



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

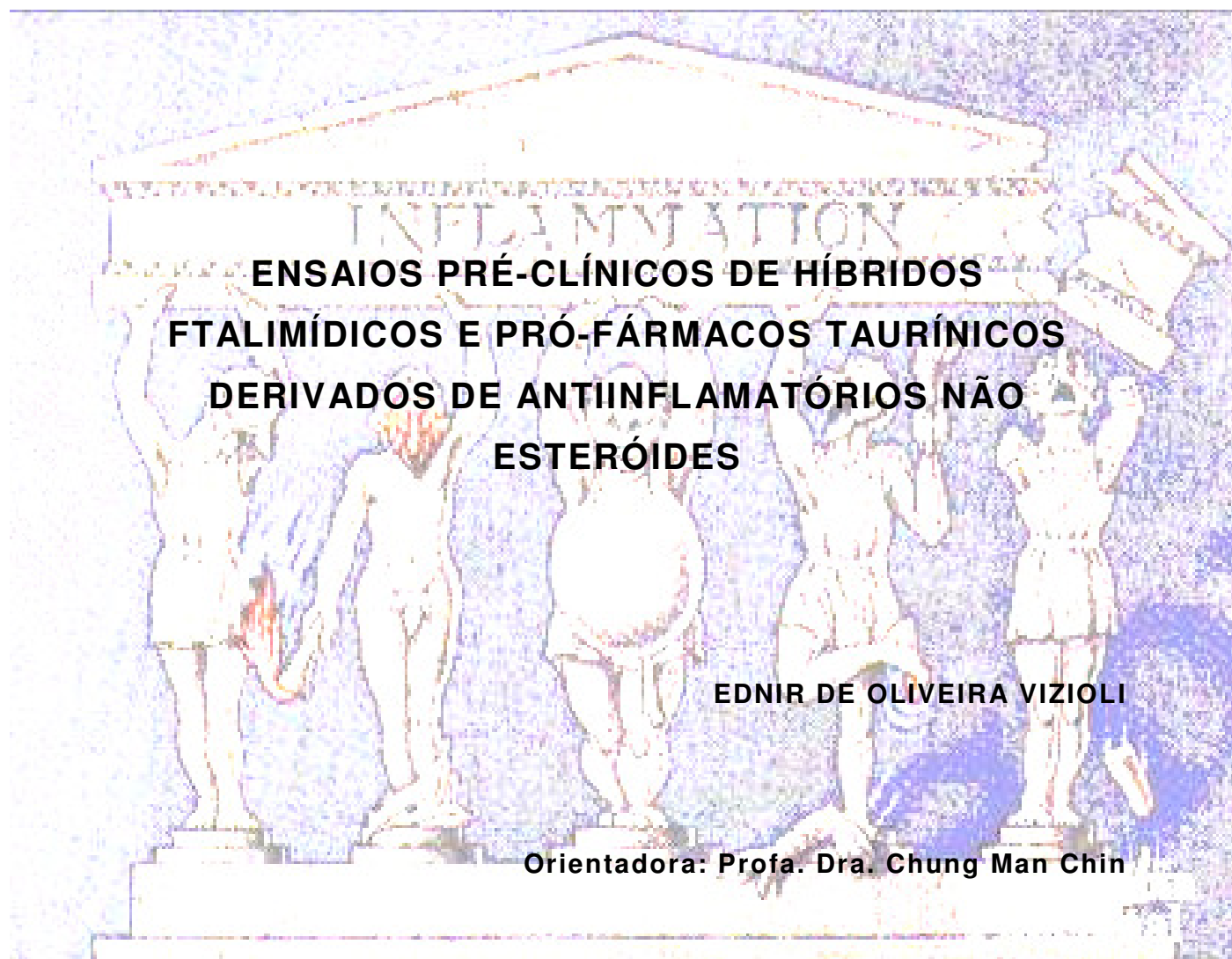
"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

**Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas,**

**Área de Pesquisa e Desenvolvimento de
Fármacos e Medicamentos.**



ARARAQUARA - SP

2009



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS DE HÍBRIDOS
FTALIMÍDICOS E PRÓ-FÁRMACOS TAURÍNICOS
DERIVADOS DE ANTIINFLAMATÓRIOS NÃO
ESTERÓIDES**

EDNIR DE OLIVEIRA VIZIOLI

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Chung Man Chin

ARARAQUARA - SP

2009

Ficha Catalográfica
Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Vizioli, Ednir de Oliveira

V864e Ensaio pré-clínico de híbridos ftálmicos e pró-fármacos taurínicos derivados de anti-inflamatórios não esteróides / Ednir de Oliveira Vizioli. – Araraquara, 2009.
128 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Chung Man Chin

1. Ensaio pré-clínico. 2. Anti-inflamatórios. 3. Taurina. 4. Pró-fármacos. 5. Híbridos ftálmicos. I. Chung Man Chin orient.. II. Título.

CAPES: 40300005

Candidato: Ednir de Oliveira Vizioli.

Título da Tese: Ensaio pré-clínicos de híbridos ftalimídicos e pró-fármacos taurínicos derivados de anti-inflamatórios não esteróides.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 14/12/2009, consideraram o candidato:

() REPROVADO (X) APROVADO

- 1) Examinador (*Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares*) _____
- 2) Examinador (*Profa. Dra. Veni Maria Andres Felli*) _____
- 3) Examinador (*Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies*) _____
- 4) Examinador (*Profa. Dra. Maria do Carmo Longo*) _____
- 5) Presidente (*Profa. Dra. Chung Man Chin*) _____

Aos meus heróis:

Ariovaldo Vizioli e
Maria Inês de Oliveira Vizioli.

&

Profa. Dra. Chung Man Chin

*“Amo como ama o amor.
Não conheço nenhuma outra
razão para amar senão amar.
Que queres que te diga, além
de que te amo, se o que quero
dizer-te é que te amo?”*

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

A DEUS, e a Nossa Senhora de Fátima (minha protetora) pelo mundo maravilhoso que sempre se apresenta que nos faz refletir nos momentos de angústia;

À Prof^a. Dr^a. Chung Man Chin, por ter acreditado no tema. Pela orientação técnico-científica, profissional e valorosa companhia; bem como por tanto amor que reside em seu ser, iluminando todos os alunos que são agraciados com sua dedicação. Não ha palavras que possam esclarecer tamanha admiração, carinho e amor;

Aos amigos Prof. Dr. Osni Lazaro Pinheiro por ter me mostrado o valor da ciência em minha iniciação científica, e ao Prof. Dr. Agnaldo Bruno Chies que teve muita influência nos meus projetos, pesquisador este que sempre deixou transparecer muito amor em seus atos;

A Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Longo, pelo apoio, convivência e ensinamentos, bem como por sua valorosa contribuição na obra;

Aos membros da banca Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares e Profa. Dra. Veni Maria Andres Felli pelo cuidado e auxilio na obra.

À Cristiane Fátima Guarido e Marcos Fiaschetti por mostrar-me a paixão de ser farmacêutico e de ensinar;

Ao Prof. Dr. José Carlos Nassute, por sua alegria;

À Prof^a. Dr^a. Adélia Emília de Almeida e Prof^a. Dr^a. Márcia da Silva por sua agradável presença;

Ao grande amigo Osmar Redondo, técnico, operador experimental assíduo de meu trabalho dono de uma encantadora áurea paterna, bem como sua esposa Sueli por tecer uma forte e eterna aliança;

A toda equipe do *Lapdesf* (Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos), pela confiança depositada, Antônio Távora de Albuquerque Silva, Eliana Ometto Pavan Serafim, Lúcia Fioravanti de Castro, Priscila Longhin Bosquese ao Prof. Dr. Jean Leandro do Santos, Renato Farina Menegon, Lorena Blau pela amizade e docência de bancada, Paulo (Escobar), Mateus (Pinduca), Dudu, grandiosas pessoas que tive o prazer de conviver;

A equipe da Fundecif e EMS Sigma Pharma pelo suporte financeiro.

Aos iniciantes científicos Rafael Consolin Chelucci e Richard Chiquetto pela amizade e indiscutível participação neste trabalho;

Aos Prof. Dr. Wilton Rogério Lustri e Prof. Dr. Roberto Cuan Ravinal, pela inestimável companhia, apoio e contribuição neste trabalho.

Aos amigos de república e convívio, pelos momentos agradáveis;

Aos meus avós, Maria Bastos Borges de Oliveira, Rinaldo Vizioli e Santina Milk Vizioli, padrinhos Valter Fadel e Silene de Oliveira Fadel pelas orações e amor devotados e a todos os meus familiares as quais os amo;

A toda equipe da biblioteca da FCF (Unesp), pelo auxílio na busca e aquisição do material bibliográfico utilizado durante o trabalho;

A toda equipe da secretaria de Pós-Graduação, pelo excelente trabalho e valiosas orientações;

Where are we ?

“This is not the end.
It is not even the beginning of the end.
But it is, perhaps, the end of the beginning.”

W. Churchill

Sumário

página

Resumo.....	<i>i</i>
Abstract.....	<i>ii</i>
1.INTRODUÇÃO	2
1.1 Planejamento de novos fármacos antiinflamatórios.....	2
1.2 Processo inflamatório.....	26
2. OBJETIVO	39
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1. Material.....	41
3.2. Métodos	41
3.2.1. Preparação dos compostos híbridos ftalimídicos (aine-ftd) e pró-fármacos taurínicos (aine-tau) derivados de antiinflamatórios não esteróide (AINEs).....	41
3.2.1.1. Preparação de AS-ftd (<i>N</i> -(1,3-dioxo-1,3-diidro-2 <i>H</i> -isoindol-2-il)-2-hidroxi benzamida).....	42
3.2.1.2. Preparação de nap-ftd (<i>N</i> -(1,3-dioxo-1,3-diidro-2 <i>H</i> -isoindol-2-il)-2-(6-metoxi-2-naftil) propanamida).....	43
3.2.1.3. Preparação de dic-ftd (2-{2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}- <i>N</i> -(1,3-dioxo-1,3-diidro-2 <i>H</i> -isoindol-2-il) acetamida).....	44
3.2.1.4. Preparação de ibu-ftd (<i>N</i> -(1,3-dioxo-1,3-diidro-2 <i>H</i> -isoindol-2-il)-2-(4-isobutilfenil) propanamida).....	45
3.2.1.5. Preparação de ceto-ftd (2-(3-benzoilfenil)- <i>N</i> -(1,3-dioxo-1,3-diidro-2 <i>H</i> -isoindol-2-il) propanamida).....	46
3.2.1.6. Preparação de nap-tau (ácido 2-{[2-(6-metoxi-2-naftil) propanoil]amido} etanosulfônico).....	48
3.2.1.6. Preparação de ibu-tau (ácido 2-{[2-(4-isobutilfenil) propanoil] amido} etanosulfônico))...)	48
3.2.1.7. Preparação de indo-tau (ácido 2-{[4-clorobenzamida-5-metoxi-2-metil-indol-3-acetil] amido} etanosulfônico).....	49
3.2.1.8. Preparação de AS-tau (ácido 2-[(2-hidroxibenzoil) amido] etanosulfônico).....	49

3.2.1.9. Preparação de dic-tau (ácido 2-[[2-(2,6-diclofenil)amino] fenil] acetil) amido}} etanosulfônico).....	50
3.2.2. Ensaios biológicos.....	50
3.2.2. 1. Animais.....	50
3.2.2.2. Atividade antiinflamatória aguda (modelo de edema de pata).....	51
3.2.2.3. Teste de gastrotoxicidade.....	52
3.2.2.4. Atividade analgésica (modelo de contorção abdominal).....	53
3.2.2.5. Atividade antiinflamatória crônica (colite ulcerativa distal).....	53
3.2.2.6. Análise histopatológica.....	54
a) Classificação macroscópica.....	54
b) Classificação microscópica.....	55
3.2.2.7. Planejamento estatístico.....	55
4. RESULTADOS	57
4.1 Atividade antiinflamatória aguda.....	57
4.2. Atividade analgésica.....	60
4.3. Teste de gastrotoxicidade.....	61
4.4. Atividade antiinflamatória crônica.....	65
5. DISCUSSÃO	73
5.1 Atividade antiinflamatória aguda.....	73
5.2. Atividade analgésica.....	74
5.3. Teste de gastrotoxicidade.....	76
5.4. Atividade antiinflamatória crônica.....	81
6. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS	89
7. CONCLUSÃO	92
8. PERSPECTIVAS	94
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas multi e interdisciplinares para invenção e/ou incrementação terapêutica.....	4
Figura 2. Estruturas da cimetidina e seu bioisótero, ranitidina.....	5
Figura 3. Analogos da lovastatina.....	5
Figura 4. Mecanismo de bioativação do omeprazol pelo meio ácido e sua ligação e inibição da bomba protônica (ATPase-SH).....	6
Figura 5. Esquema do processo de latenciação.....	7
Figura 6. Fármacos administrados em associação; pró-fármacos recíprocos ligados diretamente entre si e pró-fármacos recíprocos ligados via agente espaçante.....	8
Figura 7. Ação de azoredutases do cólon no metabolismo de sulfassalazina para a obtenção de mesalazina (5-ASA) e do pró-fármaco recíproco olsalazina, na obtenção de duas moléculas de mesalazina.....	9
Figura 8. Obtenção de pró-fármaco recíproco de naproxeno e propilfenazona, diretamente ligado.....	10
Figura 9. Obtenção de pró-fármaco recíproco de naproxeno e propilfenazona com agente espaçante.....	10
Figura 10. Pró-fármacos recíprocos derivado de ibuprofeno e doador de óxido nítrico (NO).....	11
Figura 11. Biossíntese de NO.....	11
Figura 12. Taurina.....	12
Figura 13. Planejamento dos pró-fármacos recíprocos derivados de taurina e AINEs.....	15
Figura 14. Representação do funil do desenvolvimento de novos fármacos.....	16
Figura 15. Construção de uma série de AINEs capazes de interferir no avanço da Doença de Alzheimer, inibindo a atividade da acetilcolinesterase (AChE), utilizando a técnica de hibridação.....	18
Figura 16. Representação da hidridação como estratégia de modificação molecular.....	19
Figura 17. Recém nascido e criança com focomelia.....	22
Figura 18. Molécula da talidomida, com seu grupo ftalimídico e glutarimídico.....	23
Figura 19. Protótipo antiasmático hidrido LASSBio-468.....	23

Figura 20. Antiasmáticos, sintetizado pela técnica de hibridação molecular.....	24
Figura 21. Protótipo antiasmático hidrido LASSBio-468 e seu metabolito ativo LASSBio-596.....	25
Figura 22. Hibridação molecular entre a subunidade ftalimidica da talidomida com os AINEs.....	26
Figura 23. Mecanismo e participação de mediadores químicos e celulares no processo de inflamação aguda.....	27
Figura 24. Cascata do ácido araquidônico.....	28
Figura 25. Mecanismo e participação de mediadores químicos e celulares no processo de inflamação crônica.....	30
Figura 26. Geração de metabólicos do ácido araquidônico (AA) e do ácido docosaexaenóico (DHA).....	33
Figura 27. Exemplos de AINEs seletivos da ciclooxigenase-2 (COX ₂).....	37
Figura 28. Esquema de tratamento adotado para realização experimental de colite ulcerativa.....	54
Figura 29. Ensaio de atividade antiinflamatória aguda (modelo de edema de pata) AINEs e seus derivados latenciado e/ou híbrido, por via oral.....	58
Figura 30. Ensaio de atividade antiinflamatória aguda (modelo de edema de pata) AINEs e seus derivados latenciado e/ou híbrido, por via oral.....	59
Figura 31. Ensaio de atividade analgésica periférica (modelo de contorção abdominal) AINEs e seus derivados híbridos, por via oral.....	61
Figura 32. Fotografia dos estômagos dos ratos tratados com dose única (300 µM) de AINEs, mistura física equimolar dos AINEs e taruina, AINE-tau e AINE-ftd.....	64
Figura 33. Foto representativa do intestino grosso dos ratos na administração por via oral em doses repetidas (300 µM) dos padrões tratados com celecoxibe, mesalazina e sulfasalazina, do controle positivo de colite ulcerativa e controle negativo.....	70
Figura 34. Foto representativa do intestino grosso dos ratos na administração por via oral em doses repetidas (300 µM) dos padrões AINES, AINE-tau e AINE-ftd.....	71
Figura 35. Mecanismo de secreção ácida pelo estômago.....	77
Figura 36. Mecanismo de formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelos leucócitos durante o processo inflamatório.....	78
Figura 37. Mecanismo de ação proposto para mesalazina, taurina e talidomida na inibição do processo inflamatório intestinal.....	85

Figura 38. Fotografia dos órgãos durante autópsia de animal com colite ulcerativa, tratado com diclofenaco 300 µM (v.o.) por 5 dias.....	86
---	----

Figura 39. Fases da pesquisa de novos fármacos indicando os estágios das pesquisas dos derivados ftalimídicos e taurínicos.....	87
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Diferenças entre o processo inflamatório agudo e crônico.....	31
Quadro 2. Classificação dos AINEs não seletivos.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito ulcerogênico dos AINEs e mistura física (AINE + taurina).....	63
Tabela 2. Análise macro e microscópica do colon e estado geral dos ratos com colite ulcerativa tratados com AINEs e seus derivados taurínicos e ftalimídicos.....	67
Tabela 3. Análise macro e microscópica do colon e estado geral dos ratos com colite ulcerativa tratados com celecoxib, mesalazina, sulfassalazina e derivados dic-tau e nap-tau i.p. (150 µM).....	68
Tabela 4. Valores de DL ₅₀ aguda (v.o) dos AINEs e toxicidade observada para o tratamento de colite ulcerativa com AINEs.....	69

LISTA DE ESQUEMAS

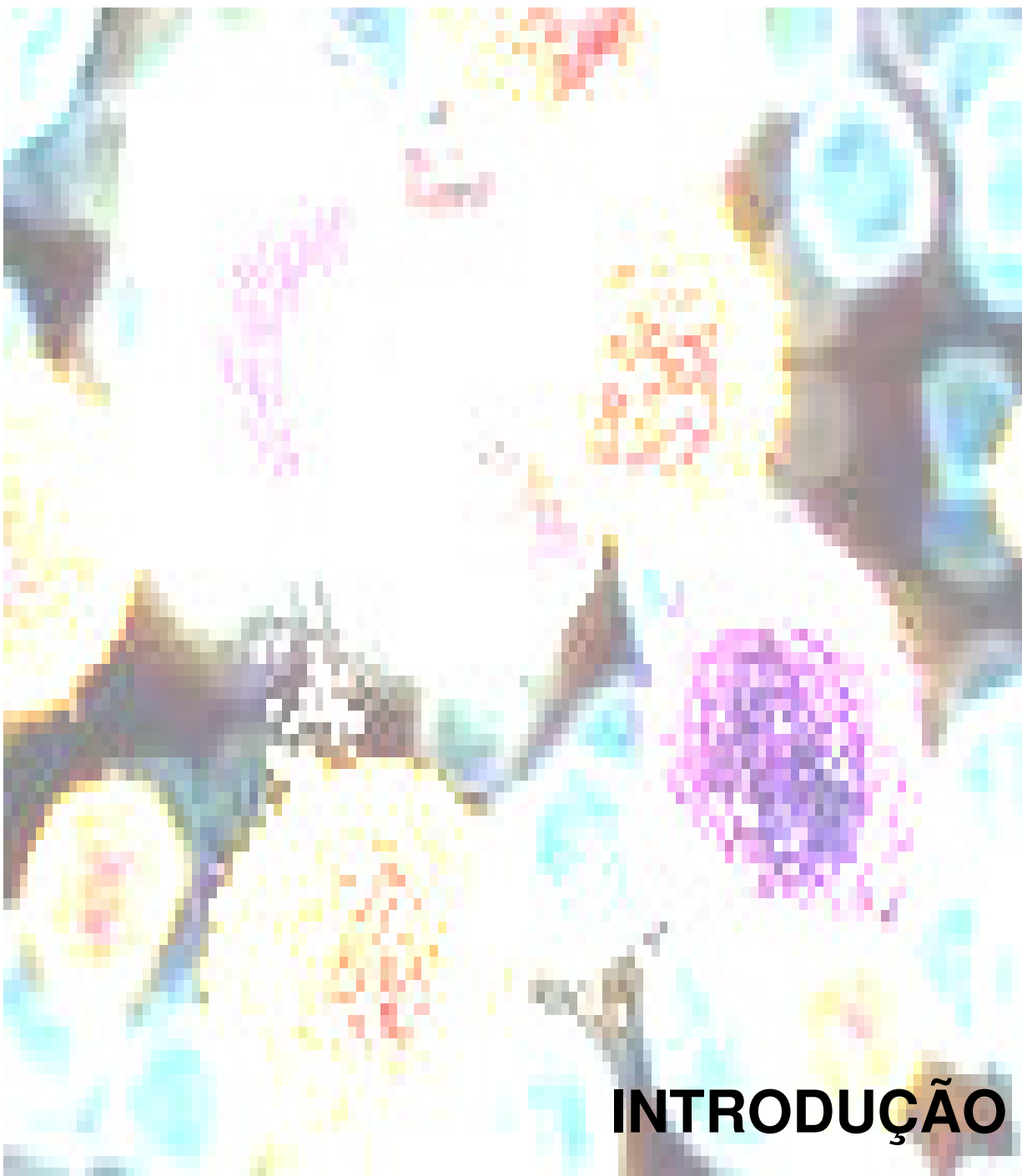
Esquema 1. Método de reação geral para preparação dos compostos AINE-ftd.....	41
Esquema 2. Método de reação geral para preparação dos compostos AINE-tau.....	47

RESUMO

A inflamação é uma reação de defesa e reparo fisiológico, importante em resposta a agressões físicas, químicas ou biológicas ao organismo, que geram o aparecimento dos quatro sinais cardinais dor, edema, calor, rubor, incluindo, muitas vezes a perda de função do tecido ou órgão. O processo inflamatório agudo é imediato e inespecífico contra o agente agressor, podendo evoluir para crônico, caso haja a permanência do agente agressivo e é caracterizado pelo aumento de celularidade e outros elementos teciduais. Várias substâncias estão envolvidas no processo inflamatório, como a prostaglandinas, histamina, serotonina e citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , NF- κ B. Estima-se que exista na terapêutica, mais de 50 antiinflamatórios não esteróides (AINEs) diferentes, mas nenhum deles totalmente destituído de efeitos tóxicos, como a gastrotoxicidade, mesmo os compostos mais novos, seletivos para receptores COX₂, como o celecoxibe. Por este motivo nenhum AINEs é recomendado para utilização em processos inflamatórios crônicos. Neste sentido, Vizioli (2006) e Castro (2008), planejaram pró-fármacos taurínicos e híbridos ftalimídicos, respectivamente, obtendo resultados promissores como antiinflamatórios potenciais destituídos de gastrotoxicidade. O presente trabalho visa realizar os testes pré-clínicos de atividade antiinflamatória aguda e crônica. Os resultados demonstraram que todos os derivados testados não apresentam gastrotoxicidade em relação ao padrão AINE testado, sem alteração significativa da resposta inflamatória aguda, com exceção do derivado de ibuprofeno *N*-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)-2-(4-isobutilfenil) propanamida, que demonstrou atividade inferior. Em estudo de atividade inflamatória crônica, todos os compostos ftalimídicos e taurínicos mostraram-se superior aos AINEs padrão, com diminuição de mortalidade e exclusão dos sinais clínicos como sangramento, perda de peso aumento da frequência de evacuações. Os derivados de diclofenaco e naproxeno, ácido 2-{[2-(2,6-diclofenil)amino] fenil} acetil) amido}} etanosulfônico e ácido 2-{[2-(6-metoxi-2-naftil) propanoil]amido} etanosulfônico quando administrados intraperitonealmente promoveram 100% de supressão da colite ulcerativa, enquanto que os fármacos mesalazina e sulfassalazina, fármacos padrão utilizados terapeuticamente no tratamento da doença apresentaram apenas 67 % de remissão. Estes dados apontam para uma nova classe revolucionária de AINEs.

ABSTRACT

Inflammation is a defense and repair physiologic reaction important in response to an physical, chemical or biological aggression of the body, providing the appearance of the four cardinal signs of pain, swelling, heat, redness, including often the loss of function of the tissue or organs. The acute inflammatory process is immediate and nonspecific against the aggressive agent and it is characterized by increased cellular and other tissue elements. Series of substances are involved in the inflammatory process such as prostaglandins, histamine, serotonin and pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-8, α -TNF, NF- κ B. It is estimated that exists more than 50 different non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) drugs in the market, but none of them are wholly without side effects such as gastro toxicity, even the newer compounds, selective to COX₂ receptors, as the celecoxib. For this reason none of NSAIDs is recommended for use in chronic inflammatory diseases. In this sense, Vizioli (2006) and Castro (2008), planned new taurine prodrugs and phthalimide hybride NSAIDs, respectively, showing promising results as anti-inflammatory without toxicity. This work aims to accomplish pre-clinical assay by acute and chronic models of inflammation. The results showed that all derivatives tested have no gastro toxicity when compared with the NSAIDs standard. No significant inflammatory response was observed with the exception to ibuprofen derivative *N*-(1,3-dioxo-1,3-dihydro-2H-isoindol-2-yl)-2-(4-isobutylphenyl) propanamide, which showed less activity. In the chronic inflammatory study activity all compounds phthalimide and taurine showed increase of activity compared to standard NSAIDs with decrease of the mortality and exclusion of the clinical signals such as bleeding, weight loss, and increased defecation rate. The derivatives of diclofenac and naproxen, 2-([2-(2,6-dichlorophenyl)amino] phenyl) acetyl) amide] etanosulfonic acid e 2-([2-(6-methoxy-2-naphthyl) propanoyl]amide) etanosulfonic acid when administered *via* intraperitoneum further 100 % of ulcerative colitis suppression, while the mesalazine and sulfasalazine, the current drugs used for the treatment of the disease showed only a 67% remission. These data aim for the new revolution class of NSAIDs.



1. INTRODUÇÃO

1.1. Planejamento de novos fármacos antiinflamatórios

O planejamento de novos fármacos com potencial atividade antiinflamatória e/ou com redução dos efeitos tóxicos inerentes ao mecanismo de ação é sustentado pela ampla utilização no tratamento de patologias, cujos processos de base permeiam pela resposta inflamatória.

O processo inflamatório sempre recebeu um grande destaque na ciência por ser o primeiro sinal biológico em qualquer estado de anormalidade, e os antiinflamatórios não esteróides (AINEs) possuem um impacto positivo sobre a qualidade de vida do paciente, por incorporar benefícios como, por exemplo, a melhoria de dores músculo-esqueléticas, e em algumas doenças que são acompanhadas da cronicidade inflamatória como a artrite reumatóide (GABRIEL & MATTESON, 1995).

Os AINEs, porém, ao alterar a atividade das prostaglandinas, inibindo as isoformas de ciclooxigenases constitutivas (COX₁) e induzidas (COX₂), geram reações adversas graves em pacientes pré-dispostos e/ou que utilizam por um período prolongado.

Em 1995, uma revisão sobre o consenso do uso de AINEs na artrite reumatóide foi elaborada, sendo apresentadas as vantagens e desvantagens. Entre os perigos do uso, encontram-se as reações gastrointestinais (GI) como dispepsia severa, úlceras duodenais e gástricas com complicações que promoveram a hospitalização, realização de procedimentos cirúrgicos e até mesmo a morte. O estudo sugere a utilização intervencionista de misoprostol, um análogo sintético de prostaglandina, como medida de controle das complicações GI (GABRIEL & MATTESON, 1995).

Em 1999, uma correlação farmacoeconômica apresentou a gastropatia na utilização de AINEs como fator de terapia associativa e aumento dos custos (WALAN & WAHLQVIST, 1999). No mesmo ano, o laboratório farmacêutico Merck Sharp & Dohme lançou nos Estados Unidos e mais de 80 países o VIOXX®

(rofecoxib, inibidor seletivo de COX₂), com a promessa de redução dos efeitos adversos (GI) comuns à classe, atingindo um faturamento mundial de US\$ 2,5 bilhões, em 2003 (REYNALES, 2009). Entretanto, em 2004, observou-se que esta classe nova de antiinflamatórios promovera toxicidade cardiovascular, fato que provocou a retirada do medicamento deste mercado mundial (LANGTON, HANKEY & EIKELBOOM, 2004).

Assim sendo, a utilização de inibidores seletivos de COX₂ devem ser cautelosos e em condições específicas, devido seu efeito adverso severo sobre o sistema cardiovascular e benefícios incertos sobre o sistema GI (INOTAI & VINCZE, 2008).

Na Italia, em 2002 uma campanha intitulada de Projeto Gardenia teve meta de avaliar as prescrições de antiinflamatórios esteróides (AIEs) e AINEs com o objetivo de orientar o uso racional e minimizar as reações adversas. Os resultados foram positivos em relação à redução dos problemas relacionados a esta classe terapêutica (SCARPATO et al, 2002).

Neste sentido, baseado nas recentes tecnologias e protocolos terapêuticos, para pacientes com risco médio de distúrbios gastrointestinais, a prescrição deve ser de medicamentos AINEs não específicos que apresentem sistemas de liberação lenta, associados ou não com inibidores de bomba de prótons (IBP) e, utilização com cautela para os AINES seletivos COX₂ (INOTAI & VINCZE, 2008).

A análise de associações ligadas ao controle de úlceras pela administração de AINEs, em 1000 pacientes tratados com IBP e 1000 não tratados, demonstrou que 95% dos não tratados apresentaram problemas gastrointestinais, constatando o aumento dos valores totais com o tratamento, a fim de reduzir os custos com internação ou procedimentos por complicação (VONKEMAN et al, 2008)

Com base nestes dados, observa-se a necessidade de novos antiinflamatórios, destituídos de efeitos adversos. Entretanto, o planejamento de novos fármacos através da modificação radical, isto é, a criação de uma molécula totalmente nova, é um processo de alto custo que envolve milhões de dólares e a participação de equipes com diversos profissionais em etapas interdisciplinares (DIMASI, HANSEN & GRABOWSKI, 2003; SANTOS, 2007; BARREIRO, 2009). A

figura 1 mostra a complexidade e as diversas ferramentas que podem ser utilizadas no planejamento de novas moléculas biologicamente ativas.

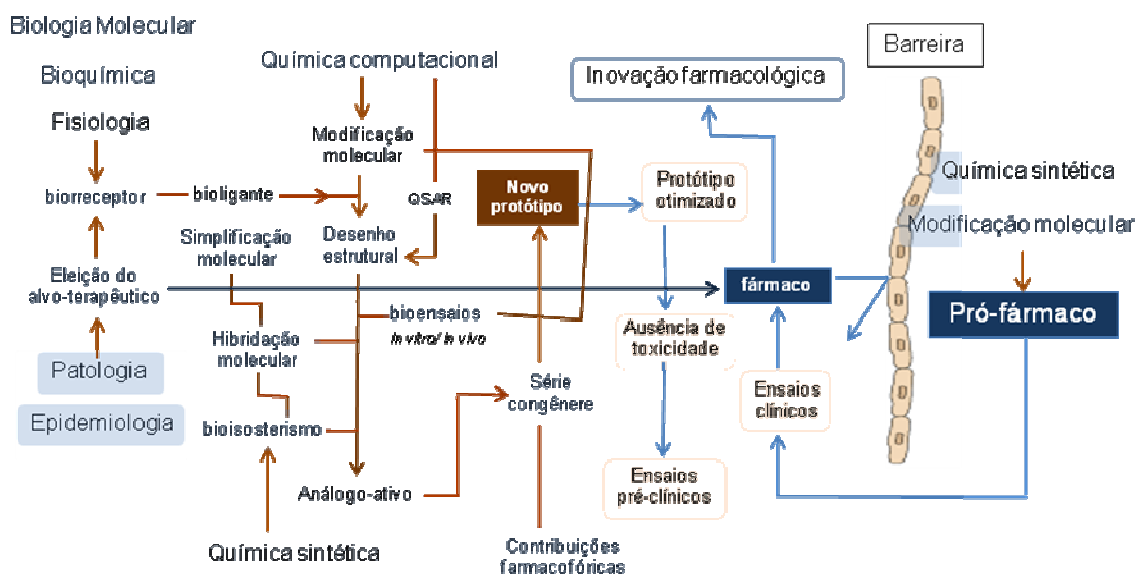


Figura 1. Etapas multi e interdisciplinares para invenção e/ou incrementação terapêutica de um fármaco (modificado de BARREIRO, 2009).

Tendo em vista a magnitude dos caminhos e processos na descoberta dos fármacos, destacam-se estratégias baseadas na modificação molecular de fármacos ou protótipos conhecidos, citado por Sir James Black, ganhador do prêmio Nobel em medicina e fisiologia em 1988. Entre as técnicas de modificação molecular (modificação incremental), podemos citar: latenciação, bioisosterismo, hibridação, anelação entre outras (WERMUTH, 2008).

A modificação molecular tem permitido a obtenção de compostos antiinflamatórios ativos, incluindo processos que consistem, basicamente, na “*reciclagem*” de substâncias antes descartadas por problemas de toxicidade, farmacocinética e outros.

Tendo o protótipo como ponto de partida, inicia-se a síntese dos análogos obtendo compostos com maior potência, especificidade e segurança além de possibilitar melhor aceitabilidade pelos pacientes e adesão ao tratamento, como por exemplo, a ranitidina, obtida como bioisótero da cimetidina (figura 2), apresentando

maior tolerabilidade e menor incidência de interações com outros medicamentos, além de diminuição dos efeitos adversos como ginecomastia (BARREIRO, 2002; OLIVEIRA, CASSAL & PIZARRO, 2003).



Figura 2. Estruturas da cimetidina e seu bioisótero, ranitidina.

Por vezes, estes novos compostos são denominados “*me too*” por serem cópias dos protótipos, entretanto é possível observar vantagens na rapidez, no desenvolvimento demonstrando melhoramento das características físico-químicas como pKa, logP, solubilidade e estabilidade, farmacocinéticas e/ou terapêuticas

Esta estratégia é utilizada pela indústria farmacêutica para produzir fármacos promissores sobre o aspecto econômico garantindo assim uma parcela prestigiosa do mercado. Entre os exemplos mais famosos encontram-se os análogos da lovastatina: sinvastatina, provastatina, fluvastatina, atorvastatina, etc (FERREIRA & KOROLKOVAS, 1980; WERMUTH, 2008).

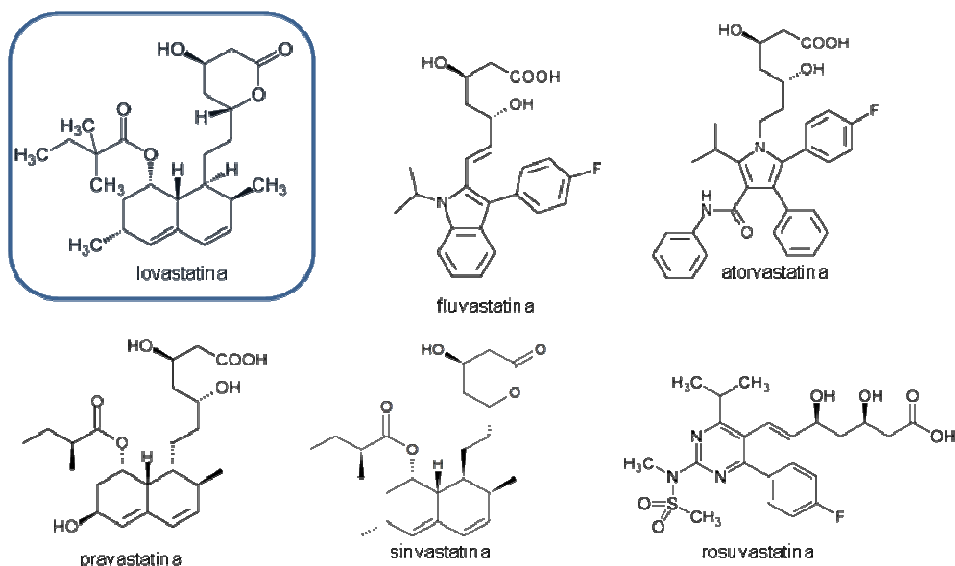


Figura 3. Análogos da lovastatina.

