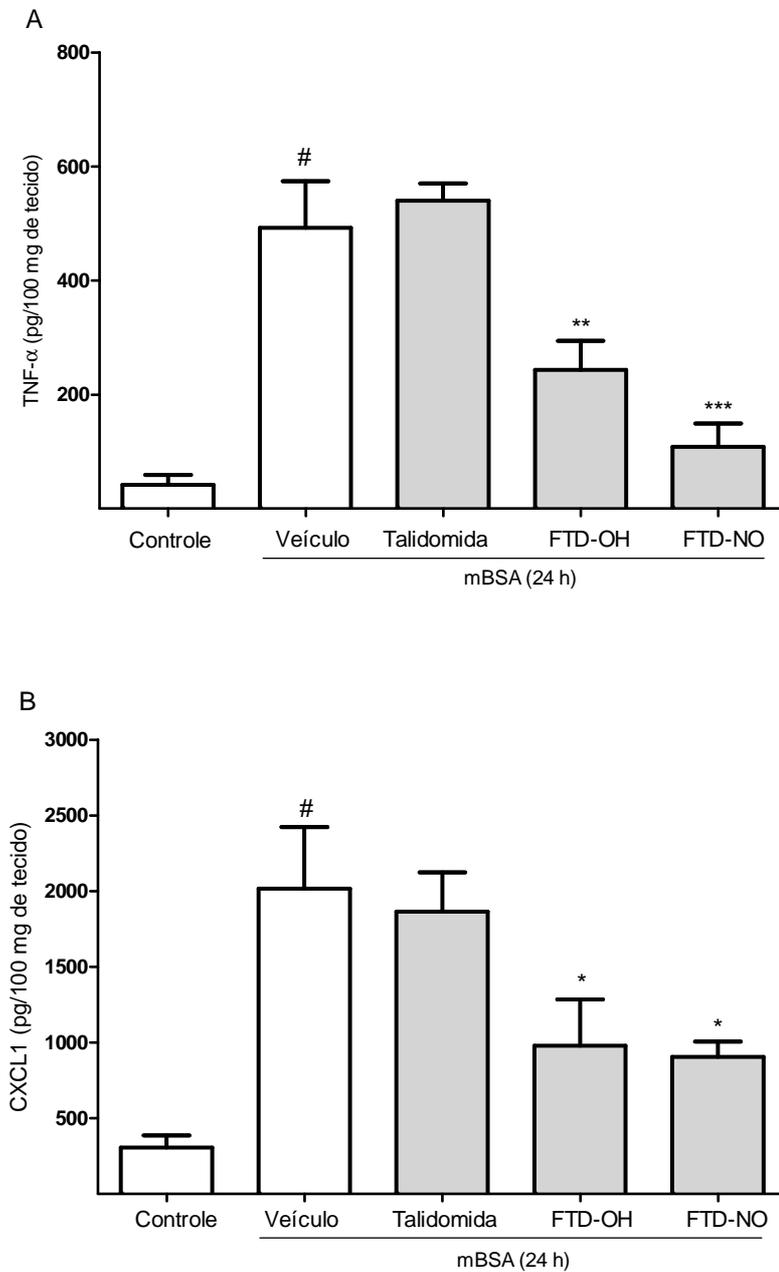


Figura 28 – Efeito induzido pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO (500 mg/kg, *p.o.*, 1 h antes da injeção intra-articular de mBSA) sobre as concentrações de TNF- α (A) ou CXCL1 (B) no tecido periarticular avaliadas 24 h após a injeção intra-articular de mBSA. *, ** e *** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,01$), $n=6$.

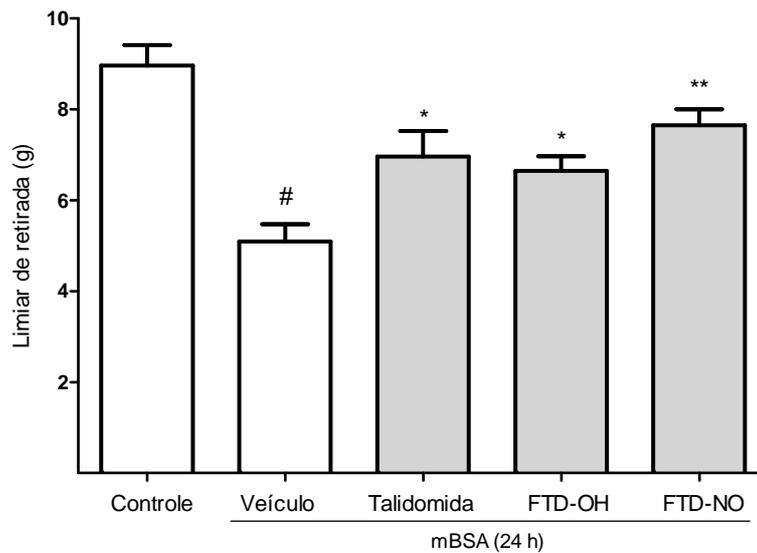


Figura 29 – Efeito induzido pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO (500 mg/kg, *p.o.*, 1 h antes da injeção intra-articular de mBSA) sobre a alodínia mecânica avaliada 24 h após a injeção intra-articular de mBSA. * e ** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,01$), $n = 6$.

5.8 Efeito induzido pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO sobre a alodínia mecânica induzida por constrição no nervo ciático

Inicialmente, foi avaliado o curso temporal do desenvolvimento da alodínia mecânica após a constrição de nervo ciático em camundongos. A redução do limiar para retirada da pata após a estimulação mecânica tornou-se estatisticamente significativa no 6º dia após a cirurgia, caracterizando a alodínia mecânica. A magnitude da alodínia mecânica se elevou até o 12º dia e, a partir desse momento, manteve-se estável até o 21º dia. Não houve alteração do limiar para retirada da pata após a estimulação mecânica nos animais falso-operados (**Figura 30**).

No 21º dia após a cirurgia, a talidomida ou os análogos ftalimídicos FTD-OH e FTD-NO foram administrados nos camundongos falso-operados e nos camundongos submetidos à constrição do nervo ciático. Nos animais falso-operados, os tratamentos com a talidomida ou com os análogos ftalimídicos (500 mg/kg) não alteraram o limiar de retirada da pata após a estimulação mecânica. Por outro lado, nos animais que foram submetidos à constrição do nervo ciático e que apresentavam alodínia mecânica, os tratamentos com talidomida ou com os

análogos ftalimídicos (500 mg/kg) induziram efeito antialodínico 1 e 3 horas após. Na avaliação do limiar de retirada da pata ocorrido na 5ª hora, apenas a talidomida induziu efeito antialodínico, enquanto na avaliação ocorrida na 7ª hora, nenhuma substância induziu efeito (**Figura 31**).

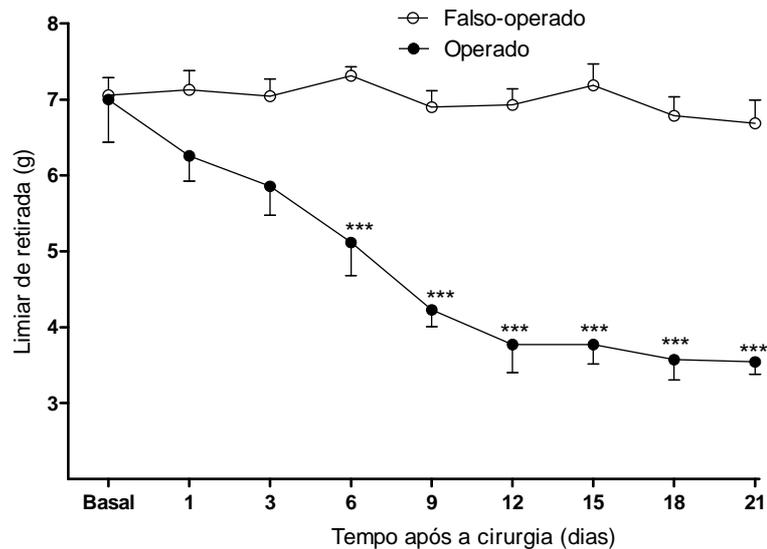


Figura 30 - Alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo ciático. *** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo falso-operado ($p < 0,001$), $n=7$.

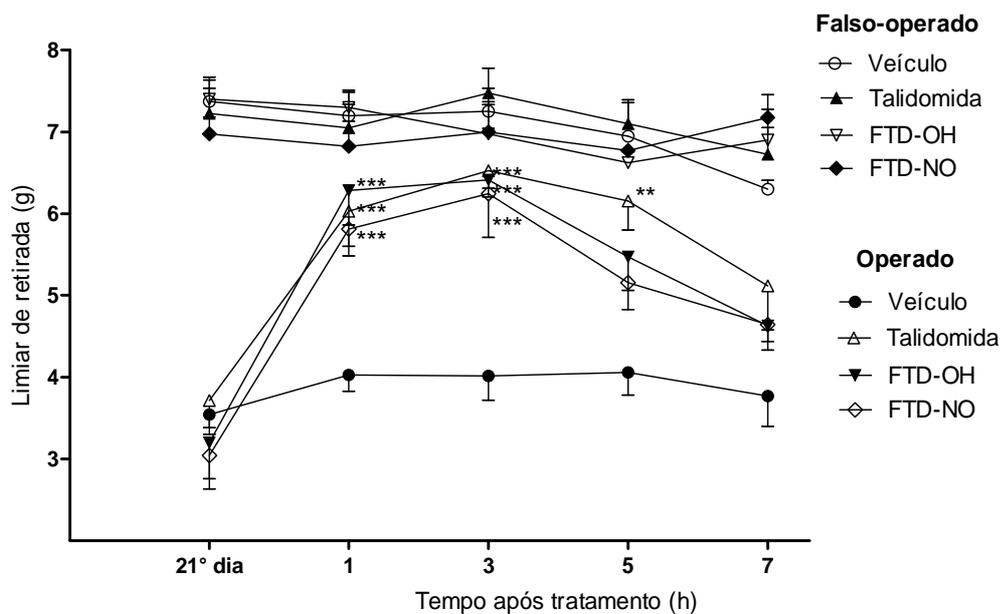


Figura 31- Efeito induzido pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO (500 mg/kg, *p.o.*, -1 h) sobre a alodínia mecânica induzida pela constrição do nervo ciático. ** e *** indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente), $n=7$.

5.9 Efeitos induzidos pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH ou FTD-NO sobre as concentrações plasmáticas de nitrito

Em animais não submetidos a qualquer tratamento, a concentração plasmática de nitrito foi aproximadamente de 6 μM . A administração *p.o.* do análogo FTD-NO, mas não de veículo, talidomida ou FTD-OH, elevou de forma significativa a concentração plasmática de nitrito, avaliada 1 h após (**Figura 32**).

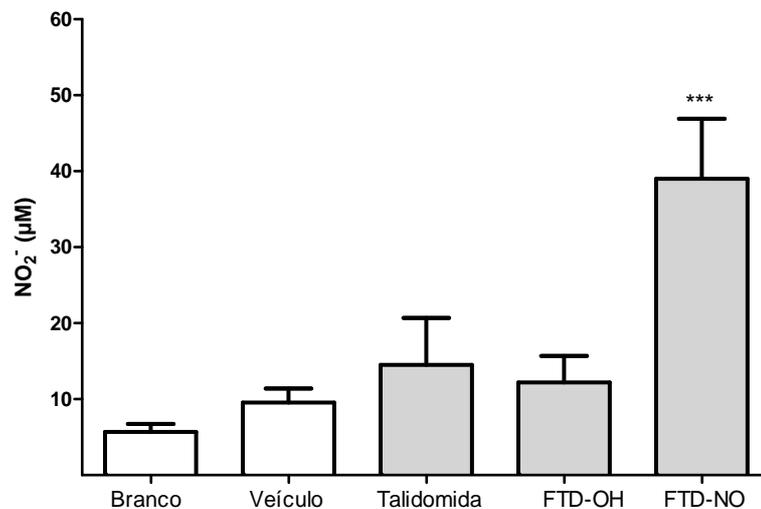
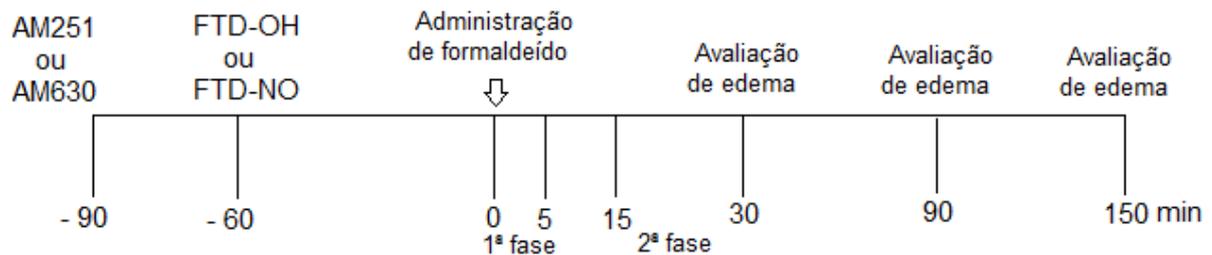


Figura 32 – Efeitos induzidos pela talidomida ou pelos análogos FTD-OH e FTD-NO (500 mg/kg, *p.o.*, -1 h) sobre a concentração plasmática de nitrito. *** indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo, n=7.

➤ Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos nos efeitos antinociceptivo e antiedematogênico induzidos pelos análogos FTD-OH e FTD-NO

Após a demonstração dos efeitos antinociceptivo e antiedematogênico induzidos pelos análogos FTD-OH e FTD-NO, foi avaliado se esses efeitos poderiam ser mediados pelos sistemas canabinoidérgico, opioidérgico ou pela ativação da via da guanilato ciclase-GMPc.

5.10 Efeitos induzidos pelos antagonistas canabinoides AM251 e AM630 sobre as atividades antinociceptiva e antiedematogênica dos análogos FTD-OH e FTD-NO nos modelos de resposta nociceptiva e edema de pata induzidos por formaldeído



A administração prévia (-1 h) de FTD-OH ou FTD-NO (500 mg/kg, *p.o.*) inibiu a primeira e a segunda fase da resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído. A administração de AM251 ou AM630 (4 ou 8 mg/kg, *i.p.*), 30 min antes da administração *p.o.* de FTD-OH ou FTD-NO, não alterou a atividade antinociceptiva de ambos os análogos ftalimídicos. Tanto o AM251 como o AM630 (8 mg/kg, *i.p.*), administrados 1,5 h antes da injeção *i.pl.* de formaldeído, não alteraram *per se* a resposta nociceptiva induzida por esse estímulo (**Figuras 33A, 34A, 35A e 36A**).

A injeção *i.pl.* de formaldeído também induziu edema de pata, avaliado 0,5, 1,5 e 2,5 h após. A administração prévia (-1 h) de FTD-OH ou FTD-NO (500 mg/kg, *p.o.*) inibiu o edema de pata induzido pelo formaldeído. A administração *i.p.* de AM251 (8 mg/kg), mas não de AM630, 30 min antes da administração *p.o.* de FTD-OH ou FTD-NO, atenuou a atividade antiedematogênica de ambos os análogos ftalimídicos. Tanto o AM251 como o AM630 (8 mg/kg, *i.p.*), administrados 1,5 h antes da injeção *i.pl.* de formaldeído, não alteraram *per se* o edema de pata induzido por esse estímulo (**Figuras 33B, 34B, 35B e 36B**).

