



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE  
SANTANA  
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA**



**BRUNO CERQUEIRA DA SILVA**

**PREDIÇÃO *IN SILICO* E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTINOCICEPTIVA DE CUMARINAS E SAPONINAS  
OBTIDAS DE PLANTAS DO SEMIÁRIDO EM MODELO DE  
ARTRITE INDUZIDA POR ZIMOSAN**

**BRUNO CERQUEIRA DA SILVA**

**PREDIÇÃO *IN SILICO* E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTINOCICEPTIVA DE CUMARINAS E SAPONINAS  
OBTIDAS DE PLANTAS DO SEMIÁRIDO EM MODELO DE  
ARTRITE INDUZIDA POR ZIMOSAN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Flávia Oliveira de Lima  
Coorientador: Prof. Dr. Manoelito Coelho dos Santos Júnior

Feira de Santana  
2019

## Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

S578p Silva, Bruno Cerqueira da  
Predição *In Silico* e avaliação da atividade antinociceptiva de  
cumarinas e saponinas obtidas de plantas do semiárido em modelo de  
artrite induzida por Zimosan / Bruno Cerqueira da Silva.-2019  
80 f.: il.  
Orientadora: Flávia Oliveira de Lima  
Coorientador: Manoelito Coelho dos Santos Júnior  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana,  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019.

1. Artrite reumatoide – Dor inflamatória 2. Potencial biotecnológico de  
plantas. 3. Zimosan. 4. Atividade biológica – Modelos *In Silico*. I. Lima,  
Flávia Oliveira de, orient. II. Santos Júnior, Manoelito Coelho, coorient.  
III. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU: 57.081

**BRUNO CERQUEIRA DA SILVA**

**PREDIÇÃO *IN SILICO* E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTINOCICEPTIVA DE CUMARINAS E SAPONINAS  
OBTIDAS DE PLANTAS DO SEMIÁRIDO EM MODELO DE  
ARTRITE INDUZIDA POR ZIMOSAN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Banca Examinadora em 26 de fevereiro de 2019.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Oliveira de Lima  
Orientadora/UEFS

Prof. Dr. Hugo Neves Brandão  
Membro Convidado/ UEFS

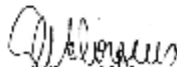
Prof. Dr. Gildomar Lima Valasques Júnior  
Membro Convidado/UESB

Feira de Santana  
2019

## **BANCA EXAMINADORA**



**Dr. Hugo Neves Brandão**  
(Universidade Estadual de Feira de Santana)



**Dr. Gildomar Lima Velasquez Junior**  
(Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia)



**Dr.ª Flávia Oliveira de Lima**  
(Universidade Estadual de Feira de Santana)  
Orientadora e Presidente da Banca

**Feira de Santana – BA**  
**2019**

Dedico a Deus, por sempre guiar meus passos. "Dirige os meus passos nos teus caminhos, para que as minhas pegadas não vacilem" (Salmos 17:5).

## AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grato à **Deus** por todas as coisas que Ele fez, faz e fará na minha vida e por permitir que eu alcance meus sonhos, e por permitir concluir mais essa etapa.

Agradeço em especial à algumas pessoas que contribuíram direto e/ou indiretamente na construção desta trajetória durante a pós-graduação.

Aos meus pais, **Laelson Amorim** e **Isailde Cerqueira**, muito obrigado pelo apoio que me deram, palavras de incentivo em momentos difíceis, sou eternamente grato por tudo que fizeram por mim.

Aos meus irmãos, **Michel**, **Elton** e **Rafael**. Obrigado pela parceria sempre.

À minha querida noiva, **Élida Rocha**, que me apoiou desde o início a nunca desistir e compartilhou comigo os bons e maus momentos durante toda esta jornada. Muito obrigado por ser tão presente em minha vida e a sempre confiar em mim.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> **Flávia Lima**, que aceitou orientar-me desde aluno de iniciação científica, no qual completo neste período seis anos de pesquisa no laboratório.

Aos colaboradores deste trabalho, Prof.<sup>o</sup> **Manoelito Coelho** e **Janay Stéfany**, por todo o suporte durante os ensaios *in silico*, e agradeço pela imensa paciência que tiveram em ensinar conceitos importantes para este trabalho. Muito obrigado!

Aos bons amigos que fiz nesta trajetória de pesquisa, **Cleisiane Lima**, **Daniela Borges** e **Laila**. Obrigado a todas vocês pelas contribuições.

Aos funcionários do Biotério da UEFS pela colaboração na pesquisa.

A unidade de fomento (CAPES) pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

“A morte do homem começa no instante em que ele desiste de aprender”  
(Albino Teixeira).



## RESUMO

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica, considerada uma das causas de invalidez temporária e/ou definitiva. Os fármacos disponíveis para o seu tratamento induzem inúmeros efeitos colaterais, associados a uma baixa eficácia e elevado custo ao paciente. Portanto, torna-se prioritário a busca por terapias mais eficientes, com menor custo e efeitos indesejados reduzidos. É nesse contexto que este trabalho avaliou a atividade antinociceptiva de quatro moléculas isoladas de espécies vegetais do semiárido nordestino em modelo experimental de AR induzida por zimosan. A artrite foi induzida em camundongos machos swiss (n=6) através da administração de zimosan 30µg/5µL (i.a) na articulação tíbio-tarsal direita. Os animais foram tratados com 1,2-benzopirona (30, 60 e 90mg/kg), 7-hidroxycumarina (30, 60 e 90mg/kg), acetato de hecogenina (3, 10 e 30mg/kg) e acetato de diosgenina (3, 10 e 30mg/kg) ou veículo 1 hora antes do estímulo. O pré-tratamento com 1,2-benzopirona, 7-hidroxycumarina, acetato de hecogenina e acetato de diosgenina provocou redução da hipernocicepção induzida por zimosan. A partir destes resultados, foram realizadas rotinas de acoplamento molecular com as enzimas ciclooxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) e a mieloperoxidase (MPO) para avaliação do padrão de interações intermoleculares. Os acoplamentos mostraram que os compostos indicam relevância de interações hidrofóbicas, pontes salinas, ligações de hidrogênio e empilhamento π, importantes para o reconhecimento molecular no sítio ativo das enzimas. Os resultados demonstram importante atividade farmacológica nos testes de artrite induzida por zimosan evidenciando pela técnica de acoplamento molecular uma afinidade desses compostos para a COX -1 e COX-2 e MPO.

Palavras-chave: Artrite. Zimosan. Antinocicepção. Acoplamento Molecular.

## ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease, considered a cause of temporary and / or definitive disability. The drugs available for its treatment induce numerous side effects, associated with a low efficacy and high cost to the patient. Therefore, the search for more efficient therapies, with lower cost and reduced unwanted effects, becomes a priority. It is in this context that this work evaluated the antinociceptive activity of four molecules isolated from plant species from the northeastern semi-arid region in an experimental model of RA induced by zymosan. Arthritis was induced in swiss male mice (n = 6) by administration of 30 µg/5 µl (i.a) zymosan at the right tibio-tarsal joint. The animals were treated with 1,2-benzopyrone (30, 60 and 90mg / kg), 7-hydroxycoumarin (30, 60 and 90mg / kg), hecogenin acetate (3, 10 and 30mg / kg) and diosgenin acetate 3, 10 and 30mg / kg) or vehicle 1 hour before the stimulus. Pretreatment with 1,2-benzopyrone, 7-hydroxycoumarin, hecogenin acetate and diosgenin acetate caused reduction of zymosan-induced hypernociception. From these results, molecular coupling routines with the enzymes cicloxygenase 1 and 2 (COX-1 and COX-2) and myeloperoxidase (MPO) were performed to evaluate the pattern of intermolecular interactions. The couplings showed that the compounds indicate relevance of hydrophobic interactions, salt bridges, hydrogen bonds and  $\pi$  stacking, important for the molecular recognition in the active site of the enzymes. The results demonstrate important pharmacological activity in the zymosan-induced arthritis tests evidencing by the molecular coupling technique an affinity of these compounds for COX-1 and COX-2 and MPO.

Keywords: Arthritis. Zymosan. Antinociception. Molecular coupling

## LISTAS DE FIGURAS

**Figura 1** – Avaliação nociceptiva articular induzida por zimosan

**Figura 2** – Avaliação da coordenação e atividade exploratória realizada através do teste do campo aberto

**Figura 3** – Avaliação do comprometimento motor realizado através do teste de rota-rod

**Figura 4** – Efeito da administração oral do BENZOP na hipernocicepção articular induzida por zimosan

**Figura 5** – Efeito da administração oral da HIDROXI na hipernocicepção articular induzida por zimosan

**Figura 6** – Efeito da administração oral do DIOACETAT na hipernocicepção articular induzida por zimosan

**Figura 7** – Efeito da administração oral do HECOACETAT na hipernocicepção articular induzida por zimosan

**Figura 8** – Efeito do pré-tratamento com a BENZOP nos testes de campo aberto e rota-rod

**Figura 9** – Efeito do pré-tratamento com a HIDROXI nos testes de campo aberto e rota-rod

**Figura 10** – Efeito do pré-tratamento com o DIOACETAT nos testes de campo aberto e rota-rod

**Figura 11** – Efeito do pré-tratamento com o HECOACETAT nos testes de campo aberto e rota rod

**Figura 12** – Representação da estrutura da COX-1 (PDB: 2AYL) (A) com destaque para o sítio ativo (B). Os aminoácidos do sítio estão representados em bastões e o ligante cristalográfico em bastão amarelo

**Figura 13** – Representação da estrutura da COX-2 (PDB: 4PH9) (A) com destaque para o sítio ativo (B). Os aminoácidos do sítio estão representados em bastões e o ligante cristalográfico em bastão amarelo

**Figura 14** – Representação da estrutura da mieloperoxidase (PDB: 4C1M) (A) com destaque para o sítio ativo (B). Os aminoácidos do sítio estão representados em bastões e o ligante cristalográfico em bastão amarelo

**Figura 15** – Representação bidimensional das estruturas moleculares. Estrutura **A**: acetato de diosgenina (DIOACETAT). Estrutura **B**: acetato de hecogenina

(HECOACETAT). Estrutura **C**: 7-hidroxicumarina (HIDROXI). Estrutura **D**: 1,2-benzopirona (BENZOP

**Figura 16** – Perfil de interação de 1,2-benzopirona com a COX-1 (A) e COX-2 (B). Enzima: azul, ligante: amarelo, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, interações  $\pi$ -paralelas: barras tracejadas verdes, pontes salinas: barra pontilhada amarela

**Figura 17** – Perfil de interação de acetato de diosgenina com a COX-1 (A) e COX-2 (B). Enzima: azul, ligante: amarelo, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas

**Figura 18** – Perfil de interação do acetato de hecogenina com a COX-1 (A) e COX-2 (B). Enzima: azul, ligante: amarelo, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas. Ligações de hidrogênio: barra azul

**Figura 19** – Perfil de interação da 7-hidroxicumarina com a COX-1 (A) e COX-2 (B). Enzima: azul, ligante: amarelo, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, interações  $\pi$ -paralelas: barras tracejadas verdes, pontes salinas: barra pontilhada amarela. Ligações de hidrogênio: barra azul

**Figura 20** – Perfil de interação da 1,2-benzopirona com a MPO. Enzima: azul, ligante: amarelo, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, pontes salinas: barra pontilhada amarela. Ligações de hidrogênio: barra azul

**Figura 21** – Perfil de interação do acetato de hecogenina com a MPO. Enzima: azul, ligante: amarelo, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas

**Figura 22** – Perfil de interação da 7-hidroxicumarina com a MPO. Enzima: azul, ligante: amarelo, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, pontes salinas: barra pontilhada amarela. Ligações de hidrogênio: barra azul

**Figura 23** – Perfil de interação do acetato de hecogenina com a MPO. Enzima: azul, ligante: amarelo, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas

## LISTAS DE TABELAS

**Tabela 1** – Valores de energia do acoplamento molecular da 1,2-benzopirona, 7-hidroxycumarina, acetato de hecogenina e acetato de diosgenina frente a COX1

**Tabela 2** – Valores de energia do acoplamento molecular da 1,2-benzopirona, 7-hidroxycumarina, acetato de hecogenina e acetato de diosgenina frente a COX2

**Tabela 3** – Valores de energia do acoplamento molecular da 1,2-benzopirona, 7-hidroxycumarina, acetato de hecogenina e acetato de diosgenina frente a MPO

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR – Artrite Reumatoide

AINEs – Anti-inflamatórios não esteroidais

TNF – Fator de necrose tumoral

DMCD – Drogas modificadoras do curso da doença

DMARD – Drogas antirreumáticos modificadores da doença

HLA – Antígenos Leucocitários Humanos

MMPs – Metaloproteinases

TNF- $\alpha$  – Fatores de Necrose Tumoral Alfa

IL – Interleucina

IFN $\gamma$  – Interferon gama

COX - Ciclooxigenase

COX-1 – Ciclooxigenase-1

COX-2 – Ciclooxigenase-2

RE – Retículo endoplasmático

SNC – Sistema nervoso central

OMS – Organização Mundial de Saúde

IASP – International Association for the Study of Pain

E.P.M – Erro padrão da média

PDB – Protein Data Bank

RMSD – Root Mean Square Deviation

BENZOP – Benzopirona

HIDROXI – 7-Hidroxycumarina

HECOACETAT – Acetato de hecogenina

DIOACETAT – Acetato de diosgenina

PAF – Fator Ativador de Plaquetas

NO – Óxido nítrico

PGE2 – Prostaglandina E2

IL-1 $\beta$  – Interleucina-1-beta

MPO-3 – Metaloproteinase 3

MPO-13 – Metaloproteinase 13

iNOS – Óxido nítrico sintase

MPO – Mieloperoxidase

s.c. – subcutânea

v.o – via oral

i.a – intrarticular

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	16
2.1 Aspectos Gerais da Artrite Reumatoide .....	16
2.2 Fisiopatologia da Artrite Reumatoide .....	17
2.3 Dor .....	21
2.4 Dor inflamatória .....	23
2.5 Potencial Biotecnológico de Plantas .....	24
2.6 Modelos <i>In Silico</i> de Atividade Biológica .....	27
3. OBJETIVOS .....	30
3.1 Objetivo Geral .....	30
3.2 Objetivos Específicos .....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
4.1 Obtenção das Moléculas .....	31
4.2 Animais Experimentais .....	32
4.3 Drogas e Diluentes .....	32
4.4 Ensaio farmacológicos .....	32
4.4.1 Administração das moléculas .....	32
4.4.2 Indução do modelo experimental de artrite induzida por Zimosan .....	33
4.4.3 Avaliação nociceptiva articular .....	33
4.4.4 Teste de campo aberto .....	35
4.4.5 Teste rota-rod .....	36
4.4.6 Análise Estatística .....	37
4.5 Ensaio <i>in silico</i> .....	37
4.5.1 Seleção e obtenção da estrutura cristalográfica das COX-1, COX-2 e MPO para acoplamento molecular .....	37
4.5.2 Acoplamento molecular .....	37
5. RESULTADOS .....	39
5.1 Modelo de artrite inflamatória induzida por zimosan .....	39
5.1.1 Efeito da administração via oral do BENZOP na hipernocicepção articular induzida por zimosan .....	39
5.1.2 Efeito da administração via oral do HIDROXI na hipernocicepção articular induzida por zimosan .....	40
5.1.3 Efeito da administração via oral do DIOACETAT na hipernocicepção articular induzida por zimosan .....	41
5.1.4 Efeito da administração via oral do HECOACETAT na hipernocicepção articular induzida por zimosan .....	42



5.1.5	Efeito do pré-tratamento nos testes de campo aberto e rota-rod.....	43
5.2	Ensaio <i>in silico</i> .....	48
5.2.1	Seleção e obtenção das estruturas cristalográficas para acoplamento molecular.....	48
5.2.2	Obtenção das estruturas moleculares .....	50
5.2.3	Acoplamento Molecular .....	51
6.	DISCUSSÃO .....	63
7.	CONCLUSÃO .....	68
	REFERÊNCIAS .....	69

## 1. INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune com caráter inflamatório, mas de etiologia desconhecida, caracterizada por poliartrite periférica e simétrica (SMOLEN; ALETAHA; MCINNES; 2016). A artrite reumatoide afeta aproximadamente 0,5%-1% da população e, embora não represente risco direto de morte, provoca uma diminuição na qualidade de vida do paciente e danos econômicos graves à sociedade, acometendo as mulheres três vezes mais do que os homens (MOTA et al., 2011). A inflamação crônica na AR provoca modificações na composição celular e no perfil de expressão gênica da sinóvia derivando em proliferação de fibroblastos sinoviais e consequentemente dano estrutural a cartilagem, ossos e ligamentos (MENEZES, 2016). Com a progressão da doença os portadores de AR tornam-se incapazes para a realização de suas atividades, tornando um problema econômico, social e de saúde pública, com impacto significativo para o paciente e para a sociedade (MENEZES, 2016).

