



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I- CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

THÁSSIA BORGES COSTA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E TOXICOLÓGICA DO
COMPOSTO (E)2-CIANO-N-3-DIFENILACRILAMIDA (JMPR-01)**

CAMPINA GRANDE

2022

THÁSSIA BORGES COSTA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E TOXICOLÓGICA DO
COMPOSTO (E)2-CIANO-N-3-DIFENILACRILAMIDA (JMPR-01)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba como requisito para obtenção do título de Farmacêutico Generalista.

Área de concentração: Farmácia

Orientadora: Profa. Dr^a. Vanda Lúcia dos Santos

CAMPINA GRANDE

2022

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

C837a Costa, Thassia Borges.
Avaliação da atividade anti-inflamatória e toxicológica do composto (E) 2-ciano- N,3- difenilacrilamida (JMPR-01) [manuscrito] / Thassia Borges Costa. - 2022.
42 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2022.

"Orientação : Profa. Dra. Vanda Lúcia dos Santos , Coordenação do Curso de Farmácia - CCBS."

1. Fenilacrilamida. 2. Toxicidade. 3. atividade anti-inflamatória. I. Título

21. ed. CDD 615.1

THÁSSIA BORGES COSTA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E TOXICOLÓGICA DO
COMPOSTO (E) 2-CIANO-N,3-DIFENILACRILAMIDA (JMPR-01)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Departamento de Farmácia da Universidade
Estadual da Paraíba, como requisito para
obtenção do título de Farmacêutico
Generalista.


Área de concentração: Farmácia

Aprovada em: 28 / 03/ 2022

BANCA EXAMINADORA



Profª. Dra. Vanda Lúcia dos Santos (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Ricardo Olimpio de Moura
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profª. Me. Maria Elaine Cristina Araruna
Centro Universitário Maurício de Nassau- UNINASSAU

AGRADECIMENTOS

Gratidão à Deus pela permissão para continuar em meio aos imprevisíveis, pelos caminhos que me permitiu trilhar e portas inimagináveis abertas e fechadas. À Nossa Senhora por toda interseção, por ter se feito presente em cada detalhe, até o último instante. À minha mãe Josefa Maria pela paciência, palavras de apoio, incentivo e orações. Ao meu pai Ramiro e minha irmã Thayse pelo suporte e companheirismo. Ao meu namorado Guilherme, pela compreensão, incentivo na vida acadêmica e exemplo. Aos meus sogros Kalina e Hermano, pelo acolhimento e conselhos.

Sou grata aos colegas de turma, Jéssika, Raíssa, Débora, Eduarda, Luan, Ana Luísa, Naara, Genil, Raísa, Bruna, Anna Júlia, Igor, Laís e Viviane pelos momentos de alegria e preocupações compartilhados.

Meus agradecimentos à Profa. Vanda Lúcia, pelo acolhimento no laboratório, oportunidades, orientações e pelo exemplo de mulher corajosa que nos faz reconhecer os ganhos do ensino público e da ciência. Gratidão aos momentos de aprendizado divididos com os fazem parte do LABENFARM- UEPB, Fábio, Yasmim, Cris, Daniela, Rayane, Brenda e Pablo, muito obrigada.

Aos amigos e familiares que de forma direta e indiretamente estiveram comigo, compreendendo os momentos de ausências e torcendo por mim.

RESUMO

A inflamação é uma reação natural do organismo frente ao dano celular ou tecidual. Decorre de eventos vasculares, celulares e bioquímicos ocasionados por mediadores pró-inflamatórios, objetivando a recuperação tecidual. A terapêutica anti-inflamatória visa, principalmente, a supressão desses mediadores e apesar da ampla utilização, muitos são os efeitos adversos inerentes às terapias já existentes, impulsionando a busca por atributos e mecanismos de ação alternativos e satisfatórios ao perfil terapêutico desejado. Nesse contexto, essa pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade anti-inflamatória e toxicológica do composto (E)2-ciano-N,3-difenilacrilamida (JMPR-01), desenvolvido através de estratégias de bioisosterismo de anel a partir de um protótipo formado por fragmentos privilegiados de paracetamol e indometacina. A atividade anti-inflamatória do derivado fenilacrilamida foi avaliada quanto seu potencial anti-edematogênico através do modelo de edema de pata induzido por CFA, e seu perfil de segurança analisado através do ensaio de toxicidade aguda de dose única (procedimentos aprovados pela CEUA/UEPB sob o nº 003/2021). Para investigação de possíveis alvos de atuação do JMPR-01, realizou-se o estudo de docking molecular com as seguintes estruturas cristalográficas: LT-A4-H, COX-2, PDE4B, 5-LOX e iNOS. No modelo de edema de pata, a dose de 50mg/kg inibiu a formação do edema a partir de 6h, na dose de 100 mg/kg a atividade anti-edematogênica foi obtida, satisfatoriamente, de 2 a 6h, semelhante ao controle, a dexametasona. No ensaio de toxicidade aguda, na dose utilizada (2000 mg/kg) o composto não se mostrou letal ou causador de alterações fisiológicas ou comportamentais nos animais. *In silico*, o JMPR-01 mostrou acoplamento satisfatório, principalmente, com as enzimas: iNOS, PDE4B e LT-A4-H, devido menores valores de energia livre de ligação obtidos, correspondentes a -8.67, -8.7 e -9.1 Kcal/mol, respectivamente. Desta forma, o composto demonstrou satisfatória atividade anti-inflamatória *in vivo*, podendo estar parcialmente relacionada com a supressão de prostaglandinas, leucotrienos e óxido nítrico, em concordância com a afinidade molecular avaliada *in silico*, mostrando-se seguro e promissor como fármaco anti-inflamatório.

Palavras-Chave: Fenilacrilamida. Inflamação. Toxicidade

ABSTRACT

Inflammation is a natural reaction of the body to cellular or tissue damage. It results from vascular, cellular, and biochemical events caused by pro-inflammatory mediators, aiming at tissue recovery. Anti-inflammatory therapy mainly aims to suppress these mediators, but, despite its wide use, there are many adverse effects inherent to existing therapies, driving the search for alternative and satisfactory attributes and mechanisms of action for the desired therapeutic profile. In this context, this research aimed to evaluate the anti-inflammatory and toxicological activity of the compound (E)-2-cyano-N,3-diphenylacrylamide (E) developed through ring bioisosterism strategies from a compound formed by privileged fragments of paracetamol and indomethacin. The anti-inflammatory activity of the phenylacrylamide derivative was evaluated for its anti-edematogenic potential through the CFA-induced paw edema model. Its security profile was analyzed through the single-dose acute toxicity assay (procedures approved by the CEUA/UEPB under n° 003/2021). A molecular docking study was carried out to investigate possible JMPR-01 targets with the following crystal structures: LT-A4-H, COX-2, PDE4B, 5-LOX, and iNOS. In the paw edema model, the dose of 50 mg/kg inhibited the formation of edema after 6h with the dose of 100 mg/kg an anti-edematogenic activity was satisfactorily obtained from 2 to 6h, similar to the control, dexamethasone. The used dosage (2000 mg/kg) was not lethal nor caused physiological or behavioral changes in animals in the acute toxicity test. In silico, JMPR-01 showed satisfactory coupling results with the enzymes: iNOS, PDE4B and LTA4H due to the lower values of binding free energy obtained, corresponding to -8.67, -8.7 and -9.1 Kcal/mol, respectively. In conclusion, the compound with the anti-inflammatory activity in vivo presents a significant correlation to the suppression of prostaglandin, leukotrienes, and nitric oxide. Also, it indicated a similar molecular affinity to the evaluated in silico experiment. Finally, the compound demonstrated security and is promising as an anti-inflammatory drug.

Keywords: Phenylacrylamide. Inflammation. Toxicity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1- Esquematização do processo de adesão e migração leucocitária para o sítio inflamatório. | 15 |
| Figura 2- Metabolismo do ácido araquidônico | 18 |
| Figura 3- Estruturas do AAS (1), paracetamol (2), ibuprofeno (3), diclofenaco (4) e indometacina (5). | 20 |
| Figura 4- Estruturas químicas do celecoxibe (23), lumiracoxibe (24), rofecoxibe (25), nimesulida (26) e edotolaco (27) | 21 |
| Figura 5- Função N-fenilacrilamida | 22 |
| Figura 6- Composto 3- (1,3-difenil- 1H -pirazol-4-il) -N-fenilacrilamida | 22 |
| Figura 7- Composto LQM334 | 23 |
| Figura 8- Obtenção da estrutura molecular do JMPR-01 | 23 |
| Figura 9- Influência do JMPR-01 no edema de pata induzido por CFA | 28 |
| Figura 10- Representação 2D das interações do AR-C95791(A) e JMPR-01(B) com o alvo iNOS. | 32 |
| Figura 11 - Representação 2D das interações do Roflumilast (A) e JMPR-01 (B) com o alvo PDE- 4B. | 34 |
| Figura 12- Representação 2D das interações do Celecoxibe (A) e JMPR-01 (B) com o alvo COX-2. | 34 |
| Figura 13- Representação 2D das interações do AKBA (A) e JMPR-01 (B) com o alvo 5-LOX. | 35 |
| Figura 14 - Representação 2D das interações do Bestatin (A) e JMPR-01 (B) com o alvo LT-A4-H. | 36 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Características físico-químicas do composto JMPR-01. | 24 |
| Tabela 2- Consumos e evolução ponderal dos animais submetidos ao teste de toxicidade | 30 |
| Tabela 3- Peso relativo dos órgãos dos camundongos submetidos ao teste de toxicidade | 30 |
| Tabela 4- Valores de energia livre de ligação e constante de inibição dos complexos ligante-proteína | 31 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------|---|
| A.A | Ácido araquidônico |
| AIEs | Anti-inflamatório esteroidal |
| AINEs | Anti-inflamatórios não esteroidais |
| ALT | Transaminase glutâmico-pirúvica |
| AST | Transaminase glutâmico-oxalacética |
| COXs | Ciclooxigenases |
| COX-1 | Ciclooxigenase -1 |
| COX-2 | Ciclooxigenase -2 |
| COX-3 | Ciclooxigenase -3 |
| DAMPs | Padrões moleculares associados a danos |
| i.p | Intraperitoneal |
| ICMD-01 | 2-ciano-3-(1H-indol-3-il)-N-fenilacrilamida |
| IFNs | Interferóns |
| IFN- γ | Interferon gama |
| IL-10 | Interleucina-10 |
| IL-11 | Interleucina-11 |
| IL-12 | Interleucina-12 |
| IL-1R | Receptor de Interleucina-1 |
| IL-1 β | Interleucina -1 beta |
| IL-2 | Interleucina -2 |
| IL-6 | Interleucina-6 |
| IL-7 | Interleucina-7 |
| IL-8 | Interleucina-8 |
| iNOS | Óxido nítrico sintase induzível |
| JMPR-01 | (E)-2-ciano-N,3-difenilacrilamida |
| LT-A4-H | Leucotrieno A4 Hidrolase |
| Log (P) | Coefficiente de partição teórico |