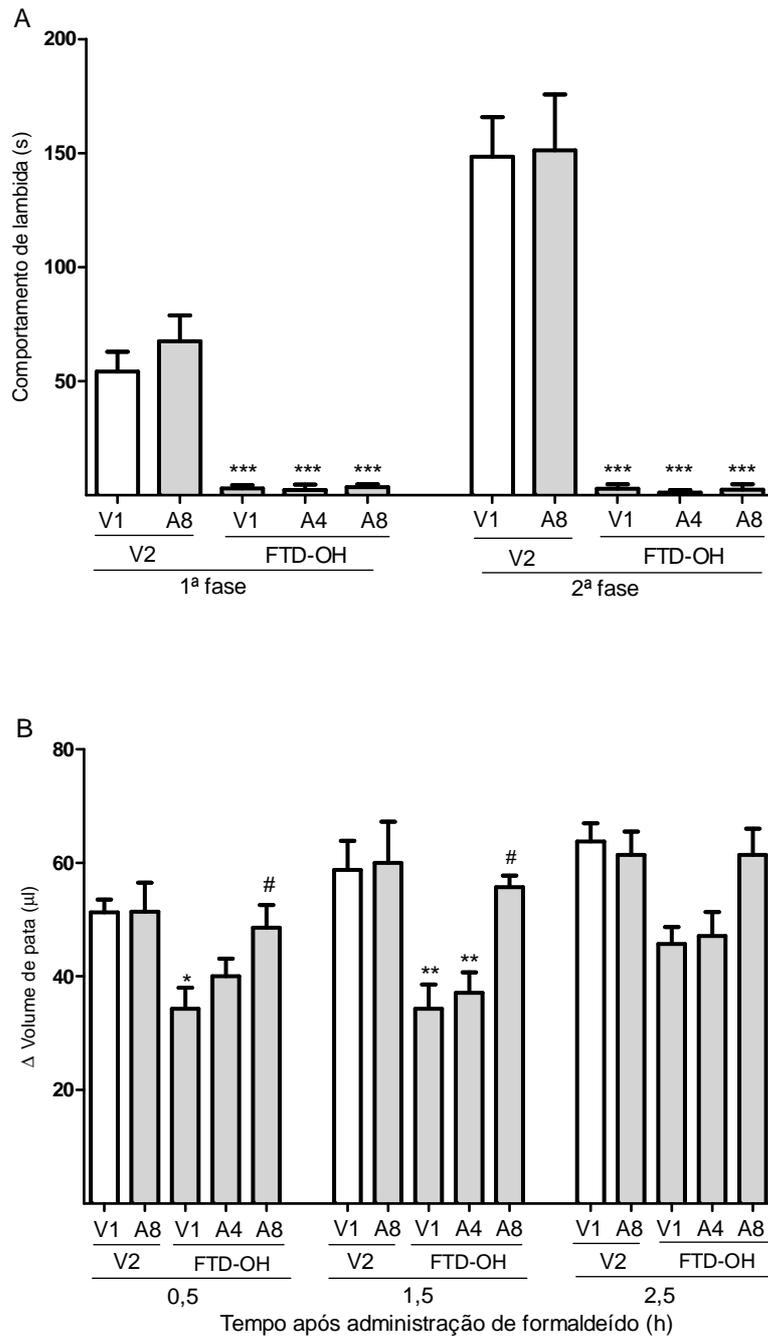


Figura 33 - Efeito induzido pelo AM251 (A4 ou A8; 4 ou 8 mg/kg, i.p. - 1,5 h) sobre as atividades antinociceptiva (A) e anti-edematogênica (B) do FTD-OH (500 mg/kg, p.o., - 1 h) nos modelos de resposta nociceptiva e edema de pata induzidos por formaldeído. V1 = veículo (Cremofor 5%, álcool 5%, salina 90%); V2 = veículo (CMC 0,5%). *, ** e *** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo tratado com V1+V2 ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com V1+FTD-OH ($p < 0,05$, $n = 8$).

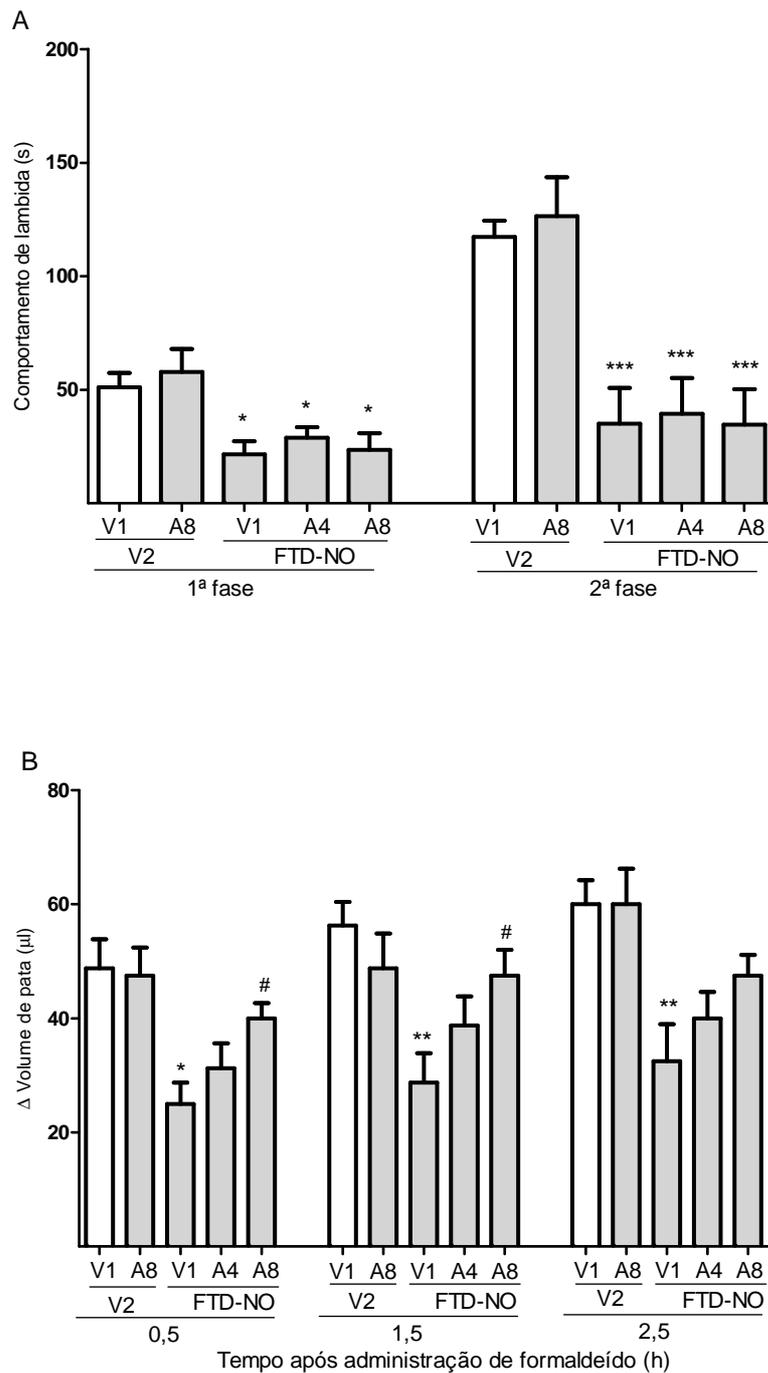


Figura 34 - Efeito induzido pelo AM251 (A4 ou A8; 4 ou 8 mg/kg, i.p. - 1,5 h) sobre as atividades antinociceptiva (A) e antiedematogênica (B) do FTD-NO (500 mg/kg, *p.o.*, - 1 h) nos modelos de resposta nociceptiva e edema de pata induzidos por formaldeído. V1 = veículo (Cremofor 5%, álcool 5%, salina 90%); V2 = veículo (CMC 0,5%). *, ** e *** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo tratado com V1+V2 ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com V1+FTD-NO ($p < 0,05$), $n = 8$.

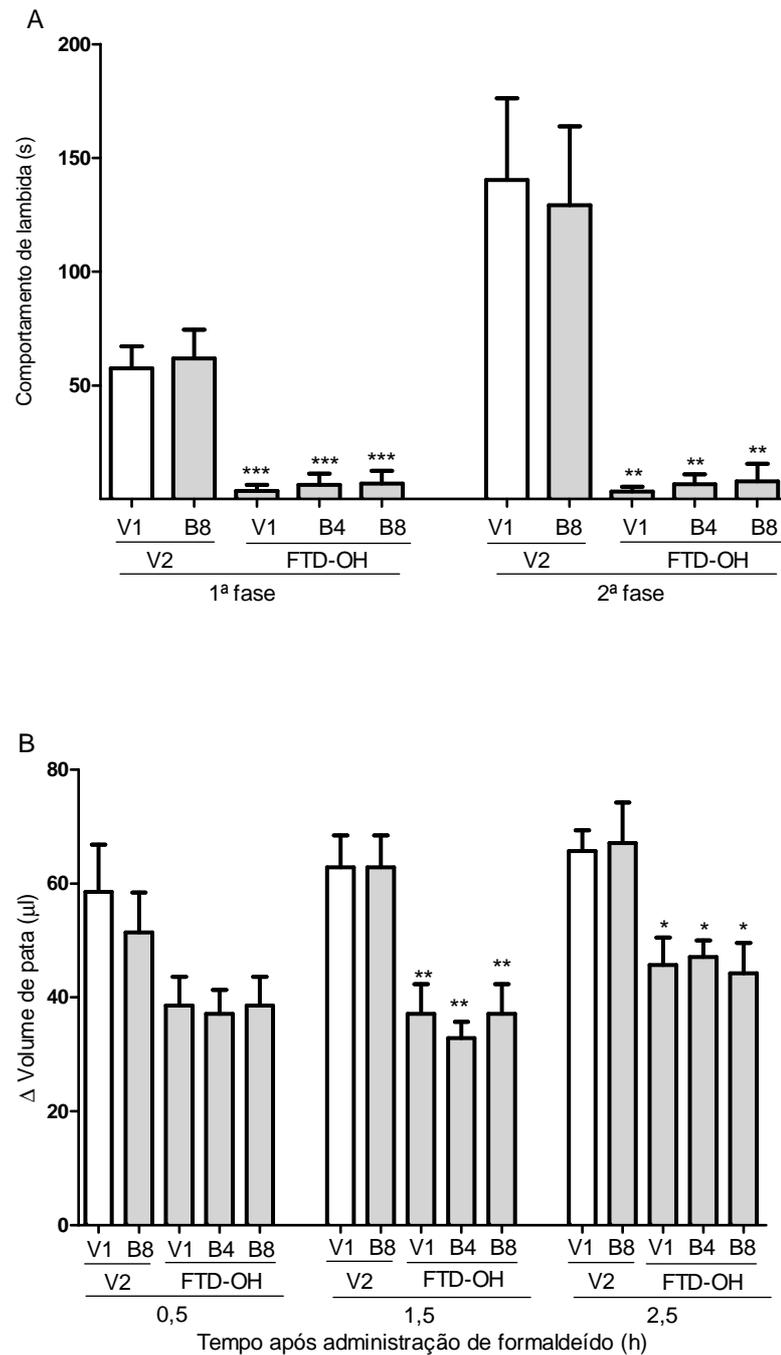


Figura 35 - Efeito induzido pelo AM630 (B4 ou B8; 4 ou 8 mg/kg, i.p. - 1,5 h) sobre as atividades antinociceptiva (A) e antiedematogênica (B) do FTD-OH (500 mg/kg, p.o., - 1 h) nos modelos de resposta nociceptiva e edema de pata induzidos por formaldeído. V1 = veículo (Cremofor 5%, álcool 5%, salina 90%); V2 = veículo (CMC 0,5%). *, ** e *** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo tratado com V1+V2 ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente), $n = 8$.

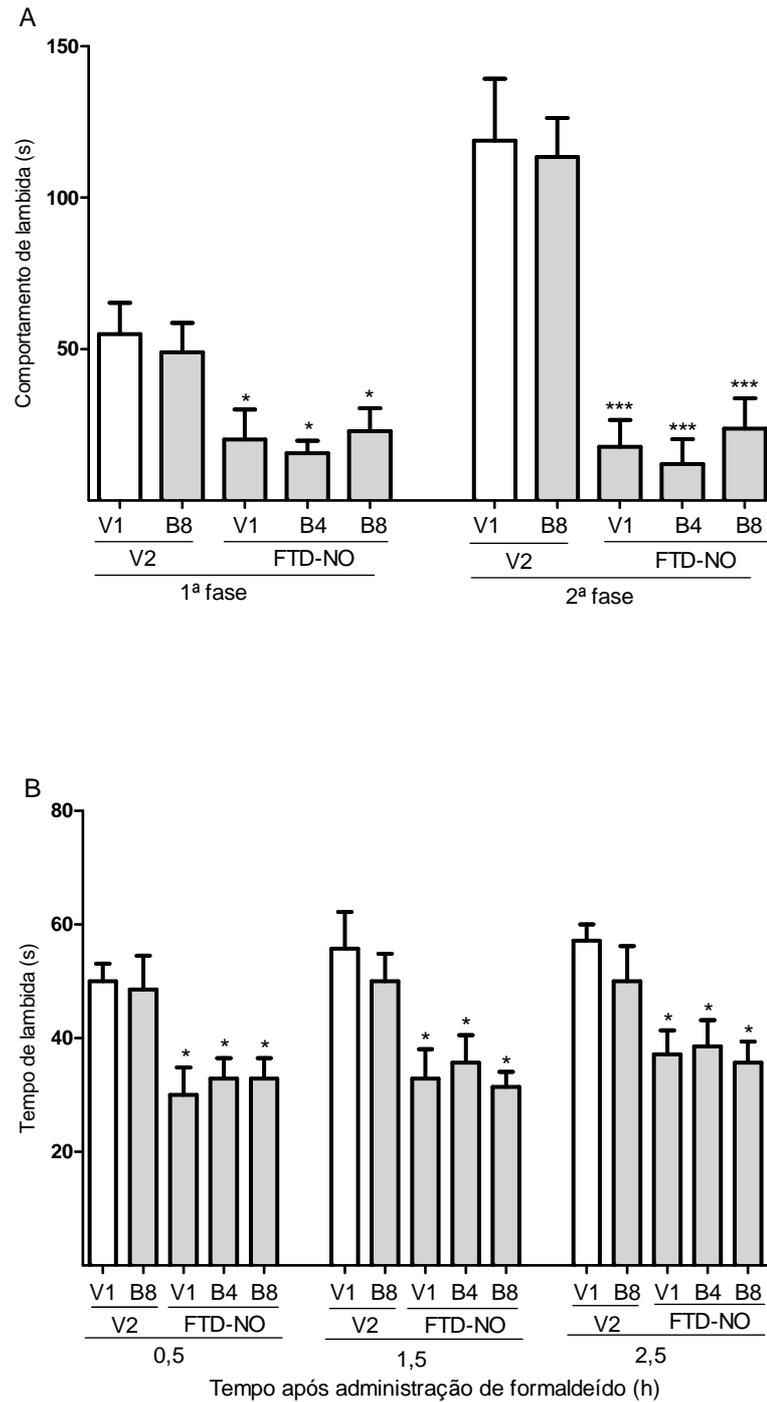
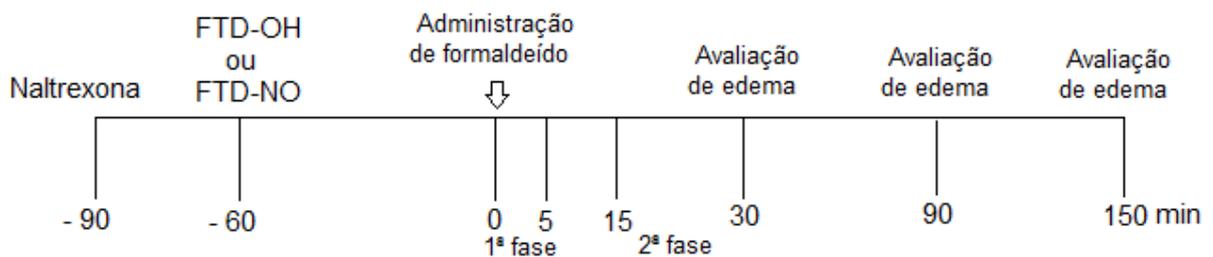


Figura 36 - Efeito induzido pelo AM630 (B4 ou B8; 4 ou 8 mg/kg, i.p. - 1,5 h) sobre as atividades antinociceptiva (A) e antiedematogênica (B) do FTD-NO (500 mg/kg, *p.o.*, - 1 h) nos modelos de resposta nociceptiva e edema de pata induzidos por formaldeído. V1 = veículo (Cremofor 5%, álcool 5%, salina 90%); V2 = veículo (CMC 0,5%). * e *** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo tratado com V1+V2 ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente), $n=8$.

5.11 Efeito induzido pela naltrexona sobre as atividades antinociceptiva e antiedematogênica dos análogos FTD-OH e FTD-NO nos modelos de resposta nociceptiva e edema de pata induzidos por formaldeído



A administração de naltrexona (5 ou 10 mg/kg, i.p.), 30 min antes da administração *p.o.* de FTD-OH ou FTD-NO, não alterou a atividade antinociceptiva de ambos os análogos ftalimídicos (**Figuras 37A e 38A**). Por outro lado, a atividade antiedematogênica do FTD-NO (**Figura 38B**), mas não do FTD-OH (**Figura 37B**), foi reduzida de forma estatisticamente significativa pelo tratamento prévio com a maior dose (10 mg/kg) de naltrexona demonstrada apenas na avaliação feita 0,5 hora após a injeção de formaldeído. Naltrexona (10 mg/kg, i.p.), administrado 1,5 hora antes da injeção *i.pl.* de formaldeído, não alterou *per se* a resposta nociceptiva e o edema de pata induzidos por esse estímulo.