A química farmacêutica e medicinal destaca os processos modificação molecular vinculado a técnica de latenciação e hibridação molecular, sendo as mais frequentemente utilizadas em todo o mundo (CHUNG & FERREIRA, 1999; BARREIRO et al, 2002; LIMA & BARREIRO, 2004; SILVA et al, 2005). Ambas serão detalhadas a seguir, em face de utilização das mesmas neste trabalho.

O processo de latenciação visa a obtenção de pró-fármacos (compostos latentes), inativos *per si*, sendo bioativados *in vivo* (STELLA & NARINGREKAR, 1985; HSIEH, HUNG & FANQ, 2009). O pró-fármaco clássico apresenta ligação bioreversível, entre o fármaco (ou protótipo) e outra molécula chamada de transportador, este podendo ou não apresentar atividade biológica, porém, isento de toxicidade.

Os bioprecursores são formas latentes que não possuem grupos transportadores, mas necessitam de reação química ou enzimática, *in vivo*, para exercerem suas atividades. Um exemplo de fármaco bioprecurso é o omeprazol, um inibidor de bomba protônica, (figura 4) (SILVA et al, 2005; WERMUTH, 2008; TESTA, 2009).

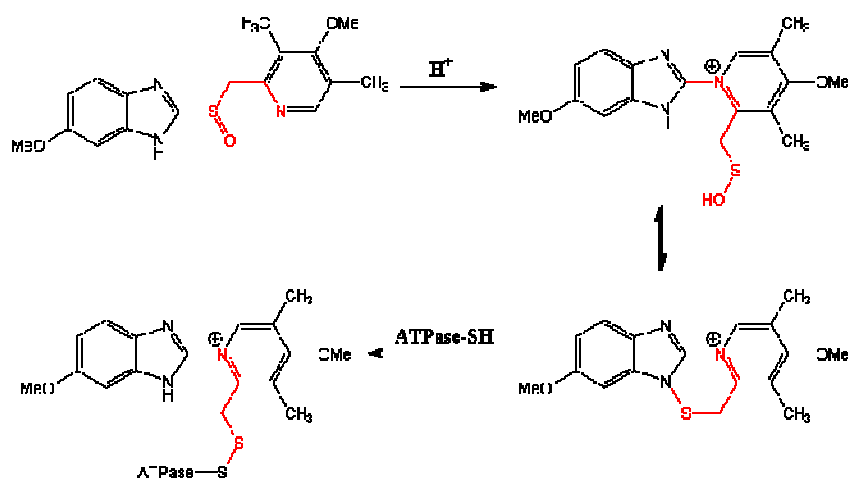


Figura 4. Mecanismo de bioativação do omeprazol pelo meio ácido e sua ligação e inibição da bomba protônica (ATPase-SH).

O omeprazol está entre os quatro medicamentos, juntamente com aciclovir, sinvastatina e enalapril, que rendem bilhões de dolares às indústrias farmacêuticas no mundo, considerados “*blockbusters*”, que apresentam como princípio esta técnica

de modificação molecular demonstrando as razões de sucesso para o emprego no planejamento de novos fármacos. (ETTMAYER et al, 2004).

Mediante a escolha de transportador adequado, é possível promover aumento de biodisponibilidade, diminuição da toxicidade, prolongamento da ação e aumento da seletividade (SINGH & SHARMA, 1994; CHUNG & FERREIRA, 1999).

Os *Pró-fármacos Mistos* apresentam características de pró-fármacos clássicos e de bioprecusores, enquanto os *Dirigidos* apresentam transportadores capazes de carregar seletivamente o fármaco do local administrado para o sítio de ação. (SILVA et al, 2005).

A liberação de fármacos no local de ação via pró-fármacos, tem gerado grande interesse para aumentar a seletividade. Isto porque podem diminuir os efeitos adversos dos protótipos dos quais derivam, além de, incrementar o arsenal terapêutico (CASTRO et al, 2004). A figura 5 mostra o esquema do processo de latenciação.

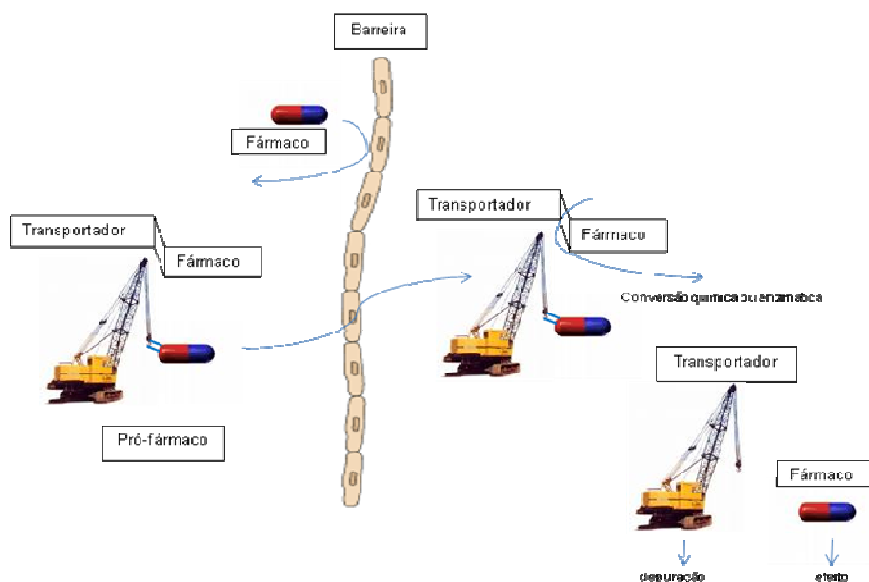


Figura 5. Esquema do processo de latenciação. A barreira representa os problemas limitantes do fármaco. Ao atravessar a barreira, *in vivo*, o pró-fármaco é bioativado, liberando o fármaco para promoção da atividade (modificado de SILVA et al, 2005).

Além da seletividade e diminuição da toxicidade, o emprego da latenciação visa corrigir problemas como:

- ✓ instabilidade ou solubilidade inadequada na formulação ou frente aos fluidos gastrintestinais,
- ✓ características organolépticas desagradáveis para uso,
- ✓ equilíbrio hidrófilo-lipófilo inadequado para atravessar membranas biológicas e
- ✓ alta taxa de biotransformação ou eliminação pré-sistêmica.

Sendo assim, o transportador pode ser um segundo fármaco e a união entre estes dois fármacos pode acontecer diretamente através de ligação lábil ou por meio de um grupo espaçante, o qual poderia facilitar o acesso enzimático do derivado por torná-lo mais exposto para hidrólise, descartando as possibilidades de impedimento estérico (Figura 6) (MENDER & ROURK, 1997).

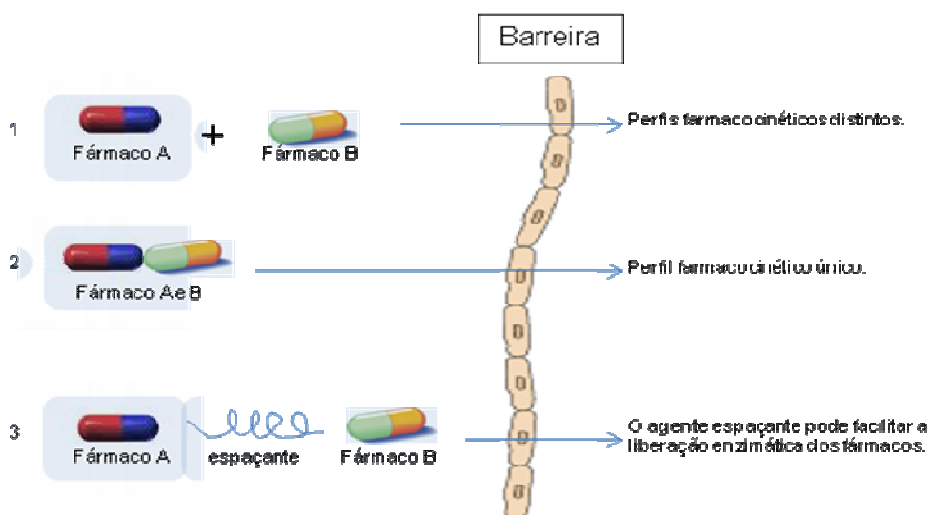


Figura 6. Fármacos administrados em associação (1); Pró-fármacos recíprocos ligados diretamente entre si (2); Pró-fármacos recíprocos ligados via agente espaçante (3).

Os pró-fármacos recíprocos não são tão recentes, já que vários compostos foram introduzidos na terapêutica antes do conhecimento de pró-fármaco propriamente dito. A sulfassalazina, introduzida na terapêutica em 1942 para o tratamento de colite ulcerativa, é clivada em sulfapiridina e ácido 5-aminossalicílico (5-ASA, mesalazina) por ação de azorredutases do cólon. Após a descoberta de que o 5-ASA era o responsável pela atividade farmacológica, foram desenvolvidos vários outros pró-fármacos derivados dele, incluindo o pró-fármaco

recíproco de duas moléculas de 5-ASA, a olsalazina (figura 7) (VILASECA et al., 1990).

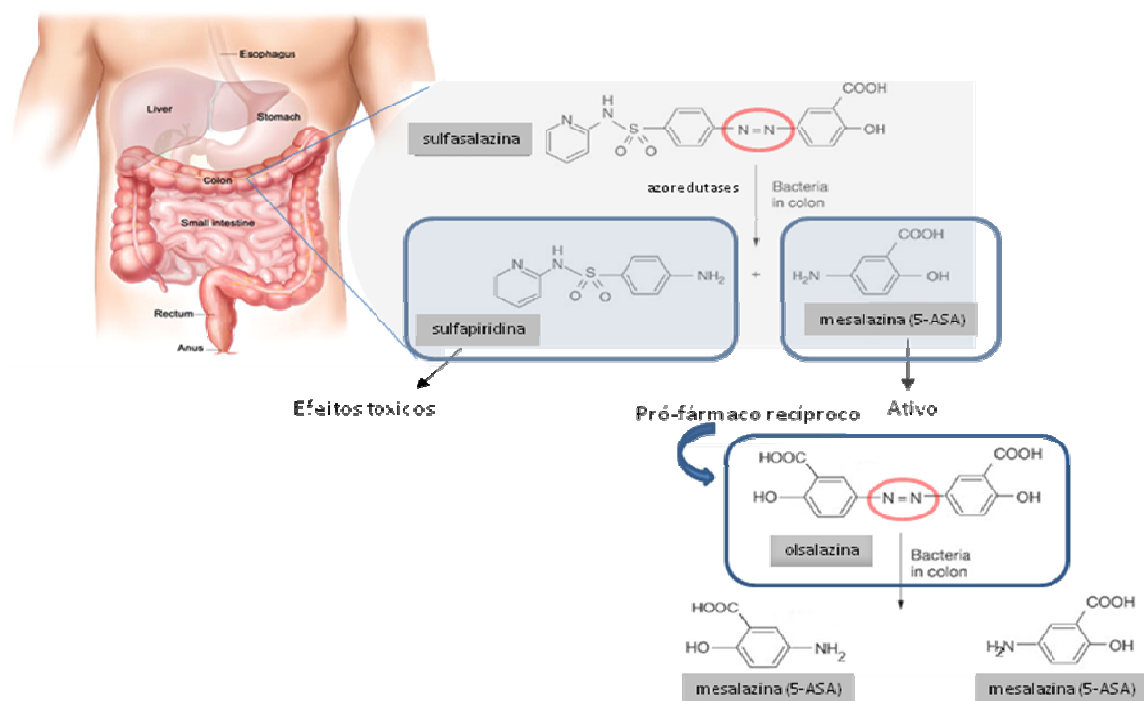


Figura 7. Ação de azoredutases do cólon no metabolismo de sulfasalazina para a obtenção de mesalazina (5-ASA) e do pró-fármaco recíproco olsalazina, na obtenção de duas moléculas de mesalazina. (modificado de NIELSEN & MUNCK, 2007).

A utilização do processo de latenciação na obtenção de pró-fármacos AINEs podem reduzir os efeitos adversos gástricos provocados pelos AINEs, permitindo seu uso crônico.

Por exemplo, Shela, Khedr & Elsherief (2002) sintetizaram uma série de pró-fármacos recíprocos derivados do naproxeno e propilfenazona (figura 8), com atividade analgésica e antipirética, obtendo maior tolerabilidade.

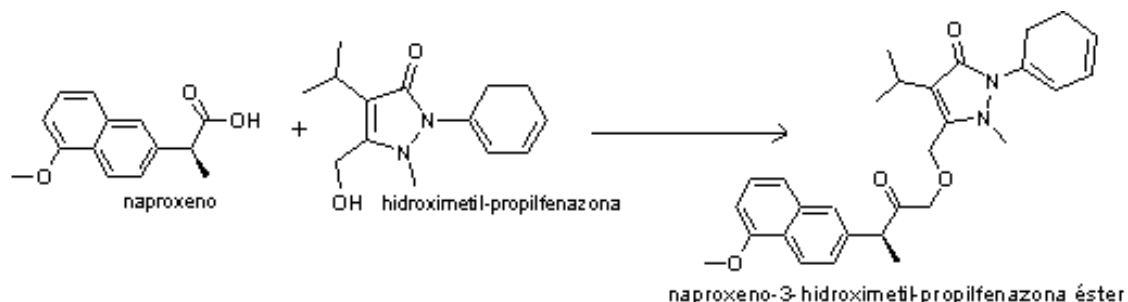


Figura 8. Obtenção de pró-fármaco recíproco de naproxeno e propilfenazona, diretamente ligado (SHELA, KHEDR & ELSHERIEF, 2002).

O uso de agentes espaçantes (figura 9) facilita a hidrólise dos fármacos ativos, devido ao menor impedimento estérico das enzimas no processo de conversão. (PARMESHWARI et al, 2007).

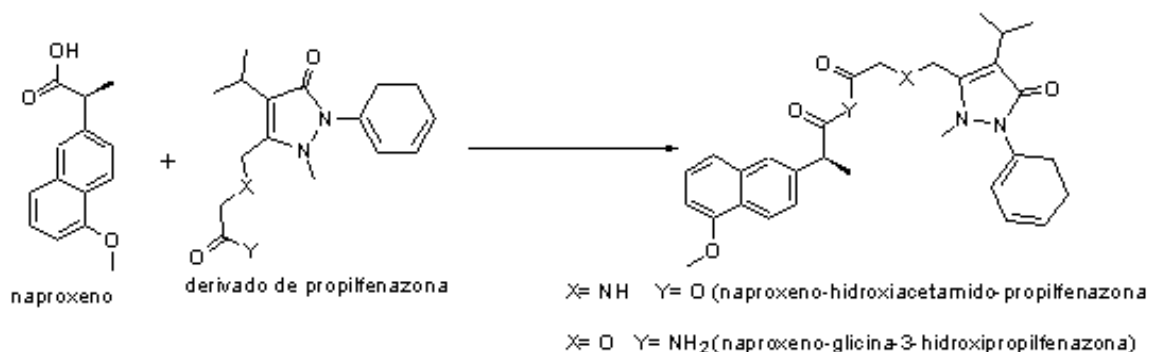


Figura 9. Obtenção de pró-fármaco recíproco de naproxeno e propilfenazona com agente espaçante (SHELA, KHEDR & ELSHERIEF, 2002).

Outro exemplo inclui uma nova de série de AINEs derivados do ibuprofeno com reduzida toxicidade gástrica e potente ação antiagregante foi obtida através da ligação com furoxanos e furazonas (figura 10) (LOLLI et al, 2001).

Estes compostos foram obtidos baseados em trabalhos utilizando-se doadores de óxido nítrico (**NO**) com o objetivo de reduzir os efeitos GI e vasculares provocados pelos AINEs (BANDARAGE et al, 2000; UCHIDA et al, 2001; MAHMOUD, MOHAMED & ABDALLAHA, 2001; RANATUNGE et al, 2006).

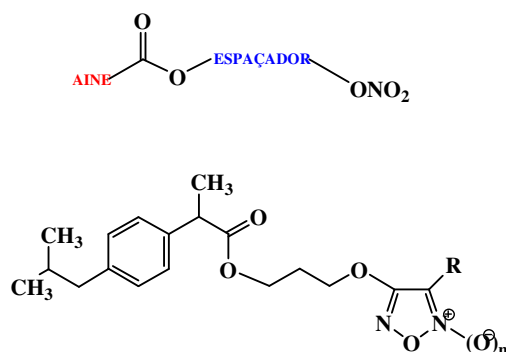


Figura 10. Pró-fármacos recíprocos derivado de ibuprofeno e doador de NO (grupo furoxâmico) (LOLLI et al, 2001).

Nesta mesma direção, derivados do ácido acetilsalicílico como doadores de NO, que apresentam atividade antiinflamatória, antiplaquetária e gastroprotetora promissora foram descritos por CENA, et al. em 2003 e novas pesquisas apontam como futuros candidatos a fármacos AINES, inibidores seletivos de COX₂ com capacidade de doar NO (ABDELLATIF et al, 2008).

O NO é um segundo mensageiro químico, com o papel de ativar ou inibir diversas moléculas alvo, merecendo destaque na regulação do tônus vascular e resposta imunológica (BARRETO, CORREIA, MUSCARÁ, 2005).

Existem três isoformas de NO sintase (NOS) sendo duas constitutivas cálcio dependentes: endotelial, eNOS e neuronal, nNOS e uma induzida, a iNOS não dependente de cálcio. O NO é produzido pela oxidação do nitrogênio guanidínico terminal de L-arginina pela NO sintase (NOS) na presença de coenzimas como a nicotinamida adenina difosfato (NADPH) e a calmodulina (CaM) no caso da isoformas constitutivas (figura 11) (THOMAS, 2003). O NO é rapidamente convertido em dióxido de nitrogênio (NO₂) e, em seguida, em formas mais estáveis como nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻) (PALMER, FERRIGE, MONCADA, 1993).

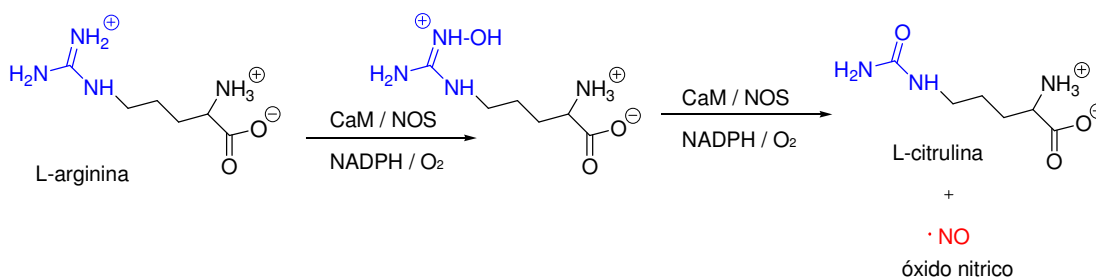


Figura 11. Biossíntese de NO.

A iNOS está presente em grande quantidade no durante o processo inflamatório, no qual o NO produzido provoca lesão oxidativa aos microorganismos invasores (DINERMAN et al, 1994; THOMAS, 2003). Neste sentido, é possível observar um aspecto marcante desta molécula: a sua capacidade de ser benéfica ou potencialmente tóxica conforme a concentração ou depuração tecidual. Alguns autores, como Schmidt & Walter (1994), denominam muito apropriadamente o NO como uma “*faca de dois gumes*” (*double-edgedsword*).

De fato, Palumbo, Cioffi e D’Ischia (2001) solicitaram patente CAN 137:346227, AN 2002:894293 e ITRM20000039 A, para compostos inibidores de NOS visando usos diversos, incluindo em processos inflamatórios, reforçando a expectativa de segurança dessa terapia com a justificativa de normalisar os níveis de NO, impedindo, desta forma, a presença ativa e exacerbada da iNOS e inibindo a cascata do ácido araquidônico (PALUMBO, CIOFFI & D’ISCHIA, 2001).

A taurina é um aminoácido não clássico, possuindo em sua estrutura um grupo sulfônico ao invés de carboxílico (figura 12), classificado como um nutriente condicionalmente essencial, importante durante o desenvolvimento dos mamíferos, porém, na maioria das vezes, é esquecido e não adicionado à lista de aminoácidos essenciais.

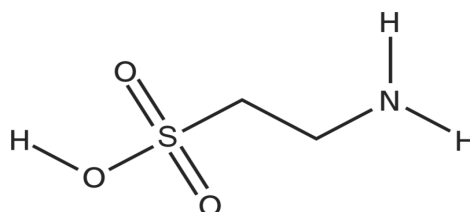


Figura 12. Taurina.

Em 2006, Vizioli planejou uma série de pró-fármacos recíprocos derivados de taurina e testou o potencial inibitório de iNOS em cultura de células macrofágicas do exsudato peritoneal de camundongos (estimulados com LPS). Tendo em vista que a taurina possui a capacidade de inibir iNOS presente em macrófagos no processo inflamatório, o objetivo do estudo foi observar se a ligação amídica dos AINEs à taurina, provocaria alteração na atividade de ambos.

O experimento foi realizado por método indireto de detecção de NO, através de seus metabólitos, utilizando o nitrito como controle positivo e aminoguanidina um inibidor enzimático seletivo, como controle negativo. Os resultados demonstraram que os pró-fármacos apresentaram diminuição da produção de NO, similarmente à da taurina, sugerindo que a ligação dos AINEs à taurina não modificou esta atividade, e consequentemente, a taurina poderia apresentar efeito sinérgico na atividade antiinflamatória.

Além disso, um teste de viabilidade celular foi realizado no intuito de comprovar que a diminuição da produção de NO não decorreu por morte celular.

Estes resultados impulsionaram o depósito da patente PI 0000220802234957/ 2008 e PCT – WO 2009/124371, de novos compostos derivados de taurina, processo de sua preparação e composições farmacêuticas contendo os mesmos, em parceria com a Empresa Farmacêutica EMS-Sigma Pharma (VIZIOLI et al, 2008).

A taurina apresenta caráter anfótero em pH fisiológico, bem como alta hidrossolubilidade e baixa lipossolubilidade (FOOS & WU, 2002). É o aminoácido intracelular mais abundante no organismo e está presente em concentrações elevadas no músculo esquelético, sendo mais evidente nas fibras de oxidação lenta tipo I (39,2 mmol/kg/massa seca) que nas fibras tipo II (9,6 mmol/kg/massa seca) (WARD et al, 1999; DAWSON et al, 2002; CUISINIER et al, 2001).

Este aminoácido recebeu pouca atenção dos pesquisadores até 1993, sendo mais explorado como pró-anabólico (WAITZBERG, 2002). Até as décadas passadas a única função atribuída a esse aminoácido era de emulsificar lipídios no sistema digestivo para facilitar seu transporte (SHIRLEY, 1994).

Atualmente, sabe-se que a taurina está envolvida em inúmeras funções fisiológicas, entre elas: fator trófico no desenvolvimento do sistema nervoso central; manutenção da integridade estrutural da membrana; antiagregante plaquetário; regulação do transporte e ligação do cálcio; antioxidante e imunomodulação (BALASUBRAMANJAN, SOMASUNDARAM & FELIX, 2004; KOUZUKI et al, 1998; WETTSTEIN & HÄUSSINGER, 1997).

A taurina é considerada um substrato indispensável durante o estresse catabólico, sendo utilizada como pró-anabólico em bebidas energéticas, uma vez observado fadiga da musculatura esquelética tendo sido relacionado com a redução deste aminoácido. Terapeuticamente, é utilizada em formulações enterais como suplemento para neonatos, para o desenvolvimento da retina. (FÜRST & STEHLE, 1994).

As pesquisas demonstraram que a taurina, no sistema imunológico, modula a ação de células T (MARCINKIEWICZ et al, 1998) e reduz a presença de neutrófilos no processo inflamatório (MARCINKIEWICZ, GRABOWSKA & CHAIN, 1998). Aditivamente, *in vitro*, inibe a geração outros mediadores macrofágicos inflamatórios (MARCINKIEWICZ, 1995), bem como a expressão celular da COX₂, sobre ação pós-transcricional, inibindo conseqüentemente, a PGE₂ (QUINN; PARK & SCHULLER-LEVIS, 1996; LIU et al, 1998), sem alterar o padrão de resposta vascular e resistência periférica, demonstrados em experimentos de vaso-relaxamento em órgãos isolados de aorta, artéria renal e mesentérica de coelhos (NIU et al, 2007).

Motawi, Abd Elgawad, e Shahin, em 2007, investigaram o envolvimento da infiltração de neutrófilos, produção de NO e estresse oxidativo, na promoção da ulceração gástrica, induzida pela indometacina. Os experimentos demonstraram um efeito antioxidante da taurina quando associado a este AINE, normalizando as atividades da glutathione redutase e superóxido dismutase.

Takeuchi e colaboradores, em 1995, sugeriram que a taurina apresenta atividade gastroprotetora por reduzir a secreção de ácidos aumentando a liberação luminal de ânions bicarbonato. Este pesquisador demonstrou, também, que esta atividade gastroprotetora não se devia à inibição da secreção ácida no estômago. Além disso, o pré-tratamento de ratos com inibidores da síntese de óxido nítrico (N^G-nitro-L-arginina metilester - L-NAME) e de indometacina não afetou o efeito protetor da taurina.

Em 2000, o mesmo grupo publicou trabalho sobre o papel da interação endógena da PG e do NO na regulação da secreção ácida que induz dano no estômago de ratos, sugerindo o papel fundamental do NO nos mecanismos de lesão (TAKEUCHI et al, 2000).

Com base nestes conhecimentos e, na busca de antiinflamatórios mais potentes e destituídos de toxicidade, os pró-fármacos recíprocos planejados por Vizioli (2006) seguiu conforme a figura 13, esperando-se que *in vivo*, os AINES e a taurina fossem liberados.

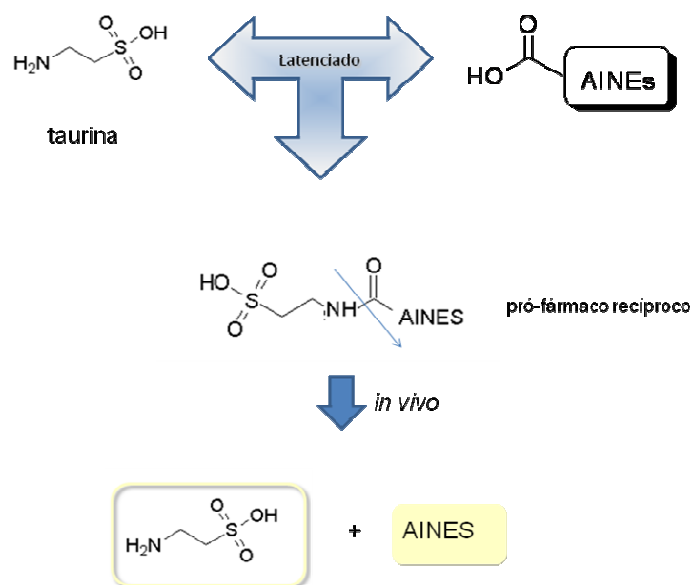


Figura 13. Planejamento dos pró-fármacos recíprocos derivados de taurina e AINES (AS, ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco e indometacina) (VIZIOLI, 2006).

Na figura 14, observa-se uma representação esquemática da dificuldade para o lançamento de um novo fármaco no mercado. São necessários milhões de dólares no desenvolvimento de moléculas que nem sempre chegam a ser comercializadas.

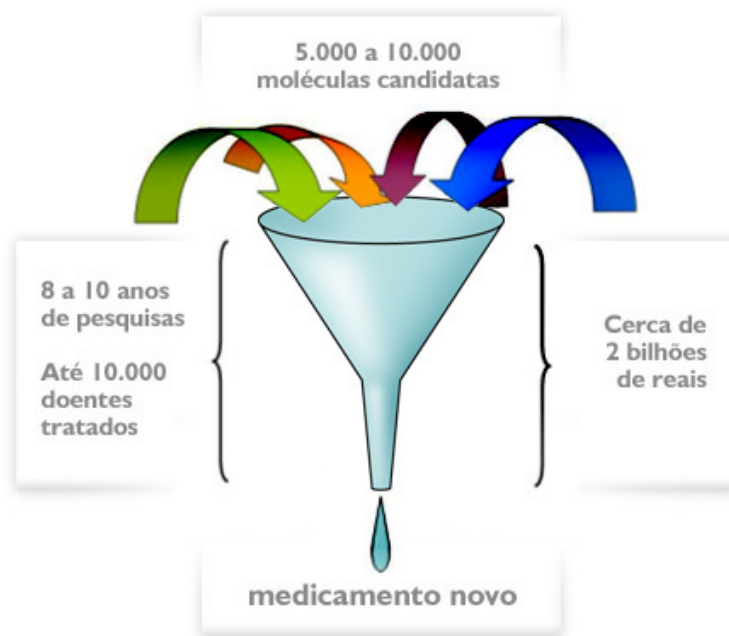


Figura 14. Representação do funil do desenvolvimento de novos fármacos (fonte: http://www.daiichisankyo.com.br/imgs/pictures/img_ped_cone.jpg, acesso 17/11/2009).

Neste sentido, a utilização de um medicamento AINE já consagrado na terapêutica, contendo a taurina como transportador (inovação incremental) seria uma alternativa a essas dificuldades, uma vez que a toxicidade da taurina em humanos é praticamente nula (SHAO & HATHCOCK, 2008).

Shao e Hathcock (2008) publicaram um estudo de revisão sobre toxicidade clínica de aminoácidos, no intuito de estabelecer a segurança da suplementação destes, incluindo a taurina. Os resultados demonstraram nenhum efeito adverso em pacientes que utilizaram dose superior a 10 g por dia durante 6 meses e em pacientes que utilizaram doses que variam de 500 mg à 1500 mg por dia por um período de 12 meses.

Para que a indústria farmacêutica dê prosseguimento a uma pesquisa de novos fármacos, evoluindo para pesquisa clínica, exige-se a prova de conceito. Os efeitos de atividade antiinflamatória aguda e gastroproteção devem ser comprovados cientificamente. Caso este fato se comprove para este grupo de pró-fármacos, a utilização destes poderá revolucionar a terapêutica de antiinflamatórios.

Além da obtenção de pró-fármacos recíprocos, outro processo de modificação molecular pode ser utilizado na obtenção de bioligantes ou protótipos em que sejam incluídas, na mesma molécula, propriedades farmacodinâmicas de duas moléculas diferentes, de forma a assegurar uma melhor eficácia terapêutica, por sinergismo de ação.

Nesse caso, o desenho estrutural, baseado no mecanismo de ação, deve considerar fatores estruturais mais complexos, de maneira a assegurar à mesma molécula planejada o reconhecimento molecular por dois alvos terapêuticos, simultaneamente.

A hibridação molecular é um processo de modificação molecular que leva em consideração o desenho de uma molécula com propriedade dual e, como as formas latenciadas, apresentam vantagens farmacocinéticas sobre a administração concomitante de dois fármacos distintos (BARREIRO et al, 2002).

O termo ligante múltiplo (LM) foi recentemente proposto por Espinhosa-Fonseca (2006), para denominar um fármaco com a capacidade de ser reconhecido por mais de um receptor, antes chamados de ligantes duais e heterodímeros. As vantagens do LM são:

1. Inibição de diferentes alvos de uma mesma rota metabólica por uma única molécula, aumentando a eficácia terapêutica;
2. Para uma molécula de estrutura química simplificada, pode-se não somente alterar a biodisponibilidade na célula, mas também sua capacidade de ser eficientemente eliminada depois de sua ação, devido à facilidade dos sistemas de distribuição e excreção.

Quando se planeja a obtenção de compostos híbridos deve-se levar em consideração, a relação estrutura química atividade dos compostos assim como dos seus receptores (SANTOS, 2007).

A busca por novos LM prototipos ativos, em geral requer o planejamento de uma série de derivados híbridos moleculares. A utilização desta ferramenta para descoberta de novos fármacos antiinflamatórios permite a obtenção de compostos com atividade, por vezes, superior aos AINEs, capazes de atuar em processos

crônicos degenerativos como a doença de Alzheimer, conforme exemplo da figura 15 (ROCHA & VIEGAS-Jr, 2008).

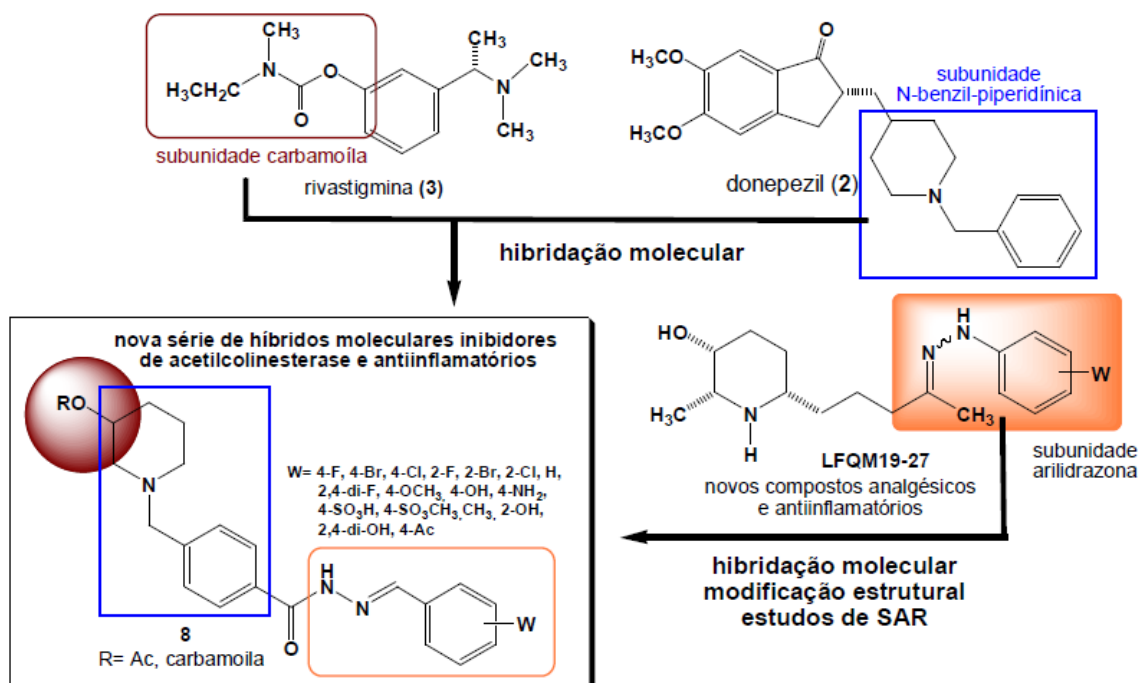


Figura 15. Construção de uma série de AINEs capazes de interferir no avanço da Doença de Alzheimer, inibindo a atividade da acetilcolinesterase (AChE), utilizando a técnica de hibridação (ROCHA & VIEGAS-Jr, 2008).