| | |
|-------|--|
| LOX | Lipoxigenase |
| MAPK | Proteína quinase ativada por mitógeno |
| NFκB | Fator nuclear kappa beta |
| PAMPs | Padrões moleculares associados a patógenos |
| PDE4B | Fosfodiesterase 4B |
| PGs | Prostaglandinas |
| PRRs | Receptor de reconhecimento de padrões |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| TNFα | Fator de necrose tumoral alfa |
| TX | Tromboxanos |
| WBC | Concentração de glóbulos brancos |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 | OBJETIVOS | 13 |
| 2.1 | Objetivos geral | 13 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 13 |
| 3 | REFERENCIAL TEÓRICO | 14 |
| 3.1 | Fisiopatologia da inflamação | 14 |
| 3.2 | Principais mediadores inflamatórios | 15 |
| 3.2.1 | Citocinas | 16 |
| 3.2.2 | Eicosanoides | 17 |
| 3.2.3 | Óxido nítrico (NO) | 19 |
| 3.3 | Anti-inflamatórios não esteroidais | 20 |
| 3.4 | Função fenilacrilamida e o composto (E) 2-ciano-N,3-difenilacrilamida (JMPR-01) | 21 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 25 |
| 4.1 | Obtenção do composto | 25 |
| 4.2 | Animais e procedimentos éticos | 25 |
| 4.3 | Investigação da atividade anti-inflamatória e toxicológica | 25 |
| 4.3.1 | Edema de pata induzido por Adjuvante Completo de Freund (CFA) | 25 |
| 4.3.2 | Toxicidade aguda de dose única | 25 |
| 4.3.3 | Docking molecular | 26 |
| 4.4 | Análise estatística | 27 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 28 |
| 5.1 | Edema de pata induzido por Adjuvante Completo de Freund (CFA) | 28 |
| 5.2 | Toxicidade aguda | 30 |
| 5.3 | Docking molecular | 31 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 6 | CONCLUSÕES | 37 |
| | REFERÊNCIAS | 38 |
| | ANEXO A- Protocolo utilizado na triagem farmacológica comportamental | 42 |

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é uma reação natural e essencial do organismo frente ao dano celular ou tecidual, decorre de eventos vasculares, celulares e bioquímicos ocasionados por mediadores com ação pró-inflamatória, como as citocinas, cininas, eicosanoides, óxido nítrico e aminas vasoativas, tendo como objetivo a iniciação de processos de reparo e extinção do agente agressor. Apesar de ser uma resposta benéfica, em sua cronicidade, faz parte da patogênese de diversas doenças como asma, câncer, artrite reumatoide, doenças metabólicas, neurodegenerativas e cardiovasculares (LIU et al., 2021; MURAKAMI; HIRANO, 2012).

No que se refere ao manejo clínico da inflamação, os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs), atuam como supressores da resposta imune e inflamatória, sendo a principal escolha para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas. Contudo, seu uso prolongado ou em doses elevadas, associa-se a efeitos adversos sobre as vias metabólicas e endócrinas (ERRANTE, et al., 2014). Quanto aos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), são frequentemente prescritos na prática médica, existindo uma ampla variedade de AINEs disponível, com diferentes graus de inibição das enzimas cicloxigenase (COX-1 e COX-2), promovendo atividade anti-inflamatória, antipirética e analgésica, em contrapartida, determinando seu perfil de efeitos colaterais (SYLVESTER, 2019).

Desta forma, torna-se fundamental o desenvolvimento de novos agentes com ação anti-inflamatória, visando, principalmente, contornar os efeitos indesejáveis inerentes às clássicas terapias já existentes e usufruir do melhor entendimento da multifatorialidade de aspectos bioquímicos e celulares que norteiam o processo inflamatório (ETIENNE; VIEGAS; VIEGAS JUNIOR, 2021).

A química medicinal atua através de estratégias de planejamento de excelência para o desenvolvimento e otimização de candidatos a novos fármacos. Derivados da função fenilacrilamida vêm sendo estudados quanto sua atuação em processos fisiológicos, sendo ainda introdutórias as abordagens quanto suas atribuições nas resoluções dos processos inflamatórios (GU et al., 2019). Nesse contexto, o presente estudo teve como proposta avaliar um novo derivado dessa função quanto seu potencial anti-inflamário e toxicológico, o composto (E)-2-ciano-N,3-difenilacrilamida (JMPR-01), que foi desenvolvido através de estratégias de bioisosterismo molecular a partir de um protótipo híbrido com iminente potencial imunomodulador e anti-inflamatório.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos geral

Avaliar o perfil anti-inflamatório e toxicológico do JMPR-01, através de estudos em modelos *in silico* e *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade anti-inflamatória do JMPR-01 frente ao modelo de edema de pata induzido por CFA;
- Avaliar o potencial toxicológico do composto através do ensaio de toxicidade aguda de dose única;
- Realizar ensaios de docking molecular para avaliação de possíveis interações do JMPR-01 com as enzimas LT-A4-H, PDE4, 5-LOX, iNOS e COX-2.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

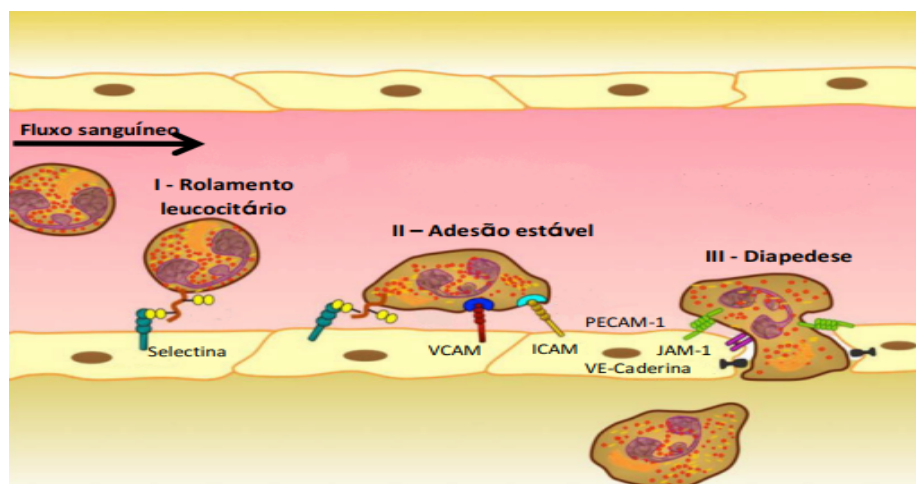
3.1 Fisiopatologia da inflamação

A inflamação compreende a primeira linha de defesa do organismo frente a danos celulares ou teciduais causados por agentes de natureza química, física ou biológica, tendo como objetivo a remoção do estímulo indutor da resposta inicial e a recuperação tecidual local (ETIENNE; DIAS VIEGAS; VIEGAS, 2021). Desta forma, Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) ou Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs) deflagram a resposta inflamatória ao se ligarem a Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs) expressos em células do sistema imune, induzindo a ativação de cascatas de sinalização intracelular que culminam na transcrição e produção de mediadores pró-inflamatórios (MURAKAMI; HIRANO, 2012). Estes, por sua vez, são responsáveis pelos eventos vasculares e celulares que compõem o processo inflamatório, assim como, pelo desenvolvimento dos sinais cardinais característicos: rubor, edema, calor, dor e possível evolução para prejuízo funcional (CRUVINEL et al., 2010; MURAKAMI; HIRANO, 2012).

A resposta inflamatória evolui a partir de uma fase transitória de vasoconstrição, seguida por vasodilatação induzida por mediadores como a histamina, interleucinas (ILs), óxido nítrico (NO) e prostaglandinas (PG) liberados por macrófagos residentes no tecido (CRUVINE *et al.*, 2010). A vasodilatação promove o aumento do fluxo sanguíneo na área lesionada e liberação do líquido plasmático ultrafiltrado contendo pouca proteína (transudato), resultando em eritema e calor (ALESSANDRI *et al.*, 2013).

Alterações no endotélio vascular também são prontamente detectáveis, incluindo-se o aumento da permeabilidade do leito vascular à eletrólitos, do sistema fibrinolítico, complemento, da coagulação, cininas e água configurando o processo de exsudação e formação de edema (TEIXEIRA, 2018; ALESSANDRI et al., 2013). Esses eventos são acompanhados por alterações celulares, à primeiro momento pelo recrutamento de células polimorfonucleares e mononucleares por meio de diapedese através de uma série de eventos da microcirculação, conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1- Esquemática do processo de adesão e migração leucocitária para o sítio inflamatório.



Fonte: Silva, 2017

Devido ao extravasamento do exsudato, a viscosidade dentro dos vasos e a concentração de hemácias são aumentadas, tornando seu fluxo lento. Com isso, é gerado um quadro de estase intravascular que favorece a marginalização dos leucócitos e subsequente rolamento ao longo da superfície endotelial. Esses eventos são mediados, predominantemente, por selectinas presentes nos leucócitos (L-selectinas) e em células endoteliais (P-selectina e E-selectina), através de interações de baixa afinidade (ALESSANDRI et al., 2013).

Receptores expressos na superfície dos leucócitos em rolamento são ativados por fatores quimiotáticos, fazendo com que seja aumentado o número de integrinas em sua superfície e favorecido um estágio de firme adesão através das interações integrinas-imunoglobulinas. Dentre as integrinas atuantes como ligantes para células endoteliais estão a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), ICAM-2, molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) e molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1) (SCHOPPEYER; BUUL, VAN, 2021; DYE; COOMBE, 2012).

Uma vez aderidos, os leucócitos sofrem diapedese e migram até o local acometido em resposta à quimiotaxia (CRUVINEL et al., 2010). No tecido, podem ser ativados tornando-se uma importante fonte de uma série de substâncias pró-inflamatórias, além de promover a eliminação de estímulos lesivos (ALESSANDRI et al., 2013).

3.2 Principais mediadores inflamatórios

3.2.1 Citocinas

As citocinas são moléculas sinalizadoras proteicas, modulatórias, estimulatórias ou inibitórias do processo inflamatório, sintetizadas por células do sistema imunológico no local da lesão através da ativação de proteínas quinases. São representadas pelas ILs, fator de necrose tumoral (TNF), interferons (IFNs) e quimiocinas (KANY; VOLLRATH; RELJA, 2019).

Dentre as IL, têm ação pró-inflamatória a IL-1, IL-6, IL-2, IL-7 e IL-17, destacando-se por terem sido as primeiras descritas no processo inflamatório a IL-1 e IL-6. A IL-1 subdivide-se em IL-1 α e IL-1 β , onde a primeira isoforma é considerada é expressa de forma constitutiva em vários tipos celulares, quanto a IL-1 β , tem sua liberação estimulada, principalmente, em resposta a presença de patógenos. Estudos demonstraram a regulação do processo inflamatório pela IL-1 β , através da sua capacidade indutora da expressão de enzimas como ciclooxigenase-2 (COX-2) e iNOS, além de substância P, moléculas de adesão e TNF- α (WANG et al., 2020). A IL-6 é uma citocina pleiotrópica, envolvida na maturação e ativação de neutrófilos, maturação de macrófagos, maturação e diferenciação de linfócitos T citotóxicos e células NK (TEIXEIRA, 2018; OLIVEIRA et al., 2019).

O TNF- α exerce efeitos pleiotrópicos sobre vários tipos celulares, ativando o fator nuclear de sinalização intracelular kappa B (NF- κ B), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e caspases (MITOMA et al., 2018). Desta forma, controla a expressão de vários genes codificadores de proteínas efetoras no processo inflamatório, e conseqüentemente, a liberação de mediadores como IL-1 e IL-6, espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (MOELANTS et al., 2013). Além do favorecimento da regulação positiva das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), da produção de interferon γ (IFN- γ) e da expressão de receptores de IL-2 (IL-2R) (HOP et al., 2017).