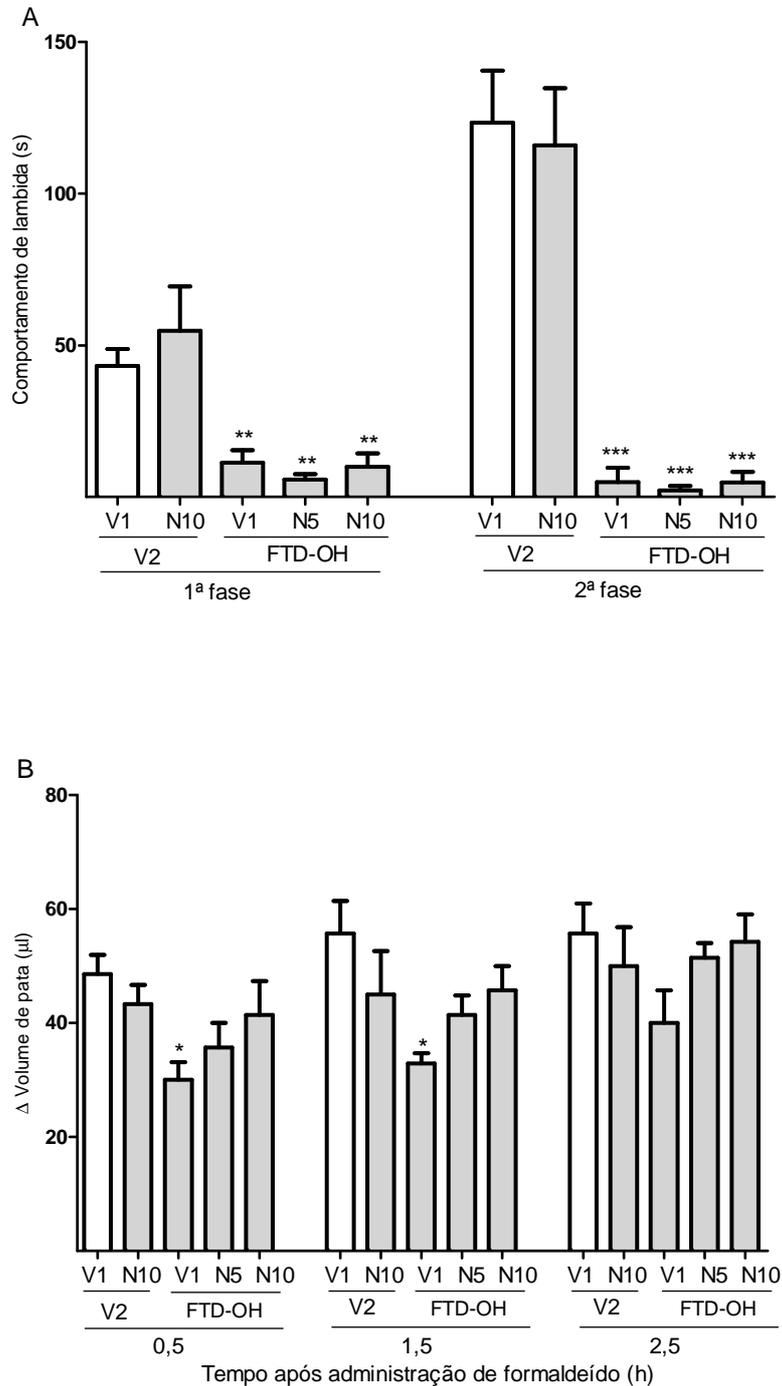


Figura 37 - Efeito induzido pela naltrexona (N5 ou N10; 5 ou 10 mg/kg, i.p. - 1,5 h) sobre as atividades antinociceptiva (A) e anti edematogênica (B) do FTD-OH (500 mg/kg, p.o., - 1 h) nos modelos de resposta nociceptiva e edema de pata induzidos por formaldeído. V1 = veículo (Salina); V2 = veículo (CMC 0,5%). *, ** e *** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo tratado com V1+V2 ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente), $n=8$.

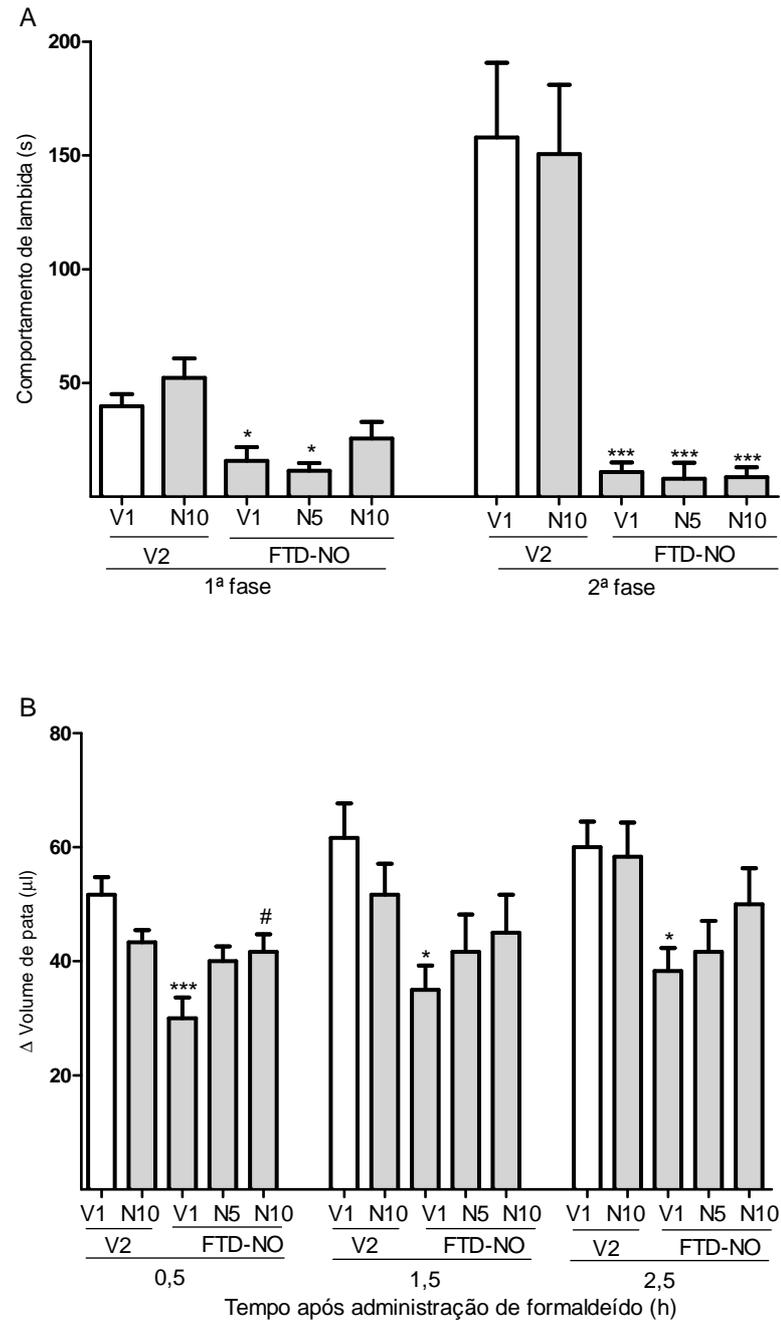
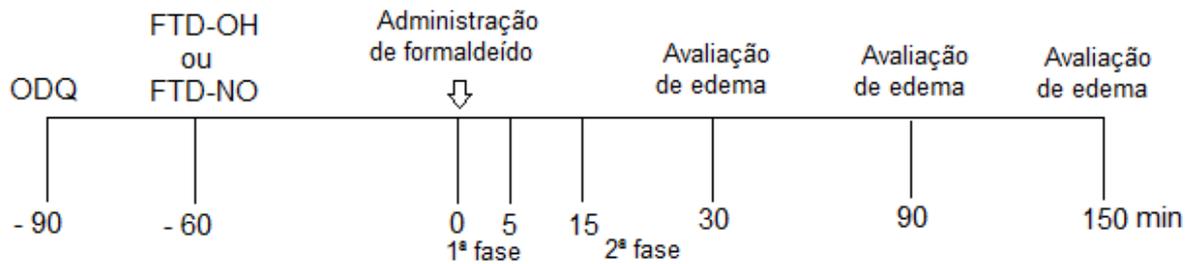


Figura 38 - Efeito induzido pela naltrexona (N5 ou N10; 5 ou 10 mg/kg, i.p. - 1,5 h) sobre as atividades antinociceptiva (A) e antiedematogênica (B) do FTD-NO (500 mg/kg, *p.o.*, - 1 h) nos modelos de resposta nociceptiva e edema de pata induzidos por formaldeído. V1 = veículo (Salina); V2 = veículo (CMC 0,5%). * e *** indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo tratado com V1+V2 ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com V1+X-NO ($p < 0,05$), $n=8$.

5.12 Efeito induzido pelo ODQ sobre as atividades antinociceptiva e antiedematogênica dos análogos FTD-OH e FTD-NO nos modelos de resposta nociceptiva e edema de pata induzidos por formaldeído



A administração de ODQ (4 ou 8 mg/kg, i.p.), 30 min antes da administração *p.o.* de FTD-OH ou FTD-NO, não alterou a atividade antinociceptiva desses análogos (**Figuras 39A e 40A**). Entretanto, a atividade antiedematogênica dos dois análogos foi atenuada pela maior dose (8 mg/kg) de ODQ (**Figuras 39B e 40B**). ODQ (8 mg/kg, i.p.), administrado 1,5 h antes da injeção i.pl. de formaldeído, não alterou *per se* a resposta nociceptiva e o edema de pata induzidos por esse estímulo.

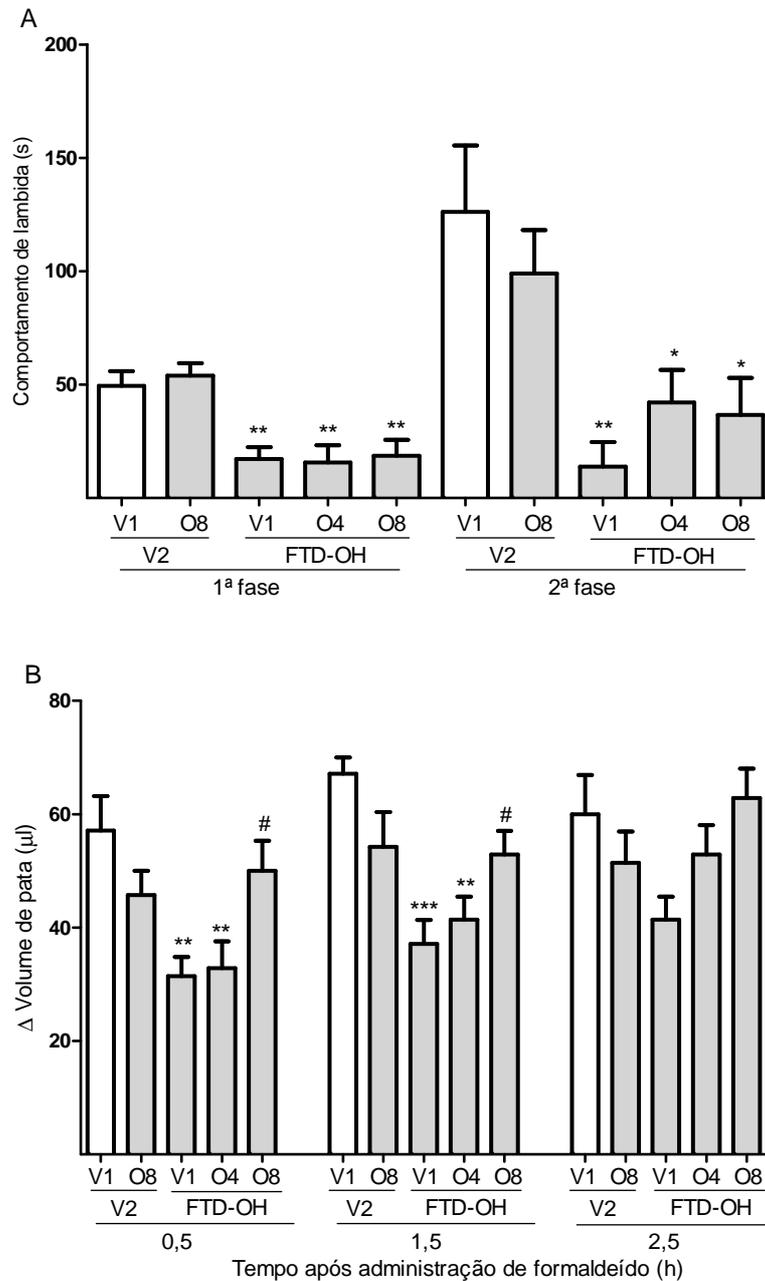


Figura 39 - Efeito induzido pelo ODQ (O4 ou O8; 4 ou 8 mg/kg, i.p., -1,5 h) sobre as atividades antinociceptiva (A) e antiedematogênica (B) do FTD-OH (500 mg/kg, p.o., - 1 h) nos modelos de resposta nociceptiva e edema de pata induzidos por formaldeído. V1 = veículo (DMSO 4%); V2 = veículo (CMC 0,5%). *, ** e * indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo tratado com V1+V2 ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com V1+FTD-OH ($p < 0,05$), $n=8$.**

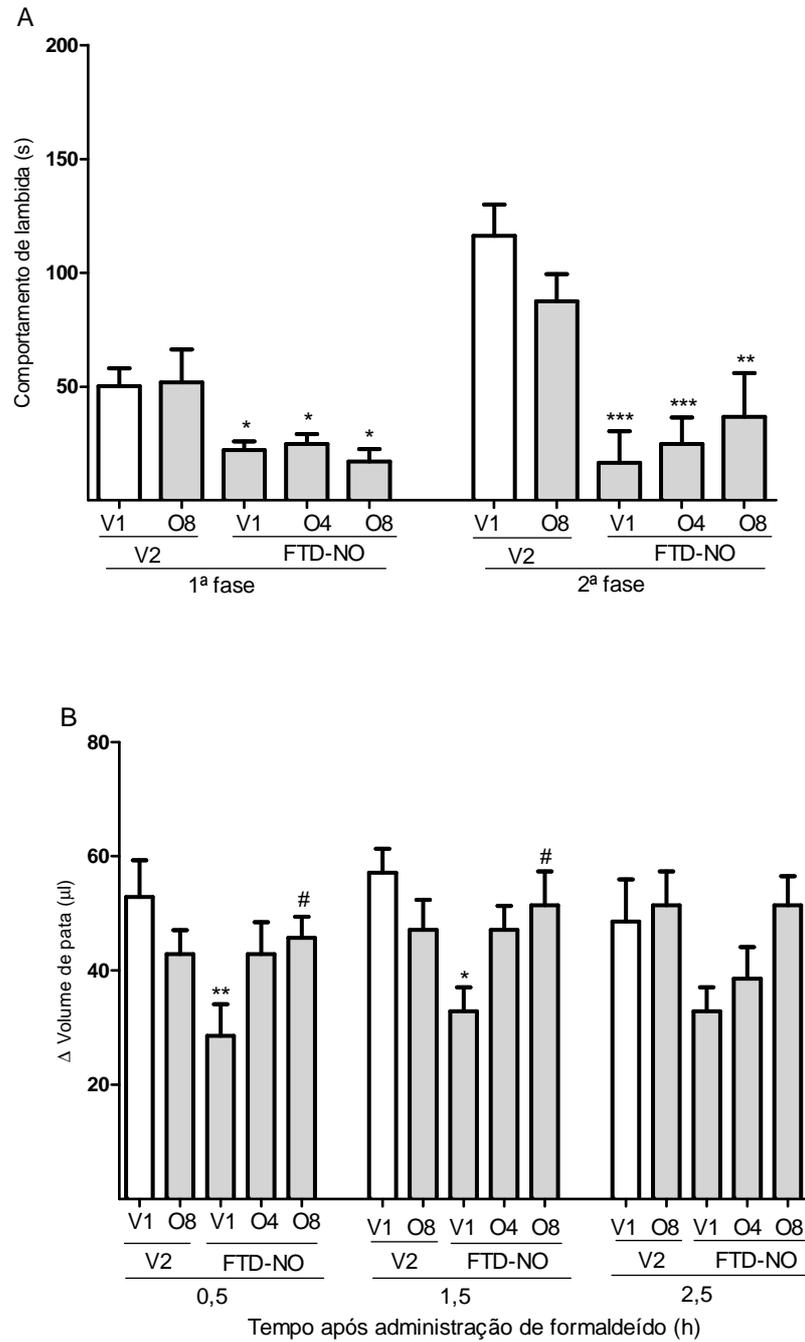


Figura 40 - Efeito induzido pelo ODQ (O4 ou O8; 4 ou 8 mg/kg, i.p., - 1,5 h) sobre as atividades antinociceptiva (A) e antiedematogênica (B) do FTD-NO (500 mg/kg, p.o., - 1 h) nos modelos de resposta nociceptiva e edema de pata induzidos por formaldeído. V1 = veículo (DMSO 4%); V2 = veículo (CMC 0,5%). *, ** e * indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo tratado com V1+V2 ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). # indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com V1+FTD-NO ($p < 0,05$), $n=8$.**