Um sintoma bastante comum na artrite é a dor. Na maioria das vezes, a dor inflamatória está presente em patologias crônicas ou até mesmo transitórias (NOGUEIRA, 2010). A dor de origem inflamatória resulta basicamente da interação entre o tecido danificado e os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos por meio da participação de mediadores inflamatórios. Ou seja, o fenômeno da dor inflamatória está relacionado ao processo de sensibilização periférica, em que, após uma lesão tecidual há a liberação de mediadores inflamatórios, responsáveis pela ativação direta ou pela sensibilização dos nociceptores (CUNHA et al., 2005).

Dados relevantes referentes à gastos para tratamento da AR, revelam o impacto econômico desta doença. Estima-se que cerca de 3,8 a 4,75 bilhões de libras por ano foram gastos apenas no Reino Unido (NIHCE, 2009) e, no Brasil, somente em 2014, esses gastos chegaram a aproximadamente R\$ 237.658.256,61 (OLIVEIRA, 2015). É sabido que os fármacos mais utilizados no tratamento da AR induzem inúmeros efeitos adversos, tornando necessário a busca por terapias mais eficazes. Além disso, apresentam baixa eficácia e/ou elevado custo (FAZAL et al., 2018).

Cerca de 11% do território nacional é ocupado pelo semiárido (CASTRO; CAVALCANTE, 2010). A Caatinga (nome de origem tupi-guarani que significa “mata branca”) cobre a maior parte da área da região Nordeste e norte de Minas Gerais, ocupando uma área de 853.383,59 Km<sup>2</sup> (SIQUEIRA et al., 2012). Englobam-se os

estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais e a ilha de Fernando de Noronha. Este tipo de vegetação é caracterizado como singular, ou seja, não é encontrada em nenhum outro lugar do mundo, é exclusivamente brasileira. Apesar de estar, bastante modificado, o bioma contém uma grande variedade de tipos vegetais, que incluem um número significativo de espécies raras e endêmicas (CASTRO; CAVALCANTE, 2010). Estas espécies demonstram grandes potenciais biotecnológicos e, de fato, vêm apresentando diversas atividades biológicas de interesse para a indústria farmacêutica.

Historicamente, plantas medicinais sempre se caracterizaram como importantes aliadas para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (WHO, 1998 *apud* BRASIL, 2016).

As terapias medicamentosas para o tratamento da AR incluem uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), glicocorticoides, drogas modificadoras do curso da doença (DMCD) sintéticas, biológicas e drogas imunossupressoras. Porém, a utilização destes fármacos à longo prazo induz efeitos adversos severos, comprometendo a continuidade da terapia farmacológica (MOTA, 2012). Sendo assim, este trabalho propôs avaliar a atividade antinociceptiva moléculas isoladas do semiárido em modelo experimental de artrite induzida por zimosan, visando uma nova alternativa terapêutica para o tratamento da AR.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos Gerais da Artrite Reumatoide

A AR é uma doença autoimune com caráter inflamatório, de etiologia desconhecida, caracterizada por poliartrite periférica e simétrica. Além disso, ocasiona uma série de complicações clínicas e problemas associados como o cansaço, a perda excessiva de peso e a rigidez matinal, podendo também desenvolver-se em outros órgãos e causar danos maiores ao seu portador, ocasionando a diminuição da expectativa de vida (SMOLEN; ALETAHA; MCINNES; 2016).

Geralmente, a artrite é caracterizada por dor e rigidez em torno de uma ou mais articulações, originando-se de forma gradual ou de repente. De acordo com o *Center for Disease Control and Prevention* (2013), só nos Estados Unidos o número de adultos acometidos pela doença chega a 50 milhões (22%) e de acordo com as estimativas, provavelmente no ano de 2030 essa quantia possa chegar a 67 milhões (25%). A prevalência estimada de AR na população mundial é de 0,5 a 1,0%, e a incidência é maior na faixa etária dos 30 aos 50 anos (INICHIELLO et al., 2016). Além disso, sabe-se que a AR é mais prevalente em mulheres numa proporção estimada de 3:1 em relação aos homens, acomete diversos grupos populacionais e ocorre em todas as etnias. Geralmente os primeiros sintomas aparecem depois dos 40 anos, no entanto, nas mulheres esses sintomas podem aparecer mais precocemente (VAZ et al., 2013).

Em relação aos gastos com a doença, recentemente no Brasil foram registrados gastos elevados pelo Ministério da Saúde com pacientes portadores de AR. Estes gastos levaram em consideração o total de gastos com medicamentos, e representaram em 2010 R\$ 187.150.174,10, em 2011 R\$ 166.312.305,45, em 2012 R\$ 223.195.179,02, em 2013 R\$ 216.590.605,39 e em 2014 R\$ 237.658.256,61, demonstrando uma escala crescente e preocupante (OLIVEIRA, 2015).

O tratamento da AR é baseado principalmente em medicamentos, mas existe também a terapia não farmacológica, ambas com o objetivo principal prevenir e/ou controlar o processo de lesão articular, evitar a perda de função e diminuir a dor, com intuito final de melhorar a qualidade de vida dos pacientes (MOTA et al., 2012). Atualmente, as classes de medicamentos mais utilizadas são: analgésicos, anti-inflamatórios não esteroides (AINES), corticosteroides, drogas modificadoras do curso da doença (DMCD) e terapias com agentes biológicos, como bloqueadores de TNF

(Fator de necrose tumoral), depletors de linfócitos B e moduladores da co-estimulação (BRATS, 2012). Esses medicamentos geram inúmeros efeitos colaterais, além do elevado custo e refratariedade à (FAZAL et al., 2018).

Estes fatos ressaltam a importância na busca por novos fármacos mais eficazes para o tratamento da Artrite e reumatoide com a minimização de efeitos indesejados e custos.

## **2.2 Fisiopatologia da Artrite Reumatoide**

A articulação é uma estrutura recoberta pela cartilagem articular, ligamentos e pela membrana sinovial que delimita a cavidade preenchida pelo líquido sinovial. Essa membrana é constituída por sinoviócitos do tipo A, macrófagos sinoviais, e do tipo B, fibroblastos sinoviais, vasos sanguíneos e nervos sensoriais, enquanto a cartilagem articular é composta por uma matriz extracelular (colágeno, proteoglicanos e ácido hialurônico) e pelos condrócitos (FAZAL et al., 2018).

Pelo fato de a AR apresentar uma origem multifatorial, os mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessa doença ainda são muito estudados. São consideradas as participações de fatores hormonais, ambientes e principalmente imunológicos que atuam em conjunto sobre indivíduos geneticamente suscetíveis, com manifestações ocasionadas a partir de diversos mecanismos inflamatórios (BALSA et al., 2010).

Acredita-se que a AR tem influências de fatores genéticos e ambientais. Foi comprovado que diversos genes já foram relacionados com o desenvolvimento da AR, dando destaque ao sistema de histocompatibilidade humano (HLA: human leukocyte antigens) no loci DRB1. Estes genes codificam as moléculas de histocompatibilidade presentes na superfície das células apresentadoras de antígenos, a principal associação genética, e além disso, estão associados ao desenvolvimento de formas mais graves da doença (STAHL et al., 2010; USNAYO et al., 2011).

A fisiopatologia da AR ainda é bastante complexa, mas parece ser iniciada quando o sistema imunológico adaptativo, tanto celular como humoral, reconhece antígenos que resultam em uma série de mecanismos inflamatórios efetadores distintos, incluindo o recrutamento de leucócitos (SILVA-JUNIOR e ROCHA, 2006; PINTO et al., 2010). O espaço sinovial normalmente é acelular, no entanto em

pacientes com AR, o espaço fica infiltrado de células inflamatórias (macrófagos, linfócitos e neutrófilos) que liberam citocinas, sendo estas as principais responsáveis pela continuidade da resposta imune nessa condição (CRUVINEL, 2010). Uma articulação inflamada apresenta hiperplasia da sinóvia, aumento do fluido sinovial, grandes infiltrados celulares (neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, células T, células B e células dendríticas), levando a uma erosão e remodelamento do osso e da cartilagem da articulação (ALETAHA, SMOLEN, 2018).

Quando há um processo inflamatório, a expressão gênica para a produção de citocinas é aumentada, e conseqüentemente há um aumento das mais variadas citocinas como por exemplo IL-17, TNF e IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-12 gerando à iniciação e amplificação da resposta inflamatória. As citocinas são peptídeos regulatórios que são produzidos potencialmente por todas as células, e somente algumas delas são constitutivamente expressas, como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) em mastócitos (ALETAHA, SMOLEN, 2018), e esses mediadores têm uma atuação crucial na ativação das células sinoviais que resultam em inflamação e destruição óssea observada na artrite.

As citocinas provenientes de macrófagos e fibroblastos apresentam-se em grandes quantidades na membrana sinovial, onde se observa um predomínio da atividade das células Th1 e uma baixa atividade de células Th2. Portanto, na artrite ocorre um desequilíbrio na regulação da amplitude e duração da inflamação, as citocinas pró-inflamatórias predominam, onde TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 apresentam maior destaque. No entanto, mesmo com esse predomínio de citocinas pró-inflamatórias também se observa a presença de mediadores anti-inflamatórios como a IL-10, mas em níveis insuficientes para suprimir a inflamação (CHOY, 2012; TAYLOR, MEHTA e TULL, 2010; FURTADO et al., 2012).

Uma outra hipótese que poderia explicar a iniciação da AR seria uma presença de um agente infeccioso ou outro tipo de exposição ambiental. Isto resultaria na ativação de mecanismos locais de imunidade inata no microambiente articular, ativando células do revestimento sinovial e resultando uma subsequente resposta celular adaptativa em indivíduos suscetíveis geneticamente, ocasionando a sinovite. Projeções de tecido proliferativo penetram na cavidade articular, invadindo a cartilagem e o tecido ósseo, formando o *pannus*, característico da AR (VOGELPOEL et al., 2015).

Quando o *pannus* invade a cartilagem, provoca a erosão do colágeno tipo II por metaloproteinases (MPOs) da matriz, e por outras enzimas produzidas por células sinoviais e condrócitos quando estimulados por diversas citocinas, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL) 1 $\beta$ , IL-6, IL-17. Portanto, as metaloproteinases da membrana tipo 1 (MMP-1) são proteinases chave que medeiam a ação do *pannus* na cartilagem (MILLER et al., 2009). Alguns estudos demonstram também que os efeitos resultantes da ação sinérgica das várias citocinas presentes no ambiente articular inflamado incluem uma produção exacerbada de MPOs, como citadas anteriormente, peças – chave para a destruição articular característica da AR (SWEENEY e FIRESTEIN, 2004; KIKUCHI et al., 2015).

Em consequência à exposição inicial (como um agente infeccioso, por exemplo), há um influxo de macrófagos e o aumento na proliferação de sinoviócitos, ocasionando uma hiperplasia da membrana sinovial; o tecido é então infiltrado por células mononucleares, em especial linfócitos T auxiliares e linfócitos B, podendo haver a formação de estruturas semelhantes a nódulos linfáticos, com a participação de macrófagos e células dendríticas, em aproximadamente um quinto dos pacientes (SWEENEY e FIRESTEIN, 2004).

Ainda assim, ocorre a ativação de mecanismos pró-inflamatórios mediados por citocinas. As células T que se acumulam na membrana sinovial produzem IL-17 e interferon gama (IFN $\gamma$ ) de maneira exacerbada, enquanto os sinoviócitos A e B sintetizam citocinas como IL-1, TNF- $\alpha$  (envolvido na regulação de outras citocinas, recrutamento celular, angiogênese e destruição tecidual) e IL-8. A ativação de todos esses eventos possibilitam a progressão e perpetuação da inflamação sinovial, já que haverá estímulo à proliferação de sinoviócitos e produção contínua de outras citocinas e enzimas que levam a efeitos que vão desde o influxo de outros macrófagos até mesmo a destruição articular, conservando um mecanismo de retroalimentação positiva de sinoviócitos e macrófagos recrutados colaborando para a progressão da doença (SWEENEY e FIRESTEIN, 2004).

Outro estudo importante destaca mais uma vez o papel primordial de MPOs na AR. A MPO é uma hemeproteína abundante em neutrófilos e possui propriedades bactericidas e inflamatórias potentes. Com a descoberta de novas funções da MPO, novos papéis podem ser descobertos para esta antiga enzima, além de seu papel clássico na imunidade inata. Níveis aumentados de MPOs têm sido demonstrados em uma ampla variedade de doenças inflamatórias, levando à hipótese de que a oxidação

mediada por metaloproteinases da membrana (MMP) está envolvida na fisiopatologia dessas doenças. Wang e colaboradores (2014), identificaram níveis elevados de MPOs em pacientes com a AR. Lefkowitz e colaboradores (1995) sugeriram um modelo para explicar a interação entre neutrófilos e macrófagos, induzindo um estado de inflamação crônica. MMP, a proteína mais frequente em neutrófilos maduros, parece desempenhar um importante papel neste processo. De fato, achados de outro estudo publicado recentemente apoiaram o papel da MPO na mediação da inflamação e dano articular em um modelo experimental de artrite (ODOBASIC et al., 2014). Em seus estudos a MPO foi regulada positivamente nas articulações de camundongos com artrite e a deficiência de MPO atenuou a gravidade da doença sem afetar os níveis circulantes de citocinas. Além disso também constataram que a MPO intracelular e extracelular foi detectada na sinóvia de pacientes com AR ativa, e a MPO humana aumentou a proliferação e diminuiu a apoptose de fibroblastos sinoviais *in vitro*.

Outros estudos também apontam uma participação ativa das ciclooxigenase 1 e 2 nos processos inflamatórios articulares. A enzima ciclooxigenase (COX) é uma glicoproteína homodimérica integral de membrana, que contém heme, e encontrada, principalmente, no retículo endoplasmático (RE). A COX em complexo com o seu substrato ácido araquidônico leva a biossíntese de prostaglandinas e tromboxanos (GOLAN, 2009). A COX-1 foi classificada fisiologicamente como constitutiva, sendo expressa na maioria dos tecidos e nas plaquetas. Está envolvida na produção de prostaglandinas para a homeostase tecidual, como, por exemplo, citoproteção gástrica e manutenção da homeostase renal e plaquetária. Apesar disso, diversos estudos relatam a participação da COX-1 nos processos inflamatórios por meio da liberação de mediadores da inflamação (BATLOUNI, 2010; VONKEMAN e van de LAAR, 2010).