Os IFNs constituem um subconjunto de citocinas que quando secretadas desempenham um papel crítico na defesa do hospedeiro, principalmente, contra infecções virais. Subdividem-se em três classes, onde os IFN-I (INF- α e β) são os principais responsáveis por induzir uma variedade de genes estimulados por IFN (ISGs) para suprimir a infecção viral (MCNAB et al., 2015). O IFN tipo II (IFN- γ) é produzido predominantemente por linfócitos T e células natural killer (NK) com papéis importantes na indução do estado antiviral, ativação de células imunes, homeostase tecidual, imunomodulação e respostas inflamatórias, o tipo III (INF- λ) exibe funções antivirais semelhantes aos IFNs do tipo I (YE; SCHNEPF; STAEHELI, 2019).

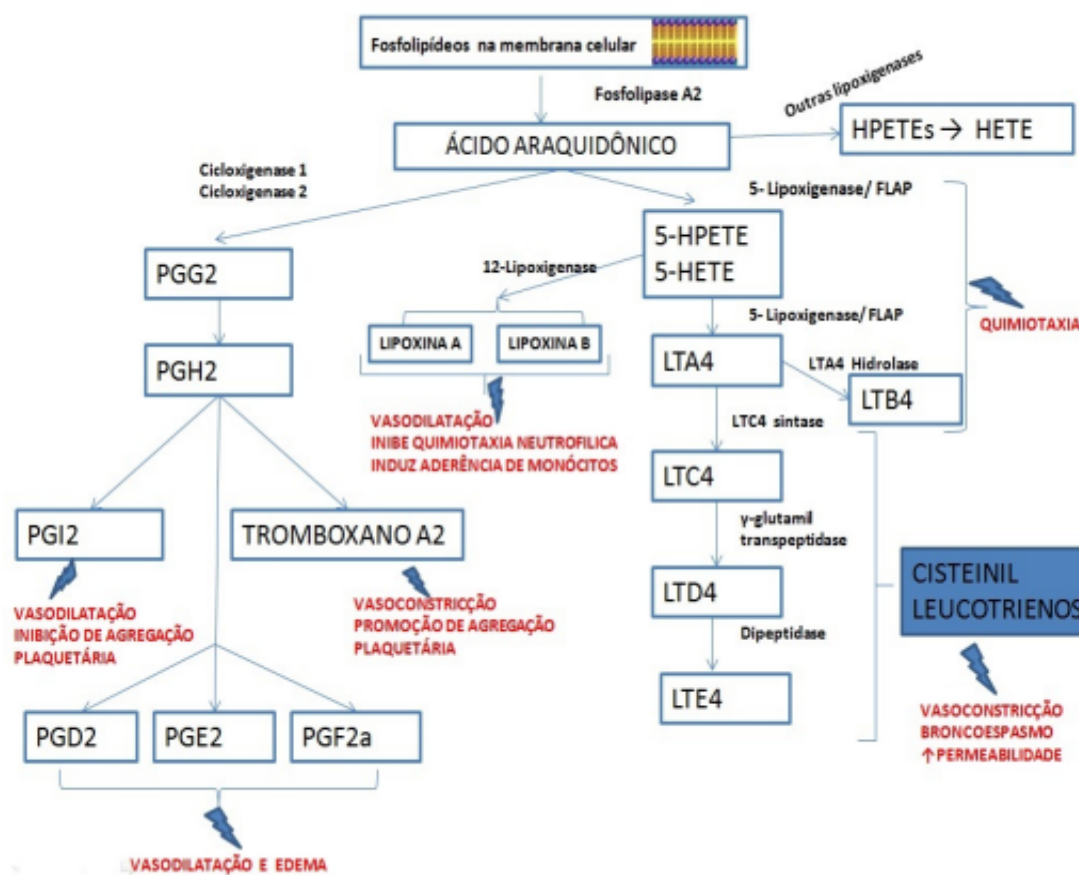
As quimiocinas formam uma grande família de citocinas, geralmente, de baixo peso molecular. Podem ser constitutivas ou induzidas, e são classificadas em quatro subfamílias: α (CXC), β (CC), δ (CX3C) e γ (XC) (ETIENNE, DIAS VIEGAS; VIEGAS, 2021). Medeiam suas funções através da ligação a receptores de sinalização intracelular acoplados a proteínas G, expressos em leucócitos, células dendríticas e células de Langerhans. A ligação quimiocina-receptor desencadeia uma complexa cascata de sinalização que culmina em respostas quimiotáticas, degranulação, liberação de espécies reativas de oxigênio e alteração na afinidade das integrinas presentes na superfície celular. Desta forma, sua importância fisiológica é resultado de sua capacidade do controle de adesão, quimiotaxia e ativação leucocitária (PALOMINO; MARTI, 2015).

3.2.2 Eicosanoides

Os eicosanoides são mediadores lipídicos derivados do metabolismo do ácido araquidônico. O precursor (ácido araquidônico) é liberado dos fosfolipídeos de membrana através da ação da enzima fosfolipase A2 (FLA2) estimulada por citocinas como IL-1, TNF- α e IFN- γ , fatores de crescimento e da cascata da MAP cinase-proteinocinase C (MAPK-PKC) (KOROTKOVA; JAKOBSSON, 2014)

Por sua vez, o ácido araquidônico intracelular não-esterificado torna-se substrato para as enzimas ciclooxigenases (COX), levando a formação de prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos; para as lipoxigenases (LOX), formando leucotrienos e lipoxinas (LXs) ou para as epoxigenases, formando ácidos epoxieicosatetraenóicos como metabólitos (Figura 2) (ARANDA et al., 2017; SAEKI; YOKOMIZO, 2017).

Figura 2- Metabolismo do ácido araquidônico



Fonte: SILVA, 2017

As cicloxigenases são encontradas em duas isoformas, designadas COX-1 e COX-2, contudo, existem estudos que sugerem a existência de uma terceira isoforma, a COX-3 (ABELLA et al., 2017). A COX-1 é expressa constitutivamente, sendo responsável pela produção de prostanoídeos com finalidades fisiológicas como manter a integridade da mucosa gástrica, estimular a agregação plaquetária e favorecer a hemostasia vascular (ARANDA et al., 2017). Quanto a COX-2, apesar de ter participação em algumas funções fisiológicas, são rapidamente estimuladas por mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β e IL-2, e inibidas por IL-4 e IL-3 sendo denominada de forma indutiva (PEEBLES, 2019).

Além das propriedades vasoativas e sobre a inibição da agregação plaquetária, (intrínseca a PGI_2) mostradas na figura 2, os prostanoídeos como PG $_2$, PGH $_2$, PGI $_2$ e o TXA $_2$, correlacionam-se, com o aumento da nocicepção, especialmente a PGE $_2$ ao ativar fibras aferentes sensitivas promovendo despolarização de neurônios Wide Dynamic Range (WDR), além de bloquear a inibição promovida pela glicina. Estando os metabólitos do AA

intrinsecamente relacionados com surgimento dos sinais cardinais da inflamação (PEEBLES, 2019; SANDER; O'NEILL; POHL, 2017).

Os leucotrienos são os principais produtos das vias das lipoxigenases, na qual propriedades fisiológicas incluem broncoconstrição, aumento da permeabilidade vascular, liberação de enzimas lisossômicas, vasoconstrição da musculatura lisa e quimiotaxia e ativação de leucócitos (LIU; YOKOMIZO, 2015). A 5-LOX é considerada uma enzima chave para síntese leucotrienos e lipoxinas, considerados reguladores das fases de iniciação e resolução da inflamação, respectivamente. Ela age em associação com a proteína ativadora de 5-LO (FLAP), utilizando como substrato o ácido araquidônico, e gerando como metabólito o ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE) e numa reação subsequente de desidratação, os leucotrienos A₄(LTA₄) que são transferidos para tecidos adjacentes. Estes, por sua vez, são substratos para as enzimas LTC₄ sintetase, responsável pela biossíntese de cisteinil-leucotrienos (CisLT) e para a LTA₄H, que catalisa a etapa final na biossíntese de LTB₄ (JIANG et al., 2018; SAEKI; YOKOMIZO, 2017).

Os LTC₄, LTD₄ e LTE₄ exercem seus papéis fisiológicos e fisiopatológicos através da ligação com o receptor CysLT₁, reconhecido promotor de broncoconstrição, produção de muco e edema das vias aéreas, e com o receptor CysLT₂ que desempenha papéis importantes na promoção da inflamação, permeabilidade vascular e fibrose do tecido (JIANG et al., 2018).

O LTB₄ é um reconhecido mediador lipídico quimiotático e ativador de leucócitos, tem sua função biológica mediada pela ativação dos receptores acoplados à proteína G (GPCR) BLT₁ e BLT₂ (SAEKI; YOKOMIZO, 2017). Age principalmente através dos receptores BLT₁, onde, o recrutamento de neutrófilos e macrófagos pelo LTB₄ vem sendo associado a uma série de doenças crônicas como diabetes do tipo 2, obesidade, resistência à insulina e aterosclerose (JIANG, 2018; MCNELIS; OLEFSKY1, 2014). Também já foi possível observar uma mediação do recrutamento de linfócitos T citotóxicos CD8⁺ em tecidos inflamados e promoção da diferenciação e migração de células Th17 (LEE, 2015).

3.2.3 Óxido nítrico (NO)

O NO é um mensageiro intracelular sintetizado a partir da biotransformação de L-arginina em L-citrulina, por um grupo de isoenzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS). Das três isoformas, a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) é uma das enzimas mais estudadas por estar envolvida em processos inflamatórios, levando a formação de elevados níveis de NO, o qual participa de diferentes mecanismos de sinalização intracelular e na

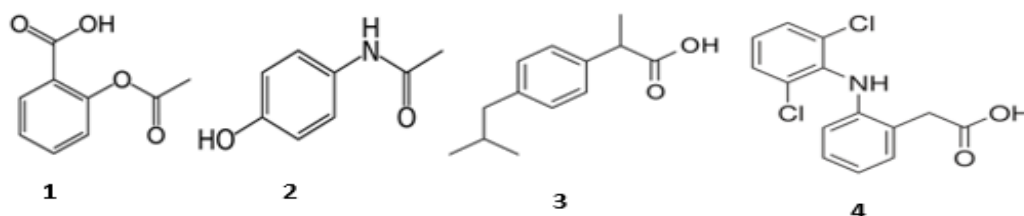
formação de espécies reativas durante o estresse oxidativo, além de ter um papel fundamental como regulador do tônus vascular e da homeostasia. Também está intrinsecamente relacionado com a resposta imunológica, mecanismos regulatórios neuronais e cardiovasculares (GHASEMI, 2019; BINDU, 2020).

3.3 Anti-inflamatórios não esteroidais

Os AINES constituem uma grande classe de medicamentos com extensa diversidade funcional. São principalmente ácidos orgânicos fracos, na qual, estrutura geral consiste em um grupamento ácido funcional ligado a um ou mais anéis aromáticos (BINDU et al., 2020). A diferença na ação primária entre esses fármacos está na seletividade de inibição das cicloxigenases, primeiro complexo enzimático envolvido na produção de PGs, (JACOB et al., 2018).