5.13 Síntese dos resultados

➤ **Parte I**

| Modelo Nociceptivo | Talidomida | FTD-OH | FTD-NO |
|--|--|---|--|
| Estímulo: Formaldeído Parâmetro avaliado: Lambida de pata | Inibe: 1ª e 2ª fases Doses: 500 e 750 mg/kg | Inibe: 1ª e 2ª fases Dose: 500 mg/kg | Inibe: 1ª e 2ª fases Doses: 500 e 750 mg/kg |
| Estímulo: Carragenina Parâmetro avaliado: Alodinia mecânica | Inibe: Após 2, 4 e 6 h Doses: 500 e 750 mg/kg | Não inibe | Inibe: Após 2 e 4 h Dose: 750 mg/kg |

| Coordenação motora | Talidomida | FTD-OH | FTD-NO |
|--|----------------------|--|----------------------|
| Estímulo: Físico Parâmetro avaliado: Tempo de permanência na haste girante | Sem alteração | Reduzido Dose: 750 mg/kg | Sem alteração |

| Modelo Edematogênico | Talidomida | FTD-OH | FTD-NO |
|--|-------------------|--|--|
| Estímulo: Formaldeído Parâmetro avaliado: Edema de pata | Não inibe | Inibe: Após 0,5 e 1,5 h Doses: 125, 250, 500 e 750 mg/kg | Inibe: Após 0,5 e 1,5 h Doses: 125, 250, 500 e 750 mg/kg |
| Estímulo: Carragenina Parâmetro avaliado: Edema de pata | Não inibe | Inibe: Após 4 e 6 h Doses: 500 e 750 mg/kg | Inibe: Após 2, 4 e 6 h Doses: 125, 250, 500 e 750 mg/kg |

➤ **Parte II**

| Concentração: MPO, TNF-α, CXCL1 Edema de pata Estímulo: Carragenina | Talidomida | FTD-OH | FTD-NO |
|--|-------------------|--|--|
| MPO | Não inibe | Inibe Dose: 500 mg/kg | Inibe Dose: 500 mg/kg |
| TNF-α | Não inibe | Não inibe | Inibe Doses: 250 e 500 mg/kg |
| CXCL1 | Não inibe | Não inibe | Inibe Doses: 250 e 500 mg/kg |

| Modelo: Artrite induzida por antígeno | Talidomida Dose: 500 mg/kg | FTD-OH Dose: 500 mg/kg | FTD-NO Dose: 500 mg/kg |
|--|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Células totais | Não inibe | Inibe | Inibe |
| Neutrófilos | Não inibe | Inibe | Inibe |
| Mononucleares | Não inibe | Não inibe | Não inibe |
| MPO | Não inibe | Inibe | Inibe |
| TNF-α | Não inibe | Inibe | Inibe |
| CXCL1 | Não inibe | Inibe | Inibe |
| Alodínia mecânica | Inibe | Inibe | Inibe |

| Modelo de dor neuropática: Constricção do nervo ciático | Talidomida Dose: 500 mg/kg | FTD-OH Dose: 500 mg/kg | FTD-NO Dose: 500 mg/kg |
|---|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Alodínia mecânica | Inibe: Após 1, 3 e 5 h | Inibe: Após 1 e 3 h | Inibe Após 1 e 3 h |

| Concentração: Nitrito - Plasma sanguíneo | Talidomida | FTD-OH | FTD-NO Dose: 500 mg/kg |
|--|----------------------|----------------------|----------------------------------|
| Nitrito (µM) | Sem alteração | Sem alteração | Aumento |

➤ **Parte III**

| Antagonistas: AM251, AM630, naltrexona, e ODQ | FTD-OH Dose: 500 mg/kg | FTD-NO Dose: 500 mg/kg |
|---|----------------------------------|----------------------------------|
| AM 251 Atividade antinociceptiva | Não altera | Não altera |
| AM 251 Atividade antiedematogênica | Atenua | Atenua |
| AM 630 Atividade antinociceptiva | Não altera | Não altera |
| AM 630 Atividade antiedematogênica | Não altera | Não altera |
| Naltrexona Atividade antinociceptiva | Não altera | Não altera |
| Naltrexona Atividade antiedematogênica | Atenua | Atenua |
| ODQ Atividade antinociceptiva | Não altera | Não altera |
| ODQ Atividade antiedematogênica | Atenua | Atenua |

6 DISCUSSÃO

6.1 Análogos ftalimídicos como candidatos a fármacos

Diferentes análogos ftalimídicos, obtidos por meio de modificações químicas relativamente simples, podem apresentar atividades farmacológicas bastante distintas daquelas da substância precursora. Como as alterações químicas não necessariamente alteram todas as atividades na mesma extensão, essa estratégia pode resultar no desenvolvimento de uma substância com relação mais favorável entre efeitos terapêuticos e reações adversas, maior potência ou com novas atividades farmacológicas. Nos últimos anos, o interesse no desenvolvimento de diferentes análogos ftalimídicos tem aumentado devido à constatação de que interagem com diferentes alvos moleculares, o que faz com que essas substâncias sejam consideradas candidatos a fármacos úteis no tratamento de pacientes com várias doenças, incluindo aquelas com manifestações inflamatórias e dolorosas. Vários análogos ftalimídicos foram avaliados em ensaios farmacológicos diversos e alguns apresentam atividades antinociceptiva e anti-inflamatória (dos Santos *et al.*, 2011). Além disso, dois análogos ftalimídicos, lenalidomida e pomalidomida, foram aprovados para o uso clínico pelo FDA no tratamento de pacientes com mieloma múltiplo (Bartlett *et al.*, 2004; Dimopoulos *et al.*, 2007; Lacy *et al.*, 2009; Richardson *et al.*, 2002b; 2013; Schey *et al.*, 2004).

No presente estudo, foram avaliados dois análogos ftalimídicos em diferentes modelos experimentais de dor e inflamação. Um análogo (FTD-OH) tem como característica o acoplamento de uma cadeia lateral com o grupo funcional álcool (-OH). O outro análogo (FTD-NO) tem como característica a substituição dessa hidroxila por um doador de NO. A investigação dos efeitos induzidos por esses dois análogos nos mesmos modelos experimentais de dor e inflamação permitiu caracterizar o perfil farmacológico de cada um e a importância do acoplamento de um doador de NO à estrutura ftalimídica para a expressão das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória.

Os análogos ftalimídicos avaliados no presente estudo, o FTD-OH e o FTD-NO, apresentaram atividades em modelos experimentais de dores nociceptiva,

inflamatória e neuropática, bem como em modelos de edema inflamatório. A atividade antinociceptiva, de uma forma geral, parece não envolver mecanismos canabinoidérgicos e opioidérgicos ou a via da guanilato ciclase-GMPc. Entretanto, a atividade antinociceptiva em modelos experimentais de dor inflamatória pode ser resultado da inibição da migração celular e da produção de citocinas inflamatórias. A atividade antiedematogênica, por sua vez, envolve mecanismos canabinoidérgicos e opioidérgicos ou a via da guanilato ciclase-GMPc, dependendo do modelo experimental usado, e também pode ser resultado da inibição da quimiotaxia e da produção de mediadores inflamatórios.

6.2 Atividade antinociceptiva da talidomida e dos análogos FTD-OH e FTD-NO

O presente estudo demonstrou as atividades antinociceptivas dos análogos ftalimídicos FTD-OH e FTD-NO em diferentes modelos experimentais de dor inflamatória (segunda fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído, alodínia mecânica induzida por carragenina e alodínia mecânica induzida por antígeno), dor neuropática (alodínia mecânica induzida por constrição do nervo ciático) e dor nociceptiva (primeira fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído). A talidomida, utilizada como um fármaco de referência para comparação com os análogos ftalimídicos, também apresentou atividade antinociceptiva nos modelos experimentais de dor inflamatória e dor neuropática.

Com o objetivo de investigar se a redução da expressão do comportamento nociceptivo avaliado nos diferentes modelos experimentais de dor poderia resultar de incoordenação motora e/ou relaxamento muscular induzidos pelos análogos ftalimídicos e não de uma atividade antinociceptiva intrínseca, foi avaliado o efeito induzido por essas substâncias sobre o tempo de permanência dos animais na haste girante. O análogo ftalimídico FTD-NO e a talidomida não reduziram o tempo de permanência dos animais na haste girante, o que permite sugerir que a redução do comportamento nociceptivo induzido por esses análogos, nas doses usadas, deve ser resultado de uma atividade antinociceptiva intrínseca. Entretanto, a maior dose do análogo ftalimídico FTD-OH (750 mg/kg) induziu incoordenação motora, de forma que só é possível relacionar a redução do comportamento nociceptivo

induzido por esse análogo a uma atividade antinociceptiva intrínseca quando são usadas doses menores do mesmo. Assim, os análogos ftalimídicos avaliados no presente estudo, de forma semelhante aos analgésicos opioides (Meert & Vermeirsch, 2005) e antiepilépticos (Kayser & Christensen, 2000), apresentam atividade antinociceptiva sem associação com comprometimento motor quando usados em doses menores.

A demonstração da atividade antinociceptiva dos dois análogos ftalimídicos em diferentes modelos experimentais de dores nociceptiva, inflamatória e neuropática corrobora a atividade antinociceptiva dessa classe de substâncias, previamente demonstrada para a talidomida (Goli, 2007) e para a lenalidomida (Asher & Furnish, 2013). É possível que vários mecanismos bioquímicos mediem a atividade antinociceptiva dos análogos ftalimídicos FTD-OH e FTD-NO, uma vez que essa atividade foi observada em modelos experimentais de dores nociceptiva, inflamatória e neuropática. O conhecimento dos mecanismos neuroquímicos relevantes para o processamento nociceptivo em um modelo experimental de dor, assim como intervenções com ferramentas farmacológicas específicas, podem proporcionar informações sobre os mecanismos que mediam a atividade antinociceptiva de uma droga em investigação.

A resposta nociceptiva induzida por formaldeído, um dos modelos usados no presente estudo, é composta por duas fases, uma que simula dor nociceptiva (primeira fase) e outra que simula dor inflamatória (segunda fase). A primeira fase começa imediatamente após a injeção de formaldeído, envolve a ativação direta de nociceptores do tipo C e tem duração aproximada de 5 min (Tjolsen *et al.*, 1992). Diferentes estudos indicam que a interação de formaldeído com receptores TRPA1 (Mcnamara *et al.*, 2007; Kerstein *et al.*, 2009) e TRPV1 (Tian *et al.*, 2009) pode estar envolvida na ativação dos nociceptores. A segunda fase da resposta nociceptiva começa 15 a 20 min após a injeção de formaldeído e tem duração aproximada de 30 a 60 min, dependendo da espécie do animal usada e da concentração do estímulo nocivo. Essa fase resulta da resposta inflamatória no local da injeção, com a liberação de múltiplos mediadores que contribuem para a ativação e sensibilização dos nociceptores, bem como da facilitação da transmissão nociceptiva no SNC (Coderre *et al.*, 1990; Shibata *et al.*, 1989; Tjolsen *et al.*, 1992).

Estudos eletrofisiológicos demonstram um aumento bifásico da excitabilidade dos nociceptores após a injeção de formaldeído (Dickenson & Sullivan, 1987a; b), que apresenta um paralelismo com o aspecto bifásico da resposta nociceptiva. O aumento da excitabilidade dos nociceptores está associado à liberação de diferentes mediadores no corno dorsal da medula espinhal, entre os quais estão o glutamato, a PGE₂ e o NO, que contribuem para o processamento nociceptivo (Malmberg & Yaksh, 1995; Okuda *et al.*, 2001). A reação inflamatória local envolve mediadores como os neuropeptídios (substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina), a histamina, a serotonina, as citocinas e os eicosanoides que contribuem para a resposta nociceptiva e o edema (Damas & Liégois, 1999; Dorazil-Dudzik *et al.*, 2004; Hagains *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2013; Yamato *et al.*, 2013; Wheeler-Aceto & Cowan, 1991). Frequentemente, a primeira fase da resposta nociceptiva induzida por formaldeído é inibida por drogas ou fármacos que agem predominantemente no SNC, como os analgésicos opioides, enquanto a segunda fase é inibida por drogas ou fármacos de ação central e também por drogas ou fármacos que apresentam atividade predominantemente anti-inflamatória (Hunnskaar & Hole, 1987; Shibata *et al.*, 1989; Tjolsen *et al.*, 1992).

No presente estudo, foi demonstrado que os análogos FTD-OH e FTD-NO, bem como a talidomida, inibem a resposta nociceptiva induzida por formaldeído. O FTD-OH e o FTD-NO inibem tanto a primeira quanto a segunda fase da resposta nociceptiva, em extensões muito semelhantes e de forma marcante quando comparados com a talidomida. Esses resultados indicam que a atividade antinociceptiva dessas três substâncias pode resultar de vários mecanismos, incluindo efeito sobre o processamento nociceptivo no SNC, o que poderia contribuir para a inibição da primeira fase da resposta nociceptiva. Por outro lado, o efeito sobre o processamento nociceptivo periférico, incluindo a inibição da produção ou ação de mediadores inflamatórios que ativam ou sensibilizam os nociceptores, juntamente com o efeito central, poderiam contribuir para a inibição da segunda fase da resposta nociceptiva.

Os análogos FTD-OH e FTD-NO investigados no presente estudo, diferentemente da talidomida, inibem a migração de leucócitos mononucleares e polimorfonucleares, avaliada de forma direta ou indireta por meio da determinação da atividade da MPO,

e a produção de TNF- α e CXCL1 induzidas por diferentes estímulos inflamatórios. Embora a talidomida seja considerada um inibidor tradicional da produção de TNF- α e de outras citocinas, vários estudos demonstraram diferentes efeitos induzidos por esse fármaco. A talidomida, dependendo das doses usadas, do tipo de célula ativada, do estímulo aplicado ou das características dos ensaios (*in vitro* ou *in vivo*) pode inibir (Sampaio *et al.*, 1991; Moreira *et al.*, 1993) ou aumentar (Corral *et al.*, 1999; Haslett *et al.*, 1998; Marriott *et al.*, 2002) as concentrações de TNF- α . Entretanto, os diferentes efeitos imunomodulatórios induzidos pela talidomida (Payvandi *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2002; Geitz *et al.*, 1996) podem justificar a sua atividade antinociceptiva, caracterizada em diferentes modelos experimentais de dor (George *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2000), incluindo a resposta nociceptiva induzida por formaldeído (Pereira *et al.*, 2009) ou por constrição do nervo ciático (George *et al.*, 2000).

Em relação aos análogos ftalimídicos, foi observada uma diferença entre os seus efeitos quando diferentes estímulos inflamatórios foram usados para induzir a migração celular e a produção de citocinas inflamatórias. Ambos os análogos inibiram de forma marcante essas respostas no modelo de inflamação articular induzida por antígeno, enquanto no modelo de inflamação induzida por carragenina, o análogo FTD-NO apresentou maior atividade que o análogo FTD-OH. A inibição da migração celular e da produção de citocinas inflamatórias pode representar um mecanismo importante que medeia a atividade dos análogos em modelos experimentais de dor inflamatória e neuropática, uma vez que resultados de vários estudos fornecem suporte à essa proposta.

A carragenina, um estímulo usado no presente estudo, induz inflamação local que resulta da ação de vários mediadores, incluindo bradicinina, histamina, serotonina, eicosanoides, citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Crunkhorn & Meacock, 1971; Ferreira *et al.*, 1993; Ianaro *et al.*, 1994; Salvemini *et al.*, 1996a; b). A carragenina também induz a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório que, uma vez ativados, produzem vários dos mediadores acima mencionados (Salvemini *et al.*, 1996a). Muitos desses mediadores, bem como leucócitos que migram para o local, também medeiam a artrite induzida por antígeno em camundongos (Coelho *et al.*, 2008; van den Berg, 1981), outro modelo

experimental de dor inflamatória usado no presente estudo. Em ambos os casos, inflamação de pata induzida por carragenina ou artrite induzida por antígeno, o desenvolvimento da alodínia mecânica é uma resposta amplamente reconhecida e indica a sensibilização marcante dos nociceptores induzida por múltiplos mediadores inflamatórios. A alodínia mecânica avaliada no modelo experimental de dor neuropática usado no presente estudo, constrição do nervo ciático em camundongos, envolve não somente vias neuronais, mas também células de Schwann, células satélites no gânglio da raiz dorsal, componentes do sistema imune periférico, micróglia e astrócitos espinhais. As citocinas inflamatórias exercem um papel fundamental na indução e manutenção da sensibilização em modelos experimentais de dor neuropática (Sommer *et al.*, 1997; 1998a). A associação entre estímulo inflamatório e lesão do nervo exacerba a nocicepção, enquanto a supressão concomitante da resposta imune com administração sistêmica de ciclosporina A (Bennett, 2000) ou dexametasona reduz a infiltração de células imunes e a hiperalgesia induzidas pela constrição de nervo ciático (Clatworthy *et al.*, 1995).