O processo de obtenção de híbridos está intimamente relacionado com a estratégia de obtenção de pró-fármacos recíprocos, sendo que a principal diferença está no fato de que os pró-fármacos devem ser hidrolisados para apresentarem ação biológica, enquanto que os híbridos podem atuar *per si* em seus receptores específicos, exercendo suas ações (figura 16).

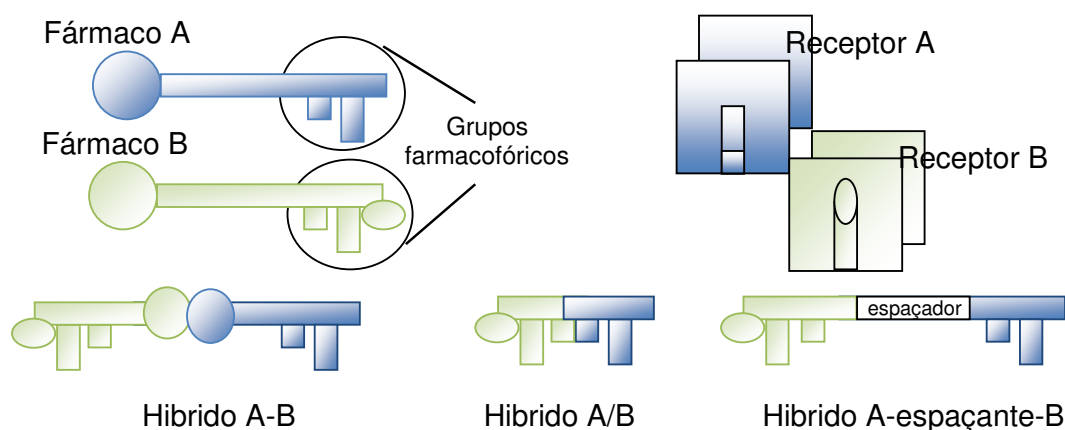


Figura 16. Representação da hidridação como estratégia de modificação molecular. O híbrido A-B é obtido através da ligação dos dois fármacos. O híbrido A/B, através da ligação dos dois grupos farmacofóricos ou pontos de interação com os receptores A e B e o híbrido A-espaçante-B, representa os dois grupos farmacofóricos ligados por meio de um agente espaçante.

A talidomida, um fármaco introduzido no Mercado farmacêutico em 1956 pela Chemie Grunenthal, indústria farmacêutica alemã, com atividade sedativa, comercializado com o nome de Contergan[®], teve em 1958, sua utilização expandida sendo para mulheres grávidas para o combate de náuseas. (TSENG et al, 1996; GROSSHANS & ILLY, 1984). Os efeitos teratogênicos provocados por este fármaco marcou o mundo. Este fato conhecido como a “*tragédia da talidomida*”, levou à sua retirada do mercado, em 1961 (TSENG et al, 1996).

Entretanto, em 1965, um dermatologista israelense chamado de Sheskin, para tratar seus pacientes portadores de hanseníase sofrendo por insônia, prescreveu talidomida. Por sua surpresa, observou que além dos efeitos hipnóticos, o fármaco foi capaz de atenuar as feridas (eritema nodoso) provocadas pelo *Mycobacterium leprae*. (GROSSHANS & ILLY, 1984; STIRLING, 1988; ORDI-ROS et al, 2000; LIMA et al, 2001; WANNMACHER, 2005).

De fato, os efeitos benéficos da talidomida podem ser atribuídos à sua atividade antiinflamatória, imunomoduladora e angiogênicas (BORGES & FROEHLICH, 2003).

O mecanismo de ação ainda não está totalmente esclarecido, entretanto, sabe-se que a talidomida é capaz de inibir a quimiotaxia de linfócitos e neutrófilos. Diminui, também, os níveis de citocinas como TNF- α e IFN- γ e estimula linfócitos T supressores. Além disso, observou-se que talidomida apresenta um papel na regulação dos linfócitos T auxiliares (TH₁ e TH₂), aumentando a produção de TH₂, das citocinas como IL-4 e IL-5 e inibindo a produção de linfócitos inflamatórios (TH₁) e da citocina IFN- γ , em células periféricas de sangue estimuladas por antígenos e mitógenos (TSENG et al, 1996, BORGES & FROEHLICH, 2003).

Apesar de a sua propriedade angiogênica estar sendo correlacionado com a sua eficácia no tratamento de alguns tipos de neoplasias, em julho de 1998, o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou a indicação da talidomida apenas para o tratamento do eritema nodoso lepromatoso (ENL). (MARRIOT et al, 1999).

A maioria dos pacientes com ENL apresenta febre, perda de peso, fraqueza muscular, nefrite, linfadenite, úlceras plantares, artralgias e leucocitose. Adicionalmente, podem desenvolver dores, nódulos eritematosos na pele e no tecido subcutâneo, o qual se acredita tratar de vasculite ou paniculite associado com deposição de complexo imune e elevados níveis de TNF- α e IFN- γ e a resposta da talidomida é expressiva, com taxas de resposta acima de 90 %, com melhora dentro de poucos dias e completa resolução em 2 semanas (LVER et al, 1971).

Em pesquisa clínica com pacientes com ENL, os efeitos adversos mais comuns relatados foram sonolência e constipação e todos os outros efeitos foram leves a moderados e não resultaram na interrupção do tratamento. A longo prazo mostrou redução das taxas de neurites e polineurites induzidas pela ENL (CALABRESE & FLEISCHER, 2000).

Apesar da aprovação pelo FDA para o tratamento somente da hanseníase, a talidomida tem sido indicada para o tratamento de várias outras doenças como a Síndrome de Behcet, o pioderma gangrenoso, lúpus eritematoso discóide e sistêmico, eritema multiforme, nevralgia pós-herpética, prurido urêmico, nodular e actínico, líquen plano, necrose epidérmica tóxica, infiltrado linfocítico de Jessner, histiocitose da célula de Langerhans em adulto, sarcoidose, doença enxerto versus doença do hospedeiro e estomatite aftosa (KYRIAKIS et al, 2000; AZULAY, 2004).

A talidomida mostrou ser benéfica, também, no tratamento da estomatite aftosa recorrente, uma doença ulcerativa muito comum da mucosa oral, caracterizada por dor e úlceras, devido à atividade em inibir o aumento da resposta quimiotóxica dos neutrófilos (HUTTON & RODGERS, 1987; RADOMSKY & LEVINE, 2001).

Além disso, devido aos seus efeitos imunomoduladores e antiangiogênicos, foram iniciados, em 1997, ensaios clínicos para o tratamento de mieloma múltiplo refratário. A resposta foi positiva não somente em refratários ou recaídos, mas também como terapia de indução e/ou de manutenção da remissão (BITTENCOURT, 2004). Nestes pacientes, a talidomida tem mostrado o aparecimento de alguns casos hipertensão pulmonar (ANTONIOLI et al, 2005) e mais raramente, com trombose arterial (FERRI et al, 2009)

A utilização da talidomida nos processos inflamatórios em doenças sem cura, graves e/ou de tratamento agressivo como o linfoma de células da zona do manto, tem sido reportada com sucesso (DAMAJ et al, 2003).

Sem dúvida alguma, a redescoberta da talidomida é um marco importante para a ciência, pois abre portas para a obtenção de novos compostos. Entretanto, a teratogenicidade e neurotoxicidade devem ser fatores de preocupação médica, sendo a correlação risco x benefício, avaliada.

Atualmente, vários grupos de pesquisa tem se esforçado no desenvolvimento de AINEs análogos da talidomida, para o tratamento de processos inflamatórios crônicos, a partir da técnica de hibridação molecular com o objetivo de melhorar as suas propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) e reduzir, principalmente, seus efeitos teratogênicos, procurando manter os grupos farmacofóricos e excluindo os toxicofóricos.

A teratogenicidade é o efeito mais deletério da talidomida. Devido a sua característica lipossolúvel, é capaz de atravessar a membrana placentária e causar danos irreversíveis, levando o feto a desenvolver anormalidades da orelha externa, oculares, malformações do trato gastrointestinal e genitourinário, provocar hipobastia dos ossos e até mesmo a ausência total dos ossos, com apenas uma dose de 50 mg (TSENG et al, 1996; CALABRESE & FLEISCHER, 2000; McBRIDE, 1977). A focomelia é observada com muita frequência com o uso de talidomida. O

encurtamento dos braços, pernas e a ausência de dedos nas mãos são comuns (figura 17).

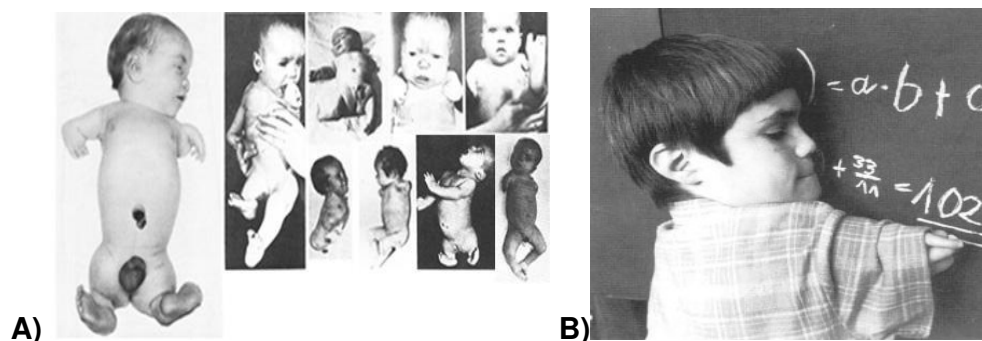


Figura 17. Recém nascido e criança com focomelia.

(Fonte: A) <http://dermatology.cdlib.org> e B) <http://www.quimicaorganica.net>)

Para minimizar o problema, nos EUA há um programa especial de educação na prescrição de talidomida segura para gestantes (*System for Thalidomide Education and Prescribing Safety*) [Website: <http://www.celgene.com/steps/>].

A talidomida não apresenta toxicidade aguda e a dose tóxica fatal é considerada virtualmente improvável, entretanto o aparecimento de neuropatia pode ser limitante para o prosseguimento do tratamento. A incidência do aparecimento de neuropatia é cerca de 11% e comumente ocorre quando a dose é superior a 200 mg diários. As reações de hipersensibilidade podem aparecer, tipicamente, 2 a 10 dias após o tratamento.

Atualmente, vários grupos de pesquisa tem se esforçado no desenvolvimento de análogos da talidomida com o objetivo de melhorar as suas propriedades farmacocinéticas e reduzir seus efeitos teratogênicos, procurando manter os grupos farmacofóricos e excluindo os toxicofóricos, visando a descoberta e desenvolvimento de novas moléculas para o tratamento de câncer e doenças imunológicas.

Os relatos da relação estrutura x atividade da talidomida e análogos revelaram o potencial farmacofórico do anel ftalimídico na atividade anti-TNF- α , mecanismo evidenciado como responsável pelos seus novos efeitos terapêuticos, ao mesmo tempo em que denotam a irrelevância do grupamento glutarimida, responsável pela toxicidade.

O planejamento de novos análogos da talidomida destituídos de teratogenicidade torna-se possível a partir dos estudos que relacionam o efeito teratogênico da talidomida com o grupamento glutarimida (figura 18) (LIMA et al, 2001).

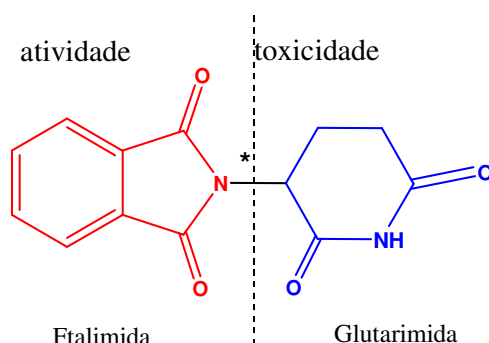


Figura 18. Molécula da talidomida, com seu grupo ftalimídico em vermelho e glutarimídico em azul.

LIMA e colaboradores (2002) demonstraram a atividade antiinflamatória do composto LASSBio-468 (Figura 19) apresentando a capacidade de inibir macrófagos quando estimulados com endotoxinas do tipo lipopolissacarídica (LPS) em até 72%, evidenciando a contribuição do grupo ftalimida em modular as ações do TNF- α .

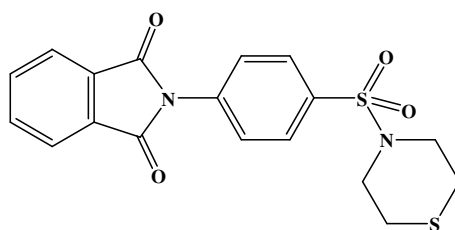


Figura 19: LASSBio-468 (LIMA et al, 2002).

Nos portadores de doenças inflamatórias crônicas, os níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α encontram-se elevados, o qual desencadeia uma série de alterações deletéricas como o desenvolvimento de doenças autoimunes, inflamatórias e imunopatológicas por exacerbar o processo inflamatório (AGGARWAL et al, 2002; SURYAPRASAD & PRINDIVILLE et al, 2003; KODAMAA,

DAVIS & FAUSTMAN, 2005; POPA et al, 2007; CLARK, 2007; KOCH et al, 2007; SCHENK et al, 2007).

Uma dessas doenças, a asma, acomete as vias aéreas com a participação de muitas células e elementos celulares, em particular, os mastócitos, eosinófilos, linfócitos T, macrófagos, neutrófilos e células epiteliais. O processo inflamatório instalado causa, também, um aumento associado da resposta exacerbada pré-existente dos brônquios a uma variedade de estímulos. Adicionalmente, evidências indicam que ocorre uma fibrose da membrana subendotelial que pode contribuir para as anormalidades da função pulmonar.

O tratamento mais potente e eficaz para a asma inclui o uso de corticosteróides (antiinflamatório esteróide, AIE), cromolina e nedocromila (dessensibilizantes antiinflamatórios), agonistas β_2 , metilxantinas e anticolinérgicos (NIH, 2009; ROTTIER & DUIVERMAN, 2009).

Com base nestes conhecimentos, híbridos com atividade dual, derivados de inibidores de TNF- α e AIEs foram obtidos com sucesso para o tratamento da asma, agindo de forma sinérgica no processo inflamatório (figura 20).

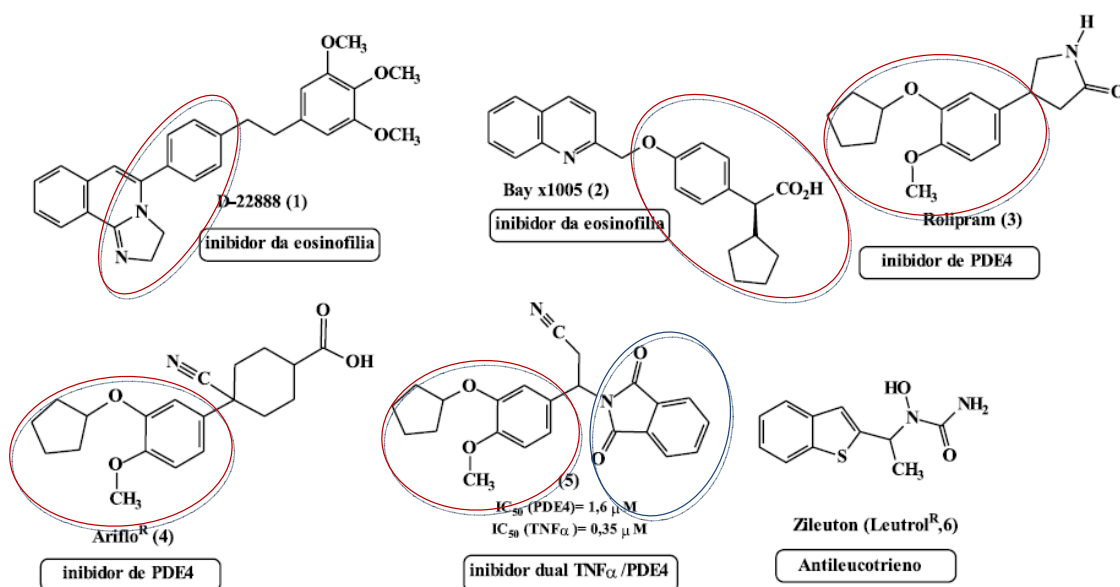


Figura 20. Antiasmáticos, em destaque o composto 5, sintetizado pela técnica de hibridação molecular, em vermelho grupo fármacofórico inibidor de prostaglandina PDE₄ e em azul o grupo ftalimídico inibidor de TNF- α (LIMA et al, 2002).

Os resultados os trabalhos demonstram a relevância terapêutica de fármacos anti-inflamatórios no controle da resposta asmática de fase tardia ou crônica, consagrando os inibidores de TNF- α como potenciais protótipos antiinflamatórios (figura 21).

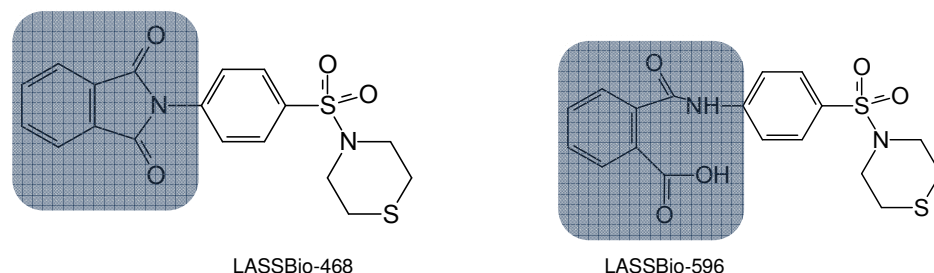


Figura 21. Protótipo antiasmático híbrido LASSBio-468 e seu metabolito ativo LASSBio-596 (adaptadbrio de LIMA & De LIMA, 2009).

Com base nestes estudos, Castro, em 2008, obteve uma série híbridos derivados de AINEs que levam em consideração somente o grupo ftalimídico. Assim sendo, compostos híbridos que poderão agir de maneira sinérgica, inibindo a COX₂ e citocinas inflamatórias como TNF- α com potencial atividade para doenças inflamatórias crônicas, como a artrite reumatóide e colite ulcerativa.

Os resultados desta pesquisa demonstraram a abolição da gastrotoxicidade provocada pelos AINEs, com a manutenção da atividade antiinflamatória em modelo de inflamação aguda, edema de pata de rato induzido por carragenina, o que levou ao depósito da patente INPI 020090033479, em parceria com a empresa Farmacêutica EMS-Sigma Pharma, em 2009. Da mesma forma que para os pró-fármacos taurínicos, a prova de conceito para doenças inflamatórias crônicas se faz necessária para o prosseguimento da pesquisa.

Entretanto, este planejamento representa uma inovação radical. A molécula, sendo totalmente nova, deve seguir todos os trâmites de pesquisa, incluindo os testes toxicológicos, o que prolonga o tempo de estudo, e aumenta a complexidade em relação a uma inovação incremental. Para as doenças crônicas, ainda não há na terapêutica, fármaco AINE destituído de reações adversas. Nesse sentido, caso as pesquisas confirmem os indicativos de atividade, será, também, uma revolução na

terapia antiinflamatória para doenças crônicas, o qual beneficiará milhões de indivíduos no mundo inteiro. A figura 22 mostra o esquema do planejamento e os compostos obtidos.

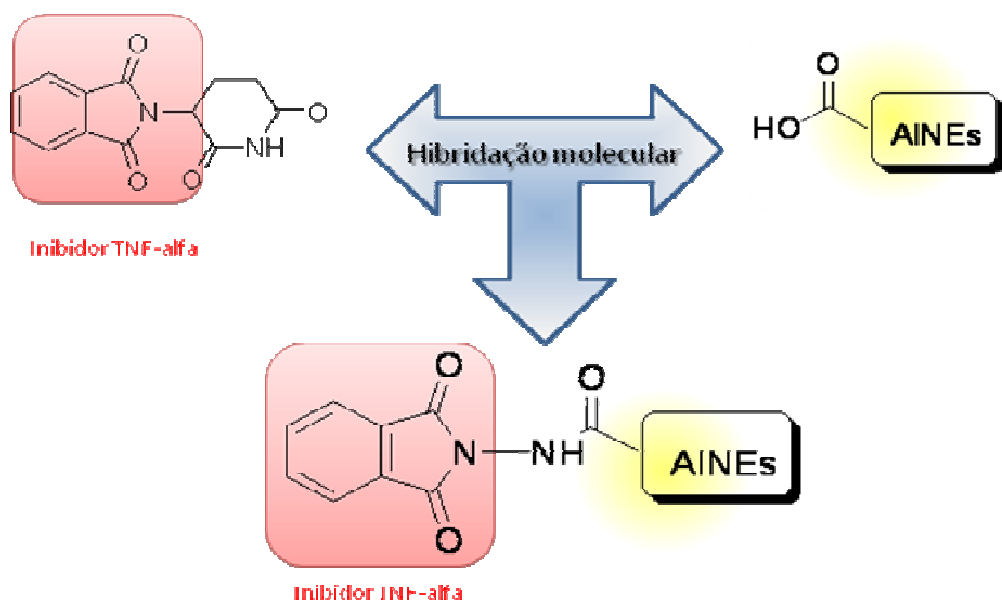


Figura 22. Hibridação molecular entre a subunidade ftalimidica da talidomida com os AINEs (AS, diclofenaco, naproxeno, ibuprofeno, cetoprofeno).

1.2. Processo inflamatório

A inflamação apresenta-se como uma resposta não específica, descrita desde 3000 a.C. pelos egípcios. Já no primeiro século d.C. havia registros dos sinais cardinais de inflamação, como rubor, tumor, calor, dor. Rudolf Virshow (1821-1905) adiciona a perda de função, como um quinto sinal cardinal da inflamação identificado como alteração inicial do fluxo sanguíneo, para o tecido lesado, resultante da dilatação arteriolar e abertura dos leitos capilares (ROBBINS, 2000). Os eventos vasculares caracterizam-se com o acúmulo de líquido extravascular, gerando o edema (BOGLIOLO, 2009).

Este diagrama ilustra as interações entre células do sistema imunológico e mediadores inflamatórios. No topo, o "sangue" contém "monócitos" e "neutrófilos". Os monócitos expressam o receptor "VCAM1", enquanto os neutrófilos expressam a "selectina". No centro, um "mastócito" libera "histamina", "prostaglandina" e "leucotrieno". À direita, um "macrófago" produz "IL-1, IL-6, TNF-alfa", "prostaglandina" e "leucotrieno". O macrófago também converte a "Larginina" em "iNOs" (óxido nítrico) e "ornitina - ureia". A "arginase" também atua na conversão da "Larginina". No canto superior direito, um box indica a "Ativação do sistema complemento" e a "Ativação do plaminogênio", ambas influenciadas pelo "tecido". Os mediadores "C3a e C5a" atuam sobre o mastócito e o macrófago. As "quimiocinas" atuam sobre os monócitos e neutrófilos. O "iNOs" produzido pelo macrófago atua sobre os neutrófilos, levando à formação de "iNO - citrulina".

Ao mesmo tempo, ocorre a ativação da fosfolipase A_2 que transforma os fosfolípidos de membrana em ácido araquidônico (AA), sendo substrato inicial para a cascata enzimática, que alimenta a inflamação (figura 24).

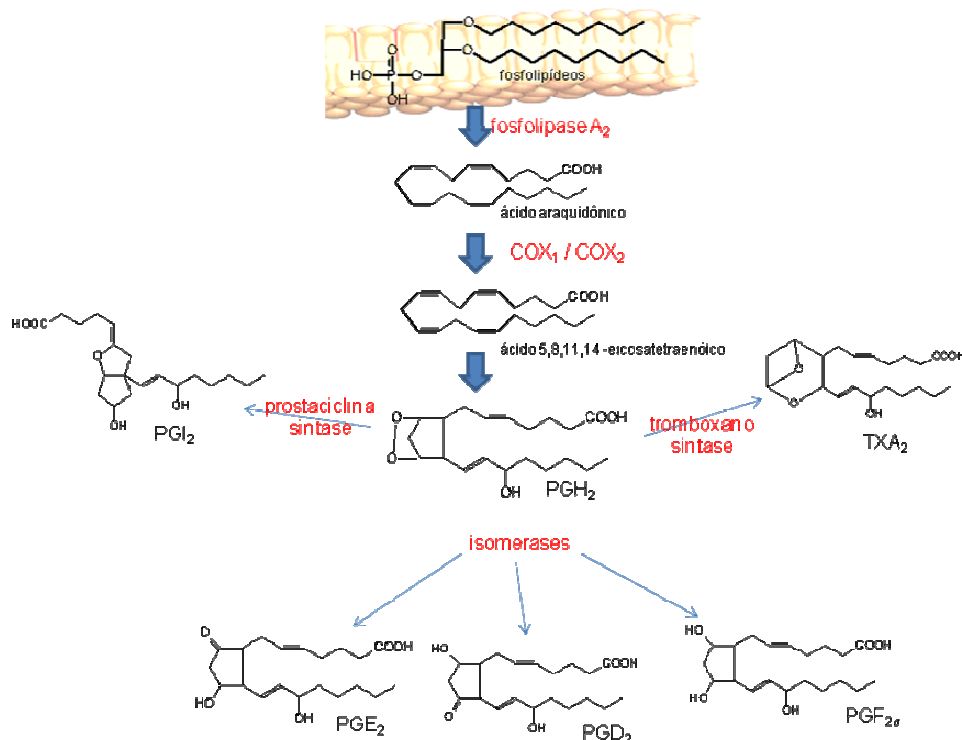


Figura 24. Cascata do ácido araquidônico.

O objetivo do sistema imune é mediar uma resposta inata a fim de destruir e fagocitar os agentes agressores, e caso haja sucesso, o estímulo é bloqueado. Quando a relação de tempo é sustentada ocorre a transição do processo agudo para o crônico (MONTENEGRO, 1999).

O processo inflamatório está envolvido em uma série de situações, incluindo o envelhecimento. Recentemente, pesquisadores sugeriram uma interrelação do envelhecimento do tecido hematopoético, TNF- α e artrite reumatóide. (WILLIAMS-SKIPP et al, 2009). Outros processos de agressão progressiva no envelhecimento por estresse oxidativo e inflamação gerando falha renal (PUCHADES et al, 2009), não poderiam ser tratados com AINEs tradicionais devido seus efeitos vasculares adversos que incluem a própria nefrototoxicidade associada a outros tratamentos, porém a utilização de inibidores de iNOS e TNF- α se tornam atraentes.

Na doença de Alzheimer o potencial terapêutico está intimamente relacionado com o log P do fármaco, como requisito para atravessar a barreira

hematoencefálica (BHE) e, sabendo da participação do processo inflamatório no envelhecimento cerebral e a formação de placa β -amilóides, foram sintetizados pró-fármacos de amantadina com AINEs (PRINS et al, 2009).

A intima participação da inflamação na sinalização e transdução de mediadores oncogênicos gerando certos tipos de câncer (AGGARWAL et al, 2009), é mais um motivo de alvo de estudo deste processo.

Na estenose de valva aorta, insuficiência cardíaca congestiva, infarto, estão envolvidos complicações multifatoriais que podem estar ligadas a uma doença inflamatória crônica, a aterosclerose. Neste sentido, foram sintetizados híbridos como potencial ativador do receptor de adenosina (A_2AR), protegendo a deficiência de apolipoproteína E, e AINEs tendo em vista o papel central da inflamação (WANG, et al, 2009).

Com efeito, a viabilização desta ferramenta imunológica ocorre com a participação de sinalizadores antiinflamatórios e pró-inflamatórios e a inter-relação determina o processo saúde-doença.

A inflamação crônica é seguida de danos e reparos mal sucedidos, em que se observa a incapacitação do órgão acometido; apresentando leucócitos da linhagem mielóide como macrófagos, e da linhagem linfóide como linfócitos T, linfócitos B e plasmócitos. Nestas situações, reações imunes são criadas contra os próprios tecidos, então os auto-antígenos resultam em uma reação autoperpetuadora, como mostra a figura 25 (COTRAN & BRISCOE, 1997).

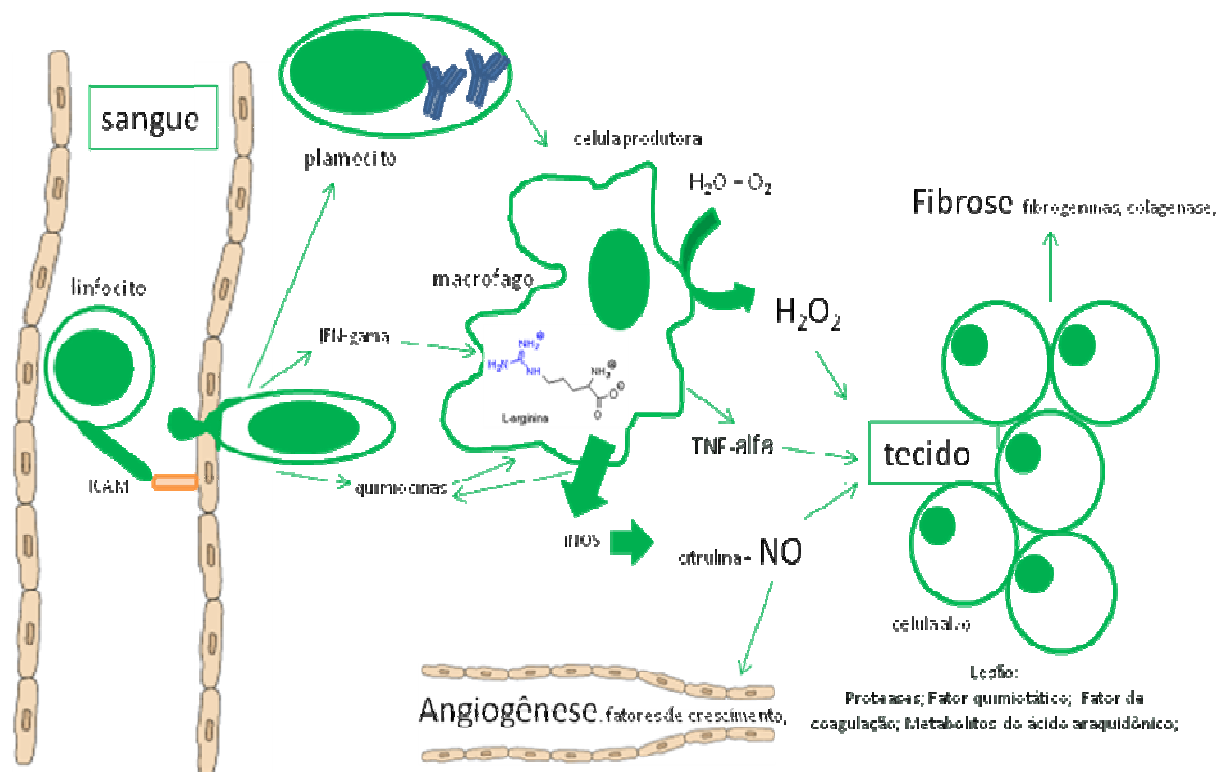


Figura 25. Mecanismo e participação de mediadores químicos e celulares no processo de inflamação crônica.

O processo inflamatório crônico pode ser tratado por diferentes intervenções terapêuticas, visto sua complexidade e a diversidade de mediadores fisiológicos envolvidos (BARREIRO et al, 2001). No quadro 1 constam as principais: diferenças entre o estágio agudo e crônico.

Quadro 1. Diferenças entre o processo inflamatório agudo e crônico.

	INFLAMAÇÃO AGUDA	INFLAMAÇÃO CRÔNICA
Duração	Curta (dias)	Longa (semanas, meses a anos)
Início	Agudo	Insidioso
Especificidade	não específica	Específica (se resposta imunitária ativada)
Células Inflamatórias	neutrófilos e macrófagos	Macrófagos, linfócitos, plasmócitos e fibroblastos
Alterações Vasculares	Vasodilatação	Neovascularização
Sinais Cardinais	Presente	Ausente
Fibrose (deposição de colagénio)	Menor frequência	Presente
Manifestações Sistêmicas	Ausente	Presente
Alterações Sangue Periférico	Fatores plasmáticos: complemento e imunoglobulinas, com febre habitualmente alta, neutrocitose e linfocitose (vírus).	Fagocitose, resposta imunitária, reparação (tecido de granulação), febre baixa, perda de peso, anemia com variáveis alterações nos leucócitos e aumento das imunoglobulinas.

fonte: ROBBINS, 2000; BRASILEIRO-FILHO, 2009.

No processo inflamatório, os lipídeos presentes na membrana celular são biologicamente convertidos em sinalizadores, que se decompõem depois de cessado o estímulo (SERHAN, HAAEQSTROM & LESLIE, 1996).

O AA ou 5, 8, 11,14-ácido eicosatetraenóico, é oriundo de fontes alimentares e da conversão do ácido linoléico (Ômega 6), não se apresenta livremente intracelular (citoplasma), sendo esterificado em fosfolipídeos de membrana. É liberado pela ação da fosfolipase A₂ por estímulos mecânicos, químicos, físicos ou ainda por outros mediadores como o sistema complemento (BOZZA et al, 1997).

Quando da ativação da cascata do A.A, os seus metabólitos são sintetizados por duas principais vias enzimáticas, as cicloxigenases (**COX**) ou **PGHS** (Prostaglandina Sintetase ou Prostaglandina Endoperóxido Sintetase) que geram prostaglandinas (**PG**) e tromboxanos (**TX**), e as lipoxigenases produzindo leucotrienos (**LTC**) e lipoxinas. A primeira pode ser inibida por AINES e a segunda por corticóides que irão inibir toda a cascata do AA, por ação indireta na inibição da fosfolipase A₂ (OKUYAMA & AIHARA, 1986).

A COX na sua isoforma 1 é expressa constitutivamente, presente em condições fisiológicas em todos os tecidos do organismo, principalmente em plaquetas, o qual leva a formação de TXA₂. Também é encontrada na mucosa gástrica, onde catalisa a biosíntese de PG citoprotetoras, e no endotélio vascular e tecido renal (RAZ et al, 1989; VANE et al, 1998; HOWARD & DELAFONTAINE, 2004).

A isoforma 2 (COX₂ ou PGHS₂) é induzível na presença de citocinas (IL-1, IL-2 e do TNF- α , fatores de crescimento e endotoxinas, sendo expressa caracteristicamente por células envolvidas no processo inflamatório, como macrófagos, monócitos e sinoviócitos (VANE et al, 1998; KUMMER & COELHO, 2002; CARVALHO et al, 2004).

Por exemplo, os tecidos sinoviais de pacientes com artrite reumatóide expressam altas taxas de COX₂. Em modelos animais de artrite, a expressão de COX₂ aumenta em paralelo com a produção de PG e inflamação clínica. Em experimentos *in vitro*, revelaram um aumento de COX₂ após a estimulação com citocinas pró-inflamatórias em vários tecidos como sinoviócitos, condrócitos, osteoblastos, monócitos e macrófagos. A COX₂ está aumentada em alguns tipos de neoplasias, particularmente no cancer de cólon. Os mecanismos desta interrelação da “super expressão” e potencial neoplásico incluem a resistência à apoptose (Crofford, 1997)

Por outro lado, evidências mostram a existência de COX₂ constitutivo nos rins e miocárdio e o seu papel fisio e patológico no coração ainda encontra-se em investigação (WANG & STREICHER, 2008; KWAK et al, 2009)

Trabalhos de CHANDRASEKHARAN e colaboradores, em 2002, descrevem uma terceira isoforma, possível variante da COX₁, pois é derivada do mesmo gene

dessa isoforma, denominada de COX₃, o qual encontra-se distribuída principalmente no córtex cerebral, medula espinhal e coração, sendo mais sensível ao paracetamol, sugerindo que a inibição da COX₃ poderia representar o mecanismo central primário de analgesia promovida pelos AINEs (CHANDRASEKHARAN et al, 2002; CARVALHO et al, 2004).