O ácido acetilsalicílico (AAS) representa o primeiro fármaco racionalmente planejado e obtido por otimização molecular, visando à modulação das propriedades adversas de seu precursor, o ácido salicílico. Inibe não seletivamente as COXs, de forma análoga ao paracetamol, derivado do para-aminofenol; ibuprofeno, derivado do ácido propiônico e ao diclofenaco, derivado do ácido fenilacético (Figura 3). Apesar de serem exemplos de fármacos clássicos utilizados na terapêutica para o tratamento da inflamação, apresentam como principal desvantagem clínica a propensão à ulceração gástrica e duodenal (ROMAINE; LOUREIRO; DA SILVA, 2021).

Figura 3- Estruturas do AAS (1), paracetamol (2), ibuprofeno (3), diclofenaco (4) e indometacina (5)



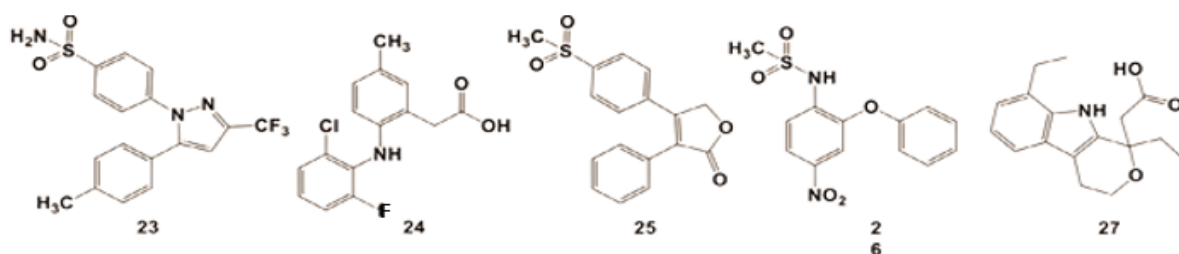
Fonte: Adaptado de Etienne; Viegas; Viegas Júnior, 2021.

No ambiente ácido do estômago, esses fármacos são compostos neutros que podem atravessar a membrana plasmática e penetrar nas células epiteliais gástricas. No ambiente intracelular neutro, os fármacos são reionizados e retidos causando lesão intracelular que é

responsável pela conseqüente lesão gastrointestinal local associada a eles. De forma sistêmica, ulcerações na mucosa decorrem da inibição da COX-1 que promove um dos mecanismos protetores que mantém a integridade da mucosa gástrica, a produção de PGE2 (BINDU et al., 2020; GOLAN; DAVID, 2009).

Neste contexto, a busca por um panorama de menos efeitos indesejáveis e de melhoramento da eficácia terapêutica levou ao lançamento AINEs com diferentes graus de seletividade para COX-2, que receberam a classificação geral de Coxibes (Figura 3) (OLIVEIRA, et al., 2019).

Figura 4- Estruturas químicas do celecoxibe (23), lumiracoxibe (24), rofecoxibe (25), nimesulida (26) e edotolaco (27)



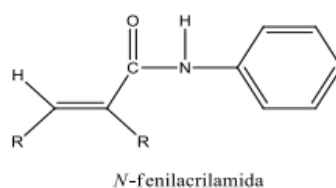
Fonte: Etienne; Viegas; Viegas Junior, 2021

O reconhecimento dos efeitos cardiovasculares e renais inerentes aos celecoxibes, juntamente com o avanço do conhecimento da multifatorialidade envolvida no processo inflamatório vem norteando o estudo de fármacos capazes de operar por novos mecanismos de ação, ou com atividade multialvo (MESHRAM et al., 2021; JACOB et al., 2018).

3.4 Função fenilacrilamida e o composto 2-ciano-N,3-difenilacrilamida (JMPR-01)

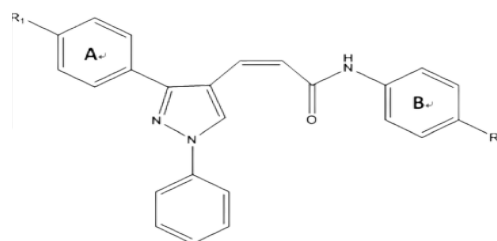
A busca por novos medicamentos, mais eficientes e menos tóxicos, vem culminando na descoberta de classes químicas, grupos e atributos funcionais, além de possíveis mecanismos de ação alternativos, satisfatórios aos perfis terapêuticos desejados (ETIENNE; VIEGAS; VIEGAS JUNIOR, 2021).

O JMPR-01 é uma substância derivada da função fenilacrilamida (Figura 3), uma estrutura privilegiada, o que significa tratar-se de uma subunidade estrutural comum à diversos fármacos ou compostos protótipos de fármacos, com capacidade de interagir com mais de um tipo de biorreceptor, conforme denominação estabelecida por Evans et al., (1988) e aprimorada por Patchtt e Nargund (2000).

Figura 5- Função N-fenilacrilamida

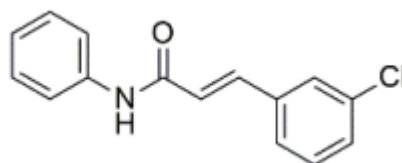
Fonte: Silva, 2020

Dentre as atividades que vêm sendo atribuídas à derivados da função está a antitumoral. Li et al., 2012, avaliaram uma série de derivados do composto 3- (1,3-difenil-1H -pirazol-4-il)-*N*-fenilacrilamida (Figura 4), quanto à inibição de histonas desacetilases (HDAC) e proliferação de células tumorais HTC116. Dentre os compostos sintetizados, o que resultou numa melhor resposta, apresentou quanto a atividade inibitória IC₅₀ de $0,42 \pm 0,02$ IM para HDAC-1 e IC₅₀ de $0,55 \pm 0,03$ IM para HDAC2. E quanto a antiproliferativa IC₅₀ = $0,62 \pm 0,02$ para HCT116.

Figura 6- Composto 3- (1,3-difenil- 1H -pirazol-4-il) -*N*-fenilacrilamida

Fonte: Li et al., 2012

Passos et al., 2020 demonstraram o efeito *in vitro* de uma série de acrilamidas derivadas do ácido cinâmico frente ao vírus Chikungunya, causador de uma doença infecciosa caracterizada por inflamação e dor dos tecidos musculoesqueléticos acompanhadas de inchaço nas articulações e danos na cartilagem. As substâncias foram avaliadas, através de citometria de fluxo, quanto a inibição da citopatogênes provocada pelo vírus em células Vero-E6. O composto denominado LQM334 (Figura 5), reduziu a porcentagem de células positivas para Chikungunya de 74,07 para 0,88%, 48h após o tratamento, tratando-se do composto que apresentou melhores resultados.

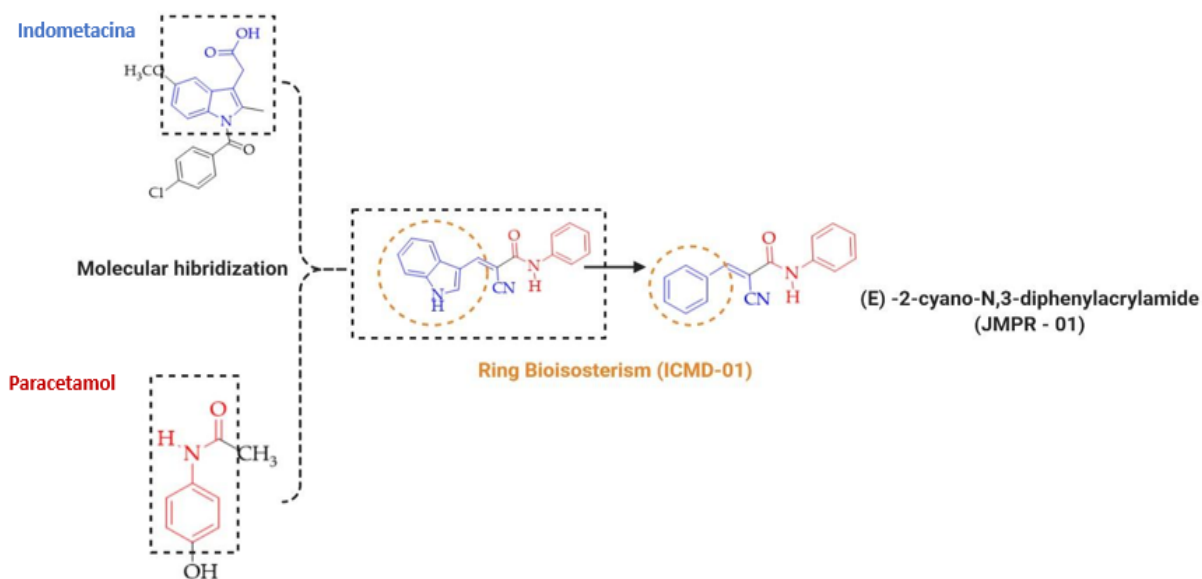
Figura 7- Composto LQM334

Fonte: Passos et al. (2020)

Outro derivado foi estudado por Silva et al., (2020) à cerca de sua potencial atividade imunomoduladora e anti-inflamatória. O composto 2-ciano-3- (1H-indol-3-il) -N-fenilacrilamida (ICMD-01), foi desenvolvido através da estratégia de hibridização molecular utilizando-se fragmentos de paracetamol e indometacina (Figura 6). O derivado fenilacrilamida mostrou, nos estudos, inibir a liberação de nitrito, citocinas e PGE2 em cultura de macrófagos J774, além de ter apresentado atividade anti-edematogênica e sobre a migração leucocitária *in vivo*.

O ICMD-01 foi utilizado como protótipo para o planejamento e desenvolvimento do JMPR-01. Conforme ilustra a Figura 6, a estratégia de bioisosterismo de anel foi empregada para a obtenção da estrutura molecular do novo derivado fenilacrilamida. Essa estratégia de modificação molecular baseia-se na substituição de fragmentos intercambiáveis, por outros que apresentem volume molecular, forma, distribuição eletrônica e propriedades físico-químicas semelhantes (LIMA; BARREIRO, 2017). Neste caso, foi realizada a substituição do núcleo indólico presente na estrutura do ICMD-01, constituído por cinco pares de elétrons, por um anel fenílico, na qual constitui-se por três pares de elétrons (Figura 6), tendo a estrutura passado, também, por um processo de simplificação molecular.

Figura 8- Obtenção da estrutura molecular do JMPR-01



Fonte: Adaptado de Silva et al. (2022)

Algumas das características físico-químicas do JMPR-01 fenilacrilamida, encontram-se descritas na Tabela 1. Os valores teóricos de Log P e peso molecular do composto enquadram-se a regra dos 5 descrita por Lipinsk *et al.*, (1997) na qual estabelece que para uma molécula ter boa biodisponibilidade deve apresentar coeficiente de partição octanol/água (LogP) menor ou igual a 5, massa molecular menor ou igual a 500 g/mol^{-1} , até dez aceptores de doação de hidrogênio e até cinco doadores de ligação de hidrogênio (WARING, 2010).

Tabela 1- Características físico-químicas do composto JMPR-01

| Composto | Aparência | MM (g/mol) | Fórmula molecular | Log (P) |
|----------|----------------|------------|--|---------|
| JMPR-01 | Pó cinza claro | 287,11 | C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O | 2,43 |

Fonte: Adaptado de Silva (2020)

Mediante os resultados preliminares obtidos com o ICMD-01 e o intuito da estratégia de bioisosterismo de melhorar o perfil farmacocinético, farmacodinâmico e toxicológico do composto protótipo, torna-se importante avaliar a significância dessa substituição.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do composto

O composto 2-ciano-N-3-difenilacrilamida (JMPR-01) foi cedido pelo Laboratório de Síntese e Vetorização Molecular (LSVM) ligado à Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), coordenado pelo Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura. Sendo o laboratório responsável pelos processos de síntese e caracterização que possuem metodologia descrita na dissertação de Silva (2020).