Há vários estudos demonstrando que o TNF- α é um mediador importante do processamento nociceptivo em modelos experimentais de dor inflamatória e neuropática. Entre os resultados apresentados nesses estudos, há demonstração das alodínias mecânica e térmica induzidas por TNF- α (Schäfers *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2007) e do aumento da concentração dessa citocina na pata de animais após a injeção de diferentes estímulos inflamatórios, incluindo carragenina (Loram *et al.*, 2007), albumina metilada (Vieira *et al.*, 2009) ou formaldeído (Patel *et al.*, 2013; Yamato *et al.*, 2013). Essa citocina também apresenta-se em concentração elevada no tecido obtido de animais com artrite induzida por antígeno (Silveira *et al.*, 2013) e no sítio da constrição do nervo ciático no modelo experimental de dor neuropática (Okamoto *et al.*, 2001; Sacerdote *et al.*, 2008). Corroborando a proposta de um papel importante do TNF- α nos modelos experimentais de dor inflamatória e neuropática, há estudos demonstrando que anticorpos ou inibidores de TNF- α inibem a resposta nociceptiva nesses modelos (Sommer *et al.*, 1998b; 2001) e que animais deficientes para receptores para TNF- α apresentam resposta nociceptiva atenuada a diferentes estímulos (Bruce *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2011).

Em relação à citocina CXCL1, também há evidências do seu papel no processamento nociceptivo em diferentes modelos experimentais de dor. Assim, foi demonstrado um aumento da produção dessa citocina em modelos experimentais de dores neuropática (Zhang *et al.*, 2013) e inflamatória (Brack *et al.*, 2004), bem como inibição da resposta nociceptiva em vários modelos experimentais quando os animais são previamente tratados com um inibidor do receptor CXCR1/2, com o qual a CXCL1 interage (Coelho *et al.*, 2008).

A migração celular, particularmente de leucócitos polimorfonucleares, também contribui de forma marcante para a resposta nociceptiva em diferentes modelos experimentais de dor, provavelmente devido a conhecida capacidade dessas células, uma vez ativadas, de secretarem uma diversidade de mediadores inflamatórios (Rittner *et al.*, 2005). Cunha *et al.* (2008) demonstraram um acúmulo de neutrófilos na pata de animais injetados com carragenina ocorrendo simultaneamente ao desenvolvimento das alodínias mecânica e térmica, bem como a inibição da alodínia mecânica induzida por esse estímulo inflamatório quando os animais são previamente tratados com um inibidor da migração de leucócitos. Também foi demonstrado o acúmulo de neutrófilos em segmentos do nervo ciático submetidos à secção parcial (Perkins e Tracey, 2000) e gânglios da raiz dorsal após constrição do nervo correspondente (Morin *et al.*, 2007; Kim e Moalem-Taylor, 2011), o que leva à sugestão de que a migração de células inflamatórias também representa uma etapa importante no processo de sensibilização em modelos experimentais de dor neuropática (para uma revisão, veja Thacker *et al.*, 2007). Assim, é esperado que nesses modelos experimentais, drogas ou fármacos que inibem a migração celular também atenuem a sensibilização.

No presente estudo, outros protocolos foram realizados com o objetivo de investigar outros mecanismos que poderiam contribuir para a atividade dos análogos ftalimídicos no modelo da resposta nociceptiva induzida por formaldeído. Inicialmente, os antagonistas dos receptores canabinoides CB₁ (AM251) (Gühring *et al.*, 2002) e CB₂ (AM630) (Malan *et al.*, 2001) foram usados com o objetivo de investigar se a via canabinoidérgica poderia mediar as atividades antinociceptivas das substâncias FTD-OH e FTD-NO. É amplamente conhecido que a atividade antinociceptiva de várias drogas ou fármacos é revertida por antagonistas

canabinoides (Gühring *et al.*, 2002; Guindon *et al.*, 2006; Ibrahim *et al.*, 2004; Malan *et al.*, 2001; 2002; Schreiber *et al.*, 2012). Entretanto, a administração prévia de AM251 ou AM630 não alterou as atividades antinociceptivas do FTD-OH e do FTD-NO, o que indica que mecanismos canabinoidérgicos não são relevantes para essas atividades no modelo experimental usado.

Em seguida, foi investigada se a via opioidérgica poderia mediar as atividades antinociceptivas das substâncias FTD-OH e FTD-NO, por meio da utilização de um antagonista não-seletivo de receptores opioides (naltrexona) (Gutstein & Akil, 2006). Diferentemente de outros estudos que demonstraram a participação da via opioidérgica na atividade antinociceptiva de outras drogas ou fármacos (Lembeck & Donnerer 1985; Hong & Abbott 1995; Zhao *et al.*, 1985), o presente estudo demonstrou que a administração prévia de naltrexona não altera a atividade antinociceptiva dos análogos FTD-OH e FTD-NO. Embora os análogos ftalimídicos investigados no presente estudo não sejam estruturalmente tão semelhantes à talidomida, é importante ressaltar que a atividade antinociceptiva desse fármaco, demonstrada em modelo experimental de artrite induzida por zimosano, também não é atenuada pelo tratamento prévio dos animais com o antagonista de receptores opioides naloxona (Vale *et al.*, 2006).

Outro mecanismo bioquímico investigado foi a ativação da via da guanilato ciclase-GMPc. O ODQ, um inibidor da enzima guanilato ciclase (Boulton *et al.*, 1995; Garthwaite *et al.*, 1995), foi usado com o objetivo de investigar se a ativação dessa enzima medeia as atividades antinociceptivas das substâncias FTD-OH e FTD-NO. É amplamente conhecido que a atividade antinociceptiva de várias drogas ou fármacos é revertida por inibidores da guanilato ciclase (Alves *et al.*, 2004; Déciga-Campos & López-Munõz, 2004; Lázaro-Ibáñez *et al.*, 2001; Rodrigues & Duarte, 2000; Sachs *et al.*, 2000). No presente estudo, entretanto, não foi observada alteração do efeito antinociceptivo induzido pelos análogos ftalimídicos quando os animais foram previamente tratados com ODQ. Esse resultado indica que os análogos ftalimídicos, de forma diferente de várias outras drogas ou fármacos, induzem efeito antinociceptivo no modelo experimental por meio da ativação de mecanismos independentes de cGMP.

Em relação à capacidade de aumentar a concentração plasmática de nitrito, uma evidência indireta do estímulo à produção ou à liberação de NO, observou-se que apenas o análogo FTD-NO apresentou essa atividade. Apesar da diferença marcante observada entre o FTD-OH e o FTD-NO em relação a esse parâmetro bioquímico, a análise conjunta dos resultados indica que ambos os análogos ftalimídicos apresentam as mesmas atividades na maioria dos modelos experimentais de dor e inflamação. Apenas no modelo de inflamação aguda induzida por carragenina foi observada uma diferença, caracterizada pela atividade inibitória do FTD-NO, mas não do FTD-OH, sobre a produção de TNF- α e CXCL-1. Conclui-se, assim, que a substituição da hidroxila do análogo ftalimídico FTD-OH por um grupo doador de NO não resultou em uma substância que apresenta maior atividade na maioria dos modelos experimentais de dor e de inflamação. Esses resultados diferem daqueles observados para outras drogas ou fármacos, entre os quais o ácido acetilsalicílico (Fiorucci *et al.*, 2000; Turnbull *et al.*, 2008), o paracetamol (Romero-Sandoval *et al.*, 2007) e o naproxeno (Young *et al.*, 2005), para os quais o acoplamento de um grupo doador de NO aumentou a atividade antinociceptiva em diferentes modelos experimentais. Embora os resultados do presente estudo não permitam indicar razões para as atividades muito semelhantes dos dois análogos ftalimídicos investigados, pode-se concluir que o acoplamento de um grupo doador de NO nem sempre resulta em uma nova droga com maior atividade do que aquela da precursora.

6.3 Atividade antiedematogênica dos análogos FTD-OH e FTD-NO

No presente estudo, foi demonstrado que os análogos ftalimídicos FTD-OH e FTD-NO também inibem o edema induzido por formaldeído ou carragenina. Embora a talidomida tenha mimetizado o FTD-OH e o FTD-NO em relação à atividade antinociceptiva, esse fármaco diferiu em relação aos dois análogos ftalimídicos, uma vez que não apresentou atividade antiedematogênica.

O edema inflamatório induzido por formaldeído ou carragenina é comumente observado após a injeção i.pl. desses estímulos inflamatórios em roedores. Embora o edema de pata induzido por formaldeído seja menos investigado do que o edema

de pata induzido por carragenina, há evidências de que muitos dos mediadores que contribuem para o desenvolvimento da resposta nociceptiva também sejam relevantes para o desenvolvimento do edema. A ativação de TRPA1, que contribui para a resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído (Mcnamara *et al.*, 2007; Kerstein *et al.*, 2009), também contribui para o desenvolvimento do edema. Os resultados que permitiram essas conclusões incluem a demonstração de que a injeção i.pl. de agonista de receptores TRPA1 (alilisotiocianato) induz edema (Moilanen *et al.*, 2012; Perin-Martins *et al.*, 2013) e também a demonstração de que o edema induzido por carragenina e alilisotiocianato em animais deficientes para receptores TRPA1 ou tratados com antagonistas de receptores TRPA1 apresenta-se reduzido (Moilanen *et al.*, 2012). Também é altamente provável que muitos dos mediadores cuja produção é estimulada pela injeção i.pl. de formaldeído, incluindo substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, histamina, serotonina, citocinas e eicosanoides, contribuam para o desenvolvimento do edema inflamatório, uma vez que muitos deles induzem vasodilatação e aumento da permeabilidade (Damas & Liégois, 1999; Dorazil-Dudzik *et al.*, 2004; Hagains *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2013; Yamato *et al.*, 2013; Wheeler-Aceto & Cowan, 1991).

A carragenina, outro estímulo usado no presente estudo, induz inflamação local que resulta da ação de vários mediadores, incluindo bradicinina, histamina, serotonina, eicosanoides, citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Crunkhorn & Meacock, 1971; Ferreira *et al.*, 1993; Ianaro *et al.*, 1994; Salvemini *et al.*, 1996a; b). A carragenina também induz a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório, que uma vez ativados, produzem vários dos mediadores acima mencionados (Salvemini *et al.*, 1996a). Em muitos desses estudos, os autores demonstraram que esses mediadores inflamatórios não apenas contribuem para a alodínia induzida pela carragenina, mas também para o edema inflamatório que ocorre de forma simultânea à resposta nociceptiva.

Tanto o edema de pata induzido por formaldeído quanto o edema de pata induzido por carragenina foram atenuados em animais tratados previamente com os análogos ftalimídicos FTD-OH e FTD-NO. Embora o efeito induzido pelos análogos ftalimídicos sobre a migração celular e a produção de citocinas inflamatórias só tenha sido avaliado no modelo de inflamação induzido por carragenina, é bastante

provável que a inibição desses fenômenos contribua para explicar a atividade antiedematogênica do FTD-OH e FTD-NO nesse modelo e também no modelo de edema de pata induzido pelo formaldeído, que envolve mediadores semelhantes. A talidomida, por sua vez, não inibiu a migração celular e a produção de citocinas inflamatórias, resultados que contribuem para explicar a ausência de atividade desse fármaco nos modelos de edema de pata induzido por formaldeído ou carragenina.

No presente estudo, foram obtidas evidências de que a ativação de mecanismos canabinoidérgicos e opioidérgicos ou da via guanilato ciclase também pode contribuir para a atividade antiedematogênica dos análogos ftalimídicos no modelo de inflamação induzida pelo formaldeído. Esses resultados podem ser considerados inesperados, uma vez que essas vias são comumente descritas como relevantes para a atividade antinociceptiva de muitas drogas ou fármacos (Alves *et al.*, 2004; Gühring *et al.*, 2002; Lembeck & Donnerer 1985) e no presente estudo foi observado que a ativação dessas vias contribuiu para a atividade antiedematogênica e não para a atividade antinociceptiva.

Em relação aos mecanismos canabinoidérgicos, apenas a administração prévia do antagonista do receptor CB₁ (AM251) (Gühring *et al.*, 2002), mas não do antagonista do receptor CB₂ (AM630) (Malan *et al.*, 2001), atenuou o efeito antiedematogênico induzido pelos dois análogos. Assim, sugere-se que atividade antiedematogênica dos análogos FTD-OH e FTD-NO pode ser mediada por receptores CB₁. Outros estudos fornecerem resultados que podem auxiliar na compreensão dos resultados do presente estudo. Há demonstração de que antagonistas CB₁ podem atenuar a atividade anti-inflamatória, incluindo antiedematogênica, de diferentes drogas (Aviello *et al.*, 2011; Matos *et al.*, 2013) e também de que agonistas de receptores CB₁ inibem edema em orelha de camundongos induzido por capsaicina (Richardson *et al.*, 1998).

Em seguida, foi investigado, por meio da utilização de um antagonista não-seletivo de receptores opioides (naltrexona) (Gutstein & Akil, 2006), se a via opioidérgica poderia mediar a atividade antiedematogênica das substâncias FTD-OH e FTD-NO. A administração prévia de naltrexona atenuou a atividade antiedematogênica dos

análogos FTD-OH e FTD-NO. Assim, sugere-se que atividade antiedematogênica dos análogos FTD-OH e FTD-NO também pode ser mediada por receptores opioides. Também há evidências na literatura que fornecem sustentação a esses resultados e que indicam que a ativação de mecanismos opioidérgicos pode inibir a resposta inflamatória. A injeção intratecal (Brock & Tonussi 2008) ou i.p. (Joris *et al.* 1990) de morfina inibe o edema de pata induzido por carragenina. Por sua vez, Obara *et al.* (2009) demonstraram que a injeção i.pl. de agonistas opioides reduz o edema de pata induzido por formaldeído.

Também foi investigado se a ativação da via da guanilato ciclase-GMPc poderia contribuir para a atividade antiedematogênica dos análogos ftalimídicos. No presente estudo, foi observada a atenuação do efeito antiedematogênico induzido pelos análogos ftalimídicos FTD-OH e FTD-NO quando os animais foram previamente tratados com ODQ, um inibidor da enzima guanilato ciclase (Boulton *et al.*, 1995; Garthwaite *et al.*, 1995). Esse resultado indica que os análogos ftalimídicos podem induzir efeito antiedematogênico por meio da ativação de mecanismos dependentes de cGMP. Há estudos que demonstraram que a ativação dessa via induz efeitos anti-inflamatórios, como redução do recrutamento de neutrófilos e da liberação de TNF- α (Brock & Tonussi 2008; Fernandes *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2011).

6.4 Perspectivas

Os análogos FTD-OH e FTD-NO, destituídos do anel glutarimídico, quando comparados com a talidomida, apresentam atividades antinociceptiva e anti-inflamatória superiores em vários modelos experimentais. A demonstração dessas atividades indica que esses dois análogos ftalimídicos, *per se*, podem representar candidatos a fármacos anti-inflamatórios e analgésicos. Entretanto, o interesse nesses análogos não deriva apenas dessa demonstração. Em relação aos aspectos químicos, deve ser ressaltada a simplicidade molecular do FTD-OH e do FTD-NO quando comparados a vários outros análogos ftalimídicos sintetizados por diferentes grupos de pesquisa (Chaulet *et al.* 2011; Mazzoccoli *et al.* 2012; Miyachi *et al.*, 1997a; Stewart *et al.*, 2007; 2010; Sano *et al.*, 2004; Noguchi *et al.*, 2004). Em relação aos aspectos relacionados à segurança, há a demonstração de que outros

análogos ftalimídicos destituídos do anel glutarimídico, diferentemente da talidomida, não apresentam atividade teratogênica (D'Amato *et al.*, 1994; Huang and McBride, 1997; Joussem *et al.*, 1999; Lepper *et al.*, 2004). Assim, os análogos ftalimídicos investigados no presente estudo, mesmo que sejam avaliados como candidatos inadequados a fármacos em estudos posteriores, continuam sendo objeto de interesse tendo em vista que podem ser considerados como protótipos para o desenvolvimento de novas substâncias com menor complexidade estrutural e perspectiva de melhor perfil de segurança.

6.5 Limitações

Embora o presente estudo tenha fornecido resultados que demonstram de uma forma inequívoca que o FTD-OH e o FTD-NO induzem efeitos em vários modelos experimentais de dor e inflamação, bem como demonstrado algumas alterações bioquímicas que poderiam mediar esses efeitos, não há conhecimento sobre o(s) alvo(s) moleculare(s) com o(s) qual(is) esses análogos interagem para expressar suas atividades. O desconhecimento desse aspecto pode dificultar o desenvolvimento de novas substâncias, estruturalmente relacionadas aos dois análogos estudados, que poderiam ter um perfil farmacológico mais interessante. Da mesma forma, não há conhecimento sobre o perfil farmacocinético e sobre a segurança do FTD-OH e FTD-NO que permita avaliar se esses análogos apresentam potencial como candidatos a fármacos.

6.6 Conclusões

Os resultados do presente estudo demonstram que dois análogos ftalimídicos, o FTD-OH e o FTD-NO, apresentam atividades marcantes em vários modelos experimentais de dor e inflamação, provavelmente relacionadas com efeitos sobre a produção e/ou ação de mediadores inflamatórios e também sobre o processamento nociceptivo no SNC. A modificação do FTD-OH, por meio do acoplamento de um doador de NO, não resultou em uma substância com maior atividade na maioria dos modelos experimentais. A atividade antiedematogênica, mas não a atividade

antinociceptiva, dos análogos ftalimídicos envolve a ativação de mecanismos canabinoidérgicos e opioidérgicos ou da via da guanilato ciclase. Assim como outros análogos ftalimídicos investigados por diferentes grupos de pesquisa, o FTD-OH e o FTD-NO podem ser considerados candidatos a fármacos analgésicos e anti-inflamatórios ou a protótipos para o desenvolvimento de outros candidatos com estruturas químicas mais simples e com melhor perfil de segurança.