Já a COX-2, é induzida na maioria dos tecidos por estímulos inflamatórios e traumas tissulares, sendo responsável pela produção de mediadores prostanóides da inflamação. Porém, a COX-2 está presente em níveis detectáveis no sistema nervoso central, rim e coração (ANDREASSON, 2010). Além disso, as ciclooxigenases quando induzidas em processos inflamatórios promovem a inflamação e dano do tecido local por meio da síntese de prostaglandinas e citocinas inflamatórias. De fato a COX-2 expressa em fibroblastos sinoviais de pacientes com AR, contribui ainda mais para o aumento de citocinas inflamatórias na matriz da cartilagem (HUANG e HUANG, 2014).



Apesar de todos estes eventos acontecerem, antes disso, os neutrófilos (que são as células predominantes no fluído sinovial) fagocitam imunocomplexos e liberam proteases potencialmente citotóxicas, além de serem capazes de se comunicar com outros tipos celulares e regular as suas funções (BOSTAN et al., 2002; CROSS et al., 2005; CASCÃO et al., 2010). Ou seja, influxo de neutrófilos também é um importante achado histopatológico na AR.

Os neutrófilos são produzidos na medula óssea e circulam no sangue por poucas horas antes de serem seletivamente recrutados para determinados tecidos lesionados por infecções, traumas ou uma reação autoimune (ZARBOCK e LEY, 2008). De fato, a função primordial dos neutrófilos é reconhecer, fagocitar e destruir micro-organismos invasores e proteger o hospedeiro de infecções, o que pode incluir a habilidade de gerar espécies reativas de oxigênio e uma variedade de proteases, resultando assim em possíveis danos teciduais devido a esse enorme potencial citotóxico.

Essas células são atraídas para as articulações anormais por quimioatraentes como por exemplo LTB<sub>4</sub>, IL-8 e TGF- $\beta$  e, quando recrutados nas articulações e citadas anteriormente, estas células são expostas a uma variedade de citocinas locais pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-6 e IL-18 (FELDMANN et al., 1990, SIMMONDS e FOXWELL, 2008). Essa complexa rede de citocinas, incluindo-se quimiocinas, regula a migração para os sítios inflamatórios e conseqüentemente, sua ativação, função e processo apoptótico estão modificados nesta patologia (MONTECUCCO et al., 2008; CASCÃO et al., 2010).

### **2.3 Dor**

A dor pode ser definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real, potencial ou descrita em tais termos. Embora incômoda e desagradável, a dor exerce função biológica para conservar a integridade da vida do indivíduo, contribuindo para a preservação da espécie. Entretanto, a persistência da dor, constitui a principal causa de sofrimento, incapacitação para o trabalho e ocasiona graves conseqüências psicossociais e econômicas

Quando o estímulo da dor é desenvolvido, é possível identificar dois componentes neste fenômeno: um sensorial-discriminativo, que permite identificar o estímulo como doloroso e sua respectiva localização; e um componente afetivo-motivacional (BASBAUM; WOOLF 1999; CALVINO; GRILO 2006; PEDERSEN, SCHEEL-KRUGER et al., 2007). O componente sensorial refere-se ao mecanismo pelo qual o estímulo da dor é transportado ao sistema nervoso central (SNC), também denominado de nocicepção. Em contrapartida, o componente afetivo está associado à memória, aprendizagem e o sentido característico dado ao fenômeno sensitivo (VITOR et al, 2008).

O fenômeno doloroso geralmente inicia com a presença de um estímulo potencialmente nocivo na periferia, seja ele mecânico, químico ou térmico. Quando há a geração do estímulo nocivo, logo é detectado pelos nociceptores. Os nociceptores são estruturas não mielinizadas e ramificadas que sinalizam quando o tecido corporal está sofrendo injúria ou em risco de sofrer lesão e estão presentes nas terminações sensoriais dos tecidos periféricos (VITOR et al., 2008). Estão presentes na maioria dos tecidos corporais, são ausentes no encéfalo, embora sejam encontrados nas meninges (PIAUILINO, 2017) e se projetam da periferia para o corno dorsal da medula espinal, onde estabelecem conexões sinápticas com neurônios espinais (neurônios de segunda ordem) de distribuição altamente organizada (PIAUILINO, 2017).

Na medula espinal, essa informação nociva na forma de potenciais de ação eleva-se, sob múltiplos controles, para o tronco encefálico e o tálamo que, a seguir, transmitem a informação para o córtex, onde são processadas informações como intensidade e localização da dor e para o sistema límbico, onde os aspectos emocionais e afetivos são agregados na experiência da percepção da dor (PIAUILINO, 2017). Ou seja, quando um estímulo potencialmente nocivo ou destrutivo é capaz de ativar os nociceptores, estes transformam essa informação nociceptiva em potenciais de ação. Esses potenciais são conduzidos ao longo de neurônios sensoriais aferentes primários aos neurônios de segunda e terceira ordem do sistema nervoso central.

Nesse processo da transmissão nociceptiva, podem ser observadas três fases constituintes do mecanismo de dor: transdução, que é o acionamento dos nociceptores por alteração de um estímulo nocivo em um potencial de ação; transmissão, que é o conjunto de eventos que possibilitam que o impulso nervoso,

gerado no início do nociceptor, seja transportado para o sistema nervoso central; e modulação, que são os mecanismos e vias responsáveis pela supressão ou simplificação da dor e que podem ser ativados pelas próprias vias nociceptivas (CAMPOS-LIMA, 2013).

## **2.4 Dor inflamatória**

Na maioria das vezes, a dor inflamatória está presente em doenças crônicas ou até mesmo transitórias (NOGUEIRA, 2010). A dor de origem inflamatória resulta basicamente da interação entre o tecido danificado e os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos por meio da participação de mediadores inflamatórios. Ou seja, o fenômeno da dor inflamatória está relacionado ao processo de sensibilização periférica, em que, após uma lesão tecidual há a liberação de mediadores inflamatórios, responsáveis pela ativação direta ou pela sensibilização dos nociceptores (CUNHA et al., 2005).

Quando ocorre a instalação de um processo inflamatório, já se sabe que há uma liberação de diversos mediadores inflamatórios, como aminas vasoativas, óxido nítrico, citocinas, fatores de necrose tumoral, cininas e substância P, entre outros (ROCHA et al., 2007; MENESCAL-DE-OLIVEIRA, 2008). Com a ativação da via do ácido araquidônico e assim o início da síntese de prostaglandinas pelas ciclooxigenases, modificações estruturais nas fibras aferentes primárias são observadas mediante a ativação de diversos segundos mensageiros, enzimas ou proteínas, provocando a redução significativa do limiar de ativação da fibra, caracterizando assim a sensibilização das vias nociceptivas resultando em uma maior excitabilidade do neurônio que, por fim, leva a ocorrência de sensações dolorosas (BASBAUM, 1999; SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

Todo este fenômeno de sensibilização de vias nociceptivas, pode ainda ser caracterizado em duas categorias distintas denominadas alodinia e hiperalgesia (CAMPI, 2015). A hiperalgesia refere-se às condições de sensibilidade dolorosa aumentada, ou seja, provocando a percepção do indivíduo sobre uma dor exagerada ou desproporcional ao estímulo nociceptivo empregado. Já alodinia provoca uma dor originada de uma estimulação que antes não causava dor, portanto, uma resposta dolorosa a um estímulo que antes não era capaz de provocar a ativação dos nociceptores (CAMPI, 2015).

O fato é que a indução de uma dor inflamatória no indivíduo é provocada pela liberação dos mediadores inflamatórios (histamina, bradicininas, serotonina, citocinas, quimiocinas e eicosanoides) que por sinal, atende à uma hierarquia temporal de liberação e de ação. Por exemplo, se forem feitas análises do exsudato inflamatório em uma fase tardia de um processo inflamatório agudo é possível identificar uma série destes mediadores, tanto finais quanto intermediários. Todavia, caso seja realizada uma análise minuciosa desse mesmo exsudato, durante uma sequência de tempos em tempos definida no processo inflamatório, nota-se uma sequência acentuada desta liberação.

Por este motivo, pode-se bloquear uma cascata de fenômenos no processo inflamatório por meio da inativação ou bloqueio de determinados alvos partícipes de todo este conjunto de eventos, reduzindo assim o processo inflamatório e consequentemente a dor (CUNHA et al., 1992, FERREIRA et al., 1993; WATKINS et al., 1995; SACHS et al., 2002; LORENZETTI et al., 2002).

## **2.5 Potencial Biotecnológico de Plantas**

O Brasil ocupa quase metade da América do Sul e é o país com a maior diversidade de espécies no mundo, espalhadas nos seis biomas terrestres e nos três grandes ecossistemas marinhos. São mais de 103.870 espécies animais e 43.020 espécies vegetais conhecidas no país. Suas diferentes zonas climáticas favorecem a formação de zonas biogeográficas (biomas), tais como: Amazônia, Cerrado, Pantanal, Mata Atlântica, Caatinga, Campos Sulinos e o bioma Costeiro. Em sua biodiversidade, encontra-se inúmeras plantas com propriedades medicinais, que ao longo do tempo vem sendo utilizadas no uso da melhoria da saúde (BRASIL, 2019).

As plantas vêm sendo analisadas como potenciais fontes de moléculas com interesse biotecnológico. A possibilidade de aplicação desses compostos na saúde humana, assim como em outras áreas, tem proporcionado a intensos estudos ligados a extração, caracterização e respectiva atividade biológica (GERN et al., 2007).

A utilização dessas plantas medicinais na fabricação de fármacos, tem recebido incentivos da Organização Mundial de Saúde (OMS). Em meados dos anos de 1991, a OMS, reforçou a importante contribuição da medicinal tradicional na prestação de assistência social, em especial às pessoas de baixo acesso aos sistemas de saúde,

solicitando que os estados parceiros, intensificassem a cooperação entre praticantes da medicina tradicional e da assistência sanitária moderna, principalmente no tocante ao emprego de remédios tradicionais de eficácia científica demonstrada, a fim de reduzir os gastos com medicamentos (BRASIL, 2016, p.16).

Dessa forma, reiterou a importância do cultivo, e conservação das plantas medicinais nos cuidados com a saúde, além de reforçar o compromisso em estimular um maior desenvolvimento de políticas públicas com a finalidade de inseri-las no sistema oficial de saúde.

Desta forma, plantas medicinais se caracterizam como importantes aliadas para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (WHO, 1998 *apud* BRASIL, 2016 p.17).

Diversas substâncias isoladas de plantas continuam sendo fontes de medicamentos como, por exemplo, os glicosídeos cardiotônicos obtidos da *Digitalis*, usados para insuficiência cardíaca. Plantas que foram a origem da descoberta de medicamentos para o coração. Delas extrai-se glicosídeos cardiotônicos chamados cardenólídeos, sendo os mais utilizados a digitoxina e a digoxina. Outros exemplos são: *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae), vulgarmente conhecida por papoula, planta usada para a extração do ópio, cujo componente majoritário é a morfina, princípio ativo empregado para combater a dor. Após um século, fora isolado dessa mesma planta, a codeína e mais tarde a papaverina (FOGLIO et al., 2006).

Dentre as mais variadas espécies de plantas medicinais, a *Typha domingensis*, é também conhecida pelo nome de tabôa, uma hidrófita. É uma planta invasora frequente em margem de lagoas ou represas, canais de drenagem e baixadas pantanosas em geral. Se classifica como planta perene e herbácea, com cerca de 2,5 metros de altura, que, na época de reprodução, apresenta espigas da cor café contendo sementes. Seus rizomas são comestíveis, possuindo um teor de proteínas igual ao do milho e de carboidratos igual ao da batata. A folha fornece excelente fibra para a fabricação de papel e para outros fins (SILVA, 2014).

A 7-hidroxicumarina é o metabólito ativo da cumarina, e pode ser encontrada na *Typha domingensis*. Possui propriedades antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória e anticoagulante. Adicionalmente, estudos realizados sobre as propriedades antitumorais e antimetásticas da 7-hidroxicumarina mostram que esta apresenta maior

potência inibitória frente a células proliferativas tumorais do que a 1,2-benzopirona (ELINOS-BÁEZ et al., 2005 *apud* MARCOLAN et al., 2008).

A 1,2- benzopirona, também é uma cumarina encontrada na *Typha domingensis*, sendo, pois, composto orgânico heterocíclico, aromático e foi isolada pela primeira vez a partir de *Dipteryx odorata* (fava-tonka), espécie denominada anteriormente *Coumarouna odorata*, por isso o termo cumarina (FEUER, 1974 *apud* LUCETTI, 2010). As cumarinas de maneira geral são uma grande classe de metabólitos secundários largamente distribuídos na natureza. Podem ser metabolizados por hidroxilação em diferentes posições. Estes compostos vêm despertando grande interesse biotecnológico em função das diversas atividades biológicas que exibem (KAYSER; KOLODZIEJ; NATURFORSCH, 1999; KAWASE et al., 2001; HELGELAND, 1980), como propriedades anti-inflamatórias, antitrombóticas e vasodilatadoras (DOMINGO; LÓPEZ-BREA, 2003).

De fato, vários estudos recentemente apontam para os potenciais efeitos anti-inflamatórios destes compostos, como por exemplo a 7-hidroxicumarina (TIMONEN et al., 2011; VASCONCELOS, et al., 2007; BARROS, et al., 2010). Além disso, outros estudos confirmaram que a 7-hidroxicumarina apresenta baixa toxicidade, além de reduzir diversos mediadores inflamatórios presentes na fisiopatologia da AR (LIMA, et al., 2011).

A *Dioscorea cayenensis*, também conhecida vulgarmente por inhame de caiena ou inhame amarelo, é uma espécie de planta do gênero *Dioscorea* e da família Dioscoreaceae. A cultura do inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.) tem apresentado grande expansão no Nordeste brasileiro, dada a crescente demanda de produção nos mercados interno e externo. Essa dioscoreacea é ainda pouco estudada, principalmente sobre adubação, existindo na literatura poucos trabalhos (SANTOS et al., 2009).

O acetato de diosgenina é uma sapogenina esteroide, um dos principais constituintes bioativos de várias plantas, principalmente na *Dioscorea cayenensis*, e é encontrada em alimentos consumidos em todo o mundo. Além disso, é um dos principais precursores na produção industrial de vários esteroides sintéticos conhecidos. Este composto não é sintetizado metabolicamente nem convertido em outros esteroides no organismo humano e, portanto, tem sido considerado seguro (REBELO, 2011).

A hecogenina é também uma sapogenina esteroide adquirida de plantas do gênero *Agave* (comumente conhecidas como “sisal”), pertencentes à família Agavaceae, distribuídas vastamente em regiões tropicais e subtropicais do mundo. As espécies de *Agave* possuem importância comercial tanto como fonte de fibras industriais e medicinais, como são usadas na medicina popular chinesa no tratamento de escabiose, tumores, dor e distúrbios inflamatórios. Além disso, a hecogenina é um importante precursor para a síntese de hormônios esteroides. No mais a hecogenina tem uma vasta gama de atividades farmacológicas já relatadas. Em função da atividade antiproliferativa da hecogenina, os efeitos mais estudados dessa sapogenina são aqueles relacionados à pesquisa oncológica (GAMA et al., 2013).

## **2.6 Modelos *In Silico* de Atividade Biológica**

O planejamento de novas substâncias tem como principal objetivo a obtenção de compostos que possuam propriedades farmacoterapêuticas úteis, capazes de representarem novas entidades químicas, candidatas a protótipos de fármacos eficazes e seguros. (BARREIRO et al., 2002).

Nas últimas décadas, é notável uma grande procura por substâncias farmacologicamente ativas e, mesmo que, várias estruturas quimicamente bioativas tenham sido identificadas o crescente desenvolvimento tecnológico contemporâneo possibilita opções que apresentam melhores resultados na obtenção de novos princípios biologicamente ativos, sendo a Química Medicinal a responsável pelo desenvolvimento desses estudos.