4.2 Animais e procedimentos éticos

Foram utilizados camundongos albinos pertencentes à linhagem *Swiss Webster* (*Mus musculus*) provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade da Paraíba, tratando-se de machos e fêmeas, pesando entre 25 a 35g. Os animais foram mantidos em instalações com temperatura e umidade controladas, em gaiolas plásticas, alimentando-se de água e ração *ad libitum*, e respeitando-se o ciclo claro-escuro de 12h. A eutanásia ocorreu mediante aprofundamento anestésicos, utilizando-se Xilazina (30mg/kg) e Cetamina (300mg/kg), *ip*. Os protocolos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual da Paraíba e aprovados sob o parecer nº 003/2021.

4.3 Investigação da atividade anti-inflamatória e toxicológica

4.3.1 Edema de pata induzido por Adjuvante Completo de Freund (CFA)

Os camundongos foram separados em grupos experimentais (n=6) e tratados com solução salina + 5% DMSO 10 mL kg⁻¹, JMPR-01 (25, 50 e 100 mg kg⁻¹ v.o) ou dexametasona (2 mg kg⁻¹ i.p). Após 1 h foram levemente anestesiados com halotano e receberam 20 µL de adjuvante completo de Freund (CFA 1 mg/mL) na região plantar da pata traseira direita (LIMA et al. 2013). O edema foi medido em plestismômetro.

4.3.2 Toxicidade aguda de dose única

O teste de toxicidade aguda oral foi realizado segundo metodologia descrita no Guia 423 das diretrizes da OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Foram utilizados dois grupos (n=3) de animais fêmeas. Os animais do grupo controle receberam o veículo (v.o DMSO 5% acrescido de salina) e o grupo teste foi tratado com o JMPR-01 na dosagem de 2000 mg kg⁻¹ v.o. Foram realizadas observações comportamentais sistemáticas nos tempos de 15min, 30 min, 1h, 2h, 4h e 8h após a administração, por meio do screening hipocrático segundo Almeida (1999). A partir de então, parâmetros como massa corporal e consumo de água e ração foram observados a cada 24h, durante 14 dias. No 15º dia os animais foram submetidos a eutanásia, sendo os órgãos (fígado, coração, baço, rins e estômago) retirados, pesados e avaliados macroscopicamente.

4.3.3 Docking molecular

O composto foi desenhado através do software ChemDraw Professional 15.1, seguindo da conversão da estrutura para sua forma tridimensional utilizando-se o Chem3D 15.1. Posteriormente, por meio de mecânica molecular (MM2), a energia molecular do ligante foi reduzida e as estruturas salvas.

As estruturas cristalográficas dos alvos utilizadas foram retiradas do repositório Protein Data Bank (PDB), sendo elas: iNOS complexada com AR-C95791(PDB ID: 3E7G), PDE-4B co-cristalizada com o inibidor Roflumilast (PDB ID: 1XMU), COX-2 complexada com celecoxibe (PDB ID: 3LN1), 5-LOX co-cristalizada com AKBA (PDB ID: 6NCF) e LT-A4-H co-cristalizada com Bestatin (PDB ID: 1HS6).

O tratamentos dos alvos foi realizado através do software PyMol, onde foram retirados os ligantes complexados, moléculas de água e outros heteroátomos e, posteriormente, por meio do AutoDock Tools feita a junção de hidrogênios não polares, adição de hidrogênios polares e cargas de Kollman, sendo então as estruturas salvas no formato pdqb. O estudo de docking foi realizado utilizando o software AutoDock Tools (ADT) 1.5.6, aplicando-se o algoritmo genético Lamarckiano (LGA) para geração dos cálculos de interação e escore baseado na Energia Livre de Ligação (ΔG), e para simulação de uma Constante de Inibição Estimada (Ki).

A validação do estudo ocorreu através de *redocking*, através do software AutoDock Tools 1.5.6. Onde as moléculas co-cristalizadas com as proteínas foram utilizadas na parametrização, utilizando-se no estudo de docking a conformação que apresentou menor RMSD (root-mean-square deviation) em relação aos dados padrão da molécula. A otimização

global iniciou-se com uma população de 150 indivíduos posicionados aleatoriamente com um máximo de 2.500.000 avaliações de energia e um máximo de 27.000 gerações. Durante cada experimento de docking, 100 corridas foram realizadas, gerando 100 conformações. As imagens em 2D foram obtidas através do programa Discovery Studio 2017 R2 Client.

4.4 Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando-se o programa Prisma 5.0. Os dados foram analisados pelo teste T ou pela análise de variância (ANOVA), seguido, quando necessário, pelo teste de Dunnett. O nível de significância foi fixado em 5% ($p < 0,05$).

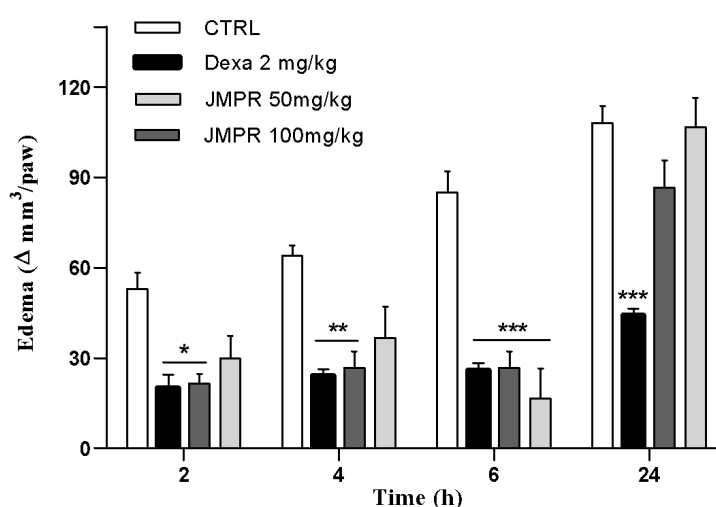
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Edema de pata induzido por Adjuvante Completo de Freund (CFA)

O Adjuvante Completo de Freund (CFA) é uma substância constituída de óleo mineral e *Mycobacterium tuberculosis* inativada, capaz de induzir o processo inflamatório através da mobilização de células apresentadoras de antígenos (APCs), células T e da indução de processos de sinalização intracelular que levam à expressão de genes codificadores de mediadores de ação pró-inflamatória, como citocinas (IL-2, IFN- γ , IL-1 β , IL-8 e TNF- α), prostaglandinas e NO, sendo amplamente utilizados em modelos de inflamação crônica e nocicepção (BEHER; DIVANGAHI, 2015; KUMAR et al., 2019; MONTES et al., 2016).

Na figura 9, encontra-se o resultado da avaliação da atividade anti-inflamatória do JMPR-01 pelo método do edema de pata induzido por CFA. O pré-tratamento realizado com o composto na concentração de 50mg/kg, inibiu a formação de edema a partir de 6h, tendo a atividade cessado após 24h. Utilizando-se o composto numa maior concentração (100mg/kg), uma inibição satisfatória pode ser observada de 2 a 6h, com atividade semelhante ao controle, a Dexametasona, e, possivelmente, relacionada à manutenção dos níveis de mediadores atuantes nas fases iniciais do processo inflamatório.

Figura 9- Influência do JMPR-01 no edema de pata induzido por CFA



Os dados são expressos em média \pm SEM; n=6 camundongos por grupo. * diferença significativa do grupo controle ($p < 0.05$). ANOVA seguido do teste de Benferroni.

O NO é um potente mediador vasoativo, envolvido no aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação através de sua ação estimulante sobre a enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) e consequente formação de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP). Sob estímulos de produtos microbianos, a enzima iNOS é ativada em células inflamatórias, catalisando a biossíntese de NO (GHASEMI, 2019). Desta forma, a atividade anti-edematogênica observada pode estar relacionada a modulação da liberação desse mediador pelo composto.

O JMPR-01 demonstrou satisfatório potencial supressor frente a liberação de TNF- α e IL-1 β , por macrófagos estimulados por LPS, em estudos realizados por Silva et. al., (2022). À essas citocinas, são atribuídas à regulação, à nível transcricional, das enzimas COX-2 que catalisam a biossíntese de PGI₂, PGE₂ e PGD₂, mediadores intrinsecamente relacionados ao aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação (GUNTER et al., 2017).

A mediação da liberação dos níveis de citocinas como IL-1, IL-12 e TNF- α também vem sendo relacionada a regulação dos níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), como demonstrado por Xu et al. (2020), ao utilizar o Roflumilast, um inibidor seletivo da enzima PDE4, em modelos experimentais de sepse, uma síndrome com fisiopatologia caracterizada pela vasodilatação generalizada e aumento da permeabilidade endotelial (DELFRATE, FERNANDES; FRANCO, 2021). Neste caso, a liberação das citocinas pró-inflamatórias foi mediada pela regulação dos níveis desse nucleotídeo que é metabolizado pelas enzimas fosfodiesterases (PDE), a qual inibição de suas diferentes especificidades é estratégia para prevenção de respostas inflamatórias (DELFRATE; FERNANDES; FRANCO, 2021; DERICI et al., 2019).

Desta forma, o fato da supressão de TNF- α e IL-1 β corrobora com a hipótese de atuação do JMPR-01 na manutenção dos níveis de mediadores pró-inflamatórios e vasoativos por diferentes mecanismos.

5.2 Toxicidade aguda

A avaliação da toxicidade sistêmica aguda é realizada objetivando a classificação e rotulagem de substâncias de acordo com seu potencial de letalidade ou toxicidade como estabelecido pela legislação. Parâmetros são investigados para identificar o potencial tóxico em órgãos específicos, indícios de alterações no sistema nervoso central, registros de modificações de condutas e letalidade (VALADARES, 2006).

A avaliação toxicológica do JMPR-01 decorreu conforme a metodologia descrita no Guia 423 das diretrizes da OECD e seguindo-se o screening hipocrático comportamental de acordo com o protocolo de Almeida (1999) (Anexo1). Na concentração avaliada, 2000 mg/kg, o composto não se mostrou letal ou causador de alterações motoras, nociceptivas e sedativas nos animais. Observando-se, apenas, o aumento da micção. Também não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) na evolução ponderal e peso dos órgãos dos animais, comparado ao grupo controle (Tabela 3 e Tabela 4). Além de terem sido mantidas as características macroscópicas dos órgãos.

Tabela 2- Consumos e evolução ponderal dos animais submetidos ao teste de toxicidade

| Consumos | Controle | JMPR-01 |
|---------------------|--------------|----------------------------|
| Água(mL) | 16.93 ± 0.88 | 16.21 ± 0.96 ^{ns} |
| Ração(g) | 13.21 ± 0.39 | 13.79 ± 0.63 ^{ns} |
| Varição de Peso (g) | 1.66 ± 0.33 | 2.33 ± 0.33 ^{ns} |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022. Resultados expressos como Média ± EPD. Teste de T de Student ($p < 0,05$).