REFERÊNCIAS

- **Artigos e livros:**

ABRAMSON, S. B. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 10, Suppl 2, p. 1-7, Oct 2008.

ALVES D. P. *et al.* Diclofenac-induced peripheral antinociception is associated with ATP-sensitive K⁺ channels activation. **Life Sci**, v. 74, n. 20, p. 2577- 91, Apr 2004.

ANDRADE, P. *et al.* The thalidomide analgesic effect is associated with differential TNF-alpha receptor expression in the dorsal horn of the spinal cord as studied in a rat model of neuropathic pain. **Brain Res**, v. 1450, p. 24-32, Apr 2012.

ASHER, C; FURNISH T. Lenalidomide and thalidomide in the treatment of chronic pain. **Expert Opin Drug Saf**, v. 12, n. 3, p. 367-74, May 2013.

ATRA, E.; SATO, E. I. Treatment of the cutaneous lesions of systemic lupus erythematosus with thalidomide. **Clin Exp Rheumatol**, v. 11, n. 5, p. 487-93, Sep-Oct 1993.

AVIELLO G. *et al.* Ultrapotent effects of salvinorin A, a hallucinogenic compound from *Salvia divinorum*, on LPS-stimulated murine macrophages and its anti-inflammatory action in vivo. **J Mol Med**, v. 89, n. 9, p. 891-902, Sep 2011.

BAIDAS, S. M. *et al.* Phase II evaluation of thalidomide in patients with metastatic breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 18, n. 14, p. 2710-7, Jul 2000.

BARNES, P. J.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends Pharmacol Sci**, v. 14, n. 12, p. 436-41, Dec 1993.

BARTLETT, J. B. *et al.* Phase I study to determine the safety, tolerability and immunostimulatory activity of thalidomide analogue CC-5013 in patients with metastatic malignant melanoma and other advanced cancers. **Br J Cancer**, v. 90, n. 5, p. 955-61, Mar 2004.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, n. 1, p. 87-107, Apr 1988.

BENNETT G. J. A neuroimmune interaction in painful peripheral neuropathy. **Clin J Pain**, v. 16, n. 3, p. 139-43, Sep 2000.

BOULTON, C. L. *et al.* Nitric oxide-dependent long-term potentiation is blocked by a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. **Neuroscience**, v. 69, n. 3, p. 699-703, Dec 1995.

BRACK A. *et al.* Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells. **Pain**, v. 112, n. 3, p. 229-38, Dec 2004.

BROCK S. C; TONUSSI C. R. Intrathecally injected morphine inhibits inflammatory paw edema: the involvement of nitric oxide and cyclic-guanosine monophosphate. **Anesth Analg**, v. 106, n. 3, p. 965-71, Mar 2008.

BROWER, V. New paths to pain relief. **Nat Biotechnol**, v. 18, n. 4, p. 387- 91, Apr 2000.

BRUCE A. J. *et al.* Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. **Nat Med**, v. 2, n. 7, p. 788-94, Jul 1996.

BRYNNER, R.; STEPHENS T. Dark remedy – The impact of thalidomide and its revival as a vital medicine. 1a ed. Cambridge: Basic Books, 2001. Cap 1-13, p. 1-202.

CHAN, H. N. *et al.* Use of antidepressants in the treatment of chronic pain. **Ann Acad Med Singapore**, v. 38, n. 11, p. 974-9, Nov 2009.

CHAULET, C. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of new thalidomide analogues as TNF-alpha and IL-6 production inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 21, n. 3, p. 1019-22, Feb 2011.

CHU, W. M. Tumor necrosis factor. **Cancer Lett**, v. 328, n. 2, p. 222-5, Jan 2013.

CLANCY, R. M. *et al.* Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. **J Clin Invest**, v. 90, n. 3, p. 1116-21, Sep 1992.

CLATWORTHY A. L. Role of peri-axonal inflammation in the development of thermal hyperalgesia and guarding behavior in a rat model of neuropathic pain. **Neurosci Lett**, v. 184, n. 1, p. 5-8, Jan 1995.

CODERRE T. J. *et al.* Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. **Brain Res**, v. 535, n.1, p. 155-8, Dec 1990.

COELHO, F. M. *et al.* The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. **Arthritis Rheum**, v. 58, n. 8, p. 2329-37, Aug 2008.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **Int Immunopharmacol**, v. 1, n. 8, p. 1397-406, Aug 2001.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T (Eds.). Robbins pathologic basis of disease. 6th ed. Philadelphia: Saunders, 1999. cap. 3, p. 50-88.

CORRAL, L. G. *et al.* Selection of novel analogs of thalidomide with enhanced tumor necrosis factor alpha inhibitory activity. **Mol Med**, v. 2, n. 4, p. 506-15, Jul 1996.

CORRAL L.G.; KAPLAN, G. Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. **Ann Rheum Dis**, v. 58, n. 1, p. 107-13, Nov 1999.

CORRAL, L. G. *et al.* Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-alpha. **J Immunol**, v. 163, n. 1, p. 380-6, Jul 1999.

CRUNKHORN, P.; MEACOCK, S. C. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. **Br J Pharmacol**, v. 42, n. 3, p. 392-402, Jul 1971.

CUNHA T.M. *et al.* Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 4, p. 824-32, Apr 2008.

DAMAS J.; LIÉGEOIS J. F. The inflammatory reaction induced by formalin in the rat paw. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 359, n.3, p. 220-7, Mar 1999.

D'AMATO, R. J. *et al.* Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 9, p. 4082-5, Apr 1994.

DE ALMEIDA, M. V. *et al.* Thalidomide analogs from diamines: Synthesis and evaluation as inhibitors of TNF-alpha production. **Chem Pharm Bull**, v. 55, n. 2, p. 223-6, Feb 2007.

DÉCIGA-CAMPOS M.; LÓPEZ-MUÑOZ F. J. Participation of the L-arginine-nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K⁺ channel cascade in the antinociceptive effect of rofecoxib. **Eur J Pharmacol**, v. 484, n. 2-3, p. 193-9, Jan 2004.

DELATORRE, A. *et al.* Endotoxin-mediated S-nitrosylation of p50 alters NF-kappa B-dependent gene transcription in ANA-1 murine macrophages. **J Immunol**, v. 162, n. 7, p. 4101-8, Apr 1999.

DICKENSON, A. H.; SULLIVAN A. F. Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurones. **Neurosci Lett**, V. 83, n. 1-2, p. 207-11, Dec 1987a.

DICKENSON, A. H.; SULLIVAN A. F. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. **Pain**, v. 30, n. 3, p. 349-60, Dec 1987b.

DIDONATO, J. A. *et al.* NF-kappaB and the link between inflammation and cancer. **Immunol Rev**, v. 246, n. 1, p. 379-400, Mar 2012.

DIMOPOULOS, M. *et al.* Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. **N Engl J Med**, v. 357, n. 21, p. 2123-32, Nov 2007.

DIMOPOULOS, M. A. *et al.* A review of second primary malignancy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma treated with lenalidomide. **Blood**, v. 119, n. 12, p. 2764-7, Mar 2012.

DORAZIL-DUDZIK, M. *et al.* The effects of local pentoxifylline and propentofylline treatment on formalin-induced pain and tumor necrosis factor-alpha messenger RNA levels in the inflamed tissue of the rat paw. **Anesth Analg**, v. 98, n. 6, p. 1566-73, Jun 2004.

DOS SANTOS, J. L. *et al.* Design, synthesis, and pharmacological evaluation of novel hybrid compounds to treat sickle cell disease symptoms. **J Med Chem**, v. 54, n. 16, p. 5811-9, Aug 2011.

DREDGE, K. *et al.* Novel thalidomide analogues display anti-angiogenic activity independently of immunomodulatory effects. **Br J Cancer**, v. 87, n. 10, p. 1166-72, Nov 2002.

DUARTE, I. D. *et al.* Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **Eur J Pharmacol**, v. 217, n. 2-3, p. 225-7, Jul 1992.

DUARTE, I. D. G.; FERREIRA, S. H. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **Eur J Pharmacol**, v. 221, n. 1, p. 171-4, Jun 1992.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J Am Pharm Assoc**, v. 46, n. 3, p. 208-9, Mar 1957.

EIGLER, A. *et al.* Exogenous and endogenous nitric oxide attenuates tumor necrosis factor synthesis in the murine macrophage cell line RAW 264.7. **J Immunol**, v. 154, n. 8, p. 4048-54, Apr 1995.

EISEN, T. *et al.* Continuous low dose Thalidomide: a phase II study in advanced melanoma, renal cell, ovarian and breast cancer. **Br J Cancer**, v. 82, n. 4, p. 812-7, Feb 2000.

FELISATI, D.; KNAPP, V. Thalidomide and congenital abnormalities. **The Lancet**, v. 280, n. 7258, p. 724-5, Oct 1962.

FERNANDES D. *et al.* Nitric oxide-induced inhibition of mouse paw edema: involvement of soluble guanylate cyclase and potassium channels. **Inflamm Res**, v. 51, n. 8, p. 377-84, Aug 2002.

FERREIRA, S. H. *et al.* Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v. 110, n. 3, p. 1227-31, Nov 1993.

FIORUCCI, S. NO-releasing NSAIDs are caspase inhibitors. **Trends Immunol**, v. 22, n. 5, p. 232-5, May 2001.

FIORUCCI, S. *et al.* IL-1 beta converting enzyme is a target for nitric oxide-releasing aspirin: new insights in the antiinflammatory mechanism of nitric oxide-releasing nonsteroidal antiinflammatory drugs. **J Immunol**, v. 165, n. 9, p. 5245-54, Nov 2000.

FISHMAN, S. J. *et al.* Long-term remission of Crohn's disease treated with thalidomide: a seminal case report. **Angiogenesis**, v. 3, n. 3, p. 201-4, 1999.

FOLKMAN, J. Proceedings: Tumor angiogenesis factor. **Cancer Res**, v. 34, n. 8, p. 2109-13, Aug 1974.

FRATTA, I. D. *et al.* Teratogenic effects of thalidomide in rabbits, rats, hamsters, and mice. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 7, n. 2, p. 268-6, Mar 1965.

FULLERTON, P. M.; KREMER, M. Neuropathy after intake of thalidomide (Distaval). **Br Med J**, v. 2, n. 5256, p. 855-8, Sep 1961.

GARTHWAITE, J. *et al.* A potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Mol Pharmacol**, v. 48, n. 2, p. 184-8, Aug 1995.

GAUDILLIÈRE, P. J.; HESS V. Ways of regulating drugs in the 19th and 20 th centuries. Palgrave Macmillan, 2002, cap. 1, p. 1-17, cap. 6 , p.151-80.

GEITZ, H. *et al.* Thalidomide selectively modulates the density of cell surface molecules involved in the adhesion cascade. **Immunopharmacology**, v. 31, n. 2-3, p. 213-21, Mar 1996.

GEORGE A. *et al.* Serial determination of tumor necrosis factor-alpha content in rat sciatic nerve after chronic constriction injury. **Exp Neurol**, v. 160, n. 1, p. 124-32, Nov 1999.

GEORGE, A. *et al.* Thalidomide treatment in chronic constrictive neuropathy decreases endoneurial tumor necrosis factor-alpha, increases interleukin-10 and has long-term effects on spinal cord dorsal horn met-enkephalin. **Pain**, v. 88, n. 3, p. 267-75, Dec 2000.

GHOBRIAL, I. M.; RAJKUMAR, S. V. Management of thalidomide toxicity. **J Support Oncol**, v. 1, n. 3, p. 194-205, Sep-Oct 2003.

GOLI V. Does thalidomide have an analgesic effect? Current status and future directions. **Curr Pain Headache Rep**, v. 11, n. 2, p. 109-11, Apr 2007.

GORDON, C. J. Thermal biology of the laboratory rat. **Physiol Behav**, v. 47, n. 5, p. 963-91, May 1990.

GOW, A. J. *et al.* Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 287, n. 2, p. 262-8, Aug 2004.

GREENE, E. R. *et al.* Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 96, n. 1-4, p. 27-36, Nov 2011.

GUERRERO, A. T. *et al.* Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 84, n. 2, p. 244-51, Jun 2006.

GÜHRING H. *et al.* A role for endocannabinoids in indomethacin-induced spinal antinociception. **Eur J Pharmacol**, v. 454, n. 2-3, p. 153-63, Nov 2002.

GUINDON J. *et al.* Local interactions between anandamide, an endocannabinoid, and ibuprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in acute and inflammatory pain. **Pain**, v. 121, n. 1-2, p. 85-93, Mar 2006.

GUTIERREZ-RODRIGUEZ, O. Thalidomide. A promising new treatment for rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 27, n. 10, p. 1118-21, Oct 1984.

GUTSTEIN, H. B.; AKIL, H. Analgésicos opioides. In: BRUNTON L. L.; LAZO J. S.; PARKER K. L. (Eds.). Goodman & Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica. 11a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. Cap. 21, p. 487-526.

HAGAINS C. E. Contributions of dorsal root reflex and axonal reflex to formalin-induced inflammation. **Brain Res**, v. 1359, p. 90-7, Nov 2010.

HAMZA, M. H. Treatment of Behcet's disease with thalidomide. **Clin Rheumatol**, v. 5, n. 3, p. 365-71, Sep 1986.

HANCOCK, C. M.; RIEGGER-KRUGH, C. Modulation of pain in osteoarthritis: the role of nitric oxide. **Clin J Pain**, v. 24, n. 4, p. 353-65, May 2008.

HASHIMOTO, Y. Structural development of biological response modifiers based on thalidomide. **Bioorg Med Chem**, v. 10, n. 3, p. 461-79, Mar 2002.

HASHIMOTO Y. Thalidomide as a multi-template for development of biologically active compounds. **Arch Pharm**, v. 341, n. 9, p. 536-47, Sep 2008.

HASLETT, P. A. *et al.* Thalidomide costimulates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8+ subset. **J Exp Med**, v. 187, n. 11, p. 1885-92, Jun 1998.

HIDESHIMA, T. *et al.* Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. **Blood**, v. 96, n. 9, p. 2943-50, Nov 2000.

HONG Y.; ABBOTT, F. V. Peripheral opioid modulation of pain and inflammation in the formalin test. **Eur J Pharmacol**, v. 277, n. 1, p. 21-8, Apr 1995.

HUANG, P. H.; McBRIDE, W.G. Interaction of [glutarimide-2-14C]-thalidomide with rat embryonic DNA in vivo. **Teratog Carcinog Mutagen**, v. 17, n.1, p. 1-5, 1997.

HUANG, F. P. *et al.* Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages. **Eur J Immunol**, v. 28, n. 12, p. 4062-70, Dec 1998.

HUNSKAAR S.; Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-14, Jul 1987.

IANARO, A. *et al.* A nitric oxide synthase inhibitor reduces inflammation, down-regulates inflammatory cytokines and enhances interleukin-10 production in carrageenin-induced oedema in mice. **Immunology**, v. 82, n. 3, p. 370-5, Jul 1994.

IBRAHIM M. M. *et al.* CB2 cannabinoid receptor activation produces antinociception by stimulating peripheral release of endogenous opioids. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 8, p. 3093-8, Feb 2005.

IGUCHI, T. *et al.* Novel tubulin-polymerization inhibitor derived from thalidomide directly induces apoptosis in human multiple myeloma cells: possible anti-myeloma mechanism of thalidomide. **Int J Mol Med**, v. 21, n. 2, p. 163-8, Feb 2008.

IYER, C. G. *et al.* WHO co-ordinated short-term double-blind trial with thalidomide in the treatment of acute lepra reactions in male lepromatous patients. **Bull World Health Organ**, v. 45, n. 6, p. 719-32, 1971.

JACOBSON, J. M. *et al.* Thalidomide for the treatment of oral aphthous ulcers in patients with human immunodeficiency virus infection. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group. **N Engl J Med**, v. 336, n. 21, p. 1487-93, May 1997.

JIN, S. H. *et al.* Thalidomide suppresses the interleukin 1beta-induced NFkappaB signaling pathway in colon cancer cells. **Ann N Y Acad Sci**, v. 973, p. 414-8, Nov 2002.

JORIS J. *et al.* Opiates suppress carrageenan-induced edema and hyperthermia at doses that inhibit hyperalgesia. **Pain**, v. 43, n. 1, p. 95-103, Oct 1990.

JOUSSEN, A. M. *et al.* Effect of thalidomide and structurally related compounds on corneal angiogenesis comparable to their teratological potency. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 237, n. 12, p. 952-61, Dec 1999.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-10, Sep 2001.

JULIUSSON, G. *et al.* Frequent good partial remissions from thalidomide including best response ever in patients with advanced refractory and relapsed myeloma. **Br J Haematol**, v. 109, n. 1, p. 89-96, Apr 2000.