A química farmacêutica medicinal possui métodos eficientes para otimizar perfil farmacológico de substâncias, levando ao planejamento e síntese destas, cada vez mais ativas, com biodisponibilidade satisfatória, e metabolismo adequado ao seu emprego terapêutico. Estes métodos podem constituir de aproximação intuitiva, tais como síntese de análogos, isômeros e isósteros ou outros processos de modificação molecular, como a simplificação molecular, a latenciação, modificação de sistemas anelares, entre outros (KOROLKOVAS, 1998; WERMUTH, 2003d).

Diversos medicamentos disponíveis hoje ao alcance de todos, foram desenvolvidos através de estratégias da química medicinal. Nos últimos trinta

anos, os avanços ligados às técnicas utilizadas nessa área da ciência têm exposto histórias de sucesso.

Um bom exemplo é a cimetidina (BARREIRO; FRAGA, 2015), que foi o primeiro antagonista seletivo de receptores da histamina, subtipo 2. Este composto compete com a histamina pelo sítio ativo dos receptores das células gástricas, responsáveis pela produção de ácido clorídrico. A cimetidina foi também o protótipo de vários outros medicamentos utilizados para o tratamento de úlcera gástrica e duodenal, tais como ranitidina, famotidina, nizatidina e roxatidina. Os antirretrovirais do vírus da imunodeficiência humana (HIV), disponíveis no mercado, também foram desenhados através de técnicas racionais. O zidovudina (AZT), foi identificado a partir de algas marinhas (BARREIRO; FRAGA, 2015). É largamente utilizado para o tratamento da imunodeficiência adquirida, geralmente combinado com outros medicamentos, e atua no nível da enzima transcriptase reversa do vírus.

Portanto, a modelagem molecular tem fundamental importância para a análise dos aspectos que regem as interações de fármacos com seus alvos. A regulação dos processos biológicos se dá principalmente através da combinação de fatores: estruturais, incluindo estrutura geométrica e estrutura eletrônica, energéticos, dinâmicos e cinéticos. Em se tratando da parte estrutural, os aspectos tridimensionais, que antes não eram considerados, agora trazem indícios do comportamento da substância no ambiente biológico. Trouxeram, principalmente, ampliação da visão sobre a conformação bioativa do ligante no momento da interação com a proteína alvo.

Normalmente são utilizadas duas estratégias para a identificação ligantes a partir de métodos de triagem virtual. A primeira estratégia é baseada na estrutura tridimensional do alvo biológico, ou seja, através de um processo de reconhecimento molecular por complementaridade. A outra estratégia é fundamentada na estrutura dos ligantes, através de um processo de similaridade estrutural dos compostos biologicamente ativos (SEIFERT; WOLF; VITT, 2003).

As técnicas baseadas na estrutura do receptor tornaram-se amplamente utilizadas com a chegada de amplas quantidades de informação de alvos biológicos provenientes de técnicas cristalográficas, que terão um papel principal no processo de desenvolvimento de fármacos (PEI; WANG; LIU, 2006). Portanto, a utilização de métodos de ensaios virtuais robustos, utilizando-se alvos



moleculares bem definidos é muito importante para a identificação de novas moléculas bioativas (ALVAREZ; SCHOICHET, 2005).

A técnica de acoplamento molecular consiste em aplicar conhecimentos com a funcionalidade de se obter a melhor orientação e conformação de uma molécula ligante no seu sítio receptor (RODRIGUES et al., 2012). O objetivo é encontrar o melhor ajuste para o encaixe entre duas moléculas (complexo receptor-ligante). De acordo com Montanari (2011), por este caminho pode-se obter informações espaciais para cada acoplamento realizado, possibilitando eleger a melhor molécula que representa as interações necessárias com o alvo, para um bom resultado desejado. Portanto, a modelagem molecular se resume em identificar possíveis moléculas bioativas, com aperfeiçoamento de perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos, e maximizar as probabilidades de se ligar a seu alvo biológico.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antinociceptiva de moléculas obtidas do semiárido em modelo de artrite induzida por zimosan e investigar possíveis mecanismos envolvidos na atividade antinociceptiva em modelo de acoplamento molecular frente a COX -1, COX -2 e MPO.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito antinociceptivo da 7-hidroxicumarina, acetato de diosgenina, acetato de hecogenina e 1,2-benzopirona no modelo de artrite induzida por zimosan;
- Avaliar a possível interferência da 7-hidroxicumarina, acetato de diosgenina, acetato de hecogenina e 1,2-benzopirona na atividade motora dos animais;
- Realizar estudos de acoplamento molecular frente à COX-1, COX-2 e MPO;
- Definir as interações possíveis que ocorrem entre as moléculas e a COX-1, COX-2 e MPO;
- Determinar o perfil de afinidade e complementariedade entre as moléculas e COX-1, COX-2 e MPO;
- Avaliação das interações intermoleculares da 7-hidroxicumarina, acetato de diosgenina, acetato de hecogenina e 1,2-benzopirona com sítio ativo das enzimas COX-1, COX-2 e MPO por acoplamento molecular.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção das Moléculas

Foram disponibilizadas para teste as moléculas: 7-hidroxicumarina (HIDROXI), acetato de diosgenina (DIOACETAT), acetato de hecogenina (HECOACETAT) e 1,2-benzopirona (BENZOP). Todas as moléculas foram isoladas de plantas do semiárido por grupos de pesquisas que mantêm cooperações com o Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI/CPqGM/FIOCRUZ-BA). Acetato de hecogenina (HECOACETAT, ~90% de pureza) e acetato de diosgenina (DIOACETAT, ~90% de pureza) foram adquiridos da Sigma.

Para obtenção da 1,2-benzopirona e 7-hidroxicumarina o material vegetal das partes aéreas de *T. domingensis* Pers. foi coletado para os primeiros extratos em março de 2002 em Bravo, Estado da Bahia, em lago raso provisório no Bioma Seco “Caatinga” e depois em dezembro de 2005, próximo à cidade de Santa Rita, Paraíba, Brasil. A planta foi identificada por Ana Maria Giulietti e Maria de Fátima Agra e os espécimes de vale (Giulietti et al. 2035 e Agra et Góis 5520) foram depositados na Herbaria HUEFS e JPB.

As partes aéreas (2000g) de *T. domingensis* foram extraídos com etanol a 95% à temperatura ambiente. O isolamento de 7-hidroxicumarina de *T. domingensis* foi realizado na Universidade Federal da Paraíba, Brasil. O extrato (150g) foi evaporado sob vácuo para dar um resíduo castanho, que foi suspenso em metanol-H<sub>2</sub>O (3:7 v/v) e fracionado com clorofórmio e acetato de etila. A fase de clorofórmio (25g) foi submetida a cromatografia em coluna em sílica gel, eluindo com misturas de hexano, clorofórmio e metanol em ordem crescente de polaridade, produzindo três cumarinas e um derivado de ácido cinâmico. A fase de acetato de etila (25 g) foi submetida a cromatografia em coluna sobre Sephadex LH-20 utilizando metanol, produzindo dois flavonóides. Os compostos isolados foram identificados como 1,2-benzopirona (0,0044%), escopoletina (0,0014%), 7-hidroxicumarina (0,007%), ácido *p*-cumárico (0,0016%), quercetina (0,0028%), e isorannetina-3-O-glicosídeo (0,0039%), com base em dados espectroscópicos de RMN e comparação com valores relatados na literatura. 7-Hidroxicumarina: sólido branco, amorfo; HRESIMS *m/z* 163,0406 [M<sup>+</sup>], calculado para C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub>, 163,0390. Este composto exibiu dados de RMN condizentes com os valores da literatura. O percentual de pureza da 7-hidroxicumarina e 1,2-

benzopirona utilizadas nos experimentos biológicos, conforme determinada por HPLC, foi de 98%.

#### **4.2 Animais Experimentais**

Os experimentos foram realizados com camundongos machos adultos da linhagem Swiss Webster (25-30g) provenientes do biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana. Todos os testes comportamentais foram realizados entre às 07:00 e às 18:00 horas do dia. Os animais foram alocados em caixas apropriadas e mantidos nas dependências do biotério, sob temperatura de 22-25°C e ciclos claro-escuro de 12 horas, com livre acesso a ração e água. Todos os experimentos foram constituídos de acordo com protocolo e diretrizes da *International Association for the Study of Pain* (IASP) para uso de animais de laboratório (ZIMMERMANN, 1983). Os experimentos foram conduzidos após aprovação da comissão de ética para animais de experimentação da Universidade Estadual de Feira de Santana N° 011/2013.

#### **4.3 Drogas e Diluentes**

As drogas foram adquiridas da Sigma (Zimosan, Dimetilsulfóxido e Tween 80), Teuto (Dexametasona), Cristália (Isoflurano e Midazolam). As moléculas DIOACETAT, HECOACETAT e BENZOP foram diluídas em solução fisiológica + Tween 2%. Para a molécula HIDROXI foi utilizado dimetilsulfóxido 5% + solução fisiológica. Dexametasona, midazolam e zimosan foram diluídos em solução fisiológica.

#### **4.4 Ensaios farmacológicos**

##### **4.4.1 Administração das moléculas**

Os animais foram tratados, por via oral, com BENZOP (30, 60 e 90mg/kg); HIDROXI (30, 60 e 90mg/kg); DIOACETAT (3, 10 e 30mg/kg); HECOACETAT (3, 10 e 30mg/kg) ou veículo, 1 hora antes da indução da inflamação articular com zimosan.

A dexametasona (2mg/kg) foi utilizada como fármaco de referência, sendo administrada por via subcutânea (s.c.) 40 minutos antes da injeção do zimosan.

#### **4.4.2 Indução do modelo experimental de artrite induzida por Zimosan**

Todos os camundongos foram anestesiados com isoflurano 2%, em seguida o modelo de artrite foi induzido com a administração de zimosan (30µg/5µL) na articulação tíbio-tarsal direita de camundongos. O grupo controle recebeu 5µL de solução fisiológica na articulação tíbio-tarsal direita de camundongos.

#### **4.4.3 Avaliação nociceptiva articular**

A avaliação da hipernocicepção da porção tíbio-tarsal induzida por zimosan foi realizada como descrito por Guerrero et al. (2006). Os experimentos foram conduzidos com um anestesímetro eletrônico, que capta a pressão através de um transdutor conectado a um contador digital de força expresso em gramas (g). A captação da pressão foi feita pelo contato do transdutor de pressão à pata, que é realizado através de uma ponteira descartável de polipropileno de 4,15mm<sup>2</sup> de área conectada ao transdutor.

Os camundongos foram mantidos individualmente em boxes de acrílico, com assoalho em rede de malha de arame não maleável. Os animais foram depositados nos boxes 15 minutos antes do início do experimento, para se adaptarem ao ambiente. A avaliação da nocicepção articular consiste na aplicação, por entre as malhas da rede, de uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo, até que o animal seja estimulado a realizar flexão dorsal da articulação tíbio-tarsal, para tal foi utilizada ponteira com área de 4,15mm<sup>2</sup> que permite avaliar a hipernocicepção articular, pois tal ponteira não é *per se* nociceptiva.

A sequência dos procedimentos experimentais consistiu na quantificação da hipernocicepção mecânica articular em tempos de 0h, 1h, 3h, 5h, 7h e 24h após a indução da artrite. A intensidade da hipernocicepção mecânica articular foi quantificada através de valores absolutos de limiar mecânico (em gramas). A dexametasona (2mg/kg) foi utilizada como fármaco de referência, sendo administrada por via subcutânea (s.c.) 40 minutos antes da injeção do zimosan.

**Figura 1** - Avaliação nociceptiva articular induzida por zimosan



**Fonte:** o próprio autor

#### 4.4.4 Teste de campo aberto

O teste do campo aberto avalia respostas comportamentais como atividade locomotora, hiperatividade e comportamento exploratório. O aparato consiste em uma caixa de acrílico opaco (50cm x 60cm x 45cm), com piso demarcado em 12 quadrados iguais. No momento do teste, os animais foram alocados em um dos cantos do aparato e foi registrado o número de vezes em que os animais cruzam os quadrados com as quatro patas durante o período de três minutos. Os animais foram tratados com a 1,2-benzopirona (90mg/kg), 7-hidroxicumarina (90mg/kg), acetato de hecogenina (30mg/kg), acetato de diosgenina (30mg/kg) ou veículo via oral 1h antes de serem alocados no aparato para registro. Os resultados foram expressos em média de quantidade de quadrados percorridos. O fármaco de referência utilizado foi o midazolam via intraperitoneal (10mg/kg) com pré-tratamento de 30 minutos (MACHADO et al., 2007).

**Figura 2** - Avaliação da coordenação e atividade exploratória realizada através do teste do campo aberto.

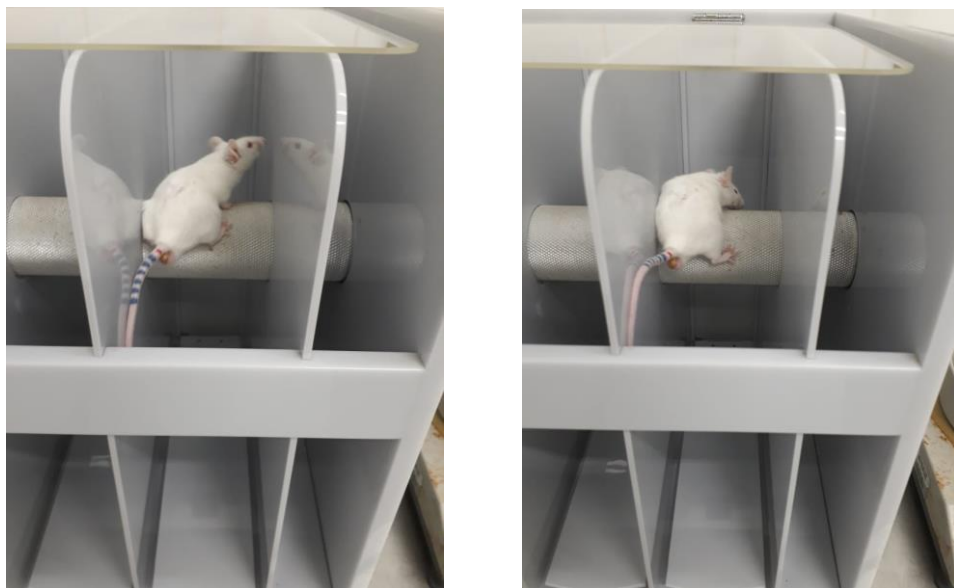


**Fonte:** o próprio autor

#### 4.4.5 Teste rota-rod

Para investigar se o tratamento influenciou a atividade motora dos animais e, conseqüentemente, prejudicou a avaliação do comportamento nociceptivo em modelos experimentais, a performance motora dos animais foi avaliada no aparelho de rota-rod, de acordo com Dunham e Miya (1957) com algumas modificações. Os animais foram submetidos a uma análise de pré-seleção um dia antes do experimento, a fim de selecionar apenas os animais que permaneceram em cima da barra de equilíbrio durante dois minutos em três tentativas. A velocidade constante escolhida foi 16 rotações por minuto (rpm). Animais selecionados foram, em seguida, tratados com a 1,2-benzopirona (90mg/kg), 7-hidroxicumarina (90mg/kg), acetato de hecogenina (30mg/kg), acetato de diosgenina (30mg/kg) ou veículo via oral 1h antes de serem alocados no aparelho. Para se manter no cilindro, o animal precisa se locomover e a capacidade de coordenação é quantificada pela duração do tempo registrado no aparelho. Os resultados foram expressos como o tempo médio, em segundos, que o animal permanece no rota-rod. O fármaco de referência utilizado foi o midazolam via intraperitoneal (10mg/kg) com pré-tratamento de 30 minutos.