Por outro lado, o metabolismo de ácidos graxos Ômega 3, como o docosahexaéico (DHA), tem apresentado um efeito anti-oxidante e antiinflamatório, agindo na retroalimentação negativa das cascatas inflamatórias (PARK, LIM & KIM, 2009). O esquema da figura 26 mostra a cascata pró-inflamatória e antiinflamatória.

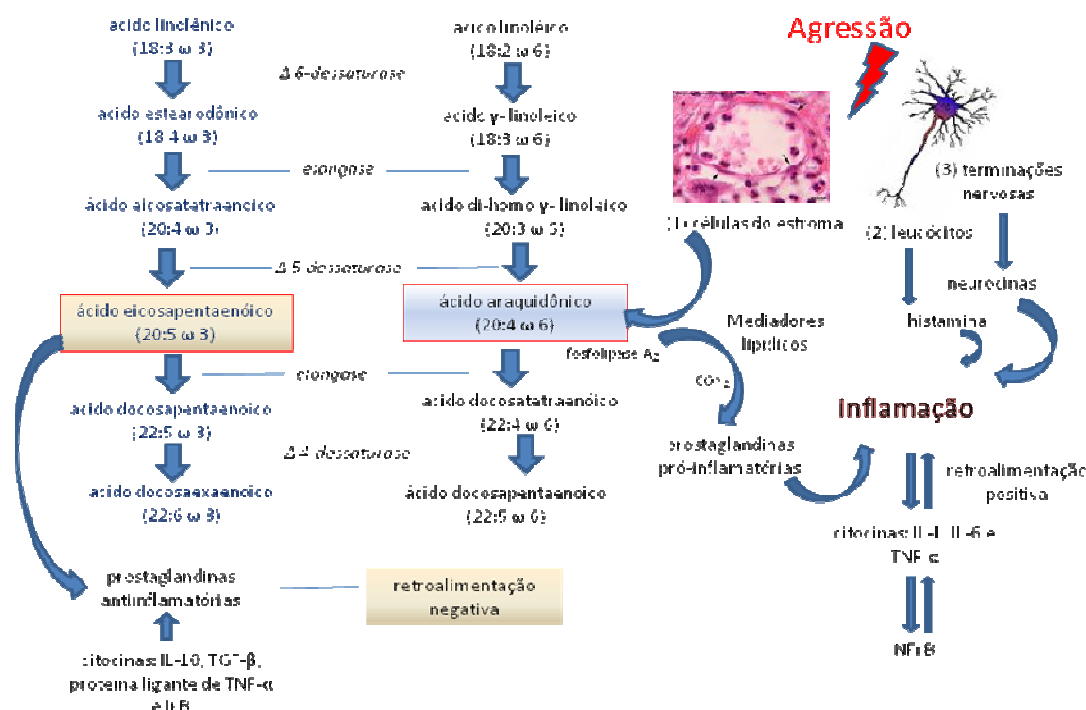


Figura 26. Geração de metabólitos do ácido araquidônico (AA) e do ácido docosaexaenico (DHA). Em (1) ocorre a desestabilização da bicamada lipídica celular com exposição do AA, que será substrato da COX₂ formando prostaglandinas. Em (2) ocorre o recrutamento das células do sistema imune, com a degranulação de histamina. Em (3) ocorre a sensibilização de nociceptores com liberação tissular de neurocininas, alimentando a inflamação. (adaptado de BRASILEIRO-FILHO, 2009)

A atividade celular torna-se competente ao inibir ou estabilizar principalmente fatores nucleares pró-inflamatórios como o NFκB e TNF-α, como exemplo a

transcrição de uma proteína ligante de TNF- α , e a expressão de I κ B ligante de NF κ B (LANTZ et al, 1990).

A ativação do sistema nervoso autônomo parassimpático tem efeito dose dependente em bloquear citocinas pró-inflamatórias (HANSEN, 2001), bem como o sistema neuroendócrino ao influenciar o sistema imune, ativando ou inibindo com a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (BLALOCK, 1994).

Como é possível observar, o processo inflamatório está presente em diversas doenças como também no processo de envelhecimento, e seu mecanismo é extremamente complexo. Dessa forma a existência de substâncias que possam bloquear tal processo, torna-se *escandalosamente milionária* para as Indústrias farmacêuticas.

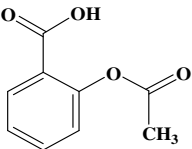
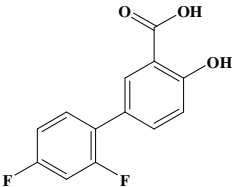
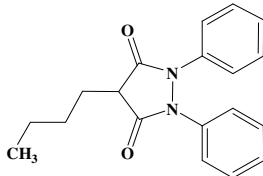
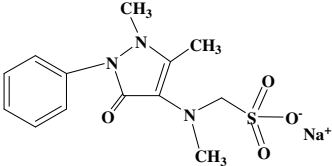
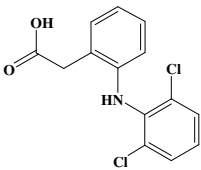
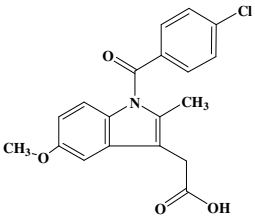
No entanto, apesar de todos os esforços, no mercado farmacêutico, estima-se a existência de mais de 50 AINEs diferentes, nenhum deles é ideal no controle ou na modificação dos sinais e sintomas da inflamação ou mesmo destituído de potencial reação adversa (RANG, DALE & RITTER, 2001; SOUZA & FERRÃO, 2006).

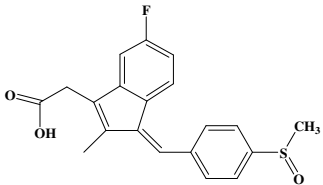
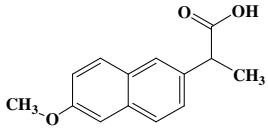
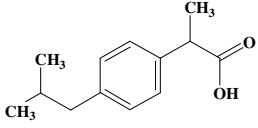
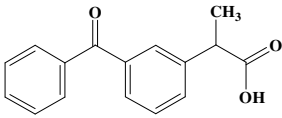
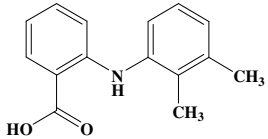
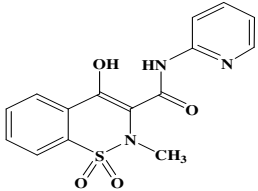
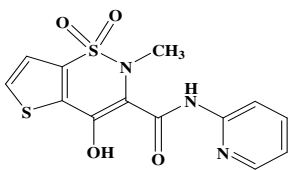
A utilização dos AINEs está associada ao risco de efeitos adversos gastrintestinais, devido à inibição não seletiva das COXs. (DUBOIS et al, 2004). No estômago, as PGs são essenciais para a proteção e manutenção de fluxo sanguíneo da mucosa, promovendo controle negativo na liberação ácida, com estimulação da secreção de bicarbonato e muco. Além disso, é responsável por promover a regulação das células de movimento e reparação da mucosa (HAWKINS & HANKS, 2000).

No caso da aspirina, o dano da mucosa gástrica é incrementado pelo efeito direto por inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial, causando erosões da mucosa e hemorragias podem ser observadas após 90 minutos de ingestão de um único comprimido (HAWKINS & HANKS, 2000).

No quadro 2 encontram-se exemplos de fármacos AINEs não seletivos enquanto a figura 27, de AINES seletivos COX₂.

Quadro 2. Classificação dos AINEs não seletivos.

CLASSIFICAÇÃO DOS AINEs		
CLASSE	FÁRMACOS	ESTRUTURAS
SALICILATOS	ácido acetil salicílico	
	diflunisal	
PIRAZOLONA	fenilbutazona	
	dipirona	
ÁCIDO FENILACÉTICO	diclofenaco	
INDOLACÉTICO	indometacina	

	sulindaco	
ÁCIDO PROPIONICO	naproxeno	
	ibuprofeno	
	cetoprofeno	
ÁCIDO FENILANTRANÍLICO	ácido mefenâmico	
ÁCIDO ENÓLICO	piroxicam	
	tenoxicam	

Fonte: Castro, 2008

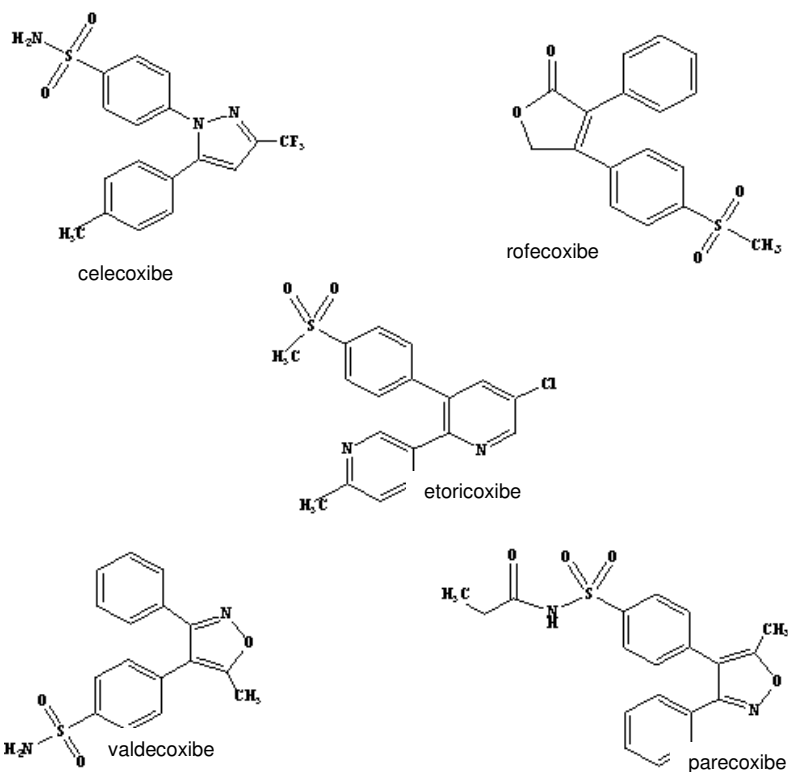


Figura 27. Exemplos de AINEs seletivos COX₂

Com o advento de fármacos AINEs mais seletivos (COX₂), observou-se, após larga utilização, o aparecimento dos efeitos adversos cardíacos. Segundo Brasileiro-Filho (2009), novos fármacos antiinflamatórios deverão conter propriedades de bloquear a adesão e migração de leucócitos, interferirem na expressão, síntese ou liberação de citocinas, sobretudo NO e TNF- α .



OBJETIVO

2. OBJETIVO

Avaliar os derivados de AINEs obtidos pelo do processo de latenciação, com características imunomoduloras sobre a inibição de iNOS e derivados de AINEs obtidos pelo processo de hibridação, com caracterísitcas duais em inibição de COX e TNF- α , como novos protótipos candidatos a fármacos para tratamento de doenças inflamatórias aguda e crônico.

2.1. Objetivos específicos:

- Avaliar a atividade antiinflamatória dos compostos ftalimídicos e taurínicos em modelo de inflamação aguda e crônica;
- Avaliar a atividade analgésica periférica dos derivados ftalimídicos;
- Avaliar da gastrototoxicidade dos compostos ftalimídicos e taurínicos;
- Avaliar os efeitos tóxicos do tratamento agudo e crônico com os compostos ftalimídicos e taurínicos.



MATERIAL & MÉTODOS

3. MATERIAL & MÉTODOS

3.1. MATERIAL

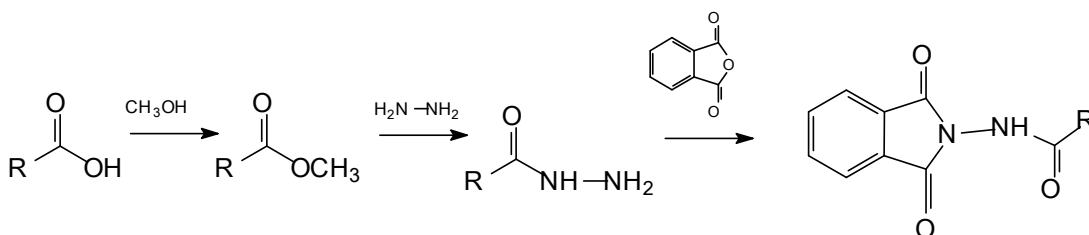
3.1.1. Reagentes e Solventes

Acetato de etila P.A. (Synth), ácido acético glacial P.A. (J. T. Baker); ácido sulfúrico P.A. (Merck); anidrido ftálico (J. T. Baker); bicarbonato de sódio (Synth); clorofórmio (Synth); diclofenaco (Galena); diclorometano P.A. (Synth); dietilcianofosfanato (DEPC), hidrato de hidrazina 25% (J. T. Baker), hidróxido de sódio (Synth); sulfato de sódio anidro (Synth), metanol P.A. (Merck); cetoprofeno (Galena), salicílico (Galena); ibuprofeno (Galena); indometacina (Galena), naproxeno (Galena); taurina (Ajinomoto), mesalazina (Purifarma), sulfassalazina (Purifarma)

3.2. MÉTODOS

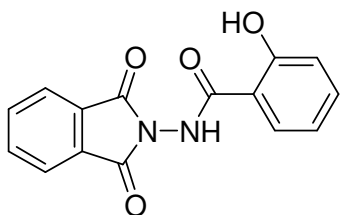
3.2.1. Preparação dos compostos AINE-*ftd* e AINE-*tau*.

Os compostos *as-ftd*, *nap-ftd*, *dic-ftd*, *ibu-ftd*, *ceto-ftd* e *as-tau*, *nap-tau*, *ibu-tau*, *indo-tau*, *dic-tau*) utilizados neste trabalho foram preparados segundo os métodos estabelecidos por Castro (2008) e Vizioli (2006), para obtenção de massa para os testes biológicos. As análises de identificação foram realizadas pela Central Analítica – IQ-USP, SP, utilizando-se equipamento de RMN da marca Brüker modelo DRX 400. no intuito de confirmação estrutural.



Esquema 1. Método de reação geral para preparação dos compostos AINE-*ftd*.

3.2.1.1. Preparação de *AS-ftd* (*N*-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)-2-hidroxibenzamida):



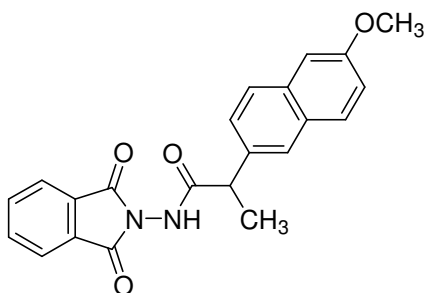
AS-ftd

salicilato de metila: reagiu-se o ácido salicílico (0,1 mol) com 40 mL de metanol anidro em presença de ácido sulfúrico conc (8 gotas), sob refluxo, por 5 horas. O excesso de solvente foi eliminado por evaporação rotatória e resfriamento, o resíduo formado foi adicionado a 10 mL de tetracloreto de carbono, neutralizado com solução saturada de bicarbonato de sódio. A mistura foi lavada com água e a fase orgânica recolhida e seca com sulfato de sódio anidro, seguida de destilação do filtrado sob pressão reduzida. Rendimento: 70%. Produto oleoso, com características (odor) do salicilato de metila.

salicilato de 2-hidroxibenzohidrazida: reagiu-se 77,5 mol de salicilato de metila (10 mL) com 50 mL de metanol e 31 mL de hidrato de hidrazina a 25%, em refluxo (70 °C) por 16 horas. Após o resfriamento, filtrou-se o sólido branco formado. Rendimento: 90%.

Híbrido *as-ftd*: reagiu-se 3,28 mmol de salicilato de 2-hidroxibenzohidrazida, 15 mL de ácido acético glacial e 3,28 mmol de anidrido ftálico, a 130 °C e agitação por 3 horas. Após resfriamento, o produto formado foi filtrado e lavado com água. Rendimento: 85%. RMN ¹H (400MHz; DMSO-d): δ 6,99-7,08 (H2 e H4; 2*H*); 7,51 (H3; *ddd*; 1*H*; *J*_{orto}=8,36 Hz e *J*_{meta}=1,71 Hz); 7,94 (H5; *dd*; 1*H*; *J*_{orto}=7,85 Hz e *J*_{meta}=1,71 Hz); 7,96 (H8; *m*; 2*H*; *J*_{orto}=8,7 Hz e *J*_{meta}=2,73 Hz); 8,02 (H7; *m*; 2*H*; *J*_{orto}=8,7 Hz e *J*_{meta}=2,73 Hz); 11,10 (H1 ou H6; 1*H*) ppm. RMN ¹³C (400MHz; DMSO-d6): δ 166,35; 165,47; 158,15; 135,6; 134,94; 130,14; 129,73; 124,03; 119,81; 117,46; 115,3 ppm.

3.2.1.2. Preparação de de *nap-ftd* (*N*-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)-2-(6-metoxi-2-naftil)propanamida):



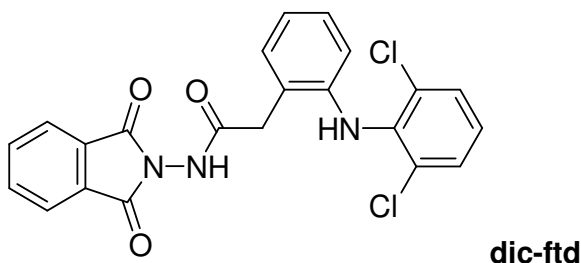
nap-ftd

metil 2-(6-metoxi-2-naftil)propanoato: reagiu-se 3 mmol de naproxeno com 50 mL de metanol anidro e ácido sulfúrico conc (2 gotas), sob refluxo, por 6 horas. O produto formado após resfriamento foi separado por filtração e lavado com água. Rendimento: 95%.

2-(6-metoxi-2-naftil)propanohidrazida: reagiu-se 3 mmol de metil 2-(6-metoxi-2-naftil) propanoato, com 50 mL de metanol e 8 mL de hidrazina a 25%, sob refluxo, por 24 horas. Após resfriamento, o produto formado foi separado por filtração e lavado com água. Rendimento: 76%.

Híbrido *nap-ftd*: reagiu-se 1,63 mmol de 2-(6-metoxi-2-naftil)propanohidrazida com 10 mL de ácido acético glacial e 1,63 mmol de anidrido ftálico, sob refluxo a 130 °C por 3 horas. Após resfriamento com banho de gelo, o pH da reação foi mantido a 7,0, com NaOH 20%, para a formação de um precipitado amarelo claro. O produto formado foi filtrado e lavado com água. Rendimento: 80%. RMN ¹H (400MHz; DMSO-d₆): δ 1,53 (H₄; *d*; 3*H*); 3,88 (H₁₂; *s*; 3*H*); 4,06 (H₅; *q*; 1*H*); 7,18 (H₁₁; *dd*; 1*H*; *J*_{orto}=8,87 Hz e *J*_{meta}=2,56 Hz); 7,32 (H₉; *d*; 1*H*; *J*_{meta}=2,56 Hz); 7,52 (H₆; *dd*; 1*H*; *J*_{orto}=8,53 Hz e *J*_{meta}=1,54 Hz); 7,82 (H₇, H₈ e H₁₀; *d*; 3*H*); 7,94 (H₁ e H₂; 4*H*); 10,89 (H₃; *s*; 1*H*) ppm. RMN ¹³C (400MHz; DMSO-d₆): δ 173,03; 157,21; 135,9; 135,26; 133,37; 130,6; 129,48; 129,21; 128,41; 126,88; 126,36; 125,64; 123,7; 118,74; 105,76; 55,19; 42,95; 18,73 ppm.

3.2.1.3. Preparação de dic-ftd (2-{2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}-N-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)acetamida):



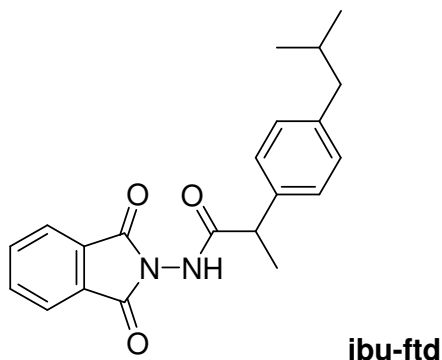
acetato de metil {2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}: reagiu-se 1,68 mmol de diclofenaco, 40 mL de metanol e ácido sulfúrico concentrado (3 gotas). A reação foi mantida sob refluxo por 6 horas. Resfriou-se a reação adicionando-se cerca de 4 mL de gelo e neutralizando a reação com solução de bicarbonato de sódio saturada. O precipitado formado foi filtrado e lavado com água. Rendimento de 90%.

2-{2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil}acetohidrazida: reagiu-se 1,61 mmol de acetato de metil {2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil} com 20 mL de metanol de 6 mL de hidrato de hidrazina a 25%, sob refluxo, por 24 horas. Após o qual se adicionou cerca de 4 mL de gelo. A mistura reacional foi mantida em geladeira por 8 horas para formação de precipitado branco, o qual foi filtrado por pressão reduzida e lavado com água. Rendimento: 90%.

Híbrido dic-ftd: reagiu-se 3,22 mmol de 2-{2-[(2,6-diclorofenil)amino] fenil} acetohidrazida com 3,22 mmol de anidrido ftálico e 7 mL de ácido acético glacial, mantendo a reação sob agitação e refluxo por 4 horas. Após resfriamento, o produto formado foi filtrado sob pressão reduzida e lavado com água. Rendimento: 96%.

RMN ^1H (400MHz; DMSO- d_6): δ 11,1 (N-H; 1H); 7,95 (m; 4H); 7,52 (dd; 1H); 7,50 (dd; 1H); 7,46 (d; 1H); 7,31 (N-H; d); 7,17 (ddd; 1H); 7,08 (ddd; 1H); 6,91 (ddd; 1H); 3,82 (s; 2H) ppm. RMN ^{13}C (400MHz; DMSO- d_6): δ 170,68; 164,81; 142,77; 136,96; 135,20; 129,37; 129,06; 123,84; 123,70; 120,79; 115,99; 36,39 ppm.

3.2.1.4. Preparação de *ibu-ftd* (*N*-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2H-isoindol-2-il)-2-(4-isobutilfenil)propanamida):

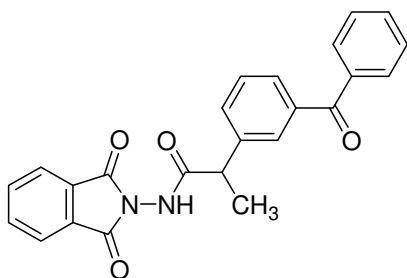


2-(4-isobutilfenil)propanoato de metila: reagiu-se 1,45 mmol de ibuprofeno com 20 mL de metanol e ácido sulfúrico conc (2 gotas), sob agitação, à temperatura ambiente por 24 horas. O solvente foi evaporado por pressão reduzida, obtendo um sólido branco. Rendimento 90%.

2-(4-isobutilfenil)propanohidrazida: reagiu-se 1,45 mmol de 2-(4-isobutilfenil)propanoato de metila com 20 mL de metanol e 10 mL de hidrato de hidrazina a 25%, sob agitação a 50 °C por 24 horas. Após o qual foi adicionado cerca de 4 mL de gelo. O precipitado formado foi filtrado e lavado com água gelada. Rendimento 55%.

Híbrido ibu- ftd: reagiu-se 1,45 mmol de 2-(4-isobutilfenil) propanohidrazida com 1,45 mmol de anidrido ftálico e 7 mL de ácido acético glacial, em refluxo por 5 horas. Após o qual foi resfriado e neutralizado (pH = 7) com solução de NaOH 20%. O precipitado formado foi filtrado e lavado com água. Rendimento: 78% RMN ¹H (400MHz; DMSO-d₆): δ 0,86 (H1; d; 6H); 1,39 (H7; d; 3H); 1,81 (H2; m; 1H); 2,41 (H3; d; 2H); 3,64 (H6; q; 1H); 7,11 (H4; dd; J= 8,0 Hz; 2H); 7,19 (H5; dd; J= 8,0 Hz; 2H); 7,89 (H10; m; J= 9,2 Hz; 2H); 7,94 (H8; s; 1H); 8,11 (H9; m; 2H) ppm. RMN ¹³C (400MHz; DMSO-d₆): δ 173,22; 172,52; 154,99; 139,84; 138,11; 135,39; 132,7; 129,57; 129,08; 128,98; 127,42; 127,23; 127,17; 125,32; 123,8; 44,34; 29,71; 22,97; ppm.

3.2.1.5. Preparação de *ceto-ftd* (2-(3-benzoilfenil)-*N*-(1,3-dioxo-1,3-diidro-2*H*-isoindol-2-il)propanamida):



ceto-ftd

2-(3-benzoilfenil) propanoato de metila: reagiu-se 1,96 mmol de cetoprofeno com 50 mL de metanol e ácido sulfúrico concentrado (2 gotas), a 50 °C, por agitação por 8 horas . O solvente foi eliminado sob pressão reduzida, obtendo-se um produto sólido amorfo de coloração branca com rendimento de 90%.

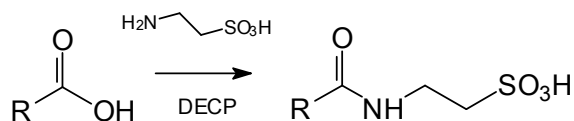
2-(3-benzoilfenil) propanohidrazida: reagiu-se 1,86 mmol de 2-(3-benzoilfenil) propanoato de metila com 50 mL de metanol e 9 mL de hidrato de hidrazina a 25%, sob refluxo por 24 horas. O solvente foi eliminado sob pressão reduzida, seguida da adição de cerca de 4 mL de gelo, formando um precipitado branco, o qual foi filtrado e lavado com água. Rendimento 75%.

Híbrido *ceto-ftd*: reagiu-se 1,86 mmol de 2-(3-benzoilfenil)propanohidrazida com 10 mL de ácido acético glacial e 1,86 mmol de anidrido ftálico, sob agitação, à 130 °C, por 5 horas. Após o qual a mistura foi resfriada com banho de gelo e neutralizada (pH = 7) com solução de hidróxido de sódio 20%. O precipitado formado foi filtrado e lavado com água. Rendimento: 65%. RMN ¹H (400 MHz; DMSO-d₆): δ 1,45 (d; 3H); 4,01 (s; 1H); 7,58 (dd; 1H; J_{orto} = 8,1 Hz); 7,66 (dd); 7,78 (dd); 7,94 (m); 8,13 (m; 2H); 8,07 (m; 2H) 9,16 (s; 1H) ppm.

Método geral de preparação dos AINES-tau

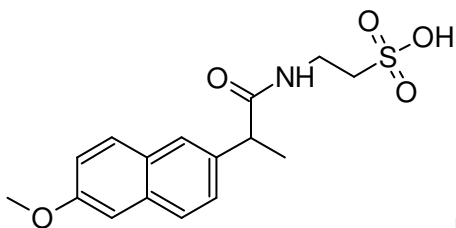
Reagiu-se 1 mol de AINE solubilizado em DMF previamente seca sob peneira molecular. Adiciona-se sequencialmente, em banho de gelo, 0,9 ml de dietilcianofosfonato (DEPC), 1,2 mol de taurina e 7,8 mL de trietilamina previamente seca sob peneira molecular. A reação é mantida por 2 horas sob agitação a temperatura ambiente.

Ao final da reação, o excesso de base é removido através de arraste por nitrogênio, e o restante é tratado com clorofórmio, filtrado e o solvente eliminado por evaporação à pressão reduzida. O resíduo obtido é adicionado, em pequenas porções, sobre uma solução aquosa saturada e gelada de NaHCO_3 . O precipitado formado é recolhido por filtração, lavado com pequena porção de água gelada e seco sob pentóxido de fósforo. A massa seca obtida é triturada sob THF sendo o resíduo sólido filtrado e seco, conforme esquema a seguir.



Esquema 2. Método de reação geral para preparação dos compostos AINE-tau.

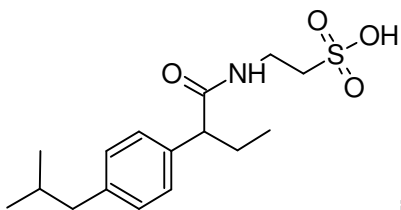
3.2.1.6. nap-tau (ácido 2-[[2-(6-metoxi-2-naftil) propanoil]amido} etanosulfônico):



nap-tau

RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6): 1,37 (3H, d, $J = 6,90$); 2,67 (2H, t, $J = 7,15$); 2,94 (3H, s); 2,96 (2H, t, $J = 7,15$); 3,66 (1H, q, $J = 6,90$); 6,59 (2H); 7,10 (1H, dd, $J = 5,10$; $J = 1,66$); 7,25 (1H, d, $J = 8,08$); 7,43 (1H, dd, $J = 9,26$ $J = 4,29$); 7,68 (1H, dd, $J = 8,08$ $J = 5,10$); 7,73 (1H, d, $J = 4,29$); 8,09 (1H, d, $J = 9,26$) e RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO-d_6): 19,4; 36,5; 55,2; 46,8; 40,2; 105,7; 106,8; 118,4; 125,3; 129,0; 132,9; 138,9; 149,3; 154,0; 156,8; 176,7.

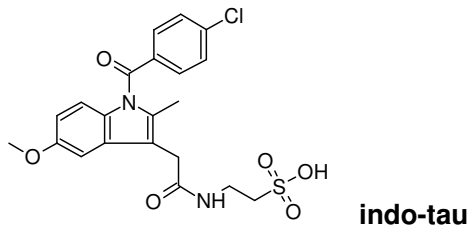
3.2.1.7. ibu-tau (ácido 2-[[2-(4-isobutilfenil) propanoil] amido} etanosulfônico)):



ibu-tau

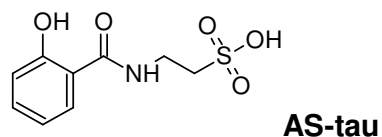
RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6): 0,85 (6H, d, $J = 6,85$); 1,27 (3H, d, $J = 7,36$); 1,78 (1H, hept., $J = 6,85$); 2,38 (2H, d, $J = 7,38$); 2,63 (2H, t, $J = 7,15$); 2,92 (2H, t, $J = 7,15$); 3,44 (1H, q, $J = 7,36$); 3,70 (2H); 6,58 (1H, dd, $J = 5,12$ $J = 1,65$); 7,02 (1H, dd, $J = 5,12$ $J = 1,65$); 7,17 (1H, dd, $J = 5,12$ $J = 1,65$); 8,10 (1H, dd, $J = 5,12$ $J = 1,65$) e RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO-d_6): 19,3; 22,1; 29,6; 36,6; 44,2; 46,3; 50,2; 106,6; 127,0; 128,4; 138,4; 140,8; 149,2; 176,5.

3.2.1.8. *indo-tau* (ácido 2-[[4-clorobenzamida-5-metoxi-2-metil-indol] 3-acetil] amido} etanosulfônico):



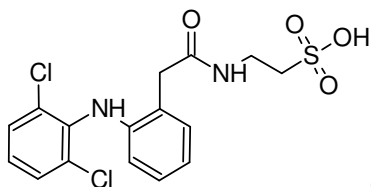
RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6): 2,17 (3H, s); 2,50 (2H, s); 2,66 (2H, t, $J = 7,15$); 2,95 (2H, t, $J = 7,15$); 3,42 (3H, s); 3,73 (2H); 6,58 (1H, d, $J = 1,66$); 6,68 (1H, dd, $J = 5,11$ $J = 1,66$); 6,94 (1H, dd, $J = 6,93$ $J = 1,35$); 7,05 (1H, dd, $J = 6,93$ $J = 1,35$); 7,63 (2H, dd, $J = 3,38$ $J = 1,35$); 8,10 (1H, d, $J = 5,11$) e RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO-d_6): 13,4; 32,5; 36,4; 38,6; 55,3; 102,1; 107,3; 114,4; 110,9; 116,6; 129,0; 131,6; 133,8; 133,9; 134,5; 149,2; 155,4; 167,8; 173,2.

3.2.1.9. *AS-tau* (ácido 2-[(2-hidroxibenzoil) amido] etanosulfônico):



RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6): 2,73 (2H, t, $J = 7,15$); 3,02 (2H); 3,04 (2H, t, $J = 7,15$); 6,60 (1H, ddd, $J = 7,42$ $J = 7,42$ $J = 1,95$); 6,62 (1H, dd, $J = 7,42$ $J = 1,95$); 6,71 (1H, dd, $J = 7,42$ $J = 7,42$ $J = 1,95$); 7,65 (1H, dd, $J = 7,42$ $J = 1,95$) e RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO-d_6): 35,9; 47,4; 106,7; 115,8; 129,8; 131,3; 145,8.

3.2.1.10 *dic-tau* (ácido 2-[[2-(2,6-diclofenil)amino] fenil] acetil) amido]] etanosulfônico):



dic-tau

RMN ^1H (400 MHz, DMSO-d_6): 2,64 (t, 2H, $J = 7,15$); 2,93 (t, 2H, $J = 7,15$); 2,96 (s, 2H); 3,39 (3H); 6,24 (d, 1H, $J = 8,23$); 6,58 (dd, 1H, $J = 5,10$ $J = 1,66$); 6,72 (dd, 1H, $J = 7,53$ $J = 7,53$); 6,92 (ddd, 1H, $J = 8,47$ $J = 8,47$ $J = 1,66$); 7,07 (ddd, 1H, $J = 8,47$ $J = 8,47$ $J = 1,66$); 7,45 (d, 1H, $J = 8,23$); 8,09 (dd, 1H, $J = 8,47$ $J = 1,66$) e RMN ^{13}C (400 MHz, DMSO-d_6): 36,9; 50,8; 44,4; 106,6; 115,4; 119,7; 123,7; 125,6; 128,2; 128,9; 129,9; 138,0; 143,2; 149,2; 175,2.

3.2.2 Ensaios Biológicos

Os trabalhos foram submetidos para o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Unesp, Araraquara, sob parecer favorável protocolo CEP/FCF/CAR. nº 09/2007 e nº 24/2009 para execução dos ensaios biológicos.

A estruturação das propostas foi realizada conforme os princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

3.2.2.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar (250-280 g) e camundongos Swiss (20-25 g) sendo 6 animais por grupo experimental, mantidos em condições ambientais do biotério, com temperatura controlada em $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ (± 1) e ciclo circadiano de 12 horas, em caixas plásticas (50 x 40 x 20) com no máximo 6 animais por caixa, iniciando o período de luz as 7:00 horas. Os animais receberam alimento e água *ad libitum*.

3.2.2.2. Atividade antiinflamatória aguda (modelo de edema de pata) (baseado em WINTER, RISLEY & NUSS, 1962).

Os experimentos de inflamação aguda foram realizados seguindo o modelo de edema de pata, em que se induziu a formação de exudato inflamatório com a carragenina 200µg / pata

O grupo controle recebeu por via subplantar o agente químico irritante, carragenina, na pata posterior direita e salina na pata posterior esquerda. Os compostos a serem testados foram administrados por via oral a outros grupos de animais, 60 minutos antes da carragenina (subplantar).