KAMIBAYASHI, T.; MAZE, M. Clinical uses of α -2-adrenergic agonists. **Anesthesiology**, v. 93, n. 5, p. 1345-9, Nov 2000.

KATSUYAMA, K. *et al.* NO inhibits cytokine-induced iNOS expression and NF-kappaB activation by interfering with phosphorylation and degradation of I-kappaB-alpha. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 18, n. 11, p. 1796-802, Nov 1998.

KAYSER, V.; CHRISTENSEN, D. Antinociceptive effect of systemic gabapentin in mononeuropathic rats, depends on stimulus characteristics and level of test integration. **Pain**, v. 88, n. 1, p. 53-60, Apr 2000.

KEEBLE, J. E.; MOORE, P. K. Pharmacology and potential therapeutic applications of nitric oxide-releasing non-steroidal anti-inflammatory and related nitric oxide-donating drugs. **Br J Pharmacol**, v. 137, n. 3, p. 295-310, Oct 2002.

KEIFER, J. A. *et al.* Inhibition of NF-kappa B activity by thalidomide through suppression of I-kappaB kinase activity. **J Biol Chem**, v. 276, n. 25, p. 22382-7, Jun 2001.

KELLOGG, A. P.; POP-BUSUI, R. Peripheral nerve dysfunction in experimental diabetes is mediated by cyclooxygenase-2 and oxidative stress. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, n. 11-12, p. 1521-9, Nov-Dec 2005.

KENYON, B. M. *et al.* Effects of thalidomide and related metabolites in a mouse corneal model of neovascularization. **Exp Eye Res**, v. 64, n. 6, p. 971-8, Jun 1997.

KERSTEIN, P. C. *et al.* Pharmacological blockade of TRPA1 inhibits mechanical firing in nociceptors. **Mol Pain**, v. 5, n. 19, p.1-13, Apr 2009.

KHURI, F. R. *et al.* Cyclooxygenase-2 overexpression is a marker of poor prognosis in stage I non-small cell lung cancer. **Clin Cancer Res**, v. 7, n. 4, p. 861-7, Apr 2001.

KIM C. F.; MOALEM-TAYLOR G. Detailed characterization of neuro-immune responses following neuropathic injury in mice. **Brain Res**, v. 1405, p. 95-108, Aug 2011.

KING, C. T. G.; KENDRICK, F. J. Teratogenic effects of thalidomide in the sprague dawley rat. **The Lancet**, v. 280, n. 7265, p. 1116, Nov 1962.

KORHONEN, R. *et al.* Nitric oxide production and signaling in inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 4, n. 4, p. 471-9, Aug 2005.

KOSONEN, O. *et al.* Inhibition by nitric oxide-releasing compounds of E-selectin expression in and neutrophil adhesion to human endothelial cells. **Eur J Pharmacol**, v. 394, n. 1, p. 149-56, Apr 2000.

KRUSE, F. E. *et al.* Thalidomide inhibits corneal angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 236, n. 6, p. 461-6, Jun 1998.

KUMAR, S. *et al.* Thalidomide as an anti-cancer agent. **J Cell Mol Med**, v. 6, n. 2, p. 160-74, Apr-Jun 2002.

KUMAR, S. *et al.* Effect of thalidomide therapy on bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. **Leukemia**, v. 18, n. 3, p. 624-7, Mar 2004a.

KUMAR, S. *et al.* Thalidomid: current role in the treatment of non-plasma cell malignancies. **J Clin Oncol**, v. 22, n. 12, p. 2477-88, Jun 2004b.

LACY, M. Q. *et al.* Pomalidomide (CC4047) plus low-dose dexamethasone as therapy for relapsed multiple myeloma. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 30, p. 5008-14, Oct 2009.

LÁZARO-IBAÑEZ G. G. *et al.* Participation of the nitric oxide-cyclic GMP-ATP-sensitive K(+) channel pathway in the antinociceptive action of ketorolac. **Eur J Pharmacol**, v. 426, n. 1-2, p. 39-44, Aug 2001.

LEFER, D. J. *et al.* Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. **Am J Physiol**, v. 276, n. 6, p. 1943-50, Jun 1999.

LEMBECK, F.; DONNERER, J. Opioid control of the function of primary afferent substance P fibres. **Eur J Pharmacol**, v. 114, n. 3, p. 241-6, Aug 1985.

LENZ, W. Thalidome and congenital abnormalities. **The Lancet**, v. 45, p.1, Jan 1962.

LEPPER, E. R. *et al.* Comparative molecular field analysis and comparative molecular similarity indices analysis of thalidomide analogues as angiogenesis inhibitors. **J Med Chem**, v. 47, n. 9, p. 2219-27, Apr 2004.

LEUNG, L.; CAHILL, C. M. TNF-alpha and neuropathic pain -- a review. **J Neuroinflammation**, v. 7, p. 27, Apr 2010.

LI, P. K. *et al.* A thalidomide analogue with in vitro antiproliferative, antimitotic, and microtubule-stabilizing activities. **Mol Cancer Ther**, v. 5, n. 2, p. 450-6, Feb 2006.

LIM, S. H. *et al.* Successful treatment with thalidomide of acute graft-versus-host disease after bone-marrow transplantation. **The Lancet**, v. 331, n. 8577, p. 117, Jan 1988.

LINDEMANN, S. *et al.* NO reduces PMN adhesion to human vascular endothelial cells due to downregulation of ICAM-1 mRNA and surface expression. **Thromb Res**, v. 97, n. 3, p. 113-23, Feb 2000.

LIVINGSTON, A. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 30, n. 4, p. 773-81, Jul 2000.

LORAM L. C. *et al.* Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. **J Pain**, v. 8, n. 2, p. 127-36, Feb 2007.

LV, P. *et al.* Reversal effect of thalidomide on established hepatic cirrhosis in rats via inhibition of nuclear factor-kappaB/inhibitor of nuclear factor-kappaB pathway. **Arch Med Res**, v. 38, n. 1, p. 15-27, Jan 2007.

MA, W.; EISENACH, J. C. Cyclooxygenase 2 in infiltrating inflammatory cells in injured nerve is universally up-regulated following various types of peripheral nerve injury. **Neuroscience**, v. 121, n. 3, p. 691-704, Oct 2003.

MACPHERSON, G. R. *et al.* Current status of thalidomide and its role in the treatment of metastatic prostate cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 46, p. 49-57, Jun 2003.

MAJUMDAR, S. *et al.* Thalidomide suppresses NF-kappa B activation induced by TNF and H₂O₂, but not that activated by ceramide, lipopolysaccharides, or phorbol ester. **J Immunol**, v. 168, n. 6, p. 2644-51, Mar 2002.

MALAN T. P. *et al.* CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. **Pain**, v. 93, n. 3, p. 239-45, Sep 2001.

MALAN T. P. *et al.* Inhibition of pain responses by activation of CB(2) cannabinoid receptors. **Chem Phys Lipids**, v. 121, n. 1-2, p. 191-200, Dec 2002.

MALMBERG A. B.; YAKSH T.L. The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E₂ using microdialysis in conscious rats. **Br J Pharmacol**, v. 114, n. 5, p. 1069-75, Mar 1995.

MARRIOTT, J. B. *et al.* Thalidomide and its analogues have distinct and opposing effects on TNF-alpha and TNFR2 during co-stimulation of both CD4(+) and CD8(+) T cells. **Clin Exp Immunol**, v. 130, n. 1, p. 75-84, Oct 2002.

MASCARO, J. M. *et al.* Thalidomide in the treatment of recurrent, necrotic, and giant mucocutaneous aphthae and aphthosis. **Arch Dermatol**, v. 115, n. 5, p. 636-7, May 1979.

MATOS I. *et al.* Preventive and therapeutic oral administration of the pentacyclic triterpene α,β -amyrin ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice: the relevance of cannabinoid system. **Mol Immunol**, v. 54, n. 3-4, p. 482-92, Jul 2013.

MATTHEWS, J. R. *et al.* Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. **Nucleic Acids Res**, v. 24, n. 12, p. 2236-42, Jun 1996.

MATTHEWS, S. J.; MCCOY, C. Thalidomide: a review of approved and investigational uses. **Clin Ther**, v. 25, n. 2, p. 342-95, Feb 2003.

MAZZOCCOLI, L. *et al.* Novel thalidomide analogues from diamines inhibit pro-inflammatory cytokine production and CD80 expression while enhancing IL-10. **Biomed Pharmacother**, v. 66, n. 5, p. 323-9, Jul 2012.

MCBRIDE, W. G. Thalidomide and congenital abnormalities. **The Lancet**, v. 278, n. 7216, p. 1358, Dec 1961.

MCCARTHY, D. M. *et al.* Thalidomide for the therapy of graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. **Biomed & Pharmacother**, v. 43, n. 9, p. 693-7, Aug 1989.

MCNAMARA, C. R. *et al.* TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 33, p. 13525-30, Aug 2007.

MEERT, T. F.; VERMEIRSCH, H. A. A preclinical comparison between different opioids: antinociceptive versus adverse effects. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 80, n. 2, p. 309-26, Feb 2005.

MILLER, M. R.; MEGSON, I. L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. **Br J Pharmacol**, v. 151, n. 3, p. 305-21, Jun 2007.

MIYACHI, H. *et al.* Novel biological response modifiers: phthalimides with tumor necrosis factor-alpha production-regulating activity. **J Med Chem**, v. 40, n. 18, p. 2858-65, Aug 1997a.

MIYACHI, H. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha production-inhibiting activity of phthalimide analogues on human leukemia THP-1 cells and a structure-activity relationship study. **Bioorg Med Chem**, v. 5, n. 11, p. 2095-102, Nov 1997b.

MOILANEN, E. *et al.* Inhibition by nitric oxide-donors of human polymorphonuclear leucocyte functions. **Br J Pharmacol**, v. 109, n. 3, p. 852-8, Jul 1993.

MOILANEN L. J. *et al.* TRPA1 contributes to the acute inflammatory response and mediates carrageenan-induced paw edema in the mouse. **Sci Rep**, v. 2, n. 380, p. 1-6, Apr 2012.

MOREIRA, A. L. *et al.* Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. **J Exp Med**, v. 177, n. 6, p. 1675-80, Jun 1993.

MORIN N. *et al.* Neutrophils invade lumbar dorsal root ganglia after chronic constriction injury of the sciatic nerve. **J Neuroimmunol**, v. 184, n. 1-2, p. 164-71, Mar 2007.

MOTTA, P. G. *et al.* Peripheral control of inflammatory but not neuropathic pain by endogenous cholinergic system. **Pharmacology**, v. 88, n. 1-2, p. 18-25, Jul 2011.

MULLER, G. W. *et al.* Structural modifications of thalidomide produce analogs with enhanced tumor necrosis factor inhibitory activity. **J Med Chem**, v. 39, n. 17, p. 3238-40, Aug 1996.

MULLER, G. W. *et al.* Amino-substituted thalidomide analogs: potent inhibitors of TNF-alpha production. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 9, n. 11, p. 1625-30, Jun 1999.

NAGY, G. *et al.* Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity. **Immunol Lett**, v. 111, n. 1, p. 1-5, Jul 2007.

NIEDERBERGER, E.; GEISLINGER, G. The IKK-NF-kappaB pathway: a source for novel molecular drug targets in pain therapy? **FASEB J**, v. 22, n. 10, p. 3432-42, Oct 2008.

NIGHTINGALE, S. L. Thalidomide approved for erythema nodosum leprosum. **JAMA**, v. 280, n. 10, p. 872, Sep 1998.

NISHIMURA, K. *et al.* Enhancement of phorbol ester-induced production of tumor necrosis factor alpha by thalidomide. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 199, n. 2, p. 455-60, Mar 1994.

NOGUCHI, T. *et al.* Thalidomide and its analogues as cyclooxygenase inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 12, n. 7, p. 1043-6, Apr 2002.

NOGUCHI, T. *et al.* Phenylhomophthalimide-type NOS inhibitors derived from thalidomide. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 14, n. 16, p. 4141-5, Aug 2004.

NOGUCHI, T. *et al.* Angiogenesis inhibitors derived from thalidomide. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 15, n. 24, p. 5509-13, Dec 2005.

OBARA I. *et al.* Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain. **Pain**, v. 141, n. 3, p. 283-91, Feb 2009.

OKAMOTO K. *et al.* Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in rat sciatic nerve chronic constriction injury model of neuropathic pain. **Exp Neurol**, v. 169, n. 2, p. 386-91, Jun 2001.

OKUDA K. *et al.* Characterization of nociceptive responses and spinal releases of nitric oxide metabolites and glutamate evoked by different concentrations of formalin in rats. **Pain**, v. 92, n. 1-2, p. 107-15, May 2001.

PAHL, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6853-66, Nov 1999.

PAPICH, M. G. Pharmacologic considerations for opiate analgesic and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 30, n. 4, p. 815-37, Jul 2000.

PARK, H. J.; MOON, D. E. Pharmacologic management of chronic pain. **Korean J Pain**, v. 23, n. 2, p. 99-108, Jun 2010.

PATEL, R. P. *et al.* Mechanisms of the pro- and anti-oxidant actions of nitric oxide in atherosclerosis. **Cardiovasc Res**, v. 47, n. 3, p. 465-74, Aug 2000.

PATEL, R. B. *et al.* Anti-nociceptive and anti-allodynic activity of aliskiren in various pain models. **Eur J Pharmacol**, v. 708, n. 1-3, p. 80-7, May 2013.

PAWLAK, W. Z.; LEGHA, S. S. Phase II study of thalidomide in patients with metastatic melanoma. **Melanoma Res**, v. 14, n. 1, p. 57-62, Feb 2004.

PAYVANDI, F. *et al.* Immunomodulatory drugs inhibit expression of cyclooxygenase-2 from TNF- α , IL-1 β , and LPS-stimulated human PBMC in a partially IL-10-dependent manner. **Cell Immunol**, v. 230, n. 2, p. 81-88, Aug 2004.

PEARSON, J. M.; VEDAGIRI, M. Treatment of moderately severe erythema nodosum leprosum with thalidomide--a double-blind controlled trial. **Lepr Rev**, v. 40, n. 2, p. 111-6, Apr 1969.

PENG, H. B. *et al.* Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. **J Biol Chem**, v. 270, n. 23, p. 14214-9, Jun 1995.

PEREIRA P. J. S. *et al.* Nociceptive and inflammatory responses induced by formalin in the orofacial region of rats: effect of anti-TNFalpha strategies. **Int Immunopharmacol**, v. 9, n. 1, p. 80-5, Jan 2009.

PERIN-MARTINS A. *et al.* Mechanisms underlying transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)-mediated hyperalgesia and edema. **J Peripher Nerv Syst**, v. 18, n. 1, p. 62-74, Mar 2013.

PERKINS N. M.; TRACEY D. J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of neutrophils. **Neuroscience**, v. 101, n. 3, p. 745-57, Nov 2000.

PINTER, M. *et al.* Thalidomide in advanced hepatocellular carcinoma as antiangiogenic treatment approach: a phase I/II trial. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 20, n. 10, p. 1012-9, Oct 2008.

PLIESS, G. Thalidomide and congenital abnormalities. **The Lancet**, v. 279, n. 7239, p. 1128-9, May 1962.

POLI, G. *et al.* Tumor necrosis factor alpha functions in an autocrine manner in the induction of human immunodeficiency virus expression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 2, p. 782-5, Jan 1990.

PRADO, W. A. *et al.* Dual effect of local application of nitric oxide donors in a model of incision pain in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 441, n. 1-2, p. 57-65, Apr 2002.

RAJKUMAR, S. V. *et al.* Complete resolution of reflex sympathetic dystrophy with thalidomide treatment. **Arch Intern Med**, v. 161, n. 20, p. 2502-3, Nov 2001.

RAJKUMAR, S. V. *et al.* Combination therapy with thalidomide plus dexamethasone for newly diagnosed myeloma. **J Clin Oncol**, v. 20, n. 21, p. 4319-23, Nov 2002.

REIRIZ, A. B. *et al.* Phase II study of thalidomide in patients with metastatic malignant melanoma. **Melanoma Res**, v. 14, n. 6, p. 527-31, Dec 2004.

REYES-TERAN, G. *et al.* Effects of thalidomide on HIV-associated wasting syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **AIDS**, v. 10, n. 13, p. 1501-7, Nov 1996.

REYNAERT, N. L. *et al.* Nitric oxide represses inhibitory kappaB kinase through S-nitrosylation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 24, p. 8945-50, Jun 2004.

RIBEIRO R. A. *et al.* Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. **Eur J Pharmacol**, v. 391, n. 1-2, p. 97-103, Mar 2000.

RICHARDSON J. D. *et al.* Cannabinoids reduce hyperalgesia and inflammation via interaction with peripheral CB1 receptors. **Pain**, v. 75, n. 1, p.111-9, Mar 1998.

RICHARDSON, P. *et al.* Thalidomide: emerging role in cancer medicine. **Annu Rev Med**, v. 53, p. 629-57, Feb 2002a.