**Figura 3** - Avaliação do comprometimento motor realizado através do teste de rota-rod.



**Fonte:** o próprio autor



#### 4.4.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando o GraphPadPrism (GraphPad Inc., San Diego, CA) e apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) de medidas feitas com 6 animais por grupo. A comparação entre grupos distintos de tratamento foi feita utilizando o ANOVA de uma via (one-way), seguido do teste de Bonferroni. Em estudos de medidas repetidas ao longo do tempo, foi utilizado o ANOVA de duas vias (two-way), seguido do teste de Bonferroni. Em todos os testes, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de  $p \leq 0,05$ .

### 4.5 Ensaios *in silico*

#### 4.5.1 Seleção e obtenção da estrutura cristalográfica das COX-1, COX-2 e MPO para acoplamento molecular

A estrutura 3D da COX-1 (PDB: 2AYL), COX-2 (4PH9) e MPO (PDB:4C1M) foram obtidas do *Protein Data Bank* (BERMAN, 2000). Essas estruturas foram preparadas para o acoplamento molecular através da remoção das moléculas de água e demais artefatos de cristalização, adição dos átomos de hidrogênio e adição de cargas Gasteiger-Huckel com auxílio do programa Chimera 1.10.1 (PETTERSEN et al., 2004).

#### 4.5.2 Acoplamento molecular

O acoplamento molecular foi realizado através do programa DOCK 6.8 e acessórios (LANG et al., 2015) utilizando a função de pontuação *Grid Score*. Inicialmente, com o objetivo de avaliar a eficiência do acoplamento realizado pelo DOCK, foi feita uma avaliação baseada no RMSD (do inglês, *Root-Mean-Square Deviation*), calculado através do ligante cristalográfico e a melhor pose do ligante acoplado.

A imagem negativa da superfície molecular do sítio foi definida através da superfície molecular de acesso ao solvente do receptor gerada pelo programa acessório DMS (FERRIN et al., 1988). Os programas SPHGEN e

SPHERE\_SELECTOR (KUNTZ et al., 1982) foram aplicados para construção de um conjunto de esferas com valores de raio entre 1,4 e 4,0Å e seleção das esferas com raio de 8,0Å ao redor do sítio, respectivamente.

As propriedades moleculares (potencial de atração e repulsão, efeitos de solvatação e contatos estéricos) para a região de acoplamento molecular foram calculadas pelo programa GRID mantendo configuração padrão (*Grid spacing* = 0,4; *attractive exponent* = 6; *repulsive exponent* = 12 e *bump\_overlap* = 0,75) (MENG; SHOICHET; KUNTZ, 1992; SHOICHET; KUNTZ; BODIAN, 1992).

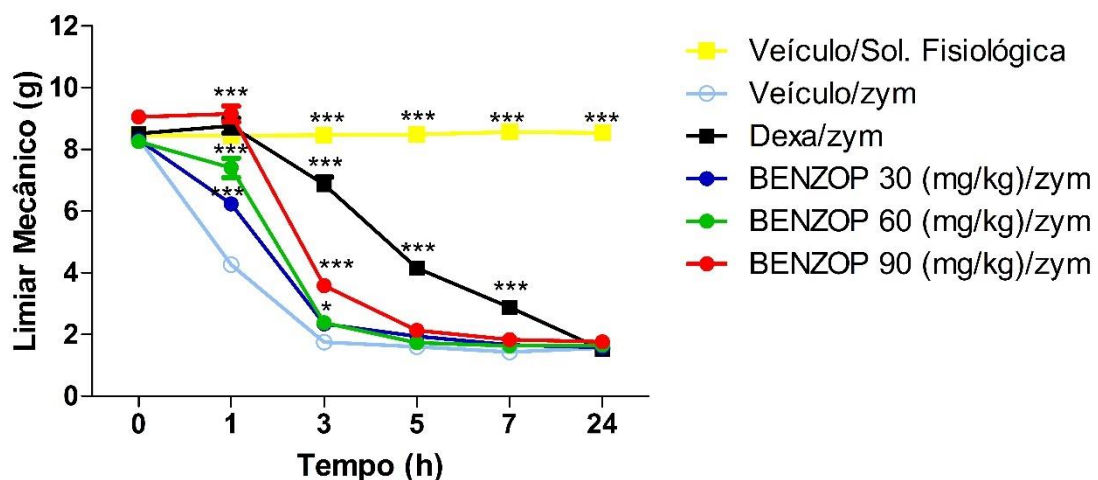
A análise de interações intermoleculares para a molécula selecionada foi realizada com o auxílio do servidor PLIP (<https://projects.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>; SALENTIN et al., 2015) e PyMOL v 1.3 (SCHRÖDINGER, 2009).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Modelo de artrite inflamatória induzida por zimosan

#### 5.1.1 Efeito da administração via oral do BENZOP na hipernocicepção articular induzida por zimosan

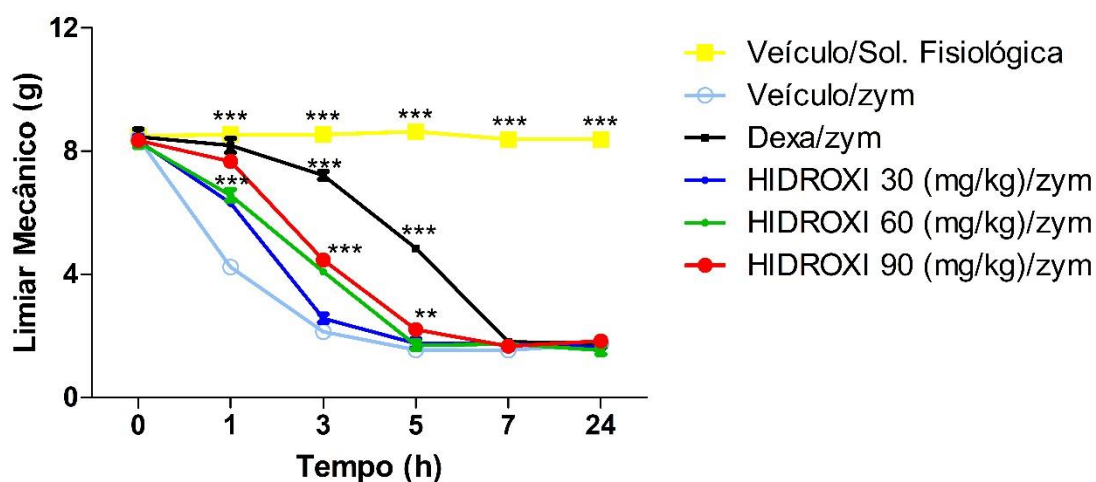
A atividade antinociceptiva da BENZOP foi avaliada no modelo de artrite induzida por zimosan. A injeção intra-articular com zimosan promoveu uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) do limiar mecânico comparado com o grupo solução fisiológica. O tratamento por via oral com BENZOP (30, 60 e 90mg/kg) reduziu de forma dose-dependente a hipernocicepção articular induzida por zimosan na primeira ( $P < 0,001$ ) e terceira hora ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,001$ ) quando comparado com o grupo veículo (solução fisiológica/zimosan). A dexametasona (2mg/kg, s.c.), fármaco de referência, também produziu um aumento do limiar mecânico permanecendo o efeito até a sétima hora quando comparado ao grupo controle negativo ( $P < 0,001$ ).



**Figura 4** - Efeito da administração oral do BENZOP na hipernocicepção articular induzida por zimosan. Os camundongos foram pré-tratados por via oral com BENZOP (30, 60 e 90mg/kg), ou veículo (solução fisiológica + tween 2%), 1 hora antes da injeção tíbio-tarsal com zimosan (30 $\mu$ g/5 $\mu$ L). O comportamento nociceptivo articular foi avaliado antes e até 24hs após a injeção intra-articular. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 6 camundongos por grupo. \* significativamente diferente quando comparado ao grupo veículo/zimosan ( $P < 0,05$ ); \*\*\* significativamente diferente em relação ao grupo veículo/zimosan ( $P < 0,001$ ). Determinado por ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni.

### 5.1.2 Efeito da administração via oral do HIDROXI na hipernocicepção articular induzida por zimosan

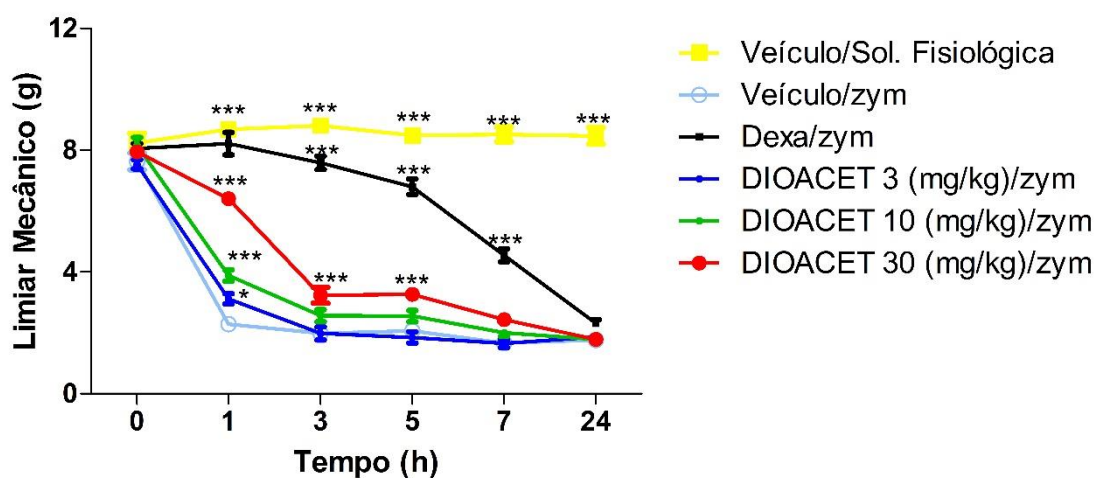
A atividade antinociceptiva da HIDROXI foi avaliada no modelo de artrite induzida por zimosan. A injeção intra-articular da solução de zimosan promoveu uma redução significativa ( $P < 0.001$ ) do limiar mecânico comparado com o grupo solução fisiológica. O tratamento por via oral com HIDROXI (30, 60 e 90mg/kg) reduziu de forma dose-dependente a hipernocicepção articular induzida por zimosan na primeira ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,001$ ), terceira ( $P < 0.001$ ) e quinta hora ( $P < 0,01$ ) quando comparado com o grupo veículo (solução fisiológica/zimosan). A dexametasona (2mg/kg, s.c.), fármaco de referência, também produziu um aumento do limiar mecânico permanecendo o efeito até a quinta hora quando comparado ao grupo controle negativo ( $P < 0,001$ ).



**Figura 5** - Efeito da administração oral da HIDROXI na hipernocicepção articular induzida por zimosan. Os camundongos foram pré-tratados por via oral com HIDROXI (30, 60 e 90mg/kg), ou veículo (solução fisiológica + DMSO 5%), 1 hora antes da injeção túbio-tarsal com zimosan (30µg/5µL). O comportamento nociceptivo articular foi avaliado antes e até 24hs após a injeção intra-articular. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 6 camundongos por grupo. \*\* significativamente diferente quando comparado ao grupo veículo/zimosan ( $P < 0,01$ ); \*\*\* significativamente diferente em relação ao grupo veículo/zimosan ( $P < 0,001$ ). Determinado por ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni.

### 5.1.3 Efeito da administração via oral do DIOACETAT na hipernocicepção articular induzida por zimosan

A atividade antinociceptiva do DIOACETAT foi avaliada no modelo de artrite induzida por zimosan. A injeção intra-articular da solução de zimosan promoveu uma redução significativa ( $P < 0.001$ ) do limiar mecânico comparado com o grupo solução fisiológica. O tratamento por via oral com DIOACETAT (3, 10 e 30mg/kg) reduziu de forma dose-dependente a hipernocicepção articular induzida por zimosan na primeira ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,001$ ), terceira hora ( $P < 0.001$ ) e quinta hora ( $P < 0,001$ ) quando comparado com o grupo veículo (solução fisiológica/zimosan). A dexametasona (2mg/kg, s.c.), fármaco de referência, também produziu um aumento do limiar mecânico permanecendo o efeito até a sétima hora quando comparado ao grupo controle negativo ( $P < 0,001$ ).

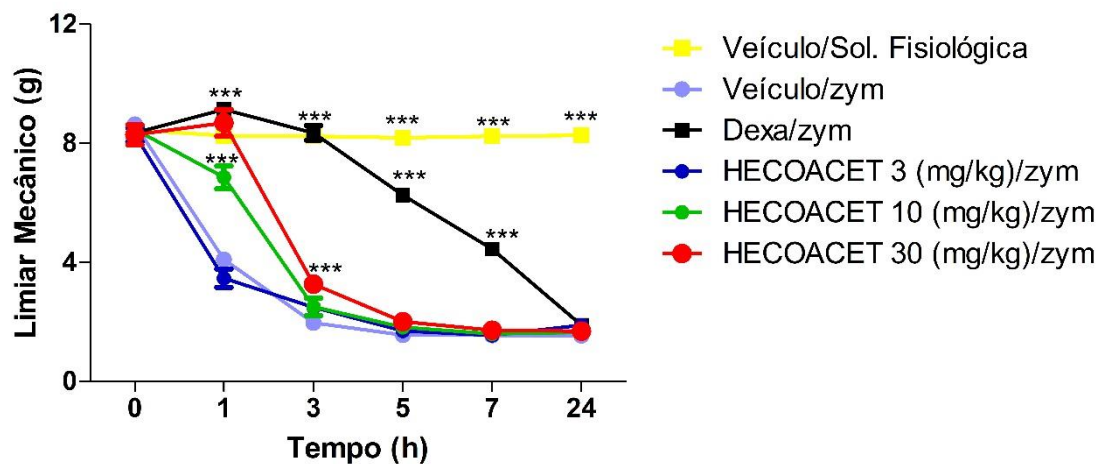


\

**Figura 6-** Efeito da administração oral do DIOACETAT na hipernocicepção articular induzida por zimosan. Os camundongos foram pré-tratados por via oral com DIOACETAT (3, 10 e 30mg/kg), ou veículo (solução fisiológica + DMSO 5%), 1 hora antes da injeção tíbio-tarsal com zimosan (30 $\mu$ g/5 $\mu$ L). O comportamento nociceptivo articular foi avaliado antes e até 24hs após a injeção intra-articular. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 6 camundongos por grupo. \* significativamente diferente quando comparado ao grupo veículo/zimosan ( $P < 0,05$ ); \*\*\* significativamente diferente em relação ao grupo veículo/zimosan ( $P < 0,001$ ). Determinado por ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni.