Na execução dos experimentos, os compostos tiveram como veículo a goma arábica 5% e foram administradas por via oral (gavage), utilizando doses de 100 µM/ Kg e 300 µM/ Kg. As doses dos compostos em mg/Kg estão listados a seguir:

COMPOSTOS	PESO MOLECULAR (g/mol)	DOSE EQUIVALENTE À	DOSE EQUIVALENTE À
		100 µM EM mg/Kg	300 µM EM mg/Kg
ácido salicílico	138,12	13,81	41,43
as-ftd	228,12	22,81	68,43
as-tau	245,27	24,53	73,59
naproxeno	230,26	23,03	69,09
nap-ftd	374,26	37,43	112,29
nap-tau	337,41	33,74	101,22
diclofenaco sódico	318,13	31,81	95,43
dic-ftd	439,29	43,93	131,79
dic-tau	402,28	40,23	120,69
ibuprofeno	206,3	20,63	61,89
ibu-ftd	350,3	35,03	105,09
ibu-tau	313,45	31,35	94,05
cetoprofeno	254,3	25,43	76,29
ceto-ftd	398,3	39,83	119,49
indometacina	357,79	35,78	107,34
indo-tau	464,94	46,49	139,47
Taurina	125,15	12,52	37,56
celecoxibe	381,38	38,14	114,42
sulfassalazina	398,39	39,84	119,52
mesalazina	153,14	15,31	45,93

As espessuras (mm) das patas posteriores foram medidas antes e após os tratamentos, de hora em hora, por 6 horas após a administração da carragenina. Os resultados foram expressos pela diferença entre as leituras das patas antes e após os tratamentos. Após 7 horas do início do experimento, os animais sofreram eutanásia com CO₂.

3.2.2.3 Teste de gastrototoxicidade:

A ulcerogênese gástrica foi verificada nos mesmos animais dos grupos utilizados para o modelo de edema de pata, acrescido de grupo tratado com a mistura física taurina e antiinflamatório (equimolar, 300 µM de taurina para 300 µM de AINE).

Após eutanásia em CO₂, os animais tiveram seus estômagos removidos, abertos no sentido da maior curvatura e lavados com solução salina. Exposta a mucosa, esta foi observada através de um microscópio-estereoscópio Leica MZAPO, quanto a coloração e integridade. No caso da existência de lesões, estas foram contadas e medidas através do programa LIDA user, obtendo-se o número de ulcerações com diferentes graus de lesão, seguindo o índice de ulcerogênese gástrica (I.U.G.), que obedece a critérios numéricos para a classificação das lesões da mucosa gástrica (CIOLI et al., 1974; DARLING et al., 2004):

Grau 1 : lesões < 1,5 mm

Grau 2: lesões de 1,5 à 2,5 mm

Grau 3: lesões de 2,5 à 3,5 mm

Grau 4: lesões de 3,5 à 4,5 mm

Grau 5: lesões > 4,5 mm

A análise segue critérios quantitativos relacionados à medida da área de lesão. Os achados fotográficos encontram-se no aumento de 8 ou 16 vezes.

3.2.2.4 Atividade analgésica (modelo de contorção abdominal) para os derivados ftalimídicos:

A avaliação antinociceptiva foi realizada através da observação do número de contorções abdominais induzida por ácido acético administrada via intraperitoneal (COLLIER et al, 1968).

Foram utilizados camundongos machos suíços, albinos, pesando de 20 - 25 g, mantidos em jejum por um período de aproximadamente 8 horas.

Os derivados híbridos foram solubilizados em goma arábica 5% e administradas por via oral (gavage) nas doses de 100 e 300 μ M/Kg de acordo com RIBEIRO e colaboradores (2000).

Após a administração dos compostos híbridos ou controle (5% goma arábica), injetou-se ácido acético 0,1 N (0,1 mL/10g de peso) na cavidade peritoneal dos animais e em seguida iniciou-se a contagem das contorções abdominais durante 30 minutos.

3.2.2.5 Atividade antiinflamatória crônica (modelo colite ulcerativa distal):

O protocolo experimental foi baseado na indução de colite ulcerativa por ácido acético e realizado seguindo critérios de Fabia et al (1992) e Vassalo et al (2007).

O grupo controle positivo de colite ulcerativa distal recebeu 2 mL *per rectum* do agente químico irritante, ácido acético, na concentração de 4% sob auxílio de um cateter/sonda gástrica de Levine nº 4, o qual 8 cm do mesmo foi introduzido e mantido por um período de exposição de 1 minuto.

O controle negativo de colite ulcerativa distal recebeu o mesmo tratamento descrito anteriormente, porém o agente irritante foi substituído por NaCl 0,9%. Após a administração do ácido acético, no quinto dia, ocorreu a administração dos compostos a serem estudados, diariamente, por mais 5 dias, com doses de 100 e/ou 300 μ M, via oral ou i.p.

Todos os animais foram pesados no início e no término do experimento, para avaliar a variação de massa corpórea e avaliados no sentido de observar o aumento da frequência de fezes e a presença sangramento, segundo descrito por Sutherland et al. (1987). Após o 10º. dia (da indução da colite) e 5º. dia do início do tratamento, os animais foram autopsiados e os intestinos enviados para análise histológica, conforme figura 28.

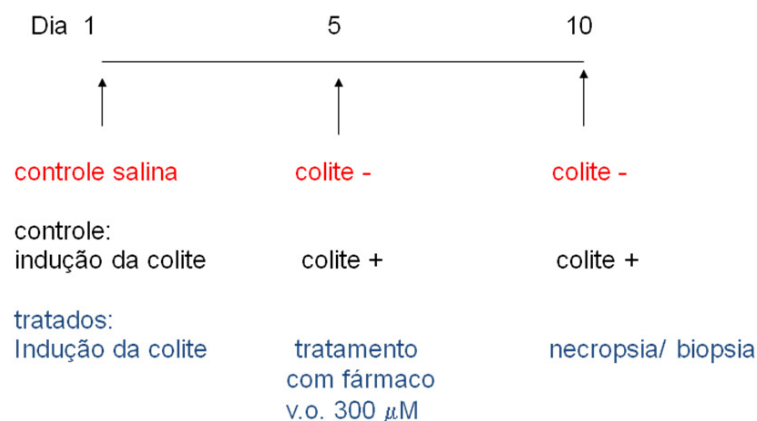


Figura 28. Esquema de tratamento adotado para realização experimental de colite ulcerativa.

3.2.2.6 Análise histopatológica

Os intestinos grossos dos animais foram removidos ao término do experimento respeitando os limites anatômicos do reto, ampola retal, colo sigmóide, colo descendente, colo transversal e ascendente, e enviados para realização de biópsia pelo Instituto de Patologia Cirúrgica e citopatológica Dr Nicolino Lia Neto (IPC) de Araraquara e avaliados segundo a classificação fornecida pelo laboratório.

a) Classificação *macroscópica*:

Segundo a aparência da mucosa intestinal, foi utilizado método semi-quantitativo segundo:

- Grau 0:** normal
Grau 1: levemente friável
Grau 2: moderadamente friável
Grau 3: exudato, com sangramento espontâneo

b) Classificação *microscópica*:

As lamínas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) para análise, e os achados fotográficos seguem aumento de 40 e 100 vezes.

Foi utilizado como critério a observação de ulceração, necrose e hiperplasia linfóide folicular do intestino grosso, em que se obteve uma tabela de graduações histopatológicas utilizando método semi-quantitativo segundo:

Ulceração:

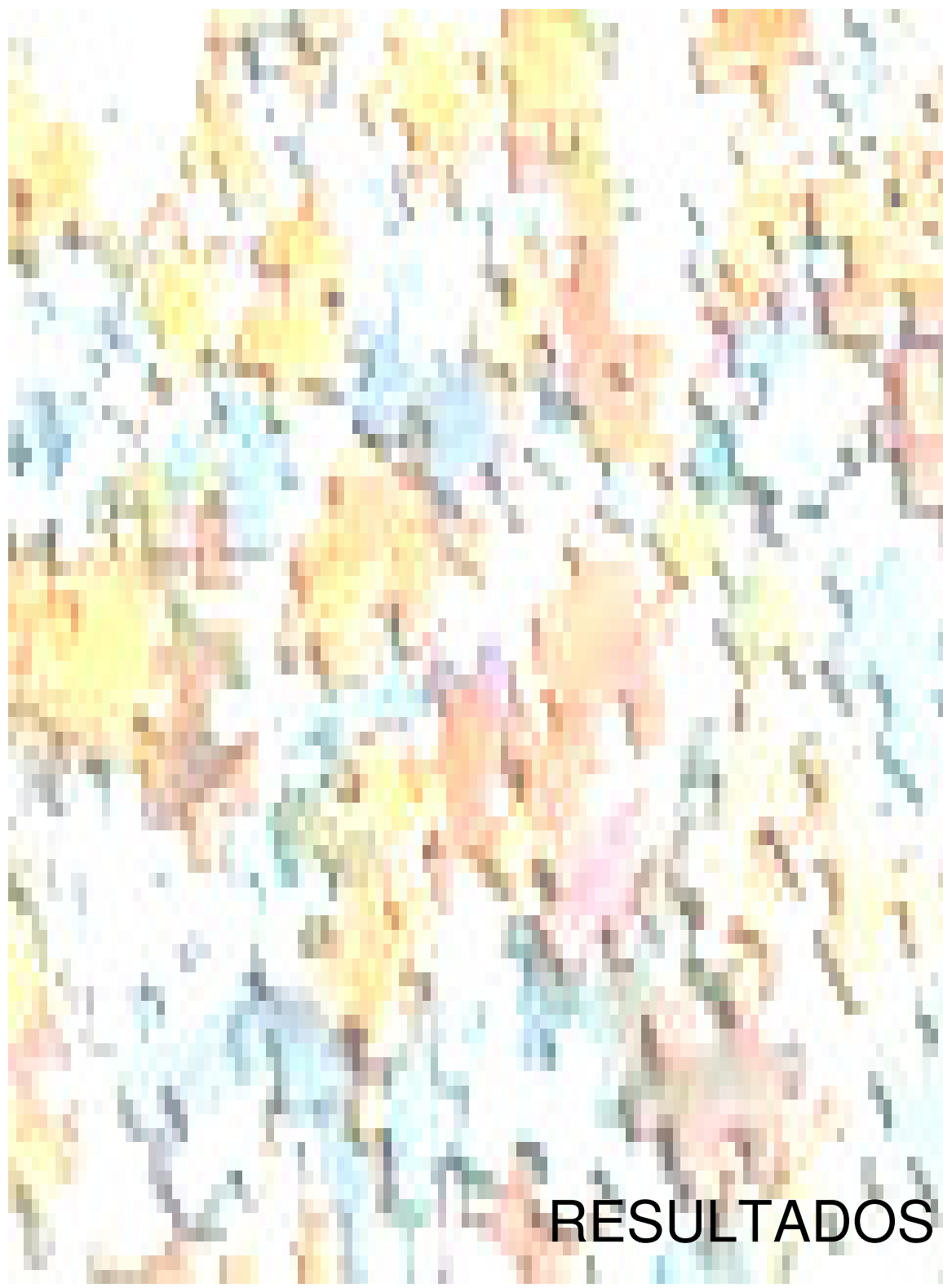
- Grau 0:** ausência
Grau 1: somente camada mucosa/submucosa
Grau 2: até a camada muscular própria

Necrose:

- Grau 0:** ausência
Grau 1: colite mucosa necrosante
Grau 2: pancolite necrosante

3.2.2.7 Planejamento estatístico

Os resultados foram submetidos ao teste de homogeneidade de variância (Teste de Levene). Os resultados com p não significativo (acima de 0,05) foram posteriormente submetidos à Análise de Variância (ANOVA). Se a ANOVA fornecer resultado significativo, será seguida por teste de comparações múltiplas (análises *post hoc*) como o teste de Newman Keuls. Valores de p iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significantes, quando houve comparação das médias foi empregado o teste de Tukey.



RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Atividade antiinflamatória aguda (modelo de edema de pata)

Os resultados obtidos para a atividade antiinflamatória do derivado nap-tau encontram-se na figura 29. Na dose 100 μ M demonstra que o mesmo não responde igualmente ao padrão naproxeno nas primeiras 5 horas, isto é, apresenta atividade antiinflamatória inferior ao padrão. Entretanto, ao observar os efeitos com a administração da dose de 300 μ M, a atividade se mantém semelhante ao AINE padrão, com excessão à terceira hora. Este fenômeno não ocorre com nap-ftd, sendo que a atividade antiinflamatória nas duas doses são semelhantes ao padrão.

Para o pró-fármaco dic-tau, o mesmo comportamento se observa com ambas as doses estudadas, até a 3^a hora, com diminuição da atividade antiinflamatória em relação ao diclofenaco padrão, se igualando a partir de então. Para o híbrido dic-ftd, a atividade antiinflamatória foi superior ao latenciado dic-tau na segunda hora, apresentando atividade similar ao diclofenaco padrão a partir da 3^a. hora (figura 29).

Os resultados obtidos com o derivado de ibuprofeno também se encontram na figura 29. Observam-se similaridade estatística entre o composto ibu-tau e o padrão ibuprofeno, nas duas doses. Os resultados obtidos para o derivado híbrido de ibuprofeno (ibu-ftd) apresentam um perfil diferenciado em relação aos demais derivados, com diminuição da atividade antiinflamatória em relação ao padrão.

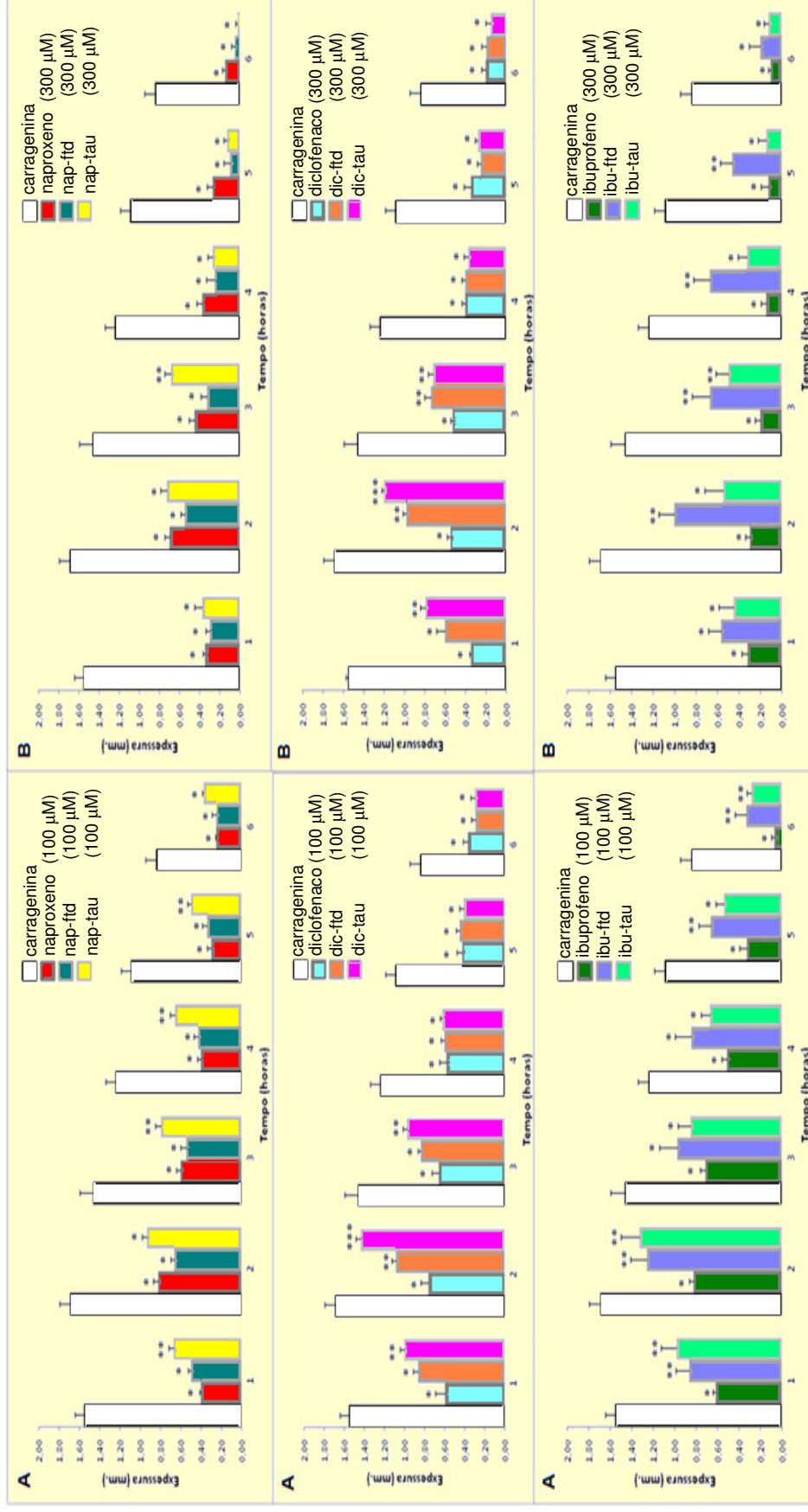


Figura 29. Ensaio de atividade antiinflamatória aguda (modelo de edema de pata) AINEs e seus derivados latenciados e/ou híbridos, por via oral. Controle positivo (carragenina, sem tratamento): A) na dose de 100 μM; em B) na dose de 300 μM. No eixo das ordenadas = tempo em horas, e abscissas = espessura em mm. (* $p < 0,05$ em relação a carragenina, ** $p < 0,05$ em relação a carragenina/AINEs e *** $p < 0,05$ em relação ao híbrido/latenciado - ANOVA).

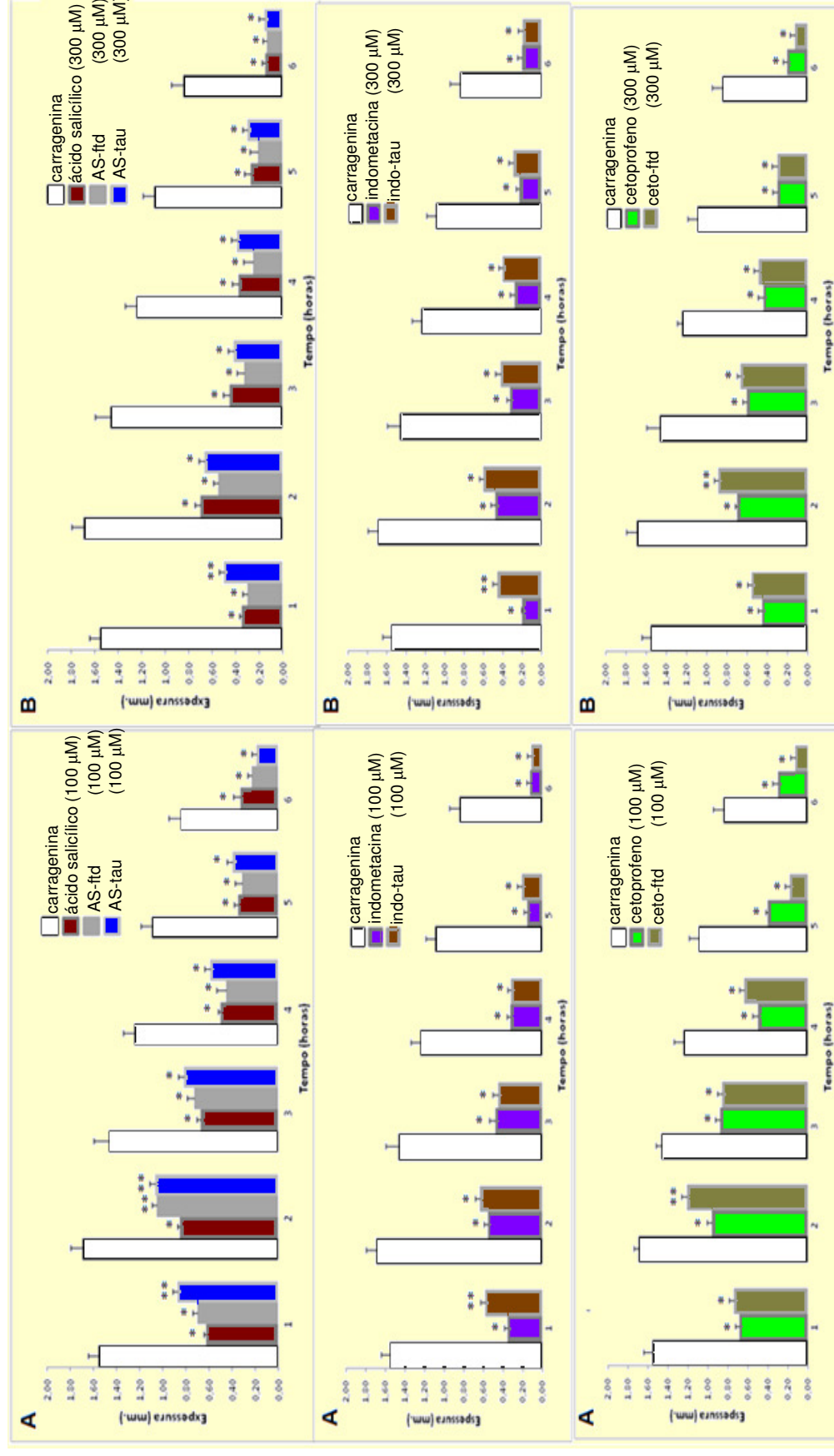


Figura 30. Ensaio de atividade antiinflamatória aguda (modelo de edema de pata) AINEs e seus derivados latenciados e/ou híbridos, por via oral (v.o). Controle positivo (carragenina, sem tratamento): A) na dose de 100 µM; em B) na dose de 300 µM. No eixo das ordenadas = tempo em horas, e abscissas = volume em mm3. (*p < 0,05 em relação a carragenina e **p < 0,05 em relação a carragenina e AINEs - ANOVA).

Na figura 30 encontram-se os resultados obtidos com o derivado salicílico as-tau (100 μ M). Observa-se uma atividade inferior ao padrão até a 2ª hora, se igualando a partir de então. Para a dose de 300 μ M, este efeito ocorre apenas na 1ª hora. Para o híbrido AS-ftd, a atividade antiinflamatória se mantém igual ao padrão AS.

O derivado indo-tau, apresentou efeito antiinflamatório nas duas doses menor na 1ª hora, se mantendo igual ao padrão após este período, enquanto o derivado de cet-ftd apresenta perfil antiinflamatório semelhante com as duas doses testadas, após a segunda hora de inflamação ao cetoprofeno, chegando a ser superior na concentração de 100 μ M, após a 5ª hora (figura 30).

4.2 Atividade analgésica (modelo de contorção abdominal) para os derivados ftalimídicos:

Na figura 31 estão apresentados os resultados obtidos de atividade analgésica para os derivados ftalimídicos, comparados com a dipirona, utilizada como controle da analgesia.

Todos os compostos apresentaram atividade analgésica de inibição da contorção abdominal induzida por ácido acético. O naproxeno apresenta atividade inferior ao observado com a administração da dipirona nas duas doses testadas, enquanto que o derivado nap-ftd mostrou atividade significativamente superior ao naproxeno e semelhantemente à dipirona, também em ambas as doses. Os resultados obtidos com cetoprofeno seguem o mesmo padrão aos observados com naproxeno.

O AS, diclofenaco e seus derivados ftalimídicos (AS-ftd e dic-ftd) mostraram atividade analgésica inferior ao controle dipirona em ambas as doses. Entretanto, quando comparados com seus respectivos AINEs padrão (as e diclofenaco), nas doses de 100 μ M, a atividade foi semelhante enquanto na dose de 300, a atividade foi significativamente superior.

Com ibuprofeno e seu derivado ibu-ftd apresentam o mesmo perfil de atividade, sendo observado atividade analgésica semelhante à dipirona na dose de

100 μ M e inferior quando adminstrado na dose de 300. A modificação molecular não alterou o perfil de atividade analgésica do ibuprofeno.

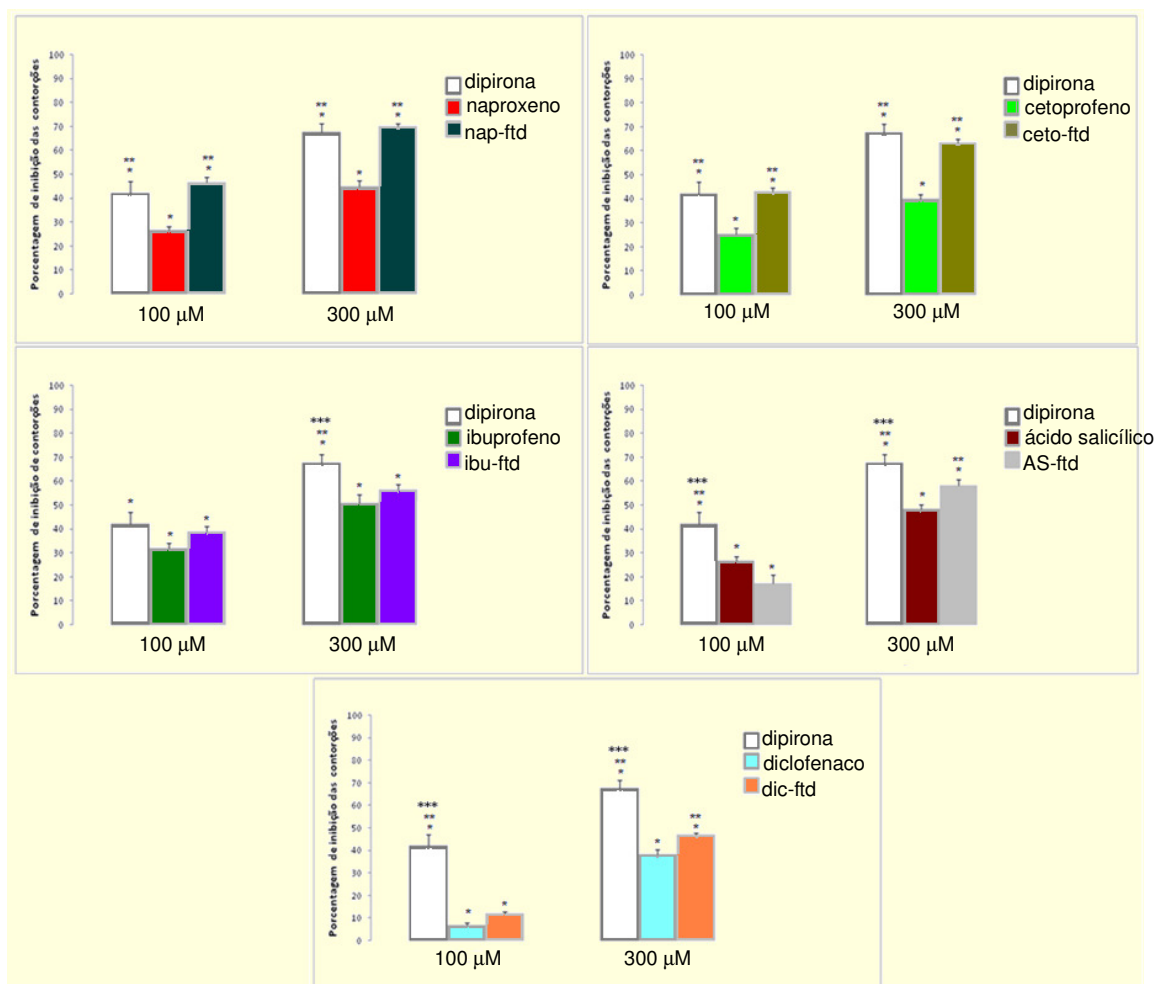


Figura 31. Ensaio de atividade analgésica periférica (modelo de contorção abdominal) AINEs e seus derivados híbridos, por via oral. Controle positivo (ácido acético, sem tratamento, 100% de contorção). No eixo das ordenadas = porcentagem de inibição das contorções, e abcissas = doses de 100 e 300 μ M. (* p < 0,05 em relação ao controle positivo (90 $\pm$ 5 contorções em 30 minutos) e ** p < 0,05 em relação ao AINEs padrão, *** p < 0,05 em relação aos híbridos AINE-ftd - ANOVA).

4.3 Gastro-ulceração ou gastrotoxicidade

A tabela 1 mostra os resultados obtidos de gastro-ulceração, através do número de lesões (úlceras) observadas com a administração dos AINEs e mistura física de AINEs com taurina.

Todos os AINEs padrões testados provocaram um número médio de úlceras de 48 a 69, observando extensão de lesão compatível com a

classificação máxima I.U.G. em grau 5. A ordem decrescente de número de lesões foi:

Total de lesões: dic > ceto > ibu > indo > AS > nap

Grau 5: indo > AS > ceto > ibu > dic > nap

Grau 1: nap > dic > ceto > ibu > AS > indo

As misturas físicas dos AINEs com taurina provocaram um número médio de ulcerações que variaram de 5 a 41, observando extensão de lesão em grau 1 a 3.

Total de lesões: AS + tau > indo+ tau > ibu + tau > dic+ tau > nap+ tau

Grau 3: indo + tau > AS + tau > ibu+ tau

Grau 1: dic+ tau = nap + tau

Para o ácido salicílico, foi observado além das lesões com pontos hemorrágicos, assinaladas, uma marcante alteração da mucosa. A mistura física com taurina mostrou redução na gastrototoxicidade para grau 1 com os derivados naproxeno e diclofenaco. Com ibuprofeno e as, a redução foi menor, com grau 3. Enquanto que para todos os derivados AINE-tau e AINE-ftd correspondentes, a gastro-ulceração foi nula (figura 32).

A indometacina, além do grau 5 de lesão, observa-se alteração na coloração do tecido gástrico. Com a mistura física com taurina, a lesão reduz para 3 e para a indo-tau, foi possível observar uma ligeira alteração da coloração da mucosa, mas sem a presença de lesões. O cetoprofeno, também promoveu grau de lesão 5, enquanto seu derivado, o tecido se mostrou íntegro sem lesão.

Os resultados demonstraram que a presença de taurina (mistura física), reduziu o índice de lesão dos AINES (de grau 5 para grau 3 ou 1). Em todas as associações a redução da área de lesão foi acompanhada por inalteração da mucosa gástrica e de pontos hemorrágicos. A figura 32 mostra as fotografias das mucosas gástricas.

Tabela 1. Efeito ulcerogênico dos AINEs, mistura física e pró-fármacos.

Composto	Número de úlceras	(Grau 1)	(Grau 2)	(Grau 3)	(Grau 4)	(Grau 5)
naproxeno	48 ± 11	37,6 ± 5,3 (78,3 %)	1,4 ± 3,4 (2,9 %)	3,1 ± 6,1 (6,4 %)	3,6 ± 4,2 (7,6 %)	2,3 ± 2,1 (4,8 %)
nap + tau *	5 ± 3	5 ± 3 (100 %)	-	-	-	-
nap-tau	0	-	-	-	-	-
diclofenaco	69 ± 6	43 ± 7,8 (62,0 %)	2,9 ± 2,5 (4,3 %)	6,62 ± 3,2 (9,6 %)	5,1 ± 2,1 (7,4 %)	4,6 ± 1,9 (6,7 %)
dic + tau *	8 ± 3	8 ± 3 (100 %)	-	-	-	-
dic-tau	0	-	-	-	-	-
ibuprofeno	66 ± 7	29 ± 1,3 (44,0 %)	14,8 ± 7,5 (22,4 %)	5,5 ± 5,2 (8,4 %)	10,6 ± 9,25 (16 %)	6,1 ± 3,3 (9,2 %)
ibu + tau *	26 ± 9	23,3 ± 2,2 (89,5 %)	1,3 ± 1,3 (5,2%)	1,4 ± 3,4 (5,3%)	-	-
ibu-tau	0	-	-	-	-	-
ácido salicílico	52 ± 10	13,7 ± 7,2 (26,2 %)	8,8 ± 8,2 (17,0 %)	6,4 ± 4,1 (12,3 %)	9,6 ± 5 (18,5 %)	13,5 ± 3,2 (26,0%)
AS + tau *	41 ± 4	25,8 ± 2,8 (63,0 %)	12,6 ± 3,3 (30,7 %)	2,6 ± 2,2 (6,3%)	-	-
AS-tau	0	-	-	-	-	-
indometacina	57 ± 11	4,5 ± 9,1 (7,9 %)	8,4 ± 10,2 (14,8 %)	9,6 ± 5,4 (16,6 %)	12,9 ± 6,3 (22,7 %)	21,6 ± 4,8 (38,0 %)
indo + tau *	29 ± 8	6 ± 1,05 (20,8 %)	11,7 ± 5,1 (40,2 %)	11,3 ± 6,7 (39,0 %)	-	-
indo-tau	0	-	-	-	-	-
cetoprofeno	67 ± 4	38,5 ± 6,6 (57,5%)	4,1 ± 12,3 (6,1%)	6,4 ± 4,1 (9,5%)	9,5 ± 7,6 (14,2%)	8,5 ± 3,2 (12,7%)

*Diferenças significativas entre os grupos tratados com naproxeno, diclofenaco, ibuprofeno, ácido salicílico, indometacina ou cetoprofeno (*P < 0,05 - Tuckey).

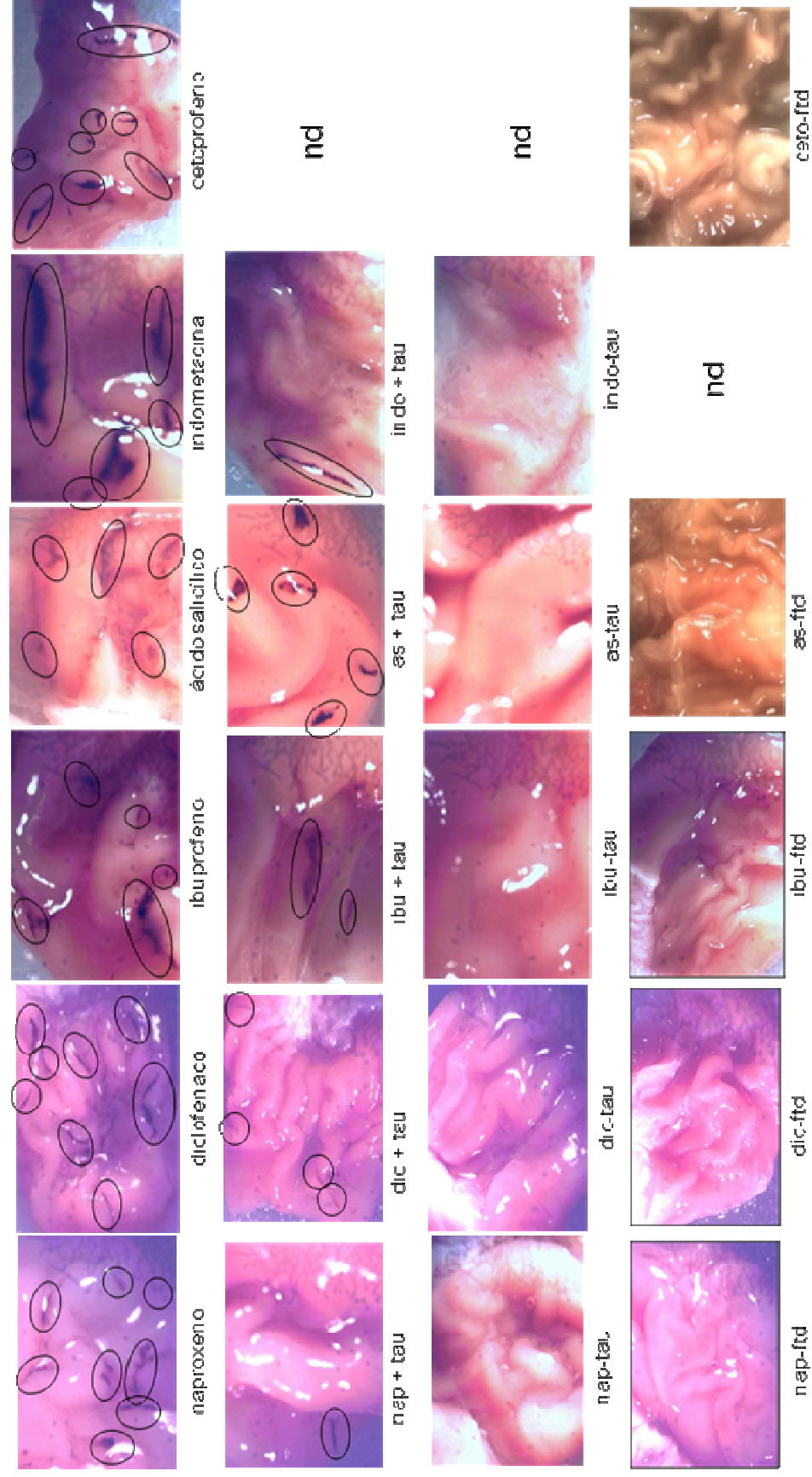


Figura 32. Fotografia dos estômagos dos ratos tratados com dose única (300 µM) de AINEs, mistura física equimolar dos AINEs e taruina, AINE-tau e AINE-ftd em aumento de 8 ou 16 vezes em microscópio-estereoscópio Leica MZAPO. Encontram-se circulados as lesões com quadro hemorrágico; **nd** = dados não disponíveis.