Tabela 3- Peso relativo dos órgãos dos camundongos submetidos ao teste de toxicidade

| Peso dos órgãos(g) | Controle | JMPR-01 |
|--------------------|---------------|-----------------------------|
| Coração | 0.137 ± 0.005 | 0.119 ± 0.005 ^{ns} |
| Fígado | 1.245 ± 0.526 | 1.106 ± 0.467 ^{ns} |
| Rins | 0.565 ± 0.023 | 0.487 ± 0.019 ^{ns} |
| Baço | 0.178 ± 0.026 | 0.129 ± 0.009 ^{ns} |
| Estômago | 0.381 ± 0.027 | 0.309 ± 0.015 ^{ns} |

Fonte: Elaborado pelo autor, 2022. Resultado dos expressos como Média ± EPD. Teste de T de Student ($p < 0,05$).

Esses resultados estão em concordância com os obtidos por Silva (2020), ao analisar o perfil de segurança do composto ICMD-01, também através do teste de toxicidade aguda de dose única. De maneira convergente, a dose de 2000 mg/kg não causou letalidade, ou alterações comportamentais nos animais. Dos órgãos analisados apenas o baço apresentou diferença estatística no peso ($p < 0,005$), porém sem alterações macroscópicas. Para os achados laboratoriais, foram observadas uma redução significativa dos níveis séricos de transaminase glutâmico-oxalacética (AST) e dos triglicérides e de algumas discrasias hematológicas, como a o aumento de plaquetas (PLT) e dos níveis de células brancas (WBC).

Desta forma, pode-se deduzir que o JMPR-01 não induziu, pelo teste realizado, alterações fisiológicas ou outros sinais de toxicidade nos animais, mostrando um perfil de segurança satisfatório na dose utilizada.

5.3 Docking molecular

O estudo de docking molecular, é um procedimento de simulação *in silico*, utilizado para prever a conformação e orientação assumida por moléculas orgânicas, assim como, interações estabelecidas entre elas e macromoléculas. A afinidade do complexo ligante-proteína pode ser representada por parâmetros como o valor de Energia Livre de Ligação (ΔG) e Constante de Inibição Estimada (K_i). Quanto menor a energia livre de ligação necessária para ocorrer a interação e constante de inibição, maior a afinidade (BALLI et al., 2012). Os resultados das análises de interações entre os alvos moleculares com o JMPR-01 e ligantes co-cristalizados utilizados encontram-se descritos na Tabela 2. Bem como os valores de RMSD obtidos na fase de *Rodocking* para validação do estudo.

Tabela 4- Valores de energia livre de ligação e constante de inibição dos complexos ligante-proteína

(Continua)

| Alvos moleculares | Ligantes | Energia livre de ligação (Kcal/mol^{-1}) | Constante de inibição (K_i) (nM) | RMSD (\AA) |
|-------------------|-----------|---|--------------------------------------|-----------------------|
| iNOS | AR-C95791 | -8.12 | 1.120 | 0.77 |
| | JMPR-01 | -8.67 | 440.93 | |

Tabela 4- Valores de energia livre de ligação e constante de inibição dos complexos ligante-proteína.

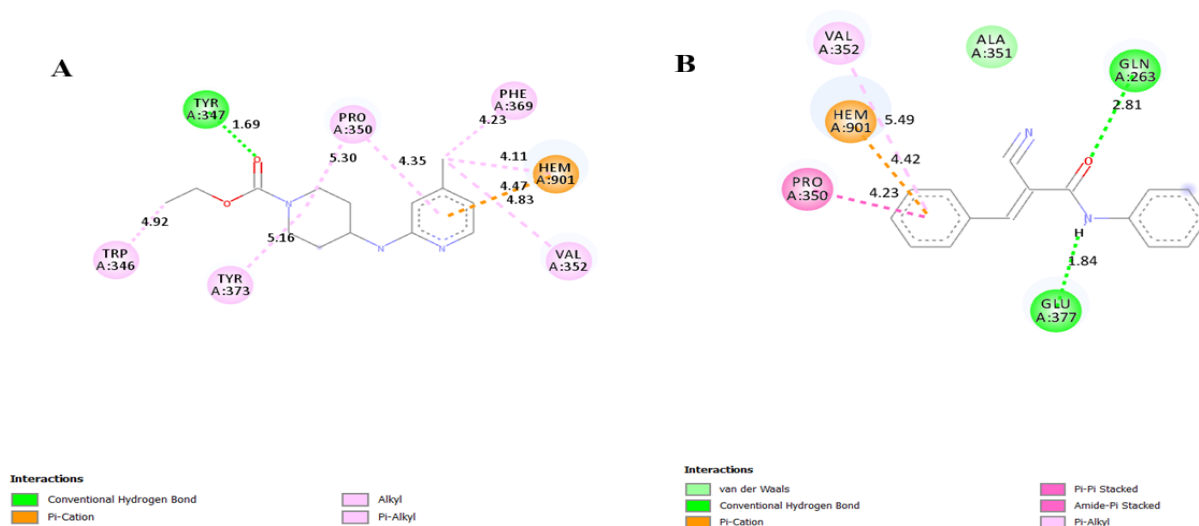
(Conclusão)

| Alvos moleculares | Ligantes | Energia livre de ligação (Kcal/mol ⁻¹) | Constante de inibição (Ki) (nM) | RMSD (Å) |
|-------------------|-------------|--|---------------------------------|----------|
| PDE 4B | Roflumilast | -7.7 | 2.250 | 0.25 |
| | JMPR-01 | -8.7 | 417.13 | |
| COX-2 | Celecoxibe | -11.18 | 6.41 | 0.93 |
| | JMPR-01 | -8.98 | 262.99 | |
| 5-LOX | AKBA | -10.28 | 29.3 | 1.71 |
| | JMPR-01 | -8.31 | 816.3 | |
| LT-A4-H | Bestatin | -9.44 | 120.44 | 0.85 |
| | JMPR-01 | -9.1 | 213.16 | |

Fonte: Elaborada pelo autor, 2022

A iNOS é uma enzima construtivamente ativa, estimulada, à nível transcricional, por mediadores da inflamação e lipopolissacarídeos bacterianos (LPS). Catalisa a biossíntese de NO, molécula sinalizadora que se difunde facilmente pela membrana e regula uma ampla variedade de processos de natureza cardiovascular, inflamatória e neuronal (GHASEMI, 2019). NO alvo iNOS (3E7G), o composto apresentou menor energia livre de ligação e maior constante de inibição quando comparado ao ligante AR-C95791, as interações estabelecidas estão mostradas na Figura 1, onde locais de interação em comum foram: Prol:350, Val:352 e o grupo Hem:901. De forma adicional, com os resíduos de aminoácidos Gln 263 e Glu 377 por interações de hidrogênio. As NOS compartilham uma arquitetura de domínio semelhante, o domínio N-terminal é um módulo catalítico contendo o grupamento heme que se liga ao cofator essencial, tetrahydrobiopterina (H4B). Desta forma, o sítio ativo do domínio heme é alvo para a maioria dos inibidores de NOS (FLINSPACH et al., 2004).

Figura 10- Representação 2D das interações do AR-C95791(A) e JMPR-01(B) com o alvo iNOS.



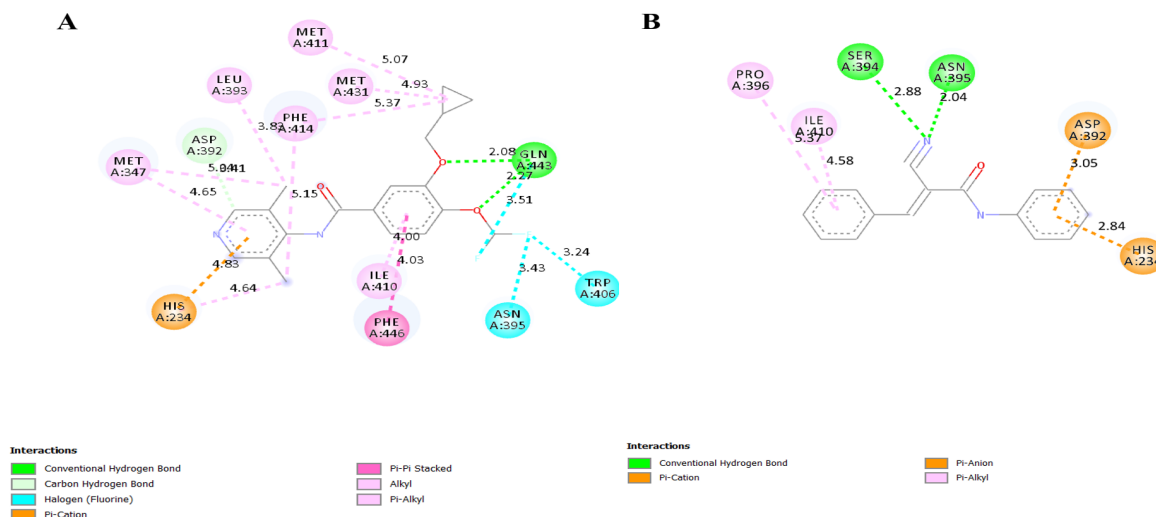
Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

As PDE-4 possuem atividade hidrolisante específica sobre o AMPc, importante segundo mensageiro celular. Entre as quatro isoformas da fosfodiesterase 4 (A-D), a PDE4B desempenha um papel central na inflamação, caracterizando-se como um subtipo predominante em monócitos e neutrófilos. Além de serem consideradas alvos centrais no tratamento de inflamações nas vias aéreas (AZAM; TRIPURANENI, 2014).

Comparando-se com a interação do inibidor Roflumilast, com o alvo PDE4B (1XMU), a energia livre gerada pelo derivado fenilacrilamida demonstrou-se mais negativa ($-8.7 \text{ Kcal/mol}^{-1}$), apresentando em comum com o ligante co-cristalizado interações com Ile:410, Asn:395, Asp:392 e His:234. Pode-se atribuir a estabilidade do complexo às ligações de hidrogênio, e por empilhamento como π -Alquil, π -Cátion e π -Ânion formadas (Figura 2).

As interações- π envolvem estruturas aromáticas, geralmente, recorrentes em sistemas biológicos (ácidos nucleicos e proteínas) e de grande relevância em sistemas químicos supramoleculares. Proporcionam uma redistribuição de carga no sistema, nas quais essas interações eletrostáticas possuem diferentes magnitudes e são dependentes da polarização de cada átomo. Possuem, também, a tendência de controlar a estereoquímica de processos orgânicos e organometálicos, gerando uma estabilização do sistema, mesmo quando há uma redistribuição de carga que acarreta numa mudança de polarizabilidade e potencial de ionização por efeito do tipo de substituinte (OLIVEIRA, 2016).