### 5.1.4 Efeito da administração via oral do HECOACETAT na hipernocicepção articular induzida por zimosan

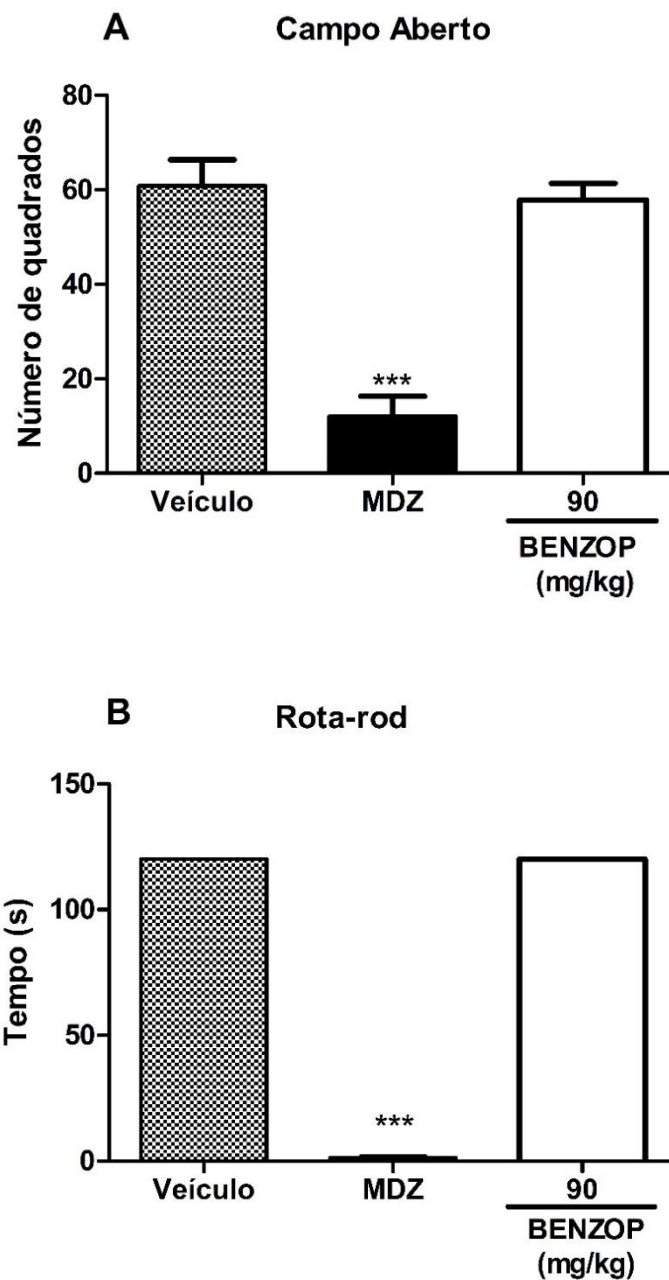
A atividade antinociceptiva da HECOACETAT foi avaliada no modelo de artrite induzida por zimosan. A injeção intra-articular da solução de zimosan promoveu uma redução significativa ( $P < 0.001$ ) do limiar mecânico comparado com o grupo solução fisiológica. O tratamento por via oral com HECOACETAT (3, 10 e 30mg/kg) reduziu de forma dose-dependente a hipernocicepção articular induzida por zimosan na primeira ( $P < 0,001$ ) e terceira hora ( $P < 0,001$ ) quando comparado com o grupo veículo (solução fisiológica/zimosan). A dexametasona (2mg/kg, s.c.), fármaco de referência, também produziu um aumento do limiar mecânico permanecendo o efeito até a sétima hora quando comparado ao grupo controle negativo ( $P < 0,001$ ).



**Figura 7.** Efeito da administração oral do HECOACETAT na hipernocicepção articular induzida por zimosan. Os camundongos foram pré-tratados por via oral com HECOACETAT (3, 10 e 30mg/kg), ou veículo (solução fisiológica + DMSO 5%), 1 hora antes da injeção tíbio-tarsal com zimosan (30 $\mu$ g/5 $\mu$ L). O comportamento nociceptivo articular foi avaliado antes e até 24hs após a injeção intra-articular. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM de 6 camundongos por grupo. \*\*\* significativamente diferente em relação ao grupo veículo/zimosan ( $P < 0,001$ ). Determinado por ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni.

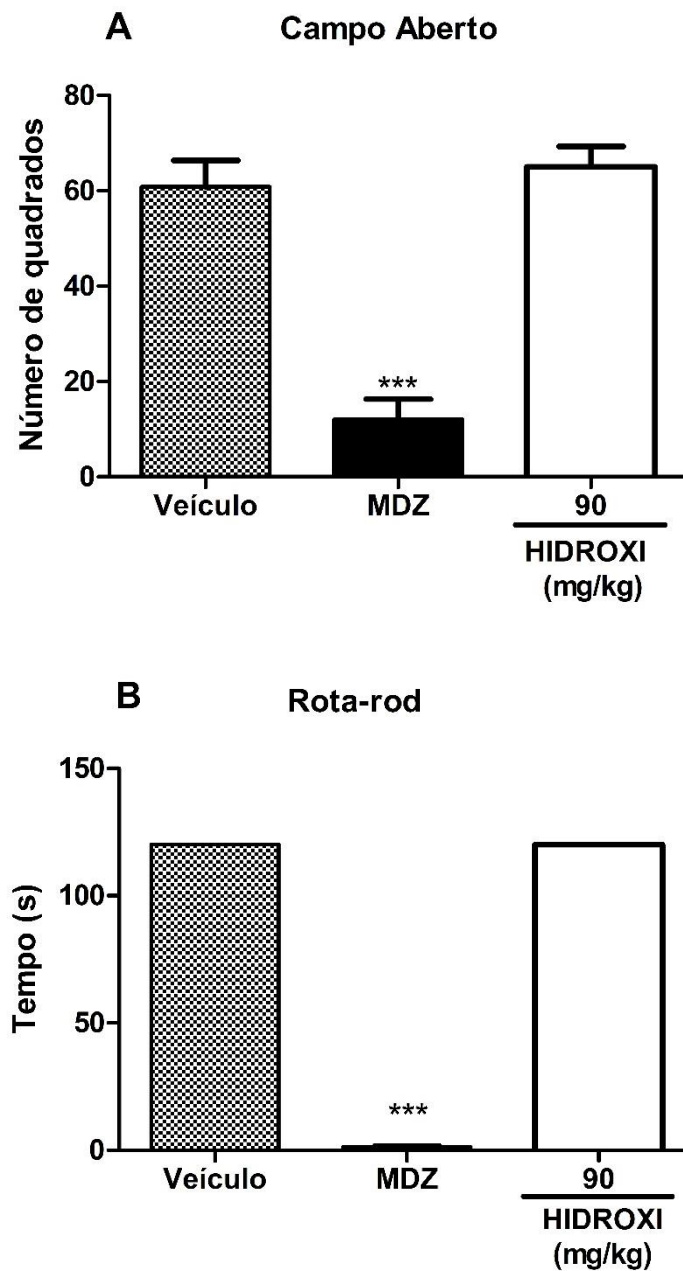
### **5.1.5 Efeito do pré-tratamento nos testes de campo aberto e rota-rod**

Os testes de campo aberto e rota-rod foram utilizados para avaliar se uma possível deficiência motora induzida pelos compostos poderia influenciar na avaliação do comportamento nociceptivo. A administração oral de 1,2-benzopirona (90mg/kg), 7-hidroxicumarina (90mg/kg), acetato de hecogenina (30mg/kg), acetato de diosgenina (30mg/kg) ou veículo, não alterou o número de quadrados percorridos pelos camundongos no campo aberto e nem no tempo de permanência no rota-rod (Figuras 8, 9, 10 e 11). Esses dados indicam que as moléculas não afetam o desempenho motor dos camundongos, confirmando o seu efeito antinociceptivo. Midazolam (10mg/kg; i.p.), depressor do sistema nervoso central, ao contrário, inibiu significativamente ( $p < 0,001$ ) o tempo de permanência dos animais no aparelho de rota-rod e o número de quadrados percorridos no campo aberto.

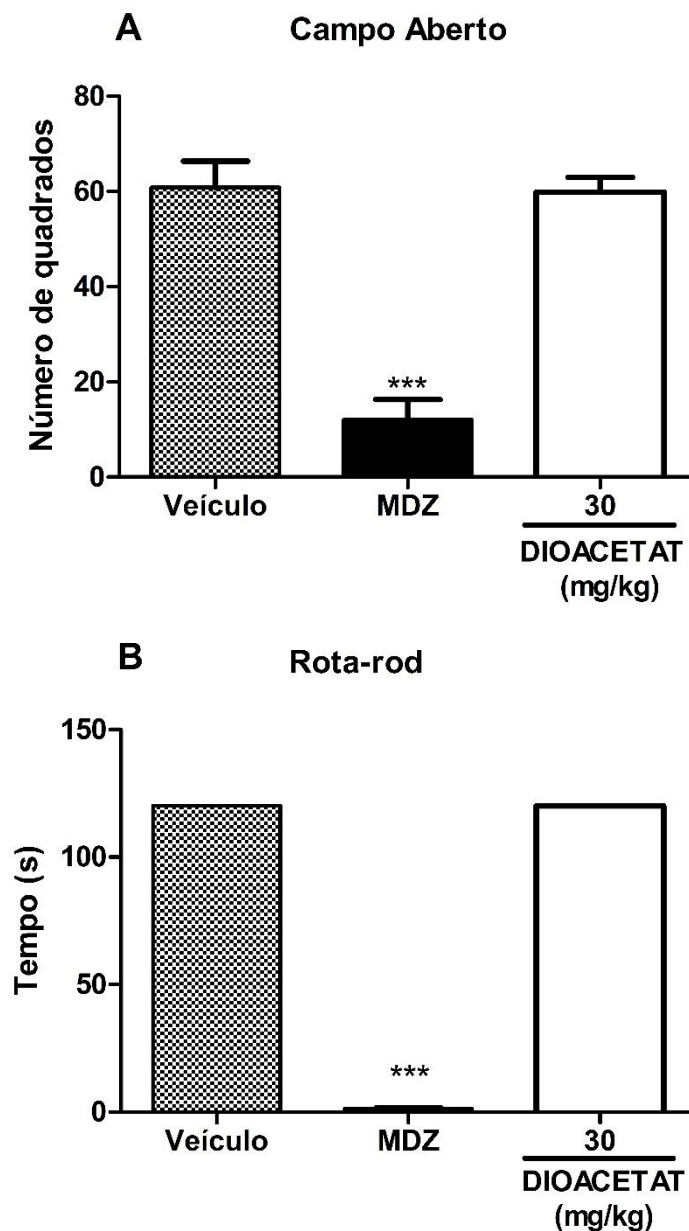


**Figura 8** - Efeito do pré-tratamento com a BENZOP nos testes de campo aberto e rota-rod. Painéis (A) e (B) representam os efeitos da 1,2-benzopirona no teste de campo aberto e rota-rod, respectivamente. Camundongos foram tratados com 1,2-benzopirona (BENZOP; 90mg/kg; v.o.), veículo (solução fisiológica + tween 2%) ou midazolam (MDZ; 10mg/kg) por via intraperitoneal 30min antes da avaliação. Dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M; n=6 animais por grupo. \*\*\* Significância estatística comparada ao grupo controle negativo ( $p < 0,001$ ) de acordo com o teste ANOVA de uma via, seguido do teste de Bonferroni.

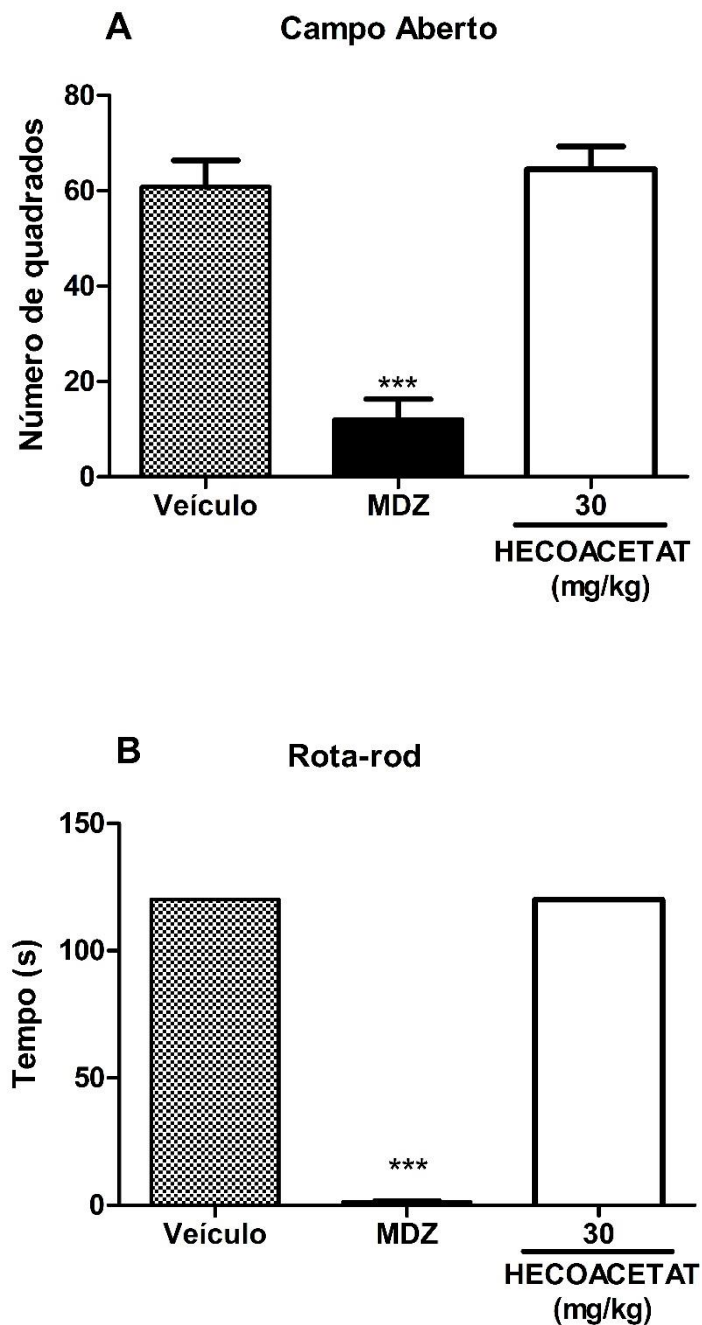




**Figura 9** - Efeito do pré-tratamento com a HIDROXI nos testes de campo aberto e rota-rod. Painéis (A) e (B) representam os efeitos da 7-hidroxicumarina no teste de campo aberto e rota-rod, respectivamente. Camundongos foram tratados com 7-hidroxicumarina (HIDROXI; 90mg/kg; v.o.), veículo (solução fisiológica + DMSO 5%) ou midazolam (MDZ; 10mg/kg) por via intraperitoneal 30min antes da avaliação. Dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M; n=6 animais por grupo. \*\*\* Significância estatística comparada ao grupo controle negativo ( $p < 0,001$ ) de acordo com o teste ANOVA de uma via, seguido do teste de Bonferroni.



**Figura 10 - Efeito do pré-tratamento com o DIOACETAT nos testes de campo aberto e rota-rod.** Painéis (A) e (B) representam os efeitos do acetato de diosgenina no teste de campo aberto e rota-rod, respectivamente. Camundongos foram tratados com acetato de diosgenina (DIOACETAT; 30mg/kg; v.o.), veículo (solução fisiológica + tween 2%) ou midazolam (MDZ; 10mg/kg) por via intraperitoneal 30min antes da avaliação. Dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M; n=6 animais por grupo. \*\*\* Significância estatística comparada ao grupo controle negativo ( $p < 0,001$ ) de acordo com o teste ANOVA de uma via, seguido do teste de Bonferroni.