4.4 . Atividade antiinflamatória crônica (modelo colite ulcerativa distal):

Os resultados das análises microscópicas dos testes da atividade antiinflamatória crônica mostraram que todos os AINEs testados diminuíam as ulcerações/necrose provocados pela colite. Entretanto, os animais perdem peso, ocorre aumento da frequência de fezes e a melema (fezes com sangue digerido) está presente. Ocorre um aumento na mortalidade, com exceção do grupo AS, onde não houve morte dos animais (tabela 2).

Os resultados observados com os grupos tratados com os derivados ftalimídicos mostraram diminuição nos quadros de ulcerações/necrose. A melhor resposta foi observada com o grupo ceto-ftd > nap-ftd > ibu-ftd = AS-ftd > dic-ftd.

Com os derivados taurínicos, todos os derivados demonstraram eficácia semelhante, com a regressão do quadro de ulceração e necrose em 5 dos 6 animais testados. Com exceção do grupo ibu-tau, todos os outros derivados não causaram mortalidade dos animais.

Os mesmos experimentos foram realizados utilizando os medicamentos: celecoxib (antiinflamatório seletivo COX₂), sulfassalazina e mesalazina, fármacos utilizados na terapêutica para o tratamento de colite ulcerativa, comparando-se com os derivados dic-tau e nap-tau, administrados i.p. na dose de 150 µM. Os resultados demonstraram que o celecoxib promove a reversão da colite 50% dos animais, e os fármacos sulfassalazina e mesalazina reverterem 87%, enquanto que a administração i.p. dos derivados dic-tau e nap-tau promoveram a reversão da colite de todos os animais testados, isto é, resposta positiva em 100% dos animais (tabela 3).

As figura 33 mostra as fotografias dos cólons do grupo controle negativo, com a presença da mucosa normal e hiperplasia linfóide folicular. Ressalta-se que a introdução do cateter/sonda gástrica de Levine nº 4, gera um estímulo mecânico imunológico, resultando em uma resposta hiperplásica com grau máximo 2 na tabela de graduação histopatológica ao utilizar método semi-quantitativo, apresentado a seguir.

Grau 0: ausência; Grau 1: até dois centros germinativos contíguos; Grau 2: mais de dois centros germinativos contíguos. Por apresentar este valor em todos os grupos, desconsiderou-se este dado nas análises histopatológicas.

A figura 33 mostra, também, as fotografias do controle positivo com a presença de ulceração e necrose provocada pela indução da colite pelo ácido acético, com destruição total da mucosa e submucosa, presença de pancolite necrosante e do sistema fagocitário mononuclear e a presença de tecido necrosado quando do tratamento com celecoxibe, sulfassalazina e mesalazina.

A figura 34 mostra as fotografias comparativas dos cólons dos animais tratados com AINEs e derivados taurínicos e ftalimídicos. É possível observar a recuperação dos tecidos quando do tratamento com os derivados ftalimídicos e taurínicos.

Com relação à toxicidade, com a dose de 62 mg/kg de ibuprofeno promoveu a morte de 1 animal no primeiro dia de tratamento enquanto que o derivado taurínico promoveu também a mortalidade de 1 animal, mas somente no 3º. dia. É possível observar que a dose de 62 mg/kg é bem abaixo da DL_{50} (cerca de 17 vezes menos), o que não deveria causar nenhuma mortalidade. A tabela 4 mostra uma correlação da DL_{50} aguda (dose única) encontrado na literatura e a toxicidade observada dos AINEs durante o experimento.

Entre todos os derivados ftalimídicos, o dic-ftd promoveu a morte de 2 animais, no último dia de tratamento, contra a morte de 4 animais (2 no 2º.dia e 2 no 3º.dia de tratamento) com o padrão de diclofenaco.

O derivado ftalimídico AS-ftd se mostrou mais eficaz do que seu padrão, mas apenas para 50% dos animais contra 16% do AINE correspondente, AS. A resposta obtida para o derivado ceto-ftd foi muito boa, sendo a melhor do grupo ftalimídico, com regressão total da necrose em 85% dos animais e ausência de mortalidade.

O derivado indo-tau, além de não causar mortalidade, Além das vantagens sobre o aspecto de toxicidade do derivado taurínico, temos uma ação terapêutica pronunciada do derivado com restabelecimento de 84% dos animais tratados contra os 34% do fármaco matriz.

Tabela 2. Análise macro e microscópica do colon e estado geral dos ratos com colite ulcerativa tratados com AINEs e seus derivados taurínicos e ftalimídicos.

Ulceração/ Necrose*	nap n (%)	nap-tau n (%)	nap-ftd n (%)	dic n (%)	dic-tau n (%)	dic-ftd n (%)	ibu n (%)	ibu-tau n (%)	ibu-ftd n (%)	AS n (%)	AS-ftd n (%)	indo n (%)	indo-tau n (%)	ceto n (%)	ceto-ftd n (%)
0	2 (34)	5 (84)	5 (84)	1 (14)	5 (84)	2 (34)	4 (66)	5 (84)	3 (50)	1 (16)	3 (50)	2 (34)	5 (84)	-	6 (86)
1	4 (66)	1 (16)	1 (16)	6 (86)	1 (16)	4	1 (16)	1 (16)	3 (50)	5 (84)	3 (50)	4 (66)	1 (16)	6 (100)	1 (14)
2	-	-	-	-	-	-	1 (16)	-	-	-	-	-	-	-	-
Aparência da mucosa**															
0	-	6 (100)	-	-	5 (84)	3	-	6 (100)	4 (66)	-	4 (66)	-	4 (66)	-	5 (72)
1	-	-	5 (84)	-	1 (16)	3	-	-	2 (34)	-	2 (34)	-	2 (34)	-	2 (28)
2	1 (16)	-	1 (16)	-	-	-	2 (34)	-	-	1 (16)	-	-	-	2 (34)	-
3	5 (84)	-	-	7 (100)	-	-	4 (66)	-	-	5 (84)	-	6 (100)	-	4 (66)	-
Mortalidade (n/dia)	50% (2/3° e 1/4°)	-	-	57% (2/2° e 2/3°)	-	33% (2/5°)	16% (1/1°)	16% (1/3°)	-	-	-	50% (3/2°)	-	67% (2/2° e 2/3°)	-
Peso (%)	- 20	+ 3	+ 6	- 15	+ 1	- 11	+ 2	+ 2	+ 6	- 4	+ 4	- 8	+ 7	- 7	+ 18
Frequência de fezes	↑↑↑	N	N	↑↑↑	N	N	↑↑↑	N	N	↑↑↑	↑	↑↑↑	↑↑	↑↑↑	N
Melema	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-

* Análise microscópica: **Grau 0:** ausência; **Grau 1:** somente camada mucosa/submucosa; **Grau 2:** até a camada muscular própria

** Análise macroscópica: **Grau 0:** normal; **Grau 1:** levemente friável; **Grau 2:** moderadamente friável; **Grau 3:** exudato, com sangramento espontâneo;

↑ = aumento; N = normal; n = número de animais; + = presença, - = ausência

nap = naproxeno; dic = diclofenaco; ibu = ibuprofeno; AS = ácido salicílico; indo = indometacina; ceto = cetoprofeno.

Tabela 3. Análise macro e microscópica do colon e estado geral dos ratos com colite ulcerativa tratados com celecoxib, mesalazina, sulfasalazina e derivados dic-tau e nap-tau i.p. (150 µM).

Ulceração/ Necrose*	CELECOXIBE	MESALAZINA	SULFASALAZINA	DIC-TAU	NAP-TAU
0	3	4	4	6	6
1	-	-	-	-	-
2	3	2	2	-	-
Aparência da mucosa**					
0	-	-	-	5	6
1	2	3	4	1	-
2	4	3	2	-	-
3	-	-	-	-	-
Mortalidade (n/dia)					
Peso (%)	+ 4,6 %	+ 4,5%	+ 2 %	+ 15 %	+ 11 %
Frequência de fezes	†††	†††	†††	N	N
Melema	N	N	N	N	N

* Análise microscópica: **Grau 0**: ausência; **Grau 1**: somente camada mucosa/submucosa; **Grau 2**: até a camada muscular própria

** Análise macroscópica: **Grau 0**: normal; **Grau 1**: levemente friável; **Grau 2**: moderadamente friável; **Grau 3**: exudato, com sangramento espontâneo;

† = aumento; N = normal; n = número de animais.

Tabela 4. Valores de DL₅₀ aguda* (v.o) dos AINEs e toxicidade observada para o tratamento de colite ulcerativa com AINEs.

AINE	DL ₅₀ ratos normais (mg/kg)	Toxicidade dos ratos com colite (mg/kg)
naproxeno	534	69
diclofenaco	150	95
ibuprofeno	1050	-
indometacina	242	107
cetoprofeno	300	< 76
AS	891	-

*Mortalidade de 50% dos animais durante o período experimental.

* Merck Index, 1996.

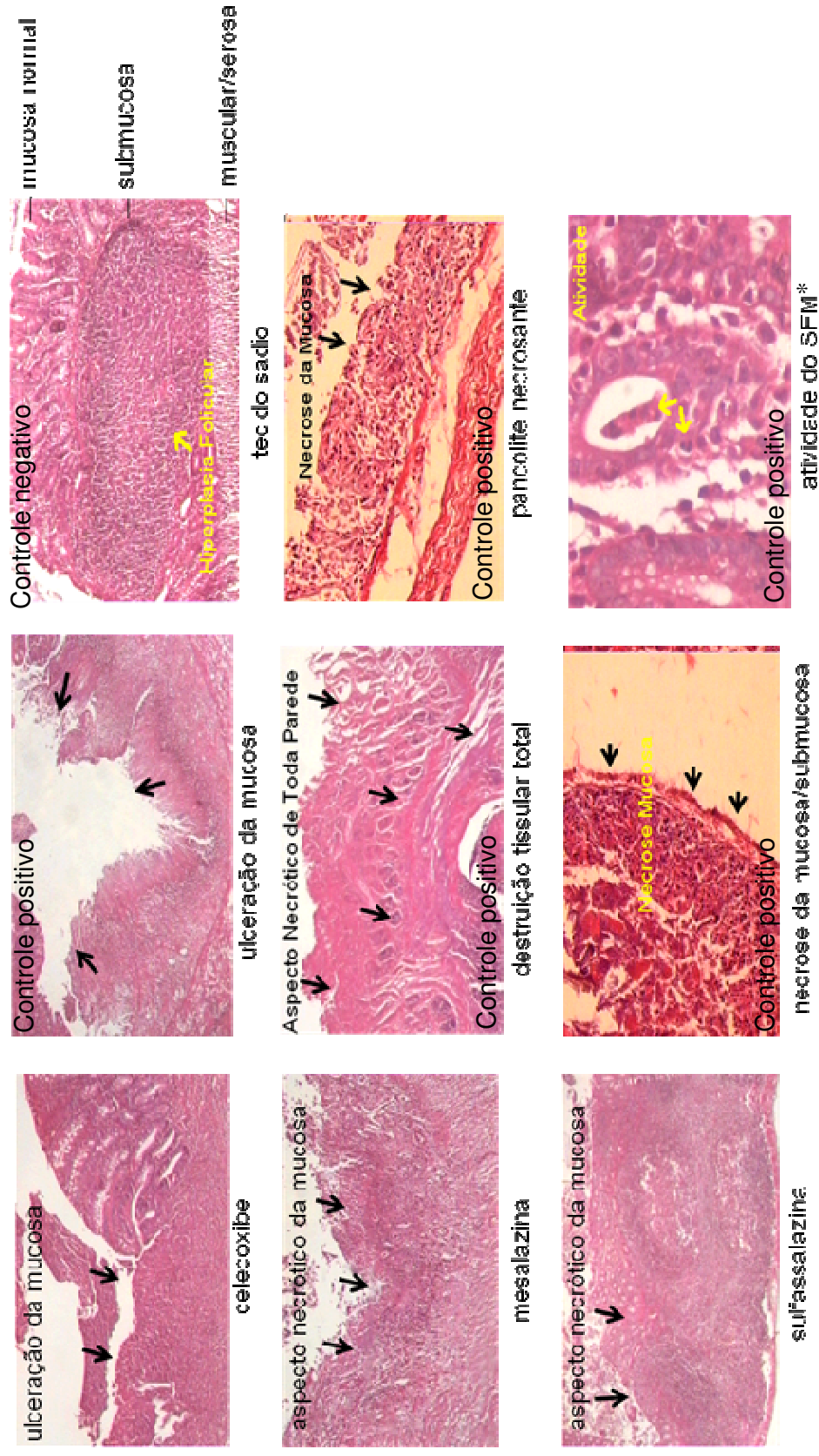


Figura 33. Foto representativa do intestino grosso dos ratos na administração por via oral em doses repetidas (300 µM) dos padrões tratados com celecoxibe, mesalazina e sulfasalazina, do controle positivo de colite ulcerativa (indução com ácido acético, *per rectum* sem tratamento) e controle negativo (salina 0,9% de NaCl, *per rectum*, sem tratamento), aumento de 40 e 100 vezes (HE). * SFM = Sistema fagocitário mononuclear.

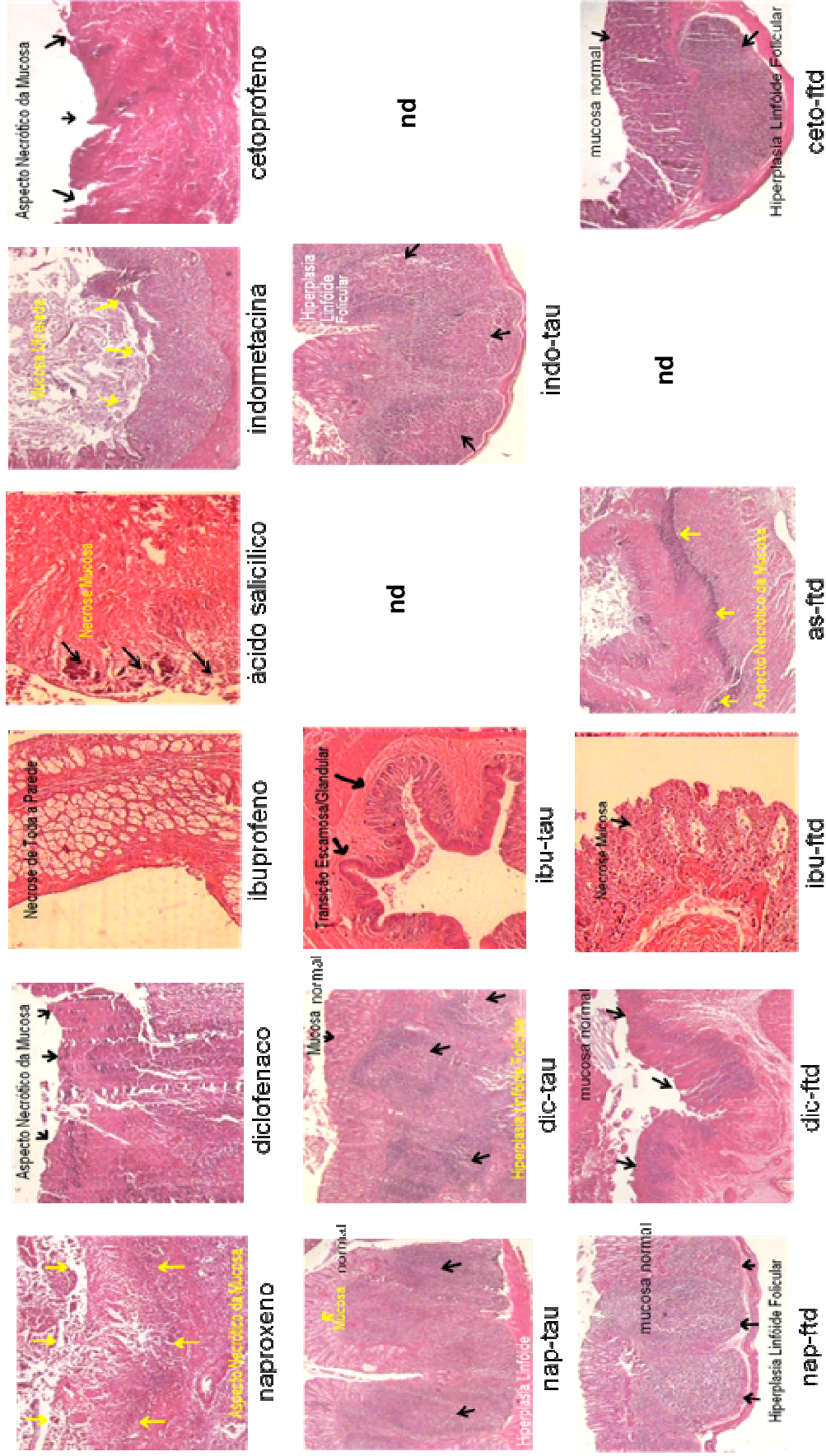


Figura 34. Foto representativa do intestino grosso dos ratos na administração por via oral em doses repetidas (300 µM) dos padrões AINES, AINE-tau e AINE-ftd, aumento de 40 ou 100 vezes (HE); **nd** = dados não disponíveis.



DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1 Atividade antiinflamatória aguda (modelo de edema de pata)

No planejamento dos pró-fármacos taurínicos, buscava-se atividade recíproca, isto é, uma potencialização da atividade antiinflamatória da taurina e AINEs, pela taurina possuir a capacidade de inibir iNOS presente nos macrófagos durante o processo inflamatório.

Entretanto, em estudo de inibição de NO, Vizioli (2006) demonstrou a inibição de iNOS pela taurina, mas não pelos AINEs. Os derivados taurínicos, suprimiram a produção de NO, similarmente à da taurina, sugerindo que a ligação dos AINEs à taurina não modificaria esta atividade.

Desta forma, estes resultados experimentais já evidenciavam a possibilidade da manutenção da atividade antiinflamatória dos pró-fármacos, uma vez que a enzima iNOS demonstrou reconhecer e se ligar sem restrições estéricas com a molécula obtida. Portanto, o fato dos pró-fármacos AINEs taurínicos apresentarem uma atividade antiinflamatória similar aos referidos padrões era previsível e o efeito inferior ao fármaco matriz nas primeiras horas, também, tendo em vista de que o pró-fármaco deve ser bioativado para exercer sua atividade (SILVA et al, 2005).

Neste sentido, esperava-se que os pró-fármacos fossem clivados por amidases, para liberar os respectivos AINEs-tau. Confirmando esta hipótese, os pró-fármacos apresentaram o mesmo perfil, variando de 1 a 3 horas para liberação total da substância ativa. Com exceção do ibuprofeno, a introdução da taurina não alterou a atividade antiinflamatória, sugerindo que este transportador não modificou as propriedades físico-químicas/conformacionais do ibuprofeno significativamente de forma a alterar sua interação com o receptor. Estudos conformacionais e de hidrólise serão necessários para comprovação desta suposição.

Os derivados ftalimídicos foram planejados por hibridação molecular, esperando-se atividade sinérgica na inibição de COX₂ e TNF- α , visando a

possível utilização em doenças inflamatórias crônicas, como colite ulcerativa e artrite reumatóide, que envolvessem a participação de diversos mediadores pró-inflamatórios como citocinas, interleucinas, NF- κ B, TNF- α .

Os resultados experimentais obtidos para os compostos híbridos ftalimídicos mostraram que estes não alteraram significativamente a atividade antiinflamatória aguda dos AINES padrão.

O experimento de edema de pata induzido por carragenina é um modelo de inflamação aguda, observada pela ativação da cascata do ácido araquidônico, ativando a síntese de prostaglandinas pró-inflamatórias. Este mecanismo é inibido por AINEs via inibição de COX₂, não tendo a participação de agentes pró-inflamatórios como o TNF- α . Desta forma, os resultados estão de acordo com os ensaios realizados.

5.2 Atividade analgésica (modelo de contorção abdominal) para os derivados ftalimídicos

Estudos de Ribeiro, 2000, demonstraram o papel da talidomida na atividade antiinflamatória e analgésica, por mecanismos de inibição de TNF- α , e estímulo de fatores antiinflamatórios como a IL-10. Neste sentido, com o objetivo de comprovar esta hipótese, foi realizado estudo de atividade analgésica para os compostos híbridos ftalimídicos.

Castro, 2008, ao realizar experimentos com o diclofenaco e seu derivado híbrido nas concentrações de 1 μ M e 100 μ M, observou baixa atividade dos mesmos, sendo que em 100 μ M, descreve inibição de apenas 16%. Neste trabalho, foi constatada inibição de 10 e 12% para o diclofenaco e derivado respectivamente, para a dose de 100 μ M.

Segundo Nakaema e colaboradores, em 2005 em concentração de 50 mg/Kg (157 μ M) o diclofenaco já apresenta atividade analgésica com 36,6% de inibição. Porém, na dose de 300 μ M a resposta analgésica do diclofenaco foi de 38,4% e do dic-ftd de 47,1%, sugerindo que este não é um bom modelo de estudo para o diclofenaco e seus respectivos derivados.

Os resultados mostraram que todos os AINEs estudados, isoladamente, não são bons analgésicos, quando comparados com a dipirona. Entretanto, o processo de hibridação melhorou a atividade analgésica dos AINEs, com exceção do ibuprofeno. Com naproxeno e cetoprofeno, houve um incremento significativo nas duas doses estudadas atingindo os valores de atividade analgésica da dipirona.

Este incremento se deve ao fato de que o estímulo inflamatório induzido pelo ácido acético que foi administrado na cavidade peritoneal estimula a liberação de uma cascata de citocinas com potencial efeito hiperalgésico, iniciado pela presença de TNF- α local. Após o estímulo nocivo doloroso, a resposta pode ocorrer por duas vias clássicas: a primeira que envolve a liberação de PGs e a segunda que induz a produção de aminas simpatomiméticas (CUNHA et al., 1992).

Além disso, ambas as vias, dependendo dos fatores estimulatórios como a natureza agressiva, a intensidade e o tempo de duração, interferem na liberação de TNF- α , o que determinam a produção de bradicinina, o qual apresenta potente ação sobre a permeabilidade vascular, gerando vasodilatação arteriolar e pode causar quimiotaxia para células inflamatórias. A bradicinina, pode também induzir dor por ação direta sobre as fibras nervosas (SIQUEIRA JR, DANTAS, 2000).

Os resultados, de acordo com este mecanismo, foram dependentes da estrutura química o qual o grupo ftalimídico foi ligado. Muito provavelmente, para os compostos naproxeno e cetoprofeno, a hibridação, não alterou a capacidade do grupo ftalimídico em promover sua atividade analgésica.

Com relação ao AS e diclofenaco, apesar da modificação molecular não ter ocasionado melhora na resposta antinociceptiva em relação à dipirona, promoveu melhor resposta em relação aos AINEs padrão, demonstrando potencialização do efeito analgésico, enquanto que para o composto ibuprofeno, esta modificação não foi eficaz para esta atividade.

5.3 Gastro-ulceração ou gastrotoxicidade

Os AINES, por ação inibitória de COX₁ das células parietais, promovem o maior efeito adverso relatado para esta classe de fármacos, a gastrotoxicidade.

As PGE₂ são responsáveis pela modulação da produção ácida do estômago. Além disso, promovem a produção de muco e bicarbonato, o qual mantém a parede do estômago com pH fisiológico, protegido do meio gástrico. Com a sua inibição pela ação dos AINEs, o mecanismo protetor do estômago torna-se falho, podendo provocar ulcerações e hemorragias.

Modificações moleculares em antiinflamatórios com a introdução de transportadores, apresentam vantagens em relação à toxicidade, devido a um perfil de liberação diferenciado, que pode ser observado através do teste de edema de pata. Entretanto, era de se esperar que o perfil de gastro-ulceração para o ibu-tau apresentasse atividade similar ao ibuprofeno, uma vez que o efeito antiinflamatório não foi alterado em função do tempo.

Tal fato não ocorreu, sugerindo assim, que há, além do fator de liberação, um efeito significativo protetor da taurina quando o mesmo está ligado ao AINE.

Este efeito protetor gástrico da taurina não se deve a um efeito direto no bloqueio COX₁ gástrica, mas muito provavelmente, por suas ações indiretas provocadas por esta inibição pelos AINEs.

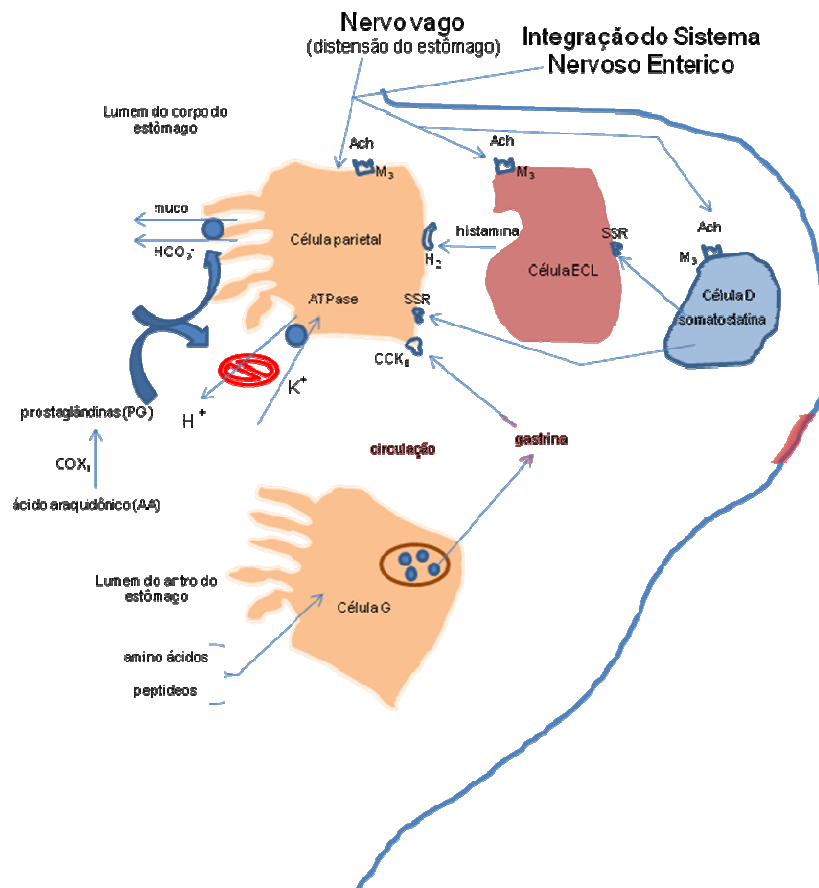


Figura 35. Mecanismo de secreção ácida pelo estômago.

Conforme a figura 35, a secreção gástrica inicia-se na fase cefálica, com a estimulação do nervo vago atuando no sistema nervoso entérico, estimulando a liberação de gastrina pelas células G no estômago. Por vez, a gastrina estimula as células tipo enterocromafins (ECL) a liberar histamina, que atua sinergicamente com a acetilcolina na liberação de HCl. As células D liberam somatostatina, que atua na regulação paracrina, inibindo a liberação de gastrina. O mecanismo de defesa da mucosa gástrica envolve a produção de muco e liberação de bicarbonato pelas células epiteliais superficiais, através de ativação de COX₁ e liberação de PGs (BRASILEIRO-FILHO, 2009).

Durante o uso de AINES, a inibição de COX₁, gera um processo inflamatório devido ao excesso de ácido e falha do sistema de defesa gástrica. Na migração de leucócitos ao tecido inflamado ocorre a extrusão de enzimas hidrolíticas, estocadas nos grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos, como

mieloperoxidase (MPO), presente em grande quantidade nos grânulos azurófilos, o qual geram dano, em conjunto com o NADPH oxidase de membrana, pela formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e oxidação de biomoléculas (VELOSSA, 2007).

Este mecanismo é de extrema importância para o sistema de defesa contra microorganismos durante a fagocitose. Duas enzimas são essenciais para este processo: NADPH oxidase, que catalisa a redução monovalente do oxigênio molecular e ânion superóxido e a MPO, que utiliza o peróxido de hidrogênio para oxidar o íon cloreto a ácido hipocloroso (HOCl). A figura 36 mostra o mecanismo de formação de EROs pelos leucócitos durante o processo inflamatório.

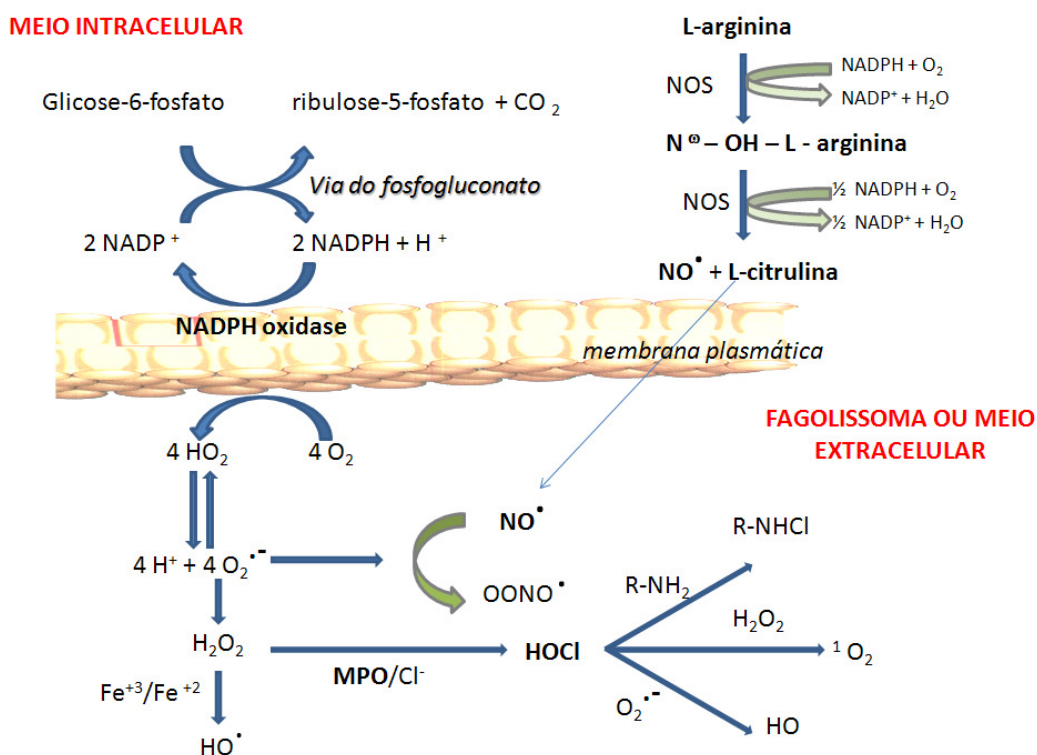


Figura 36. Mecanismo de formação de EROs pelos leucócitos durante o processo inflamatório (adaptado de VELOSSA, 2007)

Entre os EROs, encontramos:

- ✓ O ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) gerado após redução monoeletrônica do oxigênio que ocorre com quase todas as células, e na ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos. A sua forma protonada é o radical hidroxiperoxil ($\text{HO}_2^{\cdot}$), sendo esta espécie, mais reativa que o próprio superóxido. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990).
- ✓ O oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), estado excitado de oxigênio, por não apresentar os elétrons desemparelhados não é considerado um radical, mas é altamente reativo podendo oxidar facilmente lipídeos de membranas biológicas. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990)
- ✓ O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), através da dismutação enzimática, pela superóxido dismutase (SOD) ou espontânea do radical superóxido, Mesmo não sendo um radical livre é altamente tóxico, produz o radical hidroxil, ($\text{HO}\cdot$) um dos radicais mais reativos conhecidos, sendo capaz de reagir com membranas biológicas ou proteínas ligadas ao íon Fe^{++} (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).
- ✓ O **NO** e peroxinitrito ($\text{OONO}^{\cdot}$) formam-se a partir da ativação da NOS. O NO é uma espécie reativa do nitrogênio, que, em meio aquoso pode formar outras espécies reativas. O $\text{OONO}^{\cdot}$ é um potente oxidante, produto de reação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ com $\text{NO}^{\cdot}$.
- ✓ O **HOCl**, produto da oxidação do cloreto, é catalisada pela mieloperoxidase. Sendo a espécie oxidante mais abundante, pode dar origem a ao radical hidroxil e o oxigênio singlete. Apresenta um alto padrão de intoxicação celular, haja vista que os mamíferos não apresentam enzimas catalíticas capazes de detoxicar oxidantes clorados (LAPENNA & CUCCURULLO, 1996). As cloraminas, como a monoclорamina (NH_2Cl) é formada pela reação de HOCl com amônia. Sendo esta muito lipossolúvel, é mais reativa que HOCl.

O estudo das EROs torna-se importante no momento em que observa-se o seu aparecimento em diversas doenças. No processo de aterosclerose, por exemplo, foi encontrado mieloperoxidases, sugerindo segundo Wasil e colaboradores, já em 1987 a necessidade do desenvolvimento de fármacos que possam ser aplicados na terapêutica como antiinflamatórios capazes de antagonizar a HOCl, protegendo moléculas alvo biologicamente importantes.

Trabalho de Lapenna e Cuccurullo, 1996, sugere que as cloraminas, particularmente a NH_2Cl estão relacionadas à injúria gástrica, observada em

presença de infecção por *Helicobacter pylori*, que produz altas quantidades de amônia.

Com relação às ações oxidativas, Kourounakis e colaboradores (2000), sintetizaram pró-fármacos de *n*-acetilcisteína com antiinflamatórios. O estudo demonstrou que os derivados apresentam redução a toxicidade gástrica, porém em concentrações elevadas, a atividade mucolítica da *n*-acetilcisteína, devido a presença do grupo SH da cisteína, prejudica a própria mucosa, potencializando a toxicidade gástrica.

Ainda, ao administrar doses de 1,82 mg/Kg de *n*-acetil cisteína durante 4 (quatro) dias observou 80 % de óbito, sendo superior aos AINEs padrões que apresentaram índice de 50% de mortalidade (KOUROUNAKIS et al, 2000).