RICHARDSON, P. G. *et al.* Immunomodulatory drug CC-5013 overcomes drug resistance and is well tolerated in patients with relapsed multiple myeloma. **Blood**, v. 100, n. 9, p. 3063-7, Nov 2002b.

RICHARDSON, P. G. *et al.* Phase 1 study of pomalidomide MTD, safety, and efficacy in patients with refractory multiple myeloma who have received lenalidomide and bortezomib. **Blood**, v. 121, n. 11, p. 1961-7, Mar 2013.

RITTNER H. L. *et al.* Leukocytes in the regulation of pain and analgesia. **J Leukoc Biol**, v. 78, n. 6, p. 1215-22, Dec 2005.

ROCHA F. A. *et al.* Tadalafil analgesia in experimental arthritis involves suppression of intra-articular TNF release. **Br J Pharmacol**, v. 164, n. 2, p. 828-35, Sep 2011.

RODRIGUES A. R.; DUARTE I. D. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K(+) channels. **Br J Pharmacol**, v. 129, n. 1, p. 110-4, Jan 2000.

ROMERO-SANDOVAL, E. A. *et al.* Nitroparacetamol (NCX-701) and pain: first in a series of novel analgesics. **CNS Drug Rev**, v. 13, n. 3, p. 279-95, Aug 2007.

ROSA, S. C. *et al.* Nitric oxide synthase isoforms and NF-kappaB activity in normal and osteoarthritic human chondrocytes: regulation by inducible nitric oxide. **Nitric Oxide**, v. 19, n. 3, p. 276-83, Nov 2008.

ROTE, N. S. Inflammation. In: McCANCE, K.L.; HUETHER, S.E. Pathophysiology: the biologic basis for disease in adults and children. 3th ed. St. Louis: Mosby, 1998. cap. 7, p. 205-236.

RYAN, G. B.; MAJNO, G. Acute inflammation. A review. **Am J Pathol**, v. 86, n.1, p.183-276, Jan 1977.

SACERDOTE, P. *et al.* Transient early expression of TNF-alpha in sciatic nerve and dorsal root ganglia in a mouse model of painful peripheral neuropathy. **Neurosci Lett**, v. 436, n. 2, p. 210-3, May 2008.

SACHS D. *et al.* Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K⁺ channel pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 10, p. 3680-5, Mar 2004.

SALVEMINI, D. *et al.* Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan-induced rat paw edema. **Eur J Pharmacol**, v. 303, n. 3, p. 217-20, May 1996a.

SALVEMINI, D. *et al.* Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **Br J Pharmacol**, v. 118, n. 4, p. 829-38, Jun 1996b.

SAMAD, T. A. *et al.* Interleukin-1 β -mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **Nature**, v. 410, n. 6827, p. 471-5, Mar 2001.

SAMPAIO, E. P. *et al.* Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. **J Exp Med**, v. 173, n. 3, p. 699-703, Mar 1991.

SAMPAIO, E. P. *et al.* The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. **J Infect Dis**, v. 168, n. 2, p. 408-14, Aug 1993.

SANO, H. *et al.* N-phenylphthalimide-type cyclooxygenase (COX) inhibitors derived from thalidomide: substituent effects on subtype selectivity. **Chem Pharm Bull**, v. 52, n. 8, p.1021-2, Aug 2004.

SANO, H. *et al.* Anti-angiogenic activity of basic-type, selective cyclooxygenase (COX)-1 inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 16, n. 11, p. 3068-72, Jun 2006.

SCHÄFERS, M. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. **J Neurosci**, v. 23, n. 7, p. 2517-21, Apr 2003.

SCHÄFERS M. *et al.* Cyclooxygenase inhibition in nerve-injury- and TNF-induced hyperalgesia in the rat. **Exp Neurol**, v. 185, n. 1, p. 160-8, Jan 2004.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v. 18, n. 3, p. 385-405, Sep 2004.

SCHEY, S. A. *et al.* Phase I study of an immunomodulatory thalidomide analog, CC-4047, in relapsed or refractory multiple myeloma. **J Clin Oncol**, v. 22, n. 16, p. 3269-76, Aug 2004.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nat Neurosci**, v. 5, 1062-7, Nov 2002.

SCHREIBER A. K. *et al.* Peripheral antinociceptive effect of anandamide and drugs that affect the endocannabinoid system on the formalin test in normal and streptozotocin-diabetic rats. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 8, p. 1286-97, Dec 2012.

SCHUMACHER, H. *et al.* A comparison of the teratogenic activity of thalidomide in rabbits and rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 160, n. 1, p. 189-200, Mar 1968.

SCHWARTZMAN, R. J. *et al.* Thalidomide has activity in treating complex regional pain syndrome. **Arch Intern Med**, v. 163, n. 12, p. 1487-8, Jun 2003.

SCHWARTZMAN, R. J. *et al.* The natural history of complex regional pain syndrome. **Clin J Pain**, v. 25, n. 4, p. 273-80, May 2009.

SENGUPTA, S. *et al.* Cyclooxygenase-2-selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit hepatocyte growth factor/scatter factor-induced angiogenesis. **Cancer Res**, v. 63, n. 23, p. 8351-9, Dec 2003.

SHANNON, E. J.; SANDOVAL, F. Thalidomide can be either agonistic or antagonistic to LPS evoked synthesis of TNF-alpha by mononuclear cells. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 18, n. 1, p. 59-72, Feb 1996.

SHARMA, U. *et al.* Recent advances in the chemistry of phthalimide analogues and their therapeutic potential. **Mini Rev Med Chem**, v. 10, n. 8, p. 678-704, Jul 2010.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, London, v. 18, n. 3, p. 385-405, Sep 2004.

SHESKIN, J. Thalidomide in the treatment of lepra reactions. **Clin Pharmacol Ther**, v. 6, p. 303-6, May-Jun 1965.

SHIBATA M. *et al.* Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, n. 3, p. 347-52, Sep 1989.

SHIMAZAWA, R. *et al.* Thalidomide as a nitric oxide synthase inhibitor and its structural development. **Chem Pharm Bull**, v. 52, n. 4, p. 498-9, Apr 2004.

SILVEIRA K. D. *et al.* Mechanisms of the anti-inflammatory actions of the angiotensin type 1 receptor antagonist losartan in experimental models of arthritis. **Peptides**, v. 46, p. 53-63, Aug 2013.

SINGHAL, S. *et al.* Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. **N Engl J Med**, v. 341, n. 21, p. 1565-71, Nov 1999.

SOMERS, G. F. Thalidomide and congenital abnormalities. **The Lancet**, v. 279, n. 7235, p. 912-3, Apr 1962.

SOMMER, C. *et al.* A metalloprotease-inhibitor reduces pain associated behavior in mice with experimental neuropathy. **Neurosci Lett**, v. 237, n. 1, p. 45-8, Nov 1997.

SOMMER, C. *et al.* The effect of thalidomide treatment on vascular pathology and hyperalgesia caused by chronic constriction injury of rat nerve. **Pain**, v. 74, n. 1, p. 83-91, 1998a.

SOMMER C. *et al.* Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. **Exp Neurol**, v. 151, n. 1, p. 138-42, May 1998b.

SOMMER C. *et al.* Anti-TNF-neutralizing antibodies reduce pain-related behavior in two different mouse models of painful mononeuropathy. **Brain Res**, v. 913, n. 1, p. 86-9, Sep 2001.

SPEIRS, A. L. Thalidomide and congenital abnormalities. **The Lancet**, v. 279, n. 7224, p. 303-5, Feb 1962.

STEBBING, J. *et al.* The treatment of advanced renal cell cancer with high-dose oral thalidomide. **Br J Cancer**, v. 85, n. 7, p. 953-8, Sep 2001.

STEVENS, R. J. *et al.* Thalidomide in the treatment of the cutaneous manifestations of lupus erythematosus: experience in sixteen consecutive patients. **Br J Rheumatol**, v. 36, n. 3, p. 353-9, Mar 1997.

STEWART, S. G. *et al.* Synthesis and TNF expression inhibitory properties of new thalidomide analogues derived via Heck cross coupling. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 17, n. 21, p. 5819-24, Nov 2007.

STEWART, S. G. *et al.* New thalidomide analogues derived through Sonogashira or Suzuki reactions and their TNF expression inhibition profiles. **Bioorg Med Chem**, v. 18, n. 2, p. 650-62, Jan 2010.

SUN, J. *et al.* Measurement of nitric oxide production in biological systems by using griess reaction assay. **Sensors**, v. 3, n. 8, p.276-94, Mar 2003.

SUIZU, M. *et al.* Cyclooxygenase inhibitors derived from thalidomide. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 51, n. 9, p. 1098-102, Sep 2003.

TANSEY. M. G.; SZYMKOWSKI, D. E. The TNF superfamily in 2009: new pathways, new indications, and new drugs. **Drug Discov Today**, v. 14, n. 23-24, p. 1082-8, Dec 2009.

TAK, P. P.; FIRESTEIN, G. S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. **J Clin Invest**, v. 107, n. 1, p. 7-11, Jan 2001.

TALLET, D. *et al.* NO-steroids: potent anti-inflammatory drugs with bronchodilating activity in vitro. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 290, n. 1, p. 125-30, Jan 2002.

TAYLOR, E. L. *et al.* Nitric oxide: a key regulator of myeloid inflammatory cell apoptosis. **Cell Death Differ**, v. 10, n. 4, p. 418-30, Apr 2003.

TEUBERT, U. *et al.* 5'-Substituted thalidomide analogs as modulators of TNF-alpha. **Arch Pharm**, v. 331, n. 1, p. 7-12, Jan 1998.

THACKER M. A. *et al.* Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. **Anesth Analg**, v. 105, n. 3, p. 838-47, Sep 2007.

TIAN, L. J. *et al.* Mediating roles of the vanilloid receptor TRPV1 in activation of rat primary afferent nociceptive neurons by formaldehyde. **Acta Physiol Sin**, v. 61, n. 5, p. 404-16, Oct 2009.

TJOLSEN, A. *et al.* The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5-17, Oct 1992.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v.420, n.6917, p.853-859, Dec 2002.

TRAMONTANA, J. M. *et al.* Thalidomide treatment reduces tumor necrosis factor alpha production and enhances weight gain in patients with pulmonary tuberculosis. **Mol Med**, v. 1, n. 4, p. 384-97, May 1995.

TSUJII, M. *et al.* Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. **Cell**, v. 93, n. 5, p. 705-16, May 1998.

TURNBULL, C. M. *et al.* A novel hybrid aspirin-NO-releasing compound inhibits TNFalpha release from LPS-activated human monocytes and macrophages. **J Inflamm (Lond)**, v. 5, p. 12, 2008.

VALE M. L. *et al.* Anti-nociceptive effect of thalidomide on zymosan-induced experimental articular incapacitation. **Eur J Pharmacol**, v. 536, n. 3, p. 309-17, May 2006.

VAN DEN BERG W. B. *et al.* Antigen-induced and zymosan-induced arthritis in mice: studies on in vivo cartilage proteoglycan synthesis and chondrocyte death. **Br J Exp Pathol**, v. 62, n. 3, p. 308-16, Jun 1981.

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

VAZ, Z. R. *et al.* Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4,6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxyline derivative, on chemical and thermal models of nociception in mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 278, n. 1, p. 304-12, Jul 1996.

VICKERS, T. H. Concerning the morphogenesis of thalidomide dysmelia in rabbits. **Br J Exp Pathol**, v. 48, n. 6, p. 579-91, Dec 1967.

VIEIRA S. M. *et al.* A crucial role for TNF-alpha in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5. **Br J Pharmacol**, v. 158, n. 3, p. 779-89, Oct 2009.

WANG, T. *et al.* Synthesis and biological evaluation of nitric oxide-donating thalidomide analogues as anticancer agents. **Chem Biodivers**, v. 6, n. 4, p. 466-74, Apr 2009.

WARD, S. P. Thalidomide and congenital abnormalities. **Br Med J**, v. 2, n. 5305, p. 646-7, Sep 1962.

WATERS, M. F. An internally-controlled double blind trial of thalidomide in severe erythema nodosum leprosum. **Lepr Rev**, v. 42, n. 1, p. 26-42, Mar 1971.

WEBER, D. *et al.* Thalidomide alone or with dexamethasone for previously untreated multiple myeloma. **J Clin Oncol**, v. 21, n. 1, p. 16-9, Jan 2003.

WHEELER-ACETO H.; COWAN A. Neurogenic and tissue-mediated components of formalin-induced edema: evidence for supraspinal regulation. **Agents Actions**, v. 34, n. 1-2, p. 264-9, Sep 1991.

WEI X. H. *et al.* Peri-sciatic administration of recombinant rat TNF-alpha induces mechanical allodynia via upregulation of TNF-alpha in dorsal root ganglia and in spinal dorsal horn: the role of NF-kappa B pathway. **Exp Neurol**, v. 205, n. 2, p. 471-84, Jun 2007.

WETTSTEIN, A. R.; MEAGHER, A. P. Thalidomide in Crohn's disease. **The Lancet**, v. 350, n. 9089, p. 1445-6, Nov 1997.

WILLIAMS, C. S. *et al.* The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. **Oncogene**, v. 18, n. 55, p. 7908-16, Dec 1999.

YAMATO K. Antinociceptive effects of radon inhalation on formalin-induced inflammatory pain in mice. **Inflammation**, v. 36, n. 2, p. 355-63, Apr 2013.

YANAGAWA, T. *et al.* Tubulin polymerization inhibitors with a fluorinated phthalimide skeleton derived from thalidomide. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 16, n. 18, p. 4748-51, Sep 2006.

YANG, J. *et al.* Secondary primary malignancies in multiple myeloma: an old NEMESIS revisited. **Adv Hematol**, v. 2012, p. 801495, 2012.

YOULE, M. *et al.* Treatment of resistant aphthous ulceration with thalidomide in patients positive for HIV antibody. **BMJ**, v. 298, n. 6671, p. 432, Feb 1989.

YOUNG, D. V. *et al.* A comparison of the cyclooxygenase inhibitor-NO donors (CINOD), NMI-1182 and AZD3582, using in vitro biochemical and pharmacological methods. **Biochem Pharmacol**, v. 70, n. 9, p. 1343-51, Nov 2005.

YOUNG, R. J. *et al.* Analysis of circulating angiogenic biomarkers from patients in two phase III trials in lung cancer of chemotherapy alone or chemotherapy and thalidomide. **Br J Cancer**, v. 106, n. 6, p. 1153-9, Mar 2012.

ZELDIS, J. B. *et al.* S.T.E.P.S.: a comprehensive program for controlling and monitoring access to thalidomide. **Clin Ther**, v. 21, n. 2, p. 319-30, Feb 1999.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-10, Jun 1983.

ZWEIFEL, B. S. *et al.* Direct evidence for a role of cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E2 in human head and neck xenograft tumors. **Cancer Res**, v. 62, n. 22, p. 6706-11, Nov 2002.

ZHANG L. *et al.* TNF- α contributes to spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain: distinct role of TNF receptor subtypes 1 and 2. **Pain**, v. 152, n. 2, p. 419-27, Feb 2011.

ZHANG Z. J. *et al.* Chemokine contribution to neuropathic pain: respective induction of CXCL1 and CXCR2 in spinal cord astrocytes and neurons. **Pain**, v. 154, n. 10, p. 2185-97, Oct 2013.

ZHAO C. S. *et al.* Role of micro-opioid receptors in formalin-induced pain behavior in mice. **Exp Neurol**, v. 184, n. 2, p. 839-45, Dec 2003.

- **Sites FDA:**

FDA 1: Managing the risks from medical product use. Creating a risk management framework. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration May 1999.

Disponível em:

<<http://www.fda.gov/downloads/Safety/SafetyofSpecificProducts/UCM180520.pdf>>.

Acesso em: 26 abril 2013.

FDA 2: Approves thalidomide Thalidomid (thalidomide) to treat multiple myeloma.

Disponível em:

<<http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDER/ucm095651.htm>>. Acesso em: 26 abril 2013.

FDA 3: FDA Approves New Treatment for Myelodysplastic Syndrome (MDS).

Disponível em:

<<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2005/ucm108546.htm>>. Acesso em: 26 abril 2013.

FDA 4: FDA approves lenalidomide oral capsules (Revlimid) for use in combination with dexamethasone in patients with multiple myeloma.

Disponível em:

<<http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDER/ucm095626.htm>>. Acesso em: 26 abril 2013.

FDA 5: FDA Drug Safety Podcast for Healthcare Professionals: Ongoing safety review of Revlimid (lenalidomide) and possible increased risk of developing new malignancies.

Disponível em:

<<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/DrugSafetyPodcasts/ucm251421.htm>>.

Acesso em: 26 abril 2013.

FDA 6: FDA Drug Safety Communication: Safety review update of cancer drug Revlimid (lenalidomide) and risk of developing new types of malignancies.

Disponível em:

<<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm302939.htm>>. Acesso em: 26 abril 2013.

FDA 7: FDA approves Pomalyst for advanced multiple myeloma.

Disponível em:

<<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm338895.htm>>. Acesso em: 26 abril 2013.