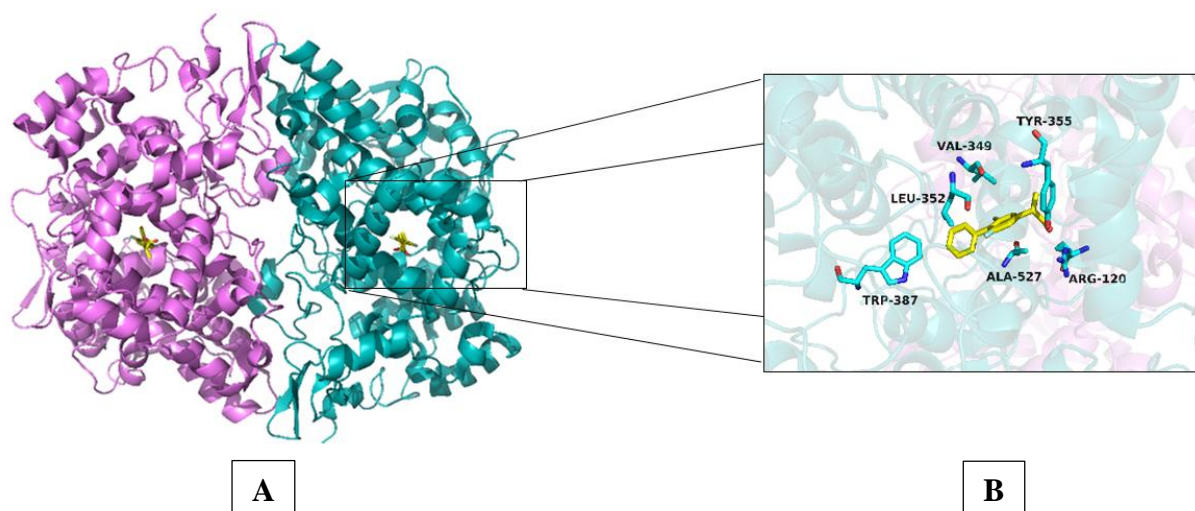


**Figura 11 - Efeito do pré-tratamento com o HECOACETAT nos testes de campo aberto e rota-rod.** Painéis (A) e (B) representam os efeitos do acetato de diosgenina no teste de campo aberto e rota-rod, respectivamente. Camundongos foram tratados com acetato de diosgenina (HECOACETAT; 30mg/kg; v.o.), veículo (solução fisiológica + tween 2%) ou midazolam (MDZ; 10mg/kg) por via intraperitoneal 30min antes da avaliação. Dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M; n=6 animais por grupo. \*\*\* Significância estatística comparada ao grupo controle negativo ( $p < 0,001$ ) de acordo com o teste ANOVA de uma via, seguido do teste de Bonferroni.

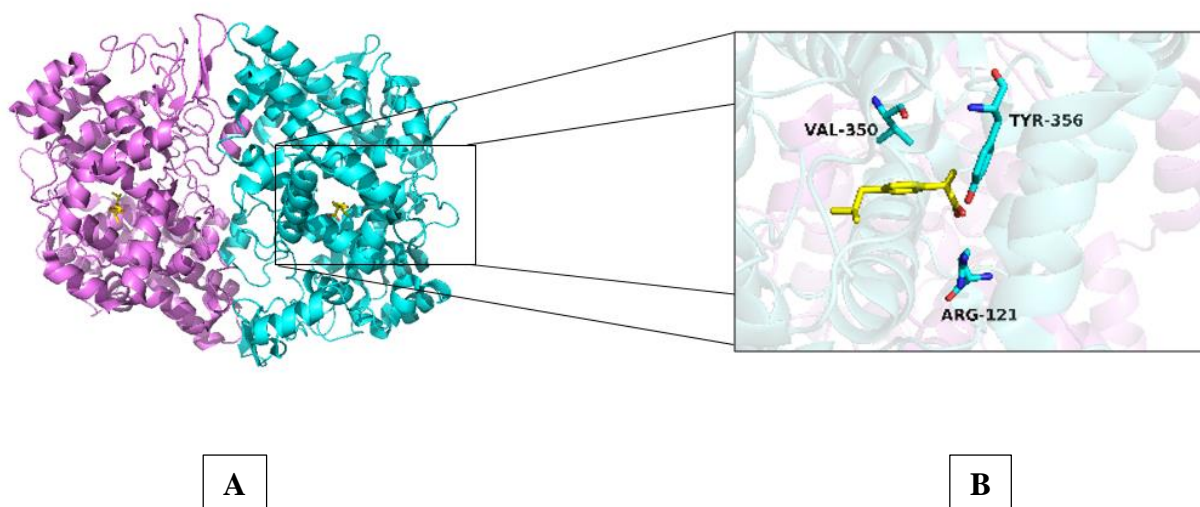
## 5.2 Ensaio *in silico*

### 5.2.1 Seleção e obtenção das estruturas cristalográficas para acoplamento molecular

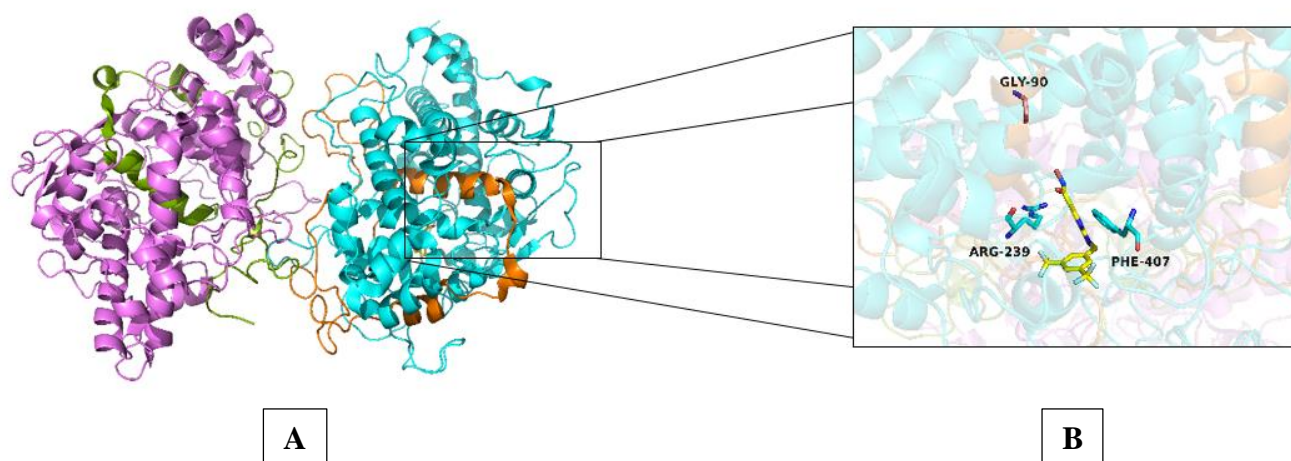
Com o intuito de avaliar a afinidade das moléculas estudadas frente a COX-1, COX-2 e MPO, procedeu-se a etapa dos estudos de acoplamento molecular. Os alvos selecionados para o acoplamento molecular foram obtidos do banco de dados *Protein Data Bank* (PDB). Os melhores alvos selecionados para o estudo foram o 2AYL, 4PH9 e 4C1M (Código PDB), COX-1, COX-2 e MPO respectivamente, por apresentarem melhores valores de resolução (figuras 12, 13 e 14). A estrutura cristalográfica 2AYL é oriunda do organismo *Ovis Aires*, com resolução de 2Å e além disso, possui 93% identidade similar na sequência comparada com o organismo humano (GUPTA et al., 2006). A estrutura 4PH9 é oriunda do organismo *mus musculus* e possui valor de resolução 1.81Å, e 88% de identidade similar na sequência comparada com o organismo humano (ORLANDO et al., 2014). A estrutura 4C1M é oriunda do organismo *Homo Sapiens*, com 2Å de resolução (FORBES et al., 2013).



**Figura 12** - Representação da estrutura da COX-1 (PDB: 2AYL) (A) com destaque para o sítio ativo (B). Os aminoácidos do sítio estão representados em bastões e o ligante cristalográfico em bastão amarelo.



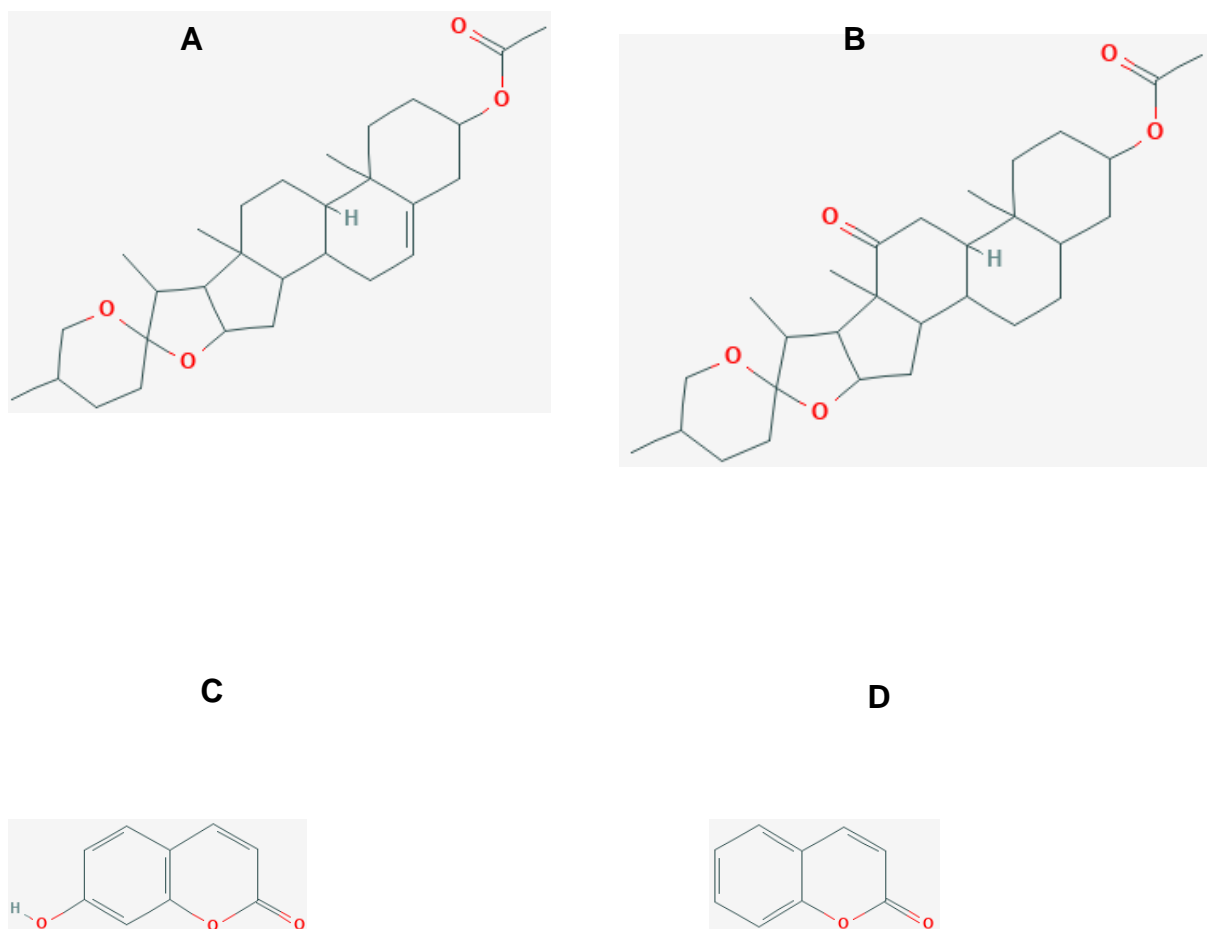
**Figura 13** - Representação da estrutura da COX-2 (PDB: 4PH9) (A) com destaque para o sítio ativo (B). Os aminoácidos do sítio estão representados em bastões e o ligante cristalográfico em bastão amarelo.



**Figura 14** – Representação da estrutura da mieloperoxidase (PDB: 4C1M) (A) com destaque para o sítio ativo (B). Os aminoácidos do sítio estão representados em bastões e o ligante cristalográfico em bastão amarelo.

### 5.2.2 Obtenção das estruturas moleculares

Todas as moléculas em formato 2D foram provenientes do endereço eletrônico “<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>”, em formato SDF. Abaixo estão listadas as estruturas moleculares bidimensionais para posterior análise do acoplamento molecular.



**Figura 15** - Representação bidimensional das estruturas moleculares. Estrutura **A**: acetato de diosgenina (DIOACETAT). Estrutura **B**: acetato de hecogenina (HECOACETAT). Estrutura **C**: 7-hidroxicumarina (HIDROXI). Estrutura **D**: 1,2-benzopirona (BENZOP).

### 5.2.3 Acoplamento Molecular

*Root Mean Square Deviation* (RMSD) foi utilizado com o intuito de análise dos parâmetros definidos no acoplamento. Esta análise demonstra o quanto de desvio foi observado a partir da conformação original do ligante após a realização do reacoplamento. O reacoplamento gerou valores de RMSD para a COX-1 (0,7535 Å), COX-2 (0,8400 Å) e MPO (1,7300 Å).

De acordo com os valores de RMSD obtidos, pode-se afirmar que todos os reacoplamentos foram realizados de forma adequada. Portanto a pose gerada pelo DOCK 6.7 não se distanciou (RMSD > 2 Å) da pose cristalográfica.

#### 5.2.3.1 Receptores da COX-1 e COX-2

O cálculo de acoplamento dos compostos resultou em valores de energia entre -34,09 a -41,70 Kcal/mol na COX-1 (Tabela 1). Na COX-2 os valores alternaram entre -31,71 a -45,44 Kcal/mol (Tabela 2).

**Tabela 1-** Valores de energia do acoplamento molecular da 1,2-benzopirona, 7-hidroxicumarina, acetato de hecogenina e acetato de diosgenina com a COX-1.

Molécula	Valores de energia Kcal/mol (COX-1)
1,2-benzopirona (BENZOP)	-34,09
7-hidroxicumarina (HIDROXI)	-36,83
Acetato de hecogenina (HECOACETAT)	-41,50
Acetato de diosgenina (DIOACETAT)	-41,70

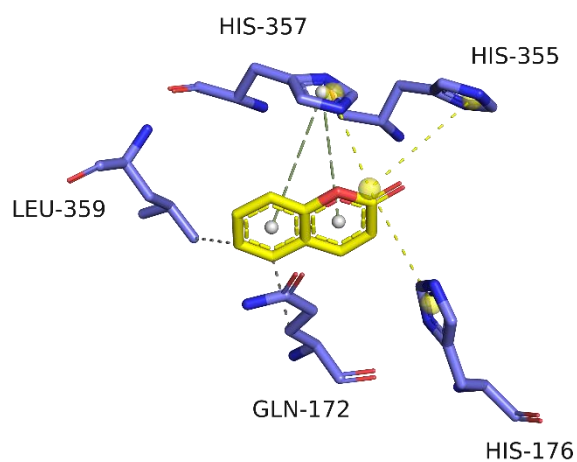
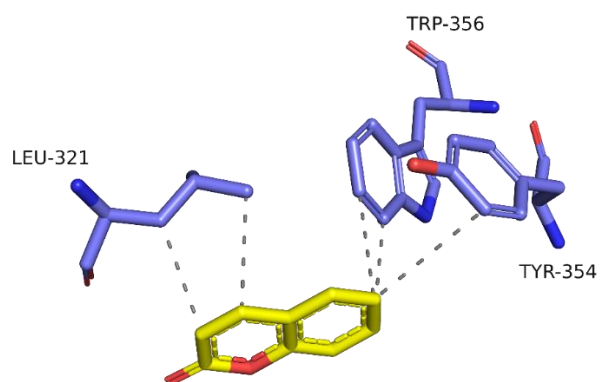
**Tabela 2-** Valores de energia do acoplamento molecular da 1,2-benzopirona, 7-hidroxycumarina, acetato de hecogenina e acetato de diosgenina com a COX-2.

<b>Molécula</b>	<b>Valores de energia Kcal/mol (COX-2)</b>
<b>1,2-benzopirona (BENZOP)</b>	-31,74
<b>7-hidroxycumarina (HIDROXI)</b>	-33,48
<b>Acetato de hecogenina (HECOACETAT)</b>	-43,44
<b>Acetato de diosgenina (DIOACETAT)</b>	-45,26

A 1,2-benzopirona (BENZOP) apresentou interações hidrofóbicas com a cadeia lateral dos resíduos LEU-359 e GLN-172 da COX-1. Interações de mesma natureza podem ser observadas com o ligante cristalográfico e os resíduos LEU-352, TRP-387, VAL-349 e ALA-527, indicando que interações hidrofóbicas são importantes para o reconhecimento molecular. Nota-se também o estabelecimento de uma ligação de empilhamento *pi* com o anel imidazol da HIS-357 e os anéis aromáticos do ligante. Por meio de grupos carboxilatos são formadas interações de pontes salinas com a HIS-176, HIS-355 e HIS-35 (figura 16A).