Um dos mecanismos de ação da gastroproteção da taurina proposto, segundo Grimbé, 1994, envolve a interação da taurina com o peróxido de hidrogênio e o cloreto na reação da mieloperoxidase, gerando taurina cloramina (Tau-Cl), um produto que também é pró-oxidante, porém de baixa reatividade, neutralizando, assim, a formação de radicais livres durante o processo inflamatório.

Adicionalmente, a Tau-Cl seria capaz de inibir a formação de mediadores inflamatórios como NO, TNF-alfa e PGE₂. Este efeito parece ser observado com a Tau-Cl, mas não pela taurina isoladamente, dose dependente (MARCINKIEWICZ et al, 1998).

Em 2006, Kontny e colaboradores observaram, também, a inibição pela Tau-Cl da proliferação de sinoviócitos FLS (*fibroblast like synoviocytes*), células que participam do processo de sinovite e hiperplasia sinovial, considerados como fatores importantes na caracterização da artrite reumatóide.

Klam e Shacter (2005) demonstraram que a Tau-Cl minimizam os efeitos de respostas inflamatórias incontroláveis responsáveis pela morte celular (necrose) causadas pela HOCl.

Estes dados sugerem fortemente que a ação gastroprotetora do pró-fármaco taurínico seja não somente por suas ações imunomoduladoras, que envolvem mecanismos múltiplos, como a participação no processo de apoptose e regulação da cascata inflamatória, por inibição de fatores pró-inflamatórios

como o TNF- α , o NF κ B e a iNOS, como também na inibição da formação de EROs, formando Tau-Cl.

Os compostos híbridos, porém, também apresentaram efeito gastroprotetor, observado para todos os compostos testados, inclusive para o derivado ibuprofeno. Tendo como base os resultados de atividade antiinflamatória aguda, esta hibridação modificou sua estrutura tridimensional no sentido de que sua ação COX₂ diminuísse. Dessa forma, é possível sugerir que o mesmo pudesse acontecer com a enzima COX₁, igualmente e, portanto, não promover gastroulceração por perda da atividade antiinflamatória COX₁ e 2. No entanto, o padrão de proteção em 100% ocorreu para todos os compostos, o que sugere o mesmo mecanismo de proteção para todos os compostos, incluindo o ibuprofeno.

Tendo em vista que a lesão no estômago pela ação da inibição em COX₁ gera um processo inflamatório com a presença de TNF- α , é possível supor que os compostos híbridos apresentaram esta atividade, inibindo TNF- α , tornando-os capazes de controlar o processo inflamatório. Esta hipótese deverá ser comprovada com o testes posteriores de atividade inibidora de TNF- α .

5.4 Atividade antiinflamatória crônica (modelo colite ulcerativa distal):

As doenças inflamatórias intestinais (DII) compreendem um amplo espectro de afecções de etiologia desconhecida, que leva a cronicidade.

Apesar de seu gatilho inicial não estar totalmente descrito, sabe-se que ocorre uma superprodução de mediadores pró-inflamatórios tais como citocinas, metabolitos do A.A. (VOWINKEL et al, 2004) e EROs (REIFEN et al, 2004; CETINKAYA et al, 2005).

A administração de antiinflamatórios, como os aminosalicílicos (mesalazina e sulfassalasina) vão de encontro com a patogênese (PRAVDA, 2005), porém não há terapia clinica definitiva (CORMAN, 2005).

Segundo Wallace, em 1992, a idéia da utilização de agentes anti-TNF- α , já era amplamente difundido, uma vez que o TNF- α está associado com a injúria tissular e indução de IL-1 β e PGE₂.

No modelo experimental de doença de Crohn, qualquer segmento digestivo é afetado enquanto que na colite ulcerativa ocorre um infiltrado leucocitário na mucosa e ulceração do epitélio do cólon e reto. A apresentação clínica envolve ataques de sangramento retal, diarreia, eliminação de muco, dor abdominal e perda de peso. Existem manifestações extra-intestinais como doença hepática, renal, artrite e amiloidose (ITZKOWITZ & YIO, 2004), descrito como *“teoria de indução radical da colite ulcerativa”*, em que deste modo, a difusão inicial de espécies reativas comprometeria a barreira local da mucosa e causaria uma transitória ativação imune, podendo gerar tais manifestações com subsequente propagação (PRAVDA, 2005).

Existem vários modelos animais para indução de colite, entre eles, o ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) e dextrano sulfato de sódio, ambos os métodos são altamente agressivos, atingindo além da camada mucosa e sub-mucosa, a camada muscular e serosa, sendo que o TNBS apresenta um alto potencial necrosante com índices de mortalidade que chegam a 40% dos animais submetidos à este protocolo. Descrito por Macpherson e Pfeiffer (1978), a aplicação de solução de ácido acético *per rectum* intraluminal, promove uma colite difusa sobre resposta inflamatória inespecífica.

Optou-se por utilizar ácido acético a 4% como agente irritante da mucosa, por apresentar padrões de similaridade com a colite ulcerativa humana (FABIA et al, 1992). Concentrações maiores como 8% aumentam o risco de mortalidade (VASSALLO et al, 2007; FABIA et al., 1992).

O tratamento se iniciou a partir do 5º (quinto) dia após a indução, pois é esperada uma uniformidade do grupo sobre a apresentação da colite após este período (FABIA et al, 1992). Ressalta-se que a introdução do cateter, gera um estímulo imunológico mecânico, resultando em uma resposta hiperplásica com mais de dois centros germinativos em toda extensão da submucosa, sendo

classificado microscopicamente com grau máximo de 2. Por apresentar este valor em todos os grupos, desconsiderou-se este dado nas análises.

Os resultados demonstraram que os AINEs, quando administrados em animais com colite inflamatória intestinal induzida por ácido acético aumentam a toxicidade, para a maioria dos AINEs estudados, aumentando os quadros de mortalidade.

Estes resultados suportam a hipótese de que a administração de AINEs acrescido ao processo inflamatório intestinal promoveu uma potencialização dos efeitos inflamatórios, com a inibição de COX₁, gerando a formação de agentes pró-oxidantes. O aumento da toxicidade variou de 1,58 a 7,74 vezes, isto é, diminuindo a margem de segurança em até 87%.

Estes resultados estão de acordo com o estudo de revisão de Kefalakes e colaboradores (2009), que discute a exacerbação da inflamação intestinal associado a AINES, observada em pesquisas clínicas, relatos de casos, artigos de revisão e outros. Os autores mostraram evidências substanciais de confirmação deste agravamento, porém, ao comparar com os inibidores seletivos COX₂, os dados são conflitantes, demonstrando segurança em relação aos AINES tradicionais, mostrando que os AINEs seletivos são mais seguros, quando utilizados em tratamento a curto prazo.

De fato, a inibição das prostaglandinas parece estar envolvida com os efeitos adversos do tratamento. Mais uma vez, a formação de HOCl pode estar envolvida como promotora de um processo inflamatório paradoxal dos AINEs.

A dose utilizada para o AS foi de 41 mg/kg ácido salicílico, que não promoveu morte nos animais. Ressalta-se que este valor foi 21,7 vezes menor que a DL₅₀.

Ambas as modificações moleculares, hibridação ou latenciação, não causaram mortalidade (com exceção de ibuprofeno) tendo a frequência de fezes normalizada e ausência de sangramento. Os animais não perderam peso durante o tratamento, sugerindo um perfil de alimentação normal. Além disso, foi observado regressão da ulceração e necrose.

Os derivados taurínicos obtiveram melhor resposta para os derivados dic-tau, ibu-tau em relação aos derivados ftalimídicos, enquanto que a resposta de nap-tau e nap-ftd se mostraram semelhante.

O celecoxibe, inibidor seletivo de COX₂, a mesalazina e sulfassalazina foram testados com o objetivo de comparação com os AINES modificados. Além disso, tendo em vista que os derivados taurínicos apresentaram alta solubilidade em água, buscou-se observar a atividade dos compostos nap-tau e dic-tau, intra-peritonealmente, na dose de 150 µM.

Os resultados por nós obtidos, demonstraram que tanto a mesalazina, como a sulfassalazina apresentaram o mesmo potencial terapêutico (84% de regressão da ulceração e necrose). Já para o celecoxibe foi verificado uma remissão em 50% dos animais, o que sugere que a inibição seletiva de COX₂ não é o unico fator envolvido na propagação do processo inflamatório intestinal (NIELSEN & MUNCK, 2007). A atividade dos derivados administrados i.p. foi surpreendente, com remissão total da ulceração e necrose, fato este que evidencia o papel imunomodulatório da taurina no processo inflamatório crônico.

O mecanismo proposto para atividade da taurina nos processos inflamatórios intestinais envolve a inibição de iNOS, TNF-α, NF-κB, interleucinas conforme a figura 37.

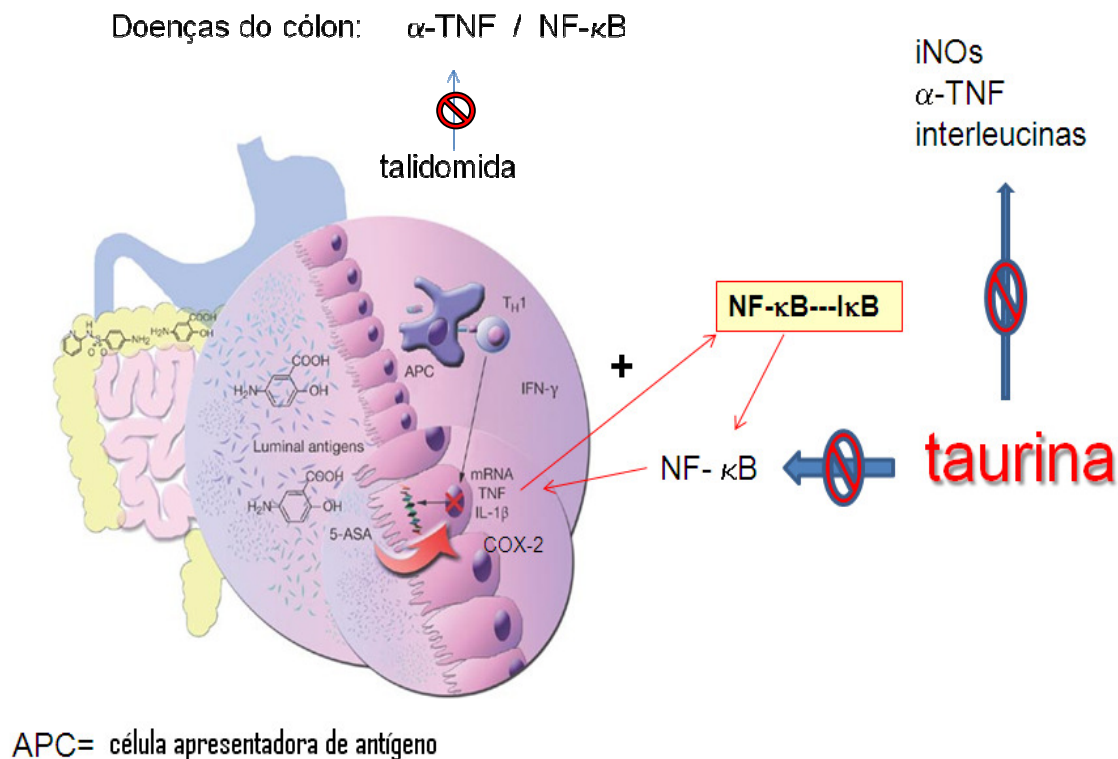


Figura 37. Mecanismo de ação proposto para mesalazina, taurina e talidomida na inibição do processo inflamatório intestinal (adaptado de NIELSEN & MUNCK, 2007).

Além disso, a taurina por formação das cloraminas potencializa o efeito protetor gástrico e intestinal. Com os derivados ftalimídicos, a resposta na regressão da ulceração e necrose foi devido à atividade inibitória de TNF- α .

Pelo mecanismo de indução de colite, o processo inflamatório promove a ativação dos mediadores pró-inflamatórios, entre eles, o TNF- α . A presença de outras citocinas pró-inflamatórias induz a liberação de NF- κ B do complexo inativo NF- κ B-I κ B o qual promove a ativação de TNF- α , gerando uma retroalimentação positiva transcricional da cascata inflamatória.

A talidomida apresenta um papel na inibição de TNF- α e estimula a transcrição de citocinas antiinflamatórias e pro-anabólicas como a IL-4 e IL-10. Os resultados dos derivados ftalimídicos vêm de encontro com os resultados

obtidos por Prakash e colaboradores, 2008, que observaram a atividade antiinflamatória intestinal da talidomida em ratos (dose dependente).

O efeito mais acentuado dos derivados taurínicos sugere que o mecanismo da taurina inclui a inibição de iNOS, além da inibição do feedback positivo da cascata inflamatória descrito acima.

Com o inibidor seletivo COX₂, o efeito sobre a inflamação evitou apenas o sangramento, mas não a frequência das fezes. Os grupos dos animais tratados com AINEs ao final do experimento apresentaram graus de lesão variados com tumefação e necrose de órgãos, conforme observado pela figura 38.

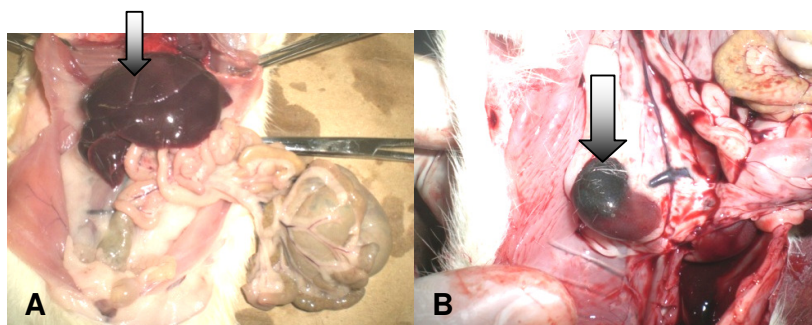


Figura 38. Fotografia dos órgãos durante autópsia de animal com colite ulcerativa, tratado com diclofenaco 300 µM (v.o.) por 5 dias. A) tumefação hepática, e B) aspecto necrótico dos rins.

Eventos visualizados na figura 38 foram observados para os derivados ftalimídicos, porém, em menor intensidade. Já com os derivados taurínicos, todos os órgãos foram preservados.

Os resultados das biopsias do intestino grosso dos AINEs mostraram necrose de toda a parede, enquanto que os derivados taurínicos, a mucosa apresenta-se íntegra, ou em processo de transição escamoso-glandular que indica restabelecimento da mucosa, demonstrando que a taurina apresentou um papel regenerador da necrose.

Estes resultados demonstram que os pró-fármacos antiinflamatórios taurínicos, são potenciais candidatos a fármacos antiinflamatórios para teste

clínico, em substituição aos AINEs clássicos. A figura 39 mostra as fases de desenvolvimento de um novo fármaco e o estágio da qual se encontra os estudos com os derivados taurínicos e ftalimídicos.

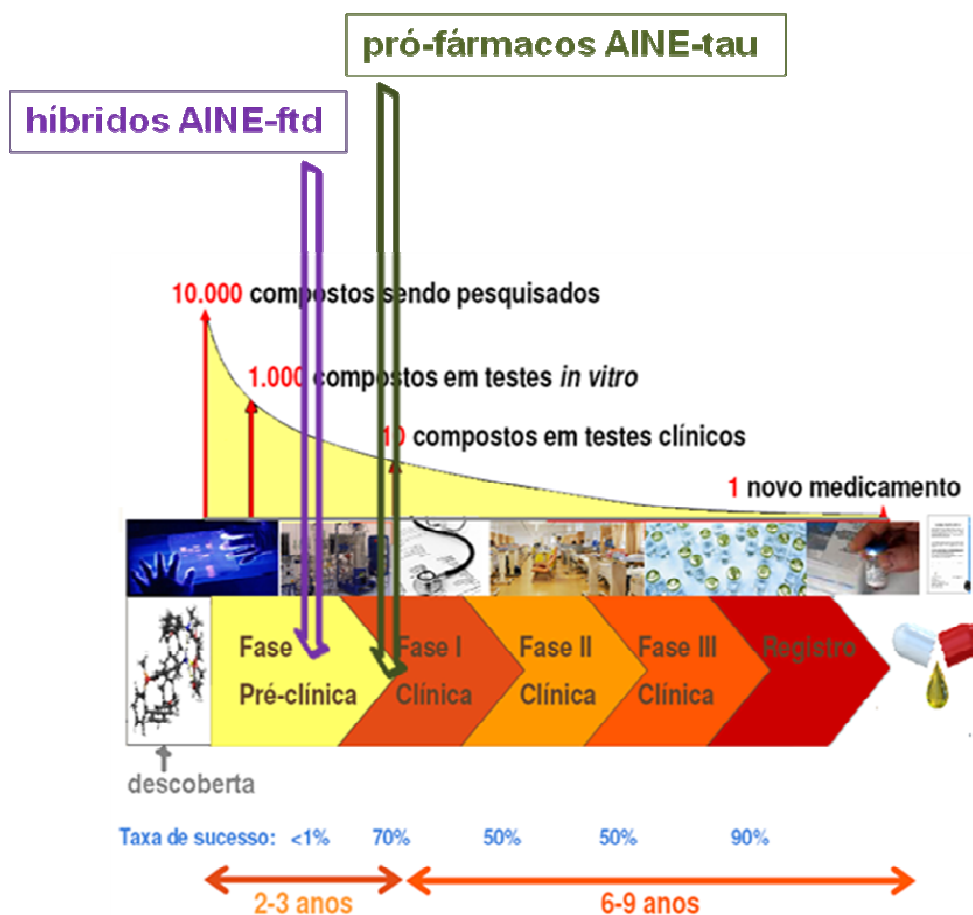


Figura 39. Fases da pesquisa de novos fármacos indicando os estágios das pesquisas dos derivados ftalimídicos e taurínicos.

A pesquisa com os derivados taurínicos se encontra mais avançada que os derivados ftalimídicos, necessitando de ensaios de hidrólise, provando a clivagem destes pró-fármacos em AINEs e taurina *in vivo*. Ambos já conhecidos e utilizados em terapêutica e em bebidas energéticas respectivamente, facilitariam o registro destes compostos novos, junto aos órgãos reguladores (ANVISA).

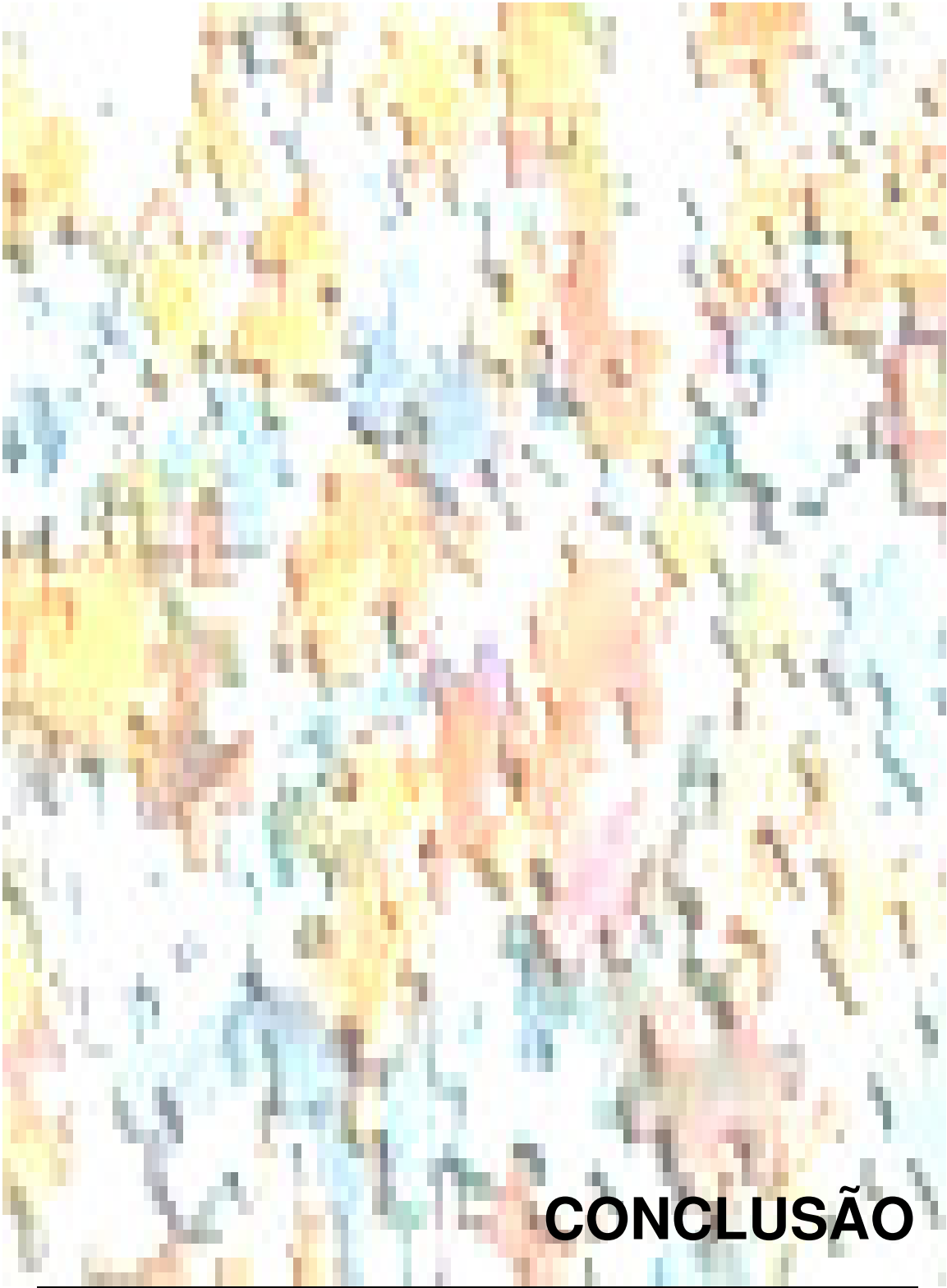


RESUMO DOS RESULTADOS

6. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS

- ✓ Os derivados ftalimídicos AS-ftd, dic-ftd, nap-ftd, ceto-ftd apresentaram atividade antiinflamatória (aguda) em modelo de edema de pata similar aos referidos padrões quando administrados nas doses de 100 e 300 μM , v.o. e atividade antiinflamatória (crônica) em modelo de colite ulcerativa, superior aos referidos padrões, na dose de 300 μM , v.o.
- ✓ O derivado ibu-ftd mostrou atividade inferior ao ibuprofeno quando testado em modelo de edema de pata e colite ulcerativa, sugerindo que a hibridação molecular possa ter alterado a biodisponibilidade e/ou interação com receptor.
- ✓ Os derivados ftalimídicos AS-ftd, dic-ftd, nap-ftd, ceto-ftd apresentaram atividade superior em promover analgesia em modelo de contorção quando comparados com seus padrões, enquanto que a atividade de ibu-ftd não foi significativamente diferente, quando administrados nas doses de 100 e 300 μM , v.o.
- ✓ Os derivados ftalimídicos não apresentaram gastrotoxicidade com dose de 300 μM , similarmente observado por Castro (2008) na dose de 100 μM .
- ✓ Os derivados taurínicos, AS-tau, dic-tau, ibu-tau, nap-tau, indo-tau são apresentaram atividade antiinflamatória (aguda) em modelo de edema de pata inferior na primeira e segunda horas seguida de atividade similar ao AINES padrões, quando administrados nas doses de 100 e 300 μM , v.o.
- ✓ A taurina atenuou a gastrotoxicidade dos AINEs, quando misturado em proporções equimolares enquanto que os pró-fármacos recíprocos taurínicos com AINEs, mostraram-se destituídos desta toxicidade, quando administrados nas doses de 100 e 300 μM , v.o.
- ✓ Os AINEs clássicos promovem aumento de toxicidade em animais com colite ulcerativa, potencializando a mortalidade..

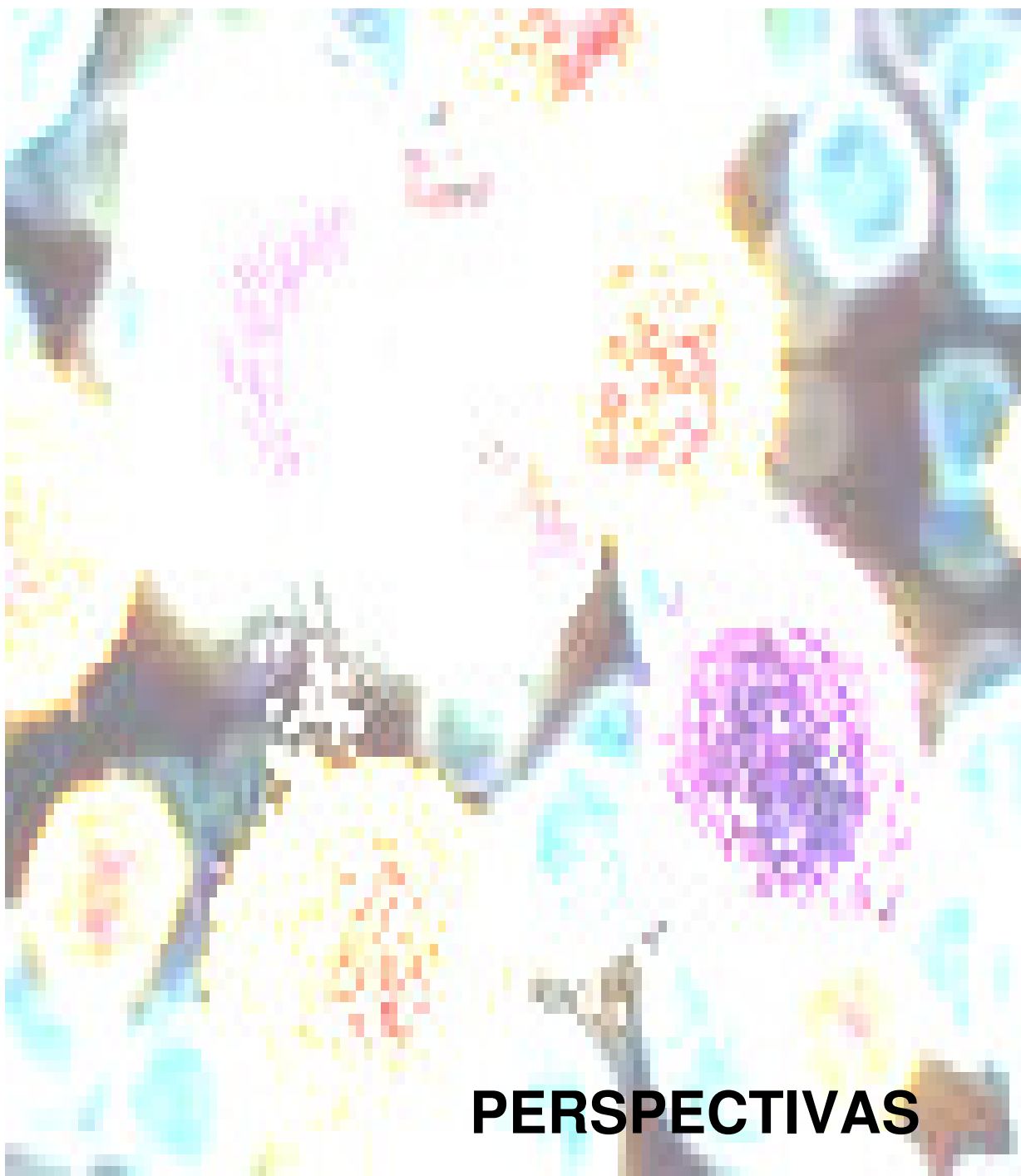
- ✓ No modelo de inflamação crônica (colite ulcerativa), os derivados taurínicos mostraram atividade superior aos AINES padrão, com diminuição de mortalidade e exclusão dos sinais clínicos como sangramentos, perda de peso e aumento da frequência de evacuações (aumento de fezes), quando administrados na dose de 300 μ M, v.o.
- ✓ Todos os derivados taurínicos são hidrossolúveis, permitindo a administração parenteral. Os derivados dic-tau e nap-tau, administrados i.p. na dose de 150 μ M apresentaram supressão da colite em 100%, superior ao valor observado pela administração v.o. de 300 μ M de mesalazina e sulfassalazina (67% de remissão total), fármacos de referência para o tratamento de colite ulcerativa.
- ✓ Todos os AINES-tau são potenciais candidatos a fármacos AINEs para estudo de fase clínica I.



CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Atualmente, não existem no mercado mundial, AINEs destituídos de gastrotoxicidade que está entre as reações adversas também provocados pelos agentes específicos, como o celecoxibe. Neste sentido, a busca de novos AINEs é de extrema importância, tendo em vista o envolvimento do processo inflamatório como gatilho de diversas doenças. Os derivados híbridos ftalimídicos (Castro, 2008) planejados com o objetivo de tratamento em inflamações crônicas, se mostraram igualmente eficazes em relação aos padrões AINEs, nos modelos de inflamação aguda e superior em modelo de colite ulcerativa e analgesia, entretanto, estudos ainda devem ser conduzidos em modelo de artrite reumatóide. Enquanto os resultados obtidos para os derivados taurínicos (Vizioli, 2006) foram surpreendentes, mostrando atividade antiinflamatória aguda e crônica e destituídos de qualquer toxicidade gástrica, obtendo remissão total das lesões ulcerativas do cólon, o que não acontece com os fármacos utilizados no mercado para o tratamento da colite, como a mesalazina e sulfassalazina. Estes dados, são promissores para o avanço em testes clínicos e se confirmando em humanos, será uma grande evolução no tratamento de processos inflamatórios, principalmente para aqueles pacientes que atualmente necessitam do medicamento, mas são impossibilitados de usá-los, como por exemplo, hipertensos, diabéticos, pacientes com disfunções renais/ hepáticos, entre outros.



PERSPECTIVAS

8. PERSPECTIVAS

Para os derivados ftalimídicos:

- ✓ Teste de atividade analgésica central: modelo *hot plate*;
- ✓ Teste de atividade antiinflamatória em modelo de artrite reumatóide;
- ✓ Teste de reatividade vascular;
- ✓ Agregação plaquetária;
- ✓ Análise histopatológico: rins, fígado e coração.

Para os derivados taurínicos:

- ✓ Teste de hidrólise;
- ✓ Análise histopatológico: rins, fígado e coração;
- ✓ Teste de reatividade vascular;
- ✓ Agregação plaquetária
- ✓ Ensaios de toxicidade em laboratório certificado pela Anvisa;
- ✓ Estudos de escalabilidade (aumento de escala sintética para a obtenção dos compostos).



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (segundo NBR 6023/2002)

ABDELLATIF, K.R.; CHOWDHURY, M.A.; DONG, Y.; VELÁZQUEZ, C.; DAS, D.; SURESH, M.R.; KNAUS, E.E. Diazen-1-ium-1,2-diolated nitric oxide donor ester prodrugs of 5-(4-hydroxymethylphenyl)-1-(4-aminosulfonylphenyl)-3-trifluoromethyl-1H-pyrazole and its methanesulfonyl analog: synthesis, biological evaluation and nitric oxide release studies. *Bioorg Med Chem.* v. 16 (22), p. 9694-9698, 2008.

AGGARWAL, B.B.; KUNNUMAKKARA, A.B.; HARIKUMAR, K.B.; GUPTA, S.R. THARAKAN, S.T.; KOCA, C.; DEY, S.; SUNG, B. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship? *Ann N Y Acad Sci.* v. 1171, p. 59-76, 2009.

ANDERSSON, J. The inflammatory reflex-introduction. *J Intern Med.* v. 257 (2), p.122-125, 2005.

ANDREADOU, I.; PAPALOIS, A.; TRIANTAFILLIDIS, J.K.; DEMONAKOU, M.; GOVOSDIS, V.; VIDALI, M.; ANAGNOSTAKIS, E.; KOUROUNAKIS, P.N. Beneficial effect of a novel non-steroidal anti-inflammatory agent with basic character and antioxidant properties on experimental colitis in rats. *Eur J Pharmacol.* v. 441 (3), p. 209-14, 2002.

ANTONIOLI, E.; NOZZOLI, C.; GIANFALDONI, G.; MANNELLI, F.; ROSSI, S.; BETTI, S.; BERNARDESCHI, P.; FIORENTINI, G.; BOSI, A. Pulmonary hypertension related to thalidomide therapy in refractory multiple myeloma. *Ann Oncol.* v.16 (11), p.1849-1850, 2005.

ARNAUT, M.M. Structural diversity of cell adhesion molecules and their role in inflammation. In: *KELLEY textbook of rheumatology*. 1997, v. 1, p.303.

AZULAY, R.D. Talidomida: indicações em Dermatologia. *An Bras Dermatol.* v. 79 (5), p. 603-608, 2004.

BALASUBRAMANIAN, T.; SOMASUNDARAM, M.; FELIX, A.J. Taurine prevents Ibuprofen-induced gastric mucosal lesions and influences endogenous antioxidant status of stomach in rats. *ScientificWorldJournal.* v. 6 (4), p. 1046-1054, 2004.

- BANDARAGE, U.K.; CHEN, L.; FANG, X.; GARVEY, D.S.; GLAVIN, A.; JANERO, D.R.; LETTS, L.G.; MERCER, G.J.; SAHA, J.K.; SCHROEDER, J.D.; SHUMWAY, M.J.; TAM, S.W. Nitrosothiol esters of diclofenac: synthesis and pharmacological characterization as gastrointestinal-sparing prodrugs. **J Med Chem.** v. 43 (21), p. 4005-4016, 2000.
- BARREIRO, E.J. & FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal: As razões moleculares da ação dos fármacos.** 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 536 p.
- BARREIRO, E.J. A Química Medicinal e o paradigma do composto-protótipo. **Rev. Virtual Quím.** v. 1 (1), p. 26-34, 2009.
- BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M.; MIRANDA, A.L.P.; RODRIGUES, C.R. A química medicinal de N-acilidrazonas: Novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. **Quím. Nova.** v. 25 (1), p. 129-148, 2002.
- BARRETO, R.L.; CORREIA, C.R.D. & MUSCARÁ, M.N.: Óxido Nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Quím. Nova.** v.28 (6), p.1046-1054, 2005.
- BERGSTROM, J.; ALVESTRAND, A.; FÜRST, P.; LINDHOLM, B. Sulphur amino acid in plasma and muscle in patients with chronic renal failure: evidence for taurine depletion. **J Inter Med.** v. 226, p. 189-194, 1989.
- BITTENCOURT, Rosane et al. Talidomida e mieloma múltiplo: verificação dos efeitos terapêuticos através de parâmetros clínico e laboratoriais. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 2004, vol.26, n.4, pp. 245-255. ISSN 1516-8484.
- BLALOCK, J. E. Shared ligands and receptors as a molecular mechanism for communication between the immune and neuroendocrine systems. **Ann N Y Acad Sci.** v. 741, p. 292–298, 1994.
- BORGES, L.G.; FROELICH, P.E. Talidomida: novas perspectivas para utilização como antiinflamatório, imunossupressor e antiangiogênico. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v. 49 (1), p. 96-102, 2003.
- BOUMA, G.; STROBER, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. **Nat Rev Immunol.** v. 3 (7), p. 521-533, 2003.

BOZZA, P.T.; YU, W.; PENROSE, J.F.; MORGAN, E.S.; DVORAK, A.M.; WELLER, P.F. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. **J Exp Med.** v.15: 186 (6), p.909-920, 1997.

BRASILEIRO-FILHO, G. **Bogliolo patologia geral.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, 364 p.

CALABRESE, L.; FLEISCHER, A.B. Thalidomide: current and potential clinical applications. **Am J Med.** v.108 (6), p. 487-495, 2000.