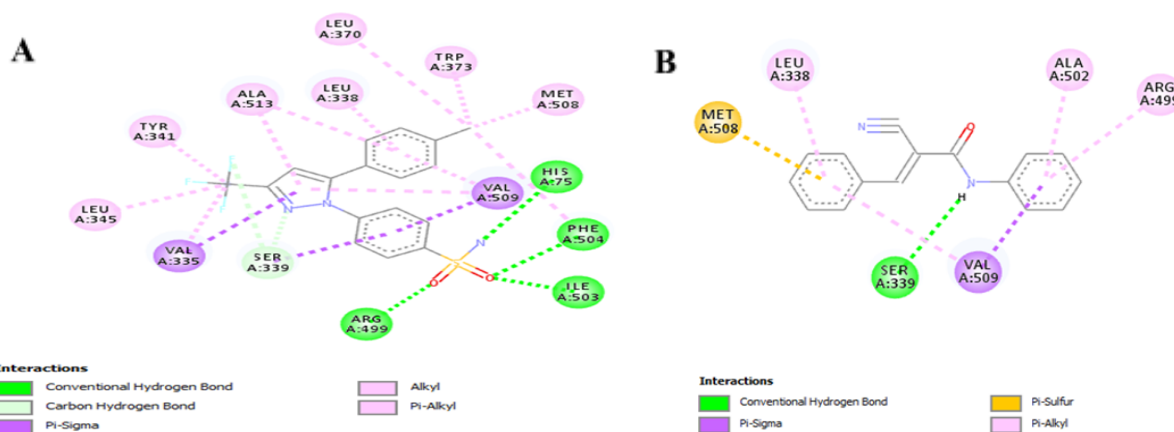
Figura 11 - Representação 2D das interações do Roflumilast (A) e JMPR-01 (B) com o alvo PDE- 4B.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

A COX-2 é considerada uma isoforma induzida, tem expressão aumentada em tecidos com resposta inflamatória ativa, pelo estímulo de mediadores como IL-1 e TNF- α , ativadores do fator de transcrição NF-kB. Medeia a conversão do A.A em PGs, TXs e prostaciclina, importantes promotores da resposta inflamatória (MITOMA et al., 2018). A constante de inibição e energia livre de ligação mostraram-se maiores para o JMPR-01 no sítio catalítico da COX-2, quando comparado ao Celecoxibe (Tabela 1). O derivado fenilacrilamida ligou-se ao alvo COX-2 (3LN1) com uma energia livre de ligação de $-9.44 \text{ Kcal/mol}^{-1}$ e $K_i = 120.09$ (Tabela 1), estabilizando-se o complexo com ligações convencionais de hidrogênio, π -sigma, π -enxofre e π -alquil, como mostra a Figura 3. Os aminoácidos Arg:499, Val: 509, Ser:399, Met: 508 3 Leu: 338 foram pontos de interações em comum para o JMPR-01 e o Celecoxibe. Dentre estes Arg:499, Val: 509, Ser:399 estão relacionados a inibição seletiva da enzima (SAĞLIK et al., 2021).

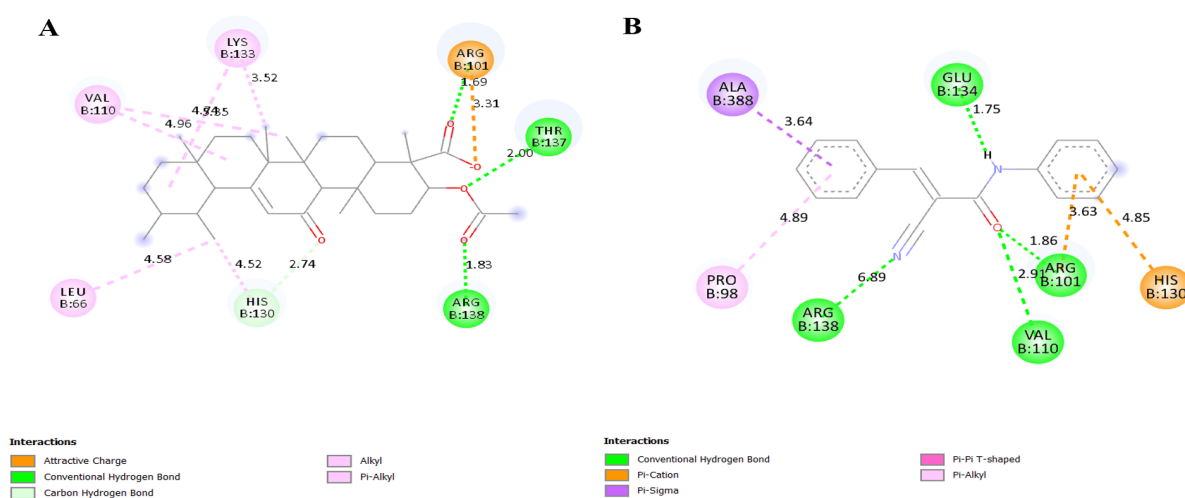
Figura 12- Representação 2D das interações do Celecoxibe (A) e JMPR-01 (B) com o alvo COX-2.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

No alvo 5-LOX (6NCF), o JMPR-01 apresentou energia de ligação de -8.45 e constante de inibição de 644.1 (Tabela 1), interagindo, principalmente por ligações de hidrogênio (Figura 4). Mostrando-se, um pouco menor, a energia gerada na interação do ligante co-cristalizado, AKBA, com o alvo, como mostra a Tabela 1. Ambos apresentaram interações com os aminoácidos Arg:101, Arg: 138, Val:110 e His: 130 sendo a quantidade de ligações, no geral, a mesma (Figura 4).

Figura 13- Representação 2D das interações do AKBA (A) e JMPR-01 (B) com o alvo 5-LOX.

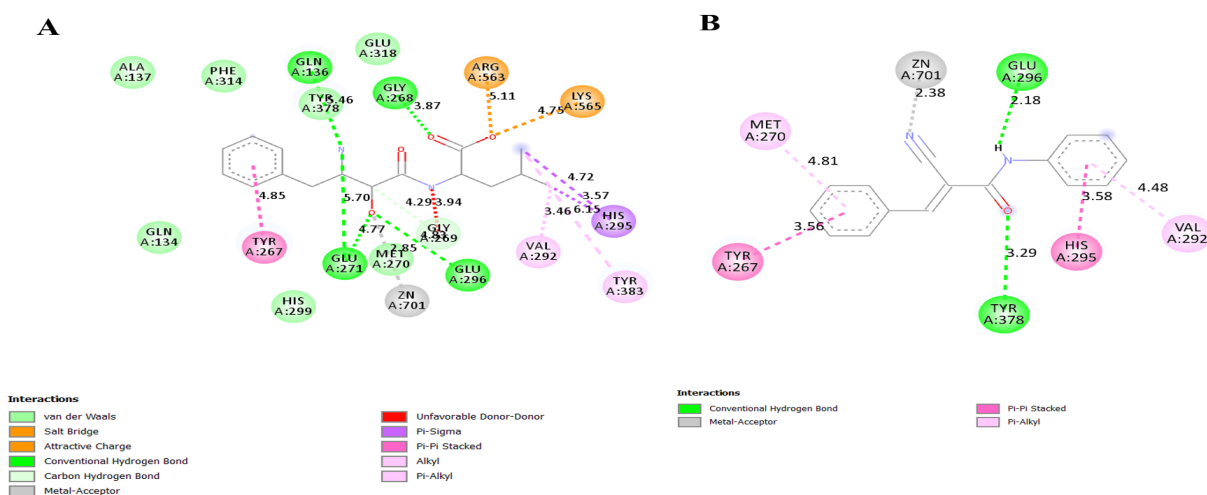


Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Conforme demonstrado na Tabela 1, o JMPR-01 demonstrou menor energia livre e constante de inibição quando comparado ao inibidor bestatin no alvo LTA4H (1HS6), enzima

responsável por catalisar a biossíntese de LTB₄, importante mediador quimiotático e ativador de células inflamatórias (SAEKI; YOKOMIZO, 2017). O JMPR-01 se ligou à proteína com uma energia de -9.74kcal/mol e Ki= 72.91 (Tabela 1), tornando-se um dos alvos no qual o composto mostrou maior afinidade. O complexo se deu através de interações de natureza estável, como π - π , π -sigma, π π -alquil e ligação convencional de hidrogênio, como mostra a Figura 1. Apresentando menor número de interações em comparação ao ligante co-cristalizado e sendo Tyr: 378, Met: 270, Tyr: 267, His: 295, Val:292 e Gluc: 296 pontos de interações em comum.

Figura 14 - Representação 2D das interações do Bestatin (A) e JMPR-01 (B) com o alvo LT-A4-H.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Desse modo, o JMPR-01 acoplou-se de forma satisfatória, principalmente, com as enzimas iNOS, PDE4B e LTA4H, corroborando com o resultado do ensaio *in vivo* realizado, e favorecendo a hipótese de atuação desse novo derivado fenilacrilamida por mais de uma via envolvida no processo inflamatório.

6 CONCLUSÕES

Conforme os resultados obtidos, pode-se concluir:

- O JMPR-01 mostrou um perfil anti-edematogênico satisfatório, principalmente na dose de 100mg/kg e no tempo de 2 a 6h;
- Quanto ao perfil de segurança, na dosagem avaliada (2000 mg/kg) não ocasionou mortes nem sinais de toxicidade relevantes nos animais;
- Os estudos *in silico* demonstraram afinidade, de forma majoritária, pelos alvos iNOS, PDE4B e LT-A4-H, sendo a inibição desses alvos sugestivos mecanismos de ação do composto através da modulação da biossíntese de seus respectivos metabólitos, os tornando propostas interessantes para futuros estudos *in vitro* e *in vivo* mais específicos.

REFERÊNCIAS

ABELLA V.; SCOTECE M.; CONDE J.; PINO J.; GONZALEZ-GAY M. A.; GÓMEZ-REINO J. J.; MERA A.; LAGO F.; GÓMEZ R.; GUALILLO O. Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 13, n. 2, p. 100–109, 5 fev. 2017.

ALESSANDRI, A. L.; SOUSA, L. P.; LUCAS, C. D.; ROSSI, A. G.; TEIXEIRA, M. M. Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 139, p. 189–212, 2013.

ARANDA, J.V.; SALOMONE, F.; VALENCIA, G. B.; BEHARRY, K. D. Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in Newborns and Infants. *Pediatric Clinics of North America*, v. 64, p. 1327–1340, 2017.

AZAM, M. A.; TRIPURANENI, N. S. Selective phosphodiesterase 4B inhibitors: a review. **Scientia pharmaceutica**, v. 82, n. 3, p. 453-482, 2014.

BALLI, A.; OHRI, R.; DEB, P. K. Synthesis, evaluation and docking studies on 3-alkoxy-4-methanesulfonamido acetophenone derivatives as non ulcerogenic anti-inflammatory agents. **European Journal Medicinal Chemistry**, v.29, p. 397-405, 2012.

BEHR, M. A.; DIVANGAHI, M. Freund's adjuvant, NOD2 and mycobacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 23, p. 126-132, 2015.

BINDU, S.; MAZUMDER, S.; BANDYOPADHYAY, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. **Biochemical Pharmacology**, v. 180, n. Jul. 2020.

CRUVINEL, W. M.; JUNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T.T.T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

DELFRATE, G.; FERNANDES, D.; FRANCO, G. C. N. Agentes inibidores da fosfodiesterase no tratamento da sepse e choque séptico. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e56310112269, 31 jan. 2021.

DERICI, M. K.; SADI, G.; CENIK, B.; GÜRAY, T.; DEMIREL-YILMAZ, E. Differential Expressions and Functions of Phosphodiesterase Enzymes in Different Regions of the Rat Heart. *European Journal of Pharmacology* **2019**, 844, p. 118–129, 2019.

ERRANTE, P. R.; MENEZES-RODRIGUES, F. S.; TAVARES, J. G. P.; REIS, M. C. M.; ICIMOTO, M. Y.; FERRAZ, R. R. N.; CARICATI-NETO, A. Mecanismos de ação e resistência ao uso de glicocorticóides. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 01-11, 2014.