CARMAN, CV. Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by invadosome-like protrusions. **J Cell Sci.** v.122 (17), p. 3025-3035, 2009.

CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos inibidores específicos da ciclooxygenase-2: avanços terapêuticos. **Rev. Bras. Anesthesiol.** v. 54, p. 448-464, 2004.

CASTRO, L.F. Obtenção de candidatos a fármacos anti-inflamatórios não esteroidais destituídos de gastrotoxicidade, Araraquara: Unesp-FCF, 2008 (**Tese de Doutorado**).

CASTRO, L.F. Síntese de Pró-fármaco Osteotrópico Derivado de Naproxeno Araraquara: Unesp-FCF, 2003 (**Dissertação de Mestrado**)

CASTRO, L.F.; SILVA, A.T.A & CHUNG, M.C. Bifosfonatos (BFs) como transportadores osteoprotéticos no planejamento de fármacos dirigidos. **Quim. Nova.** v. 27 (3), p. 456-460, 2004.

CENA, C.; LOLLI, M.L.; LAZZARATO, L.; GUAITA, E.; MORINI, G.; CORUZZI, G.; MCELROY, S.P.; MEGSON, I.L.; FRUTTERO, R.; GASCO, A. Antiinflammatory, gastrosparring, and antiplatelet properties of new NO-donor esters of aspirin. **J Med Chem.** v. 46 (5), p. 747-754, 2003.

CETINKAYA, A.; BULBULOGLU, E.; KURUTAS, E.B.; CIRALIK, H.; KANTARCEKEN, B.; BUYUKBESE, M.A. Beneficial effects of N-acetylcysteine on acetic acid-induced colitis in rats. **Tohoku J Exp Med.** v. 206 (2), 131-139, 2005.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L. et. al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other

analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. **Proc Natl Acad Sci.** v. 99, p. 13926-13931, 2002.

CHUNG, M.C.; FERREIRA, E.I. O Processo de Latenciação no Planejamento de Fármacos. **Quím. Nova.** v.22, n.1, p.75-84, 1999.

CHUNG, M.C.; SANTOS, J.L.; VIZIOLI, E.O.; BLAU, L.; MENEGON, R.F.; PECCININI, R.G.: Synthesis, *ex vivo* and *in vitro* hydrolysis study of an indoline derivative designed as an anti-inflammatory with reduced gastric ulceration properties. **Molecules.** v. 14, p. 3187-3197, 2009.

CIOLI, V.; PUTZOLU, S.; ROSSI, V.; CORZA, B.P.; CORRADINO, C. The role of direct tissue contact in the production of gastrointestinal ulcers by anti-inflammatory drugs in rats. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 50, p. 283-289, 1979.

COËFFIER, M.; MARION-LETELLIER, R.; DÉCHELOTTE, P. Potencial for amino acids supplementation during inflammatory bowel disease. **Inflamm Bowel Dis.** 1 jul, 2009.

COLLIER, H.O.J.; DINNEEN, J.C.; JONHSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br J Pharmacol Chemother.** v. 32, p. 295-310, 1968.

CORMAN, M.L. **Colon and rectal surgery.** 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. 1743 p.

COTRAN, R.S.; BRISCOE, D.M. Endothelial cells in inflammation. In: KELLEY W. et al. **Textbook of rheumatology**, 5 ed. Philadelphia: WB Saundery, 1997.

CROFFORD LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. **J Rheumatol Suppl.** v. 49, p.15-19, 1997.

CUISINIER, C.; WARD, R.J.; FRANCAUX, M.; STURBOIS, X.; De WITTE, P. Changes in plasma and urinary taurine and amino acids in runners immediately and 24h after a marathon. **Amino Acids.** v. 20 (1), p.13-23, 2001.

CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol.** v. 107 (3), p. 660-664, 1992.

- DAMAJ, G.; LEFRÉRE, F.; DELARUE, R.; VARET, B.; FURMAN, R.; HERMINE, O. Thalidomide therapy induces response in relapsed mantle cell lymphoma. **Leukemia**. v.17, p.1914–1915, 2003.
- DARLING, R.L.; ROMERO, J.J.; DIAL, E.J.; AKUNDA, J.K.; ANGENBACH, R.; LICHTENBERGER, L.M. The effects of aspirin on gastric mucosal integrity, surface hydrophobicity, and prostaglandin metabolism in cyclooxygenase knockout mice. **Gastroenterology**. v. 127 (1), p. 94-104, 2004.
- DAWSON, R. Jr; BIASETTI, M.; MESSINA, S.; DOMINY, J. The cytoprotective role of taurine in exercise-induced muscle injury. **Amino Acids**. v. 22 (4), p.309-324, 2002.
- DE-PALMA, C.; DI-PAOLA, R.; PERROTTA, C.; MAZZON, E.; CATTANEO, D.; TRABUCCHI, E.; CUZZOCREA, S.; CLEMENTI, E. Ibuprofen-arginine generates nitric oxide and has enhanced anti-inflammatory effects. **Pharmacol Res**. v. 60 (4), p. 221-228, 2009.
- DHANESHWAR, S.S.; GAIROLA, N.; KANDPAL, M.; VADNERKAR, G.; BHATT, L.; RATHI, B.; KADAM, S.S. Synthesis, kinetic studies and pharmacological evaluation of mutual azo prodrugs of 5-aminosalicylic acid for colon-specific drug delivery in inflammatory bowel disease. **Eur J Med Chem**. v. 44 (10), p. 3922-3929, 2009.
- DINERMAN, J.L.; DAWSON, T.M.; SCHELL, M.J.; SNOWMAN, A.; SNYDER, S.H. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 91 (10), p. 4214-4218, 1994.
- DUBOIS, R. W.; MELMED, G. Y.; HENNING, J. M.; LAINES, L. Guidelines for the appropriate use of non-steroidal anti-inflammatory drugs, cyclo-oxygenase-2-specific inhibitors and proton pump inhibitors in patients requiring chronic anti-inflammatory therapy. **Aliment Pharmacol Ther**. v. 19, p. 197-208, 2004.
- FABIA, R.; WILLÉN, R.; AR'RAJAB, A.; ANDERSSON, R.; AHRÉN, B.; BENGMARK, S. Acetic acid-induced colitis in the rat: a reproducible experimental model for acute ulcerative colitis. **Eur Surg Res**. v. 24 (4), p. 211-225, 1992.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.** v. 43, p. 61-68, 1997.

FERRI, M.; FAGGIOLI, G.; FRATESI, F.; STELLA, A. Multifocal Arterial Thrombosis during Thalidomide Therapy: Case Report and Review of the Literature. **Case Report Med.** v. 2009, p. 1-3, 2009.

FOOS, T.M.; WU, J.Y. The role of taurine in the central nervous system and the modulation of intracellular calcium homeostasis. **Neurochem Res.** v. 27 (1-2), p. 21-6, 2002

FRIEND, D.R. New oral delivery systems for treatment of inflammatory bowel disease. **Adv Drug Deliv Rev.** v. 57 (2), p. 247-65, 2005.

FÜRST, P.; STEHLE, P. Are intravenous amino acids solutions embalanced. **New Horizons.** v. 2, p. 215-223, 1994.

GABRIEL, S.E. & MATTESON, E.L. Economic and quality-of-life impact of NSAIDs in rheumatoid arthritis: A conceptual framework and selected literature review. **Pharmacoeconomics.** v. 8 (6), p. 479-490, 1995.

Grimble, G. K. Dietary nucleotides and gut mucosal defence. **Gut.** v. 35 (Suppl.), S46S51, 1994.

GROSSHANS, E.; ILLY, G. Thalidomide therapy for inflammatory dermatoses. **Int J Derm.** v.23 (9), p. 598-602, 1984.

HAGAR, H.H.; ETTER, E.E.; ARAFA, M. Taurine attenuates hypertension and renal dysfunction induced by cyclosporine A in rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** v.33, p.189-196, 2006.

HALEN, P.K.; RAVAL, M.K.; CHAGTI, K.K.; GIRIDHAR, R.; YADAV, M.R. Synthesis and Evaluation of Some Gastrointestinal Sparing Anti-Inflammatory Aminoethyl Ester Derivatives of Naphthalene-Based NSAIDs. **Arch. Pharm. Chem. Life Sci.** v. 340, p. 88–94, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymol.** v. 186, p.1-85, 1990.

- HANSEN, M.K.; O'CONNOR, K.A.; GOEHLER, L.E.; WATKINS, L.R.; MAIER, S.F. The contribution of the vagus nerve in interleukin-1b-induced fever is dependent on dose. ***Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol***. v. 280, p.929–934, 2001.
- HAWKINS, C.; HANKS, G. W. The gastroduodenal toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A review of the literature. ***J Pain Symptom Manage***. v.20, n.2, p. 140-151, 2000.
- HAYES, K.C.; STURMAN, J.A. Taurine in metabolism. ***Ann Rev Nutr***. v. 1, p.401-425, 1981.
- HIRATA, T.; UKAWA, H.; YAMAKUNI, H.; KATO, S.; TAKEUCHI, K. Cyclo-oxygenase isozymes in mucosal ulcerogenic and functional responses following barrier disruption in rat stomachs. ***Br J Pharmacol***. v. 122, p. 447-454, 1997.
- HIRATA, T.; UKAWA, K.; YAMAKUNI, H.; KATO, S.; TAKEUCHI, K. Cyclo-oxygenase isozymes in mucosal ulcerogenic and functional responses following barrier disruption in rat stomachs. ***Br J Pharmacol***. v. 122, p. 447-454, 1997.
- HOWARD, P.; DELAFONTAINE, P. Nonsteroidal anti-Inflammatory drugs and cardiovascular risk. ***J Am Coll Cardiol***. v. 43, n. 4, 2004.
- HSIEH, P.W.; HUNG, C.F. & FANG, J.Y. Current prodrug design for drug discovery. ***Curr Pharm Des***. v. 15 (19), p. 2236-50, 2009.
- HUTTON, K,P.; RODGERS, R.S. Recurrent aphthous stomatitis. ***Dermatol***. v. 5, p.761-68, 1987.
- INOTAI, A. & VINCZE, Z. Cost study of NSAID use in rheumatoid arthritis based on recent therapeutic protocols. ***Acta Pharm Hung***. v. 78 (2), p. 79-86, 2008.
- ITZKOWITZ, S.H.; YIO, X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. ***Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol***. v. 287 (1), 7-17, 2004.
- IYER, C.G.; LANGUILLON, J.; RAMANUJAM, K.; TARABINI-CASTELLANI, G.; DE LAS AGUAS, J.T.; BECHELLI, L.M.; UEMURA, K.; MARTINEZ, D.V.; SUNDARESAN, T. 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 (6), p. 719-732, 1971.

KANG, Y.S. Taurine transport mechanism through the blood-brain barrier in spontaneously hypertensive rats, in: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. Taurine textbook 4. v. 483, Springer Netherlands, p.321-324, 2006.

KEFALAKES, H. STYLIANIDES, T.J., AMANAKIS, G.; KOLIOS, G. Exacerbation of inflammatory bowel diseases associated with the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: myth or reality? **Eur J Clin Pharmacol**. p. 65 (10), p. 963-70, 2009.

KHATTAB, M.M.; GAD, M.Z.; ABDALLAH, D. Protective role of nitric oxide in indomethacin-induced gastric ulceration by a mechanism independent of gastric acid secretion. **Pharmacol Res**. v. 43 (5), p. 463-467, 2001.

KIM, C.; PARK, E.; QUINN, M.R.; SCHULLER-LEVIS, G. The Production of Superoxide Anion and Oxide by Cultured Murine Leukocytes and the Accumulation of TNF- α in the Conditioned Media is Inhibited by Taurine Chloramine. **Immunopharmacol**. v.34, p.89-95, 1996.

KONTNY, E.; RUDNICKA, W.; CHORAZY-MASSALSKA, M.; MARCINKIEWICZ, MAŚLIŃSKI, W. Taurine chloramine inhibits proliferation of rheumatoid arthritis synoviocytes by triggering a p53-dependent pathway. **Inflamm Res**. v. 55 (10), p. 446-455, 2006.

KOUZUKI, H.; SUZUKI, H.; ITO, K.; OHASHI, R.; SUGIYAMA, Y. Contribution of sodium taurocholate co-transporting polypeptide to the uptake of its possible substrates into rat hepatocytes. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 286 (2), p.1043-50, 1998.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios não-esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos atuais. **Rev. Bras. Anesthesiol**. v. 52, p. 498-512, 2002.

KWAK HJ, PARK KM, CHOI HE, PARK HY. Protective mechanisms of NO preconditioning against NO-induced apoptosis in H9c2 cells: role of PKC and COX-2. **Free Radic Res**.v. 43(8), p. 744-752, 2009.

KYRIAKIS, K.P.; KONTOCHRISTOPOULOS, G.J.; PANTELEOS, D.N. Experience with low-dose thalidomide therapy in chronic discoid lupus erythematosus. **Int J Derm**. v.39 (3), p.218-222, 2000.

- LANGTON, P.E.; HANKEY, G.J. & EIKELBOOM, J.W. Cardiovascular safety of rofecoxib (Vioxx): lessons learned and unanswered questions. **Med J Aust.** v. 181 (10), p. 524-525, 2004.
- LANTZ, M.; GULLBERG, U.; NILSSON, E.; OLSSON, I. Characterization in vitro of a human tumor necrosis factor-binding protein. A soluble form of a tumor necrosis factor receptor. **J Clin Invest.** v. 86 (5), p.1396-1402, 1990.
- LAPENNA, D.; CUCCUROLLO, F. Hypochlorous acid and its pharmacological antagonism: an update picture. **Gen Pharmacol.** v. 27, p. 1145-1147, 1996.
- LIMA, L.M. & DE-LIMA, N.M. Contribuição do LASSBio[®] no desenvolvimento de novos candidatos a protótipos de fármacos antiasmáticos. **Rev. Virtual Quim.** v. 1 (1), p. 35-48, 2009.
- LIMA, L.M.; FRAGA, C.A.M. & BARREIRO, E. J. O renascimento de um fármaco: talidomida. **Quím. Nova.** v. 24 (5), p. 683-688, 2001.
- LIMA, L.M.; FRAGA, C.A.M. & BARREIRO, E.J. Agentes antiasmáticos modernos: Antagonistas de receptores de leucotrienos cisteínicos. **Quim. Nova.** v. 25 (5), p. 825-834, 2002.
- LIU, Y.; TONNA-DEMASI, M.; PARK, E.; SCHULLER-LEVIS, G.; QUINN, M.R.: Taurine Chloramine Inhibits Production of Nitric Oxide and Prostaglandin E2 in Actiated C6 Glioma Cells by Supressing Inducible Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 expression. **Brain Res Mol Brain Res.** v.59, p.189-195, 1998.
- LOLLI, M.L.; CENA, C.; MEDANA, C.; LAZZARATO, L.; MORINI, G.; CORUZZI, G.; MANARINI, S.; FRUTTERO, R.; GASCO, A. A new class of ibuprofen derivatives with reduced gastrototoxicity. **J. Med. Chem.** v. 44, p. 3463-3468, 2001.
- MACPHERSON, B.R.; PFEIFFER, C.J. Experimental production of diffuse colitis in rats. **Digestion.** v. 17 (2), p. 135-150, 1978.
- MARCINKIEWICZ, J.; GRABOWSKA, A. & CHAIN, B.M. Modulation of antigen-specific T-cell activation in vitro by taurine chloramine. **Immunology.** v. 94 (3), p. 325-30, 1998.

MARCINKIEWICZ, J.; GRABOWSKA, A.; BERETA, J.; BRYNIARSKI, K.; NOWAK, B. Taurine chloramine down-regulates the generation of murine neutrophil inflammatory mediators. *Immunopharmacology*. v. 40 (1), p. 27-38, 1998.

MARRIOT, J.B.; MÜLLER, G. & DALGLEISH, A.G. Thalidomide as an emerging immunotherapeutic agent. *Immunol Today*. v. 20, p. 538-540, 1999.

MCBRIDE, W.G. Thalidomide embryopathy. *Teratology*. v.16 (1), p. 79-82, 1977.

THE MERCK index, 12th Ed. London: Chapman and Hill, 1996.

MONTENEGRO, M.R. & FRANCO, M. **Patologia processos gerais**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1999, 320 p.

MOREIRA, C. & CARVALHO, M.A.P. Antiinflamatórios não esteróides in: **Reumatologia diagnóstico e tratamento**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p. 703-717.

MOTAWI, T.K.; ELGAWAD, H.M. & SHAHIN, N.N. Modulation of indomethacin-induced gastric injury by spermine and taurine in rats. *J Biochem Mol Toxicol*. v. 21(5), p. 280-288, 2007.

NAKAEMA, N.M.K.; FRACASSO, J.F.; LONGO, M.C.; SIQUEIRA, C.E.; GODÓI, P.H.B.; RODRIGUES, L.A. Efeito do tratamento com algumas vitaminas B na potencialização do efeito antiinflamatório e antinociceptivo do diclofenaco e da talidomida. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* v. 26 (3), p. 189-193, 2005.

NARITA, M. & OKABE, S. Enhanced gastric mucosal damage in rats after chronic treatment with sodium taurocholate. *Jpn J Pharmacol*. v. 67, p. 391-394, short communication, 1995.

NATHAN, C. Perspectives Series: Nitric oxide and Nitric Oxide Synthases Inducible: What difference does it make. *J Clin Invest*. v. 100 (10), p.2417-2423, 1997.

NIELSEN, O.H.; MUNCK, L.K. Drug Insight: aminosalicylates for the treatment of IBD. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. v. 4, p. 160-170, 2007.

- NIU, L.G.; ZHANG, M.S.; LIU, Y.; XUE, W.X.; LIU, D.B.; ZHANG, J.; LIANG, Y.Q. Vasorelaxant effect of taurine is diminished by tetraethylammonium in rat isolated arteries. **Eur J Pharmacol.** v. 580 (1-2), p. 169-174, 2007.
- NOMURA, Y.; TAKEUCHI, M.; YOSHIDA, S.; SUGITA, Y.; NIINO, D.; KIMURA, Y.; SHIMIZU, K.; AOKI, R.; SUEFUJI, N.; HIROSE, S.; KIKUCHI, M.; OHSHIMA, K. Phenotype for activated tissue macrophages in histiocytic necrotizing lymphadenitis. **Pathol Int.** v. 59 (9), p. 631-635, 2009.
- OKUYAMA, S.; AIHARA, H. Hyperalgesic action in mice of intracerebroventricularly administered arachidonic acid, PG E2, PG F2 alpha and PG D2: effects of analgesic drugs on hyperalgesia. **J Pharmacobiodyn.** v.9 (11), p. 902-908, 1986.
- ORDI-ROS, J.; CORTES, F.; CUCURULL, E.; MAURI, M.; BUJAN, S.; VILARDELL, M. Thalidomide in the treatment of cutaneous lupus refractory to conventional therapy. **J Rheumatol.** v. 27 (6), p.1429-1433, 2000.
- PALUMBO, A.; CIOFFI, F.; DÍSCHIA, M. Nitric oxide synthase-inhibitory composition. 16p. CODEN: ITXXCZ IT 2000RM0039 A1 20010724 CAN 137: 346227 AN 2002: 894293 CAPLUS, 2001.
- PANOS N. KOUROUNAKIS *, KARYOFYLLIS TSIAKITZIS, ANGELIKI P. KOUROUNAKIS, DIMITRIOS GALANAKIS. Reduction of gastrointestinal toxicity of NSAIDs via molecular modifications leading to antioxidant anti-inflammatory drugs. **Toxicology.** v. 144, p. 205–210, 2000.
- PARHAM, P. **O Sistema imune.** 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2001, p.372.
- PARK, K.S.; LIM, J.W. & KIM, H. Inhibitory mechanism of omega-3 fatty acids in pancreatic inflammation and apoptosis. **Ann N Y Acad Sci.** v.1171, p. 421-427, 2009.
- PRAKASH, O.; MEDHI, B.; SAIKIA, U.N.; PANDHI, P. Effect of different doses of thalidomide in experimentally induced inflammatory bowel disease in rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** v. 103 (1), p. 9-16, 2008.
- PRAVDA, J. Radical induction theory of ulcerative colitis. **World J Gastroenterol.** v. 11(16), 2371-2384, 2005.

PRINS, L.H.; DU-PREEZ, J.L.; VAN-DYK, S.; MALAN, S.F. Polycyclic cage structures as carrier molecules for neuroprotective non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Eur J Med Chem.** v. 44 (6), p. 2577-2582, 2009.

PUCHADES, M.M.; GONZÁLEZ, R.M.; SOLÍS, S.M.; TORREGROSA, M.I.; TORMOS, M.M.; SAEZ, T.G.; JUAN, G.I.; MIGUEL, C.A. Study of oxidative stress in advanced kidney disease. **Nefrologia.** v. 29 (5), p. 464-473, 2009.

QUINN, M.R.; PARK, E. & SCHULLER-LEVIS, G. Taurine chloramine inhibits prostaglandin E2 production in activated RAW 264.7 cells by post-transcriptional effects on inducible cyclooxygenase expression. **Immunol Lett.** v. 50 (3), p. 185-188, 1996.

RADOMSKY, C.L. & LEVINE, N. Thalidomide. **Derm Clin.** v. 19 (1), p. 87-103, 2001.

RANATUNGE, R.R.; AUGUSTYNIAK, M.E.; DHAWAN, V.; ELLIS, J.L.; GARVEY, D.S.; JANERO, D.R.; LETTS, L.G.; RICHARDSON, S.K.; SHUMWAY, M.J.; TROCHA, A.M.; YOUNG, D.V.; ZEMTSEVA, I.S. Synthesis and anti-inflammatory activity of a series of N-substituted naproxen glycolamides: Nitric oxide-donor naproxen prodrugs. **Bioorg Med Chem.** v. 14, p. 2589–2599, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M. & RITTER, J. M. **Farmacologia.** 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 189, 195-203, 2001.

RAZ, A.; WYCHE, A. & NEEDLEMAN, P. Temporal and pharmacological division of fibroblast cyclooxygenase expression into transcriptional and translational phases. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 86, p. 1657-1661, 1989.

REIFEN, R.; NISSENKORN, A.; MATAS, Z.; BUJANOVER, Y. 5-ASA and lycopene decrease the oxidative stress and inflammation induced by iron in rats with colitis. **J Gastroenterol.** v.39, p.514-519, 2004.

REYNALES, H. Merck Sharp & Dohme (MSD) anuncia a retirada voluntária de VIOXX do mercado mundial. Disponível em: <<http://www.msd-brazil.com/msdbrazil/hcp/vioxx.html>>. Acesso em 03/11/09.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain, *Eur J Pharmacol.* v. 391 (1-2), p. 97-103, 2000.

ROBBINS, S. L.: Inflamação aguda e crônica, p. 44-78, Ossos, articulações e tumores de partes moles, p. 1087-1134, In: *Patologia estrutural e funcional*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

ROCHA, M.D. & VIEGAS-Jr, C. Síntese de novos candidatos a fármacos híbridos carbamoilacilidrazônicos planejados como antiinflamatórios e anticolinesterásicos. In: *31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, 2008, Águas de Lindóia: Centro de Convenções do Hotel Monte Real Resort.

ROTTIER, B.L. & DUIVERMAN, E.J. Anti-inflammatory drug therapy in asthma. *Paediatr Respir Rev.* v. 10 (4), p. 214-219, 2009.

SANTOS, J.L.; BLAU, L.; MENEGON, R.F.; OLIVEIRA, H.P.; BUELONI, R.H.; MACHADO, R.P.; LONGO, M.C.; CHUNG, M.C. Síntese e modelagem molecular do novo derivado indolinônico como candidato a antiinflamatório COX-2 seletivo. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* v. 28, p. 235-240, 2007.

SANTOS, J.L.; LANARO, C.; CHUNG, M.C.; LIMA, L.M.; FERREIRA, F.C. "Use of phthalimide and/or sulphonamide derivatives in the treatment of diseases which require reducing the TNF-alpha levels and exogenous source of nitric oxide, phthalimide derivatives, sulphonamide derivatives, and a method for obtaining a sulphonamide derivative" depositada em 16 de dezembro de 2008; **PCT/BR 2008/000386**.

SANTOS, J.L.; LANARO, C.; CHUNG, M.C.; LIMA, L.M.; FERREIRA, F.C. "Uso de compostos ftalimídicos e/ou sulfonamídicos no tratamento de doenças em que há necessidade de diminuição dos níveis do fator de necrose tumoral TNF alfa e a necessidade de uma fonte exógena de óxido nítrico, compostos derivados ftalimídicos, compostos derivados sulfonamídicos, métodos de

obtenção de um derivado sulfonamídico” depositada em 12 de dezembro de 2007; **INPI 0705396-7**.

SANTOS, J.L.; OLIVEIRA, E.V.; CHUNG, M.C.; MENEGON, R.F.; BLAU, L. Derivados ftalimídicos de compostos antiinflamatórios não-esteróide e/ou moduladores de TNF- α , processo de sua obtenção, composições farmacêuticas conendo os mesmos e seus usos no tratamento de doenças inflamatórias” depositada em 06 de abril de 2009, **INPI 020090033479**.

SCARPATO, S.; ACAMPORA, R.; CORSARO, S.; DE-RISO, L.; DE-SILVA, S.; LA-PALOMBARA, F.; LUPOLI, S.; RUSSO, R. Gastric protection against non-steroidal and steroidal antiinflammatory agents in internal medicine specialties: survey on prescription trends among hospital internal medicine physicians (Gardenia Project). **Ann Ital Med Int.** v. 17 (1), p. 41-46, 2002.

SCHMIDT, E.; FIGULA, V.; ROTH, D.; ULLRICH, V. Antioxidant and neutrophil-inhibiting properties of new 2-Omethyl-6-(alkylthio)ascorbic acid derivatives. **J. Med.Chem.** v. 36, p. 4021–4029, 1993.

SCHWYZER, R. 100 years lock-and-key concept: are peptide keys shaped and guided to their receptors by the target cell membrane? **Biopolymers.** v. 37 (1), 5-16, 1995.

SERHAN, C.N.; HAEQQSTRÖM, J.Z.; LESCIE, C.C. Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact of cytokines. **FASEB J.** V. 10 (10), p. 1147-1158, 1996

SHANBHAG, V.R.; CRIDER, A.M.; GOKHALE, R.; HARPALANI, A.; DICK, R.M. Ester and amide prodrugs of ibuprofen and naproxen: synthesis, anti-inflammatory activity, and gastrointestinal toxicity. **J Pharm Sci.** v. 81 (2), p. 149-54, 1992.

SHIRLEY, M.A.; GUAN, X.; KAISER, D.G.; HALSTEAD, G.W.; BAILLIE, T.A. Taurine conjugation of ibuprofen in humans and in rat liver in vitro. Relationship to metabolic chiral inversion. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 269 (3), p.1166-1175, 1994.

SILVA, A.T.; CHUNG, M.C.; CASTRO, L.F.; GÜIDO, R.V.; FERREIRA, E.I. Advances in prodrug design. **Mini Rev Med Chem.** v. 5 (10), p. 893-914, 2005.

SIQUEIRA-Jr, J.F.; DANTAS, C.J.S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 256 p.

SKARE, T.L. **Reumatologia princípios e prática**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p.341.

SONG, C.; HALBREICH, U.; HAN, C.; LEONARD, B.E.; LUO, H. Imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines, and between Th1 and Th2 cytokines in depressed patients: the effect of electroacupuncture or fluoxetine treatment. **Pharmacopsychiatry**. v. 42 (5), p.182-188. Epub, 2009.

SOUZA, J. S.; FERRÃO, M. F. Aplicações da espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenaco de potássio. Parte I: Dosagem por regressão multivariada. **Braz J Pharma Sci**. v. 42, p. 437-445, 2006.

STHERLAND, L.R. Medical treatment of inflammatory bowel disease: new therapies, new drugs. **CMAJ**. v. 137(9), p. 799-802, 1987.

STIRLING, D.I. Thalidomide and its impact in dermatology. **Semin Cutan Med Surg**. v.17 (4), p. 231-242, 1988.

TAKEUCHI K.; SUGAMOTO S.; YAMAMOTO H.; KAWAUCHI S.; TASHIMA K. Interactive roles of endogenous prostaglandin and nitric oxide in regulation of acid secretion by damaged rat stomachs. **Aliment Pharmacol Ther**. v. 14 (1), p. 125-134, 2000.

TAKEUCHI, K.; OHUCHI, T.; KATO, S.; OKABE, S. Cytoprotective Action of L-Arginine against HC1-Induced Gastric Injury in Rats: Involvement of Nitric Oxide? **Jpn J. Pharmacol**. v. 61, p. 13-21, 1993.

TAKEUCHI, K.; TAKEHARA, K.; KANEKO, T.; OKABE, S. Nitric oxide and prostaglandins in regulation of acid secretory response in rat stomach following injury. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 272 (1), p. 357-363, 1995.

TESTA, B. Prodrugs: bridging pharmacodynamic/pharmacokinetic gaps. **Curr Opin Chem Biol**. v. 13 (3), p. 338-344, 2009.

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

TSENG, S.; PAK, G.; WASHENIK, K.; POMERANZ, M.K.; SHUPACK, J.L. Rediscovering thalidomide: A review of its mechanism of action, side effects, and potential uses. **J Am Acad Derm.** v. 35(6), p. 969-79, 1996.

UCHIDA, M.; MATSUEDA, K.; SHODA, R.; MURAOKA, A.; YAMATO, S. Nitric oxide donating compounds inhibit HCl – induce gastric mucosal lesion mainly via prostaglandin. **Jpn J Pharmacol.** v. 85, p. 133-138, 2001.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 38, p. 97-120, 1998.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Am. J. Med.** v. 104, p. 2S-8S, 1998.

VASSALO, E.C.; POVEDANO, A.; PUPO-NETO, J.A.; PAULO, F.L. Influência da administração da *Plantago ovata* (fibra dietética) na proteção da parede colônica em colite inflamatória induzida por ácido acético: estudo estereológico experimental em ratos. **Rev. Col. Bras. Cir.** v. 44 (6), p. 385-391, 2007.

VELOSSA, J.C.R.; BARBOSA, V.F.; OLIVEIRA, O.M.M. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. **Rev. Eletr. Farm.** v. 4 (2), p. 119-130, 2007.

VIZIOLI, E.O.: Síntese de pró-fármacos recíprocos antiinflamatórios derivados de taurina como adjuvantes para o tratamento de artrite reumatóide. Araraquara: Unesp-FCF, 2006 (**Dissertação de Mestrado**)

VIZIOLI, E.O.; CHUNG, M.C.; MENEGON, R.F.; BLAU, L.; SANTOS, J.L.; LONGO, M.C. “Novel compounds derived from taurine, process of their preparation and pharmaceutical compositions containing these” depositada em 09 de abril de 2009, **PCT/BR 2009/0409** e 15 de outubro de 2009, **WO/2009/124371**.

VIZIOLI, E.O.; CHUNG, M.C.; MENEGON, R.F.; BLAU, L.; SANTOS, J.L.; LONGO, M.C. Patente “Novos compostos derivados de taurina, processo de sua preparação e composições farmacêuticas contendo os mesmos” depositada em 09 de abril de 2008, **INPI 020080052905**.

VONKEMAN, H.E.; BRAAKMAN-JANSEN, L.M.; KLOK, R.M.; POSTMA, M.J.; BROUWERS, J.R.; VAN-DE-LAAR, M.A. Incremental cost effectiveness of proton pump inhibitors for the prevention of non-steroidal anti-inflammatory drug

ulcers: a pharmacoeconomic analysis linked to a case-control study. **Arthritis Res Ther.** v. 10 (6), p. R144, 2008.

VOWINKEL, T.; MORI, M.; KRIEGISTEN, C.F.; RUSSEL, J.; SAIJO, F.;BHARWANI, S.; TURNAGE, R.H.; DAVIDSON, W.S.; TSO, P.; GRANGER,D.N.; KALOGERIS, T.J. Apolipoprotein A-IV inhibits experimental colitis. **J Clin Invest.** v. 114, p.260-269, 2004.

WAITZBERG, D.L. **Nutrição oral, enteral e pareteral na pratica clínica.** 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2002, p. 928.

WALAN, A. & WAHLQVIST, P. Pharmacoeconomic aspects of non-steroidal anti-inflammatory drug gastropathy. **Ital J Gastroenterol Hepatol.** v. 31 (1), p. S79-88, 1999.

WALLACE, J.R. Prostaglandins, NSAIDs, and cytoprotection. **Gastroenterol Clin North Am.** v. 21 (3), p. 631-41, 1992.

WANG, H.; ZHANG, W.; ZHU, C.; BUCHER, C.; BLAZAR, B.R.; ZHANG, C.; CHEN, J.F.; LINDEN, J.; WU, C.; HUO, Y. Inactivation of the adenosine A2A receptor protects apolipoprotein E-deficient mice from atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 29 (7), p. 1046-1052, 2009.

WANG, Y.; STREICHER, J. M. The Role of COX-2 in Heart Pathology. **Curr Med Chem - Cardiovasc & Hematol Agents.** v. 6 (1), p. 69-79, 2008.

WANNMACHER, L. Inibidores seletivos de cicloxigenase-2 revisitados um ano depois. **Uso racional de medicamentos:** Temas Seleccionados OPAS-OMS. v. 2 (2), p. 1-6, 2005.

WARD, R.J.; FRANCAUX, M.; CUISINIER, C.; STURBOIS, X.; De WITTE, P.Changes in plasma taurine levels after different endurance events. **Amino Acids.** v. 16 (1), p. 71-77, 1999.

WASIL, M.; HALLIWELL, B.; MOORHOUSE, C. P.; HUTCHINSON, D. C. S.; BAUM, H. Biologically significant scavenging of myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by some anti-inflammatory drugs. **Biochem Pharmacol.** v. 36, p. 3847-3850, 1987.

- WETTSTEIN, M.; HÄUSSINGER, D. Cytoprotection by the osmolytes betaine and taurine in ischemia-reoxygenation injury in the perfused rat liver. *Hepatol.* v. 26 (6), p. 1560-1596, 1997
- WILLIAMS-SKIPP, C.; RAMAN, T.; VALUCK, R.J.; WATKINS, H.; PALMER, B.E.; SCHEINMAN, R.I. Unmasking of a protective tumor necrosis factor receptor I-mediated signal in the collagen-induced arthritis model. *Arthritis Rheum.* v. 60 (2), p. 408-418, 2009.
- WINTER, C.; RISLEY, E.; NUSS, G. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* v. 111, p. 544-547, 1962.
- WU, G.; YANG, J.; SUN, C.; LUAN, X.; SHI, J.; HU, J. Effect of taurine on alcoholic liver disease in rats. *Amino Acids.* v. 36 (3), p. 457-464, 2009.
- WU, G.; YANG, J.; SUN, C.; LUAN, X.; SHI, J.; HU, J. Effect of taurine on alcoholic liver disease in rats. *Adv Exp Med Biol.* v. 643, p. 313-22, 2009.
- YAMAMOTO, H.; TANAKA, A.; KUNIKATA, T.; HIRATA, T.; KATO, S.; TAKEUCHI, K. Inducible types of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in adaptive cytoprotection in rat stomachs. *J. Physiol.* v. 93, p. 405-412, 1999.
- ZHANG, F.; TONG, L.; QIAO, H.; DONG, X.; QIAO, G.; JIANG, H.; SUN, X. Taurine attenuates multiple organ injury induced by intestinal ischemia reperfusion in rats. *J Surg Res.* v. 148, p. 101-109, 2008.