ETIENNE, R.; DIAS VIEGAS, F. P.; VIEGAS, C. Pathophysiological aspects of inflammation and drug design: An updated overview. *Revista Virtual de Quimica*, v. 13, n. 1, p. 167–191, 1 jan. 2021.

EVANS, B. E.; RITTLE, K. E.; BOCK, M. G.; DIPARDO, R. M.; FREIDINGER, R. M.; WHITTER, W. L.; LUNDELL, G. F.; VEBER, D. F.; ANDERSON, P. S.; CHANG, R. S. L.; LOTTI, V. J.; CERINO, D. J.; CHEN, T. B.; KLIG, P. J.; KUNKEL, K. A.; SPRINGER, J. P.; HIRSFIELD, J. J. Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. *Journal of medicinal chemistry*, v. 31, n. 12, p. 2235-2246, 1988.

FLINSPACH, M., LI, H., JAMAL, J., YANG, W., HUANG, H., SILVERMAN, R. B., POULOS, T. L. Structures of the neuronal and endothelial nitric oxide synthase heme domain with D-nitroarginine-containing dipeptide inhibitors bound. *Biochemistry*, v. 43, n. 18, p. 5181-5187, 2004.

GHASEMI, M. Nitric oxide: Antidepressant mechanisms and inflammation. In *Advances in Pharmacology; Academic Press Inc*, vol. 86, p. 121–152. 2019.

GOLAN, DAVID E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GU, X.; CHEN, J.; ZHANG, Y.; GUAN, M.; LI, X.; ZHOU, Q.; SONG, Q.; QIU, J. **Synthesis and assessment of phenylacrylamide derivatives as potential anti-oxidant and anti-inflammatory agents**. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 180, p. 62-71, 2019

HOP, H.T.; REYES, A. W. B.; HUY, T. X. N.; ARAYAN, L. T.; MIN, W.; LEE, H. J.; RHEE, M. H.; CHANG, H. H.; KIM, S. Activation of NF- κ B-mediated TNF-induced antimicrobial immunity is required for the efficient *Brucella abortus* clearance in RAW 264.7 cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, n. 8, 9 out. 2017.

JIANG, X.; et al. Lymphatic dysfunction, leukotrienes, and lymphedema. *Annual review of physiology*, v. 80, p. 49-70, 2018.

KANY, S.; VOLLRATH, J. T.; RELJA, B. Cytokines in inflammatory disease. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n. 23, p. 6008, 2019.

KOROTKOVA, M.; JAKOBSSON, P.-J. Persisting eicosanoid pathways in rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, v. 10, n. 4, p. 229–241, 11 fev. 2014.

KUMAR, S.; S.; BEGUM, A. S.; HIRA, K.; NIAZI, S.; KUMAR, B. R. P.; ARAYA, H.; FUJIMOTO, Y. Structure-based design and synthesis of new 4-methylcoumarin-based lignans as pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6 and IL-1 β) inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, v. 89, 2019.

LI, X.; LIU, J.-L.; YANG, X.-L.; ZHAO, T. T.; GONG, H. B.; ZHU, H. L. Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of 3-(1,3-diphenyl-1H-pyrazol-4-yl)-N-phenylacrylamide derivatives as inhibitors of HDAC activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 20, n. 14, p. 4430-4436, 2012.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. **Beyond Bioisosterism: New Concepts in Drug Discovery. Comprehensive Medicinal Chemistry III**, v. 1–8, 2017.

LIU, M.; YOKOMIZO, T. The role of leukotrienes in allergic diseases. **Allergy International**, v. 64, p. 17-26, 2015.

MCNELIS, J. C.; OLEFSKY, J. M. Macrophages, immunity, and metabolic disease. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 36-48, 2014.

MESHAM, M. A.; BHISE, U. O.; MAKHAL, P. N.; KAKI, V. R. Synthetically-tailored and nature-derived dual COX-2/5-LOX inhibitors: Structural aspects and SAR. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 225, p. 113804, 2021.

MITOMA, H. et al. Molecular mechanisms of action of anti-TNF- α agents – Comparison among therapeutic TNF- α antagonists. **Cytokine**, v. 101, p. 56–63, 1 jan. 2018.

MOELANTS, E. A. V.; MORTIER, A.; DAMME, J. V.; PROOST, P. Regulation of TNF- α with a Focus on Rheumatoid Arthritis. **Immunology and Cell Biology**, v. 91, n. 6, p. 393-401, 2013

MONTES, G. C.; HAMMES, N.; DA ROCHA, M. D.; MONTAGNOLI, T. L.; FRAGA, C. A.; BARREIRO, E. J.; SUDO, R. T.; ZAPATA-SUDO, G. Treatment with adenosine receptor agonist ameliorates pain induced by acute and chronic inflammation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 358, p. 315-323, 2016.

MURAKAMI, M.; HIRANO, T. The molecular mechanisms of chronic inflammation development. **Frontiers in Immunology/Inflammation**. v. 3, art. 323, 2012.

OLIVEIRA, A. G. C. Estudo das interações intermoleculares de líquido iônicos sob a ótica da química quântica. 2016. 104 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de Brasília, 2016.

OLIVEIRA, M. M. C.; SILVA, M. M.; MOREIRA, T. L. M.; COUTO, V. F.; COELHO, Y. N. NUNES, C. P. O uso crônico de anti-inflamatórios não-esteroidais e seus efeitos adversos. **Cadernos da Medicina-UNIFESO**, v. 2, n. 2, 2019.

JAISMY JACOB, P.; MANJU, S. L.; ETHIRAJ, K. R, ELIAS G. Safer anti-inflammatory therapy through dual COX-2/5-LOX inhibitors: A structure-based approach. **European Journal Of Pharmaceutical Sciences**. v. 267, p.356-381, ago. 2018.

PALOMINO, D. C.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. **Einstein (Sao Paulo)**, 13, n. 2299 3, p. 469-473, 2015 Jul-Set, 2015.

PASSOS, G. F. S.; GOMES, M. G. M.; AQUINO T. M.; ARAÚJO-JÚNIOR J. X.; SOUZA, S. J. M.; CAVALCANTE J. P. M.; SANTOS, E. C. D.; BASSI, E. J.; SILVA-JÚNIOR, E. F. D. Computer-aided design, synthesis, and antiviral evaluation of novel acrylamides as potential inhibitors of E3-E2-E1 glycoproteins complex from chikungunya virus. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 7, p. 141, 2020.

PEEBLES JR, R. S.. Prostaglandins in asthma and allergic diseases. **Pharmacology & therapeutics**, v. 193, p. 1-19, 2019.

ROMAINE, A. P.; LOUREIRO, F. F.; DA SILVA, F. V. M. Reações adversas no uso de Anti-inflamatório não esteroidais (AINES) no Brasil: uma revisão sistemática. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 6, p. 54653-54661, 2021.

SAEKI, K.; YOKOMIZO, T. Identification, signaling, and functions of LTB4 receptors. In: **Seminars in immunology**. V. 33, p. 30-36. 2018.

SAĞLIK, B. N.; OSMANIYE, D.; LEVENT, S.; ÇEVİK, U. A.; ÇAVUŞOĞLU, B. K.; ÖZKAY, Y.; KAPLANCIKLI, A. Z. Design, synthesis and biological assessment of new selective COX-2 inhibitors including methyl sulfonyl moiety. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 209, p. 112918, 2021.

SANDER, WILLEM J.; O'NEILL, HESTER G.; POHL, CAROLINA H. Prostaglandin E2 as a modulator of viral infections. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 89, 2017.

SCHOPPEMEYER, R.; VAN BUUL, J. D. The diapedesis synapse: dynamic leukocyte-endothelium interactions. **Current Opinion in Physiology**, v. 19, p. 1-9, 2021.

SILVA, P. R.; ESPÍRITO SANTO, R. F.; MELO, C. O.; CAVALCANTE, F. E. P.; COSTA, T. B.; BARBOSA, Y. V.; SILVA, Y. M. S. M.; SOUSA, N. F.; VILLARREAL, C. F.; MOURA, R. O.; SANTOS, V. L. The Compound (E)-2-Cyano-N, 3-diphenylacrylamide (JMPR-01): A Potential Drug for Treatment of Inflammatory Diseases. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 1, p. 188, 2022.

SILVA, V. C. **Mucosite oral induzida por 5-fluorouracil em hamsters persiste após o bloqueio farmacológico da via dos leucotrienos**. 2017. 118 f. Tese (Programa de pós graduação em ciências Médico-cirúrgicas)- Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

SILVA, P. R. **Síntese e perfil anti-inflamatório in vitro e in vivo de derivados fenilacetamida e fenilacrilamida**. 2020. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2020.

SILVA, P. R.; ALMEIDA, M.; SILVA, J.; ALBINO, S.; ESPÍRITO-SANTO, R.; LIMA, M.; VILLARREAL, C.; MOURA, R.; SANTOS, V.; (E)-2-Cyano-3-(1H-Indol-3-yl)-N-Phenylacrylamide, a Hybrid Compound Derived from Indomethacin and Paracetamol: Design, Synthesis and Evaluation of the Anti-Inflammatory Potential. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 21, n. 7, p. 2591, 2020.

VALADARES, M. C. Avaliação de Toxicidade Aguda: Estratégias Após a “Era do Teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p.93-98, 2006.

WARING, M. Lipophilicity in drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 5, n. 3, p. 235-248, 2010.

X Xu, L L.; B Hu, H. J.; M T. Roflumilast, a phosphodiesterases-4 (PDE4) inhibitor, alleviates sepsis-induced acute kidney injury. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 26, p. e921319-1, 2020.

ANEXO A- Protocolo utilizado na triagem farmacológica comportamental

| Atividade farmacológica | Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso | | | | |
|---|---|----|----|----|----|
| | Até 30 min | 1h | 2h | 3h | 4h |
| 1 – SNC | | | | | |
| a. Estimulante | | | | | |
| Hiperatividade | | | | | |
| Agressividade | | | | | |
| Tremores | | | | | |
| Convulsões | | | | | |
| Piloereção | | | | | |
| Movimento intenso das vibrissas | | | | | |
| Outras | | | | | |
| b. Depressoras | | | | | |
| Hipnose | | | | | |
| Ptose | | | | | |
| Sedação | | | | | |
| Ataxia | | | | | |
| Reflexo do endireitamento | | | | | |
| Catatonía | | | | | |
| Analgesia | | | | | |
| Resposta ao toque diminuído | | | | | |
| Perda do reflexo corneal | | | | | |
| Perda do reflexo auricular | | | | | |
| c. Outros comportamentos | | | | | |
| Ambulação | | | | | |
| Bocejo excessivo | | | | | |
| Limpeza | | | | | |
| Escalar | | | | | |
| Vocalizar | | | | | |
| Sacudir a cabeça | | | | | |
| Contorções abdominais | | | | | |
| Abdução das patas do trem posterior | | | | | |
| Pedalar | | | | | |
| Estereotípiã | | | | | |
| 2 - SN AUTÔNOMO | | | | | |
| Diarreia | | | | | |
| Constipação | | | | | |
| Defecação aumentada | | | | | |
| Respiração forçada | | | | | |
| Lacrimajamento | | | | | |
| Micção | | | | | |
| Salivação | | | | | |
| Cianose | | | | | |
| Tono muscular | | | | | |
| Força para agarrar | | | | | |
| 3 – MORTE Observações complementares | | | | | |

Fonte: Almeida et al. (1999).