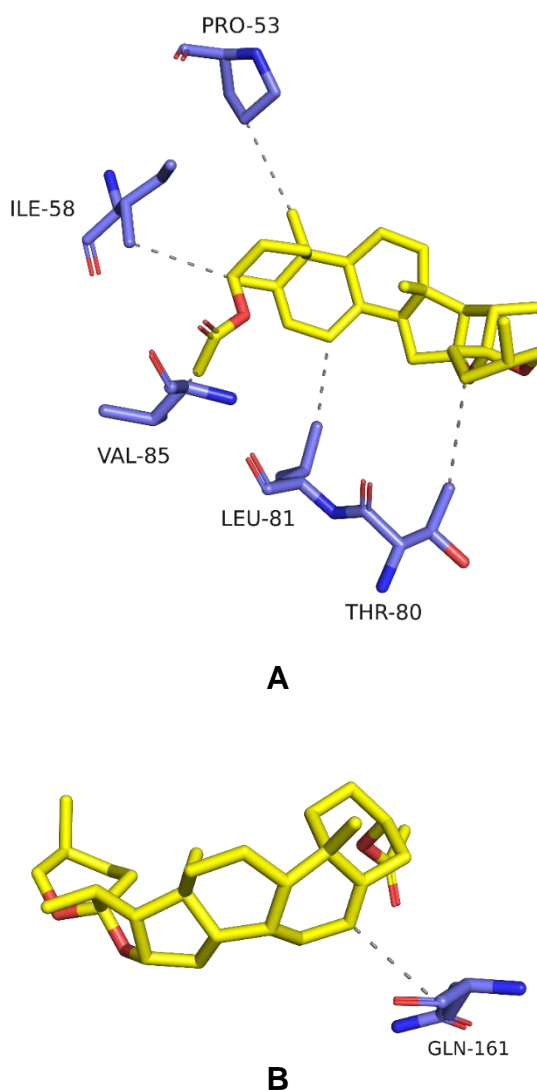
Na COX-2 (figura 16B) observa-se interações hidrofóbicas de 1,2-benzopirona com a cadeia lateral de resíduos LEU-321, TRP-356 e TYR-354. Interações de mesma natureza podem ser observadas com o ligante cristalográfico e o VAL-350, indicando que interações hidrofóbicas são importantes para o reconhecimento molecular. Além disso, apresenta ligações de hidrogênio com a cadeia lateral do resíduo TYR-356, indicando que a interação com este aminoácido é importante para o reconhecimento molecular.



**A****B**

**Figura 16** - Perfil de interação de 1,2-benzopirona com a COX-1 (A) e COX-2 (B). Enzima: azul, ligante: amarelo, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, interações  $\pi$ -paralelas: barras tracejadas verdes, pontes salinas: barra pontilhada amarela.

O acetato de diosgenina (DIOACETAT) acoplado a COX-1 apresentou interações hidrofóbicas com a cadeia lateral dos resíduos PRO-53, ILE-58, VAL-85, LEU-81, THR-80 (figura 17A). Interações de mesma natureza podem ser observadas com o ligante cristalográfico e os resíduos LEU-352, TRP-387, VAL-349 e ALA-527, indicando que interações hidrofóbicas são importantes para o reconhecimento molecular. Na figura 17B nota-se também interação hidrofóbica com a cadeia lateral do resíduo GLN-161 na COX-2. Interações de mesma natureza são observadas com o ligante cristalográfico e o VAL-350, reafirmando a importância de interação hidrofóbicas para o reconhecimento molecular

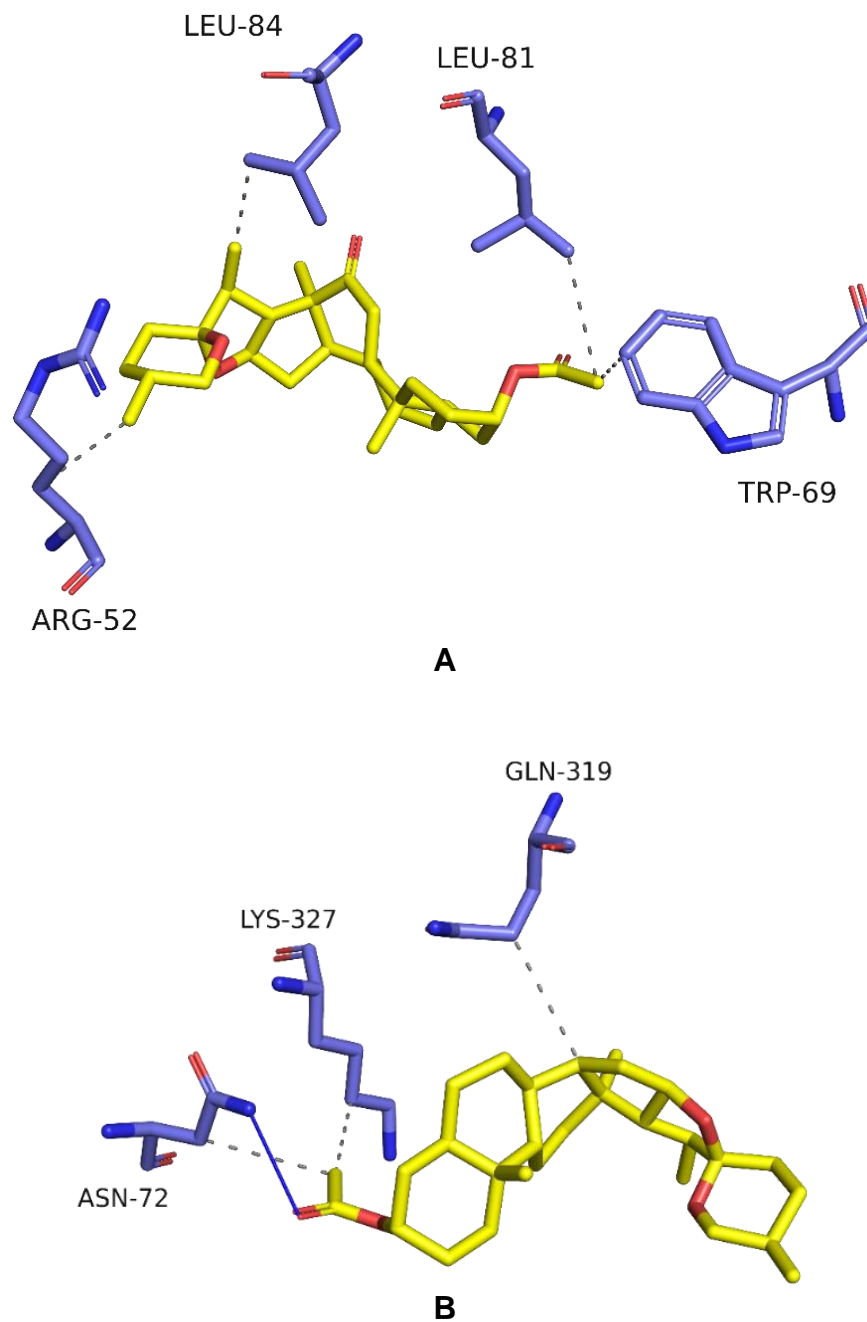


**Figura 17** - Perfil de interação de acetato de diosgenina com a COX-1 (A) e COX-2 (B). Enzima: azul, ligante: amarelo, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas.

O acetato de hecogenina (HECOACETAT) apresentou interações hidrofóbicas com a cadeia lateral dos resíduos LEU-84, LEU-81, TRP-69, ARG-52 da COX-1 (figura 18A). Interações de mesma natureza podem ser observadas com o ligante cristalográfico e os resíduos LEU-352, TRP-387, VAL-349 e ALA-527, indicando que interações hidrofóbicas são importantes para o reconhecimento molecular.

Além disso, observa-se ligações de hidrogênio entre o ligante cristalográfico e o resíduo ARG-120, demonstrando assim a importância de interações com os resíduos LEU e ARG para o reconhecimento molecular.

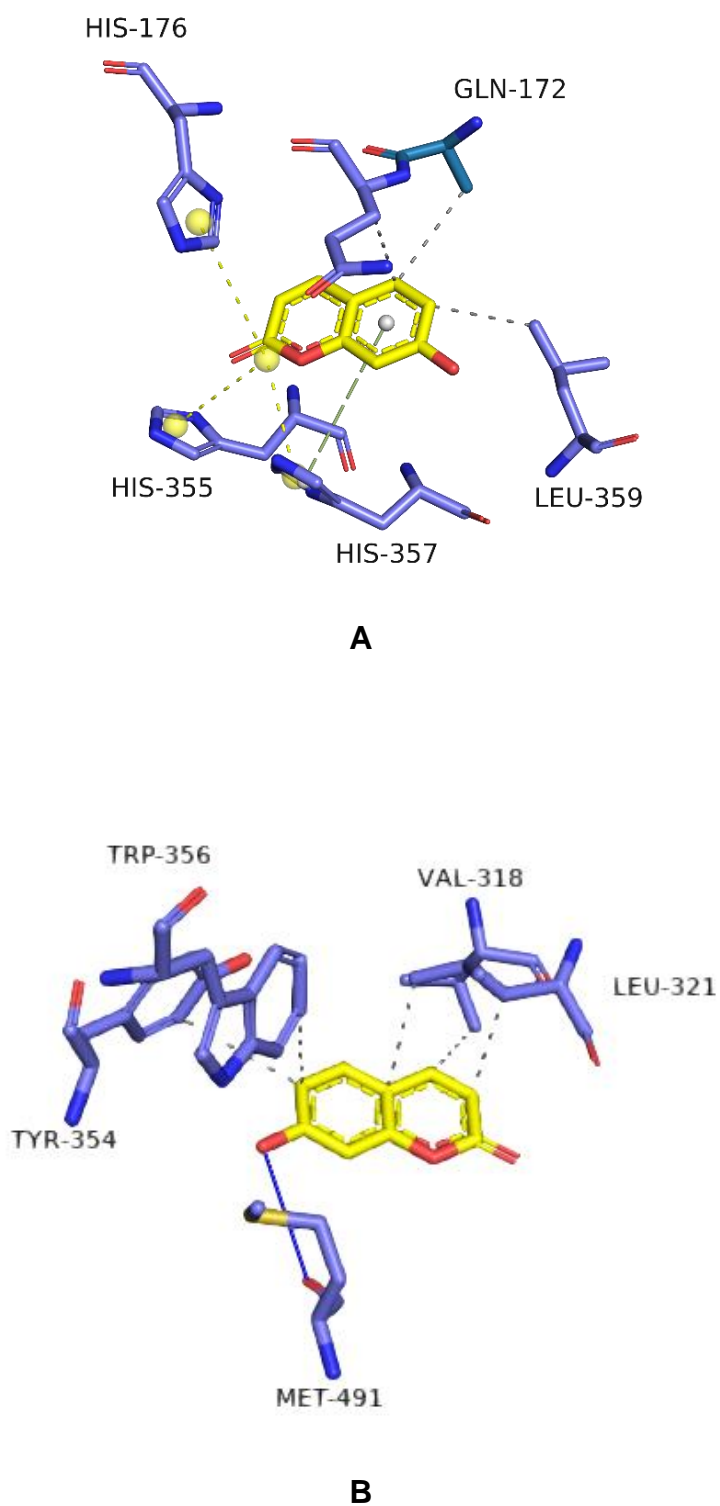
No acoplamento com a COX-2 (figura 18B), nota-se também o estabelecimento de uma ligação de hidrogênio com a cadeia lateral do resíduo ASN-72 e interações hidrofóbicas com a cadeia lateral dos resíduos ASN-72, LYS-327 e GLN-319. Interações de mesma natureza são observadas com o ligante cristalográfico e o resíduo VAL-350, demonstrando a importância deste tipo de interação para o reconhecimento molecular.



**Figura 18** - Perfil de interação do acetato de hecogenina com a COX-1 (A) e COX-2 (B). Enzima: azul, ligante: amarelo, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas. Ligações de hidrogênio: barra azul.

A 7-hidroxicumarina (HIDROXI) apresentou interações hidrofóbicas com a cadeia lateral dos resíduos GLN-172, LEU-359 da COX-1 (figura 19A). Interações de mesma natureza podem ser observadas com o ligante cristalográfico e os resíduos LEU-352, TRP-387, VAL-349 e ALA-527, indicando que interações hidrofóbicas são importantes para o reconhecimento molecular. Nota-se também o estabelecimento de duas ligações de empilhamento  $\pi$  com o anel imidazol da HIS-357 e os anéis aromáticos do ligante, carbonos (1, 2, 3, 4, 6, 7) e carbonos (1, 2, 4, 8, 9, 10). Por meio de grupos carboxilatos são formadas interações de pontes salinas com a HIS-176, HIS-355, HIS-357 (figura 19A).

Além disso, a 7-hidroxicumarina apresentou interações hidrofóbicas com a cadeia lateral dos resíduos LEU-321, VAL-318, TYR-354, TRP-356 da COX-2 (figura 19B). Interações de mesma natureza são observadas com o ligante cristalográfico e o resíduo VAL-350, e interações de ligação de hidrogênio com o resíduo TYR-356, demonstrando mais uma vez não só a importância deste tipo de interação para o reconhecimento molecular, mas também a presença destes dois resíduos como cruciais para a interação.



**Figura 19.** Perfil de interação da 7-hidroxycumarina com a COX-1 (A) e COX-2 (B). Enzima: azul, ligante: amarelo, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, interações  $\pi$ -paralelas: barras tracejadas verdes, pontes salinas: barra pontilhada amarela. Ligações de hidrogênio: barra azul.

### 5.2.3.2 Receptor da Mieloperoxidase

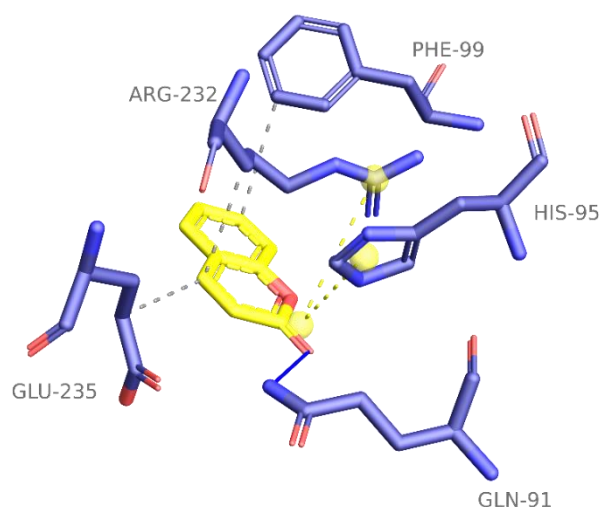
O cálculo de acoplamento dos compostos resultou em valores de energia entre -40,04 a -53,74 Kcal/mol na MPO (Tabela 3).

**Tabela 3** - Valores de energia do acoplamento molecular da 1,2-benzopirona, 7-hidroxicumarina, acetato de hecogenina e acetato de diosgenina frente a MPO.

<b>Molécula</b>	<b>Valores de energia Kcal/mol (MPO)</b>
<b>1,2-benzopirona (BENZOP)</b>	-40,04
<b>7-hidroxicumarina (HIDROXI)</b>	-41,71
<b>Acetato de diosgenina (DIOACETAT)</b>	-51,80
<b>Acetato de hecogenina (HECOACETAT)</b>	-53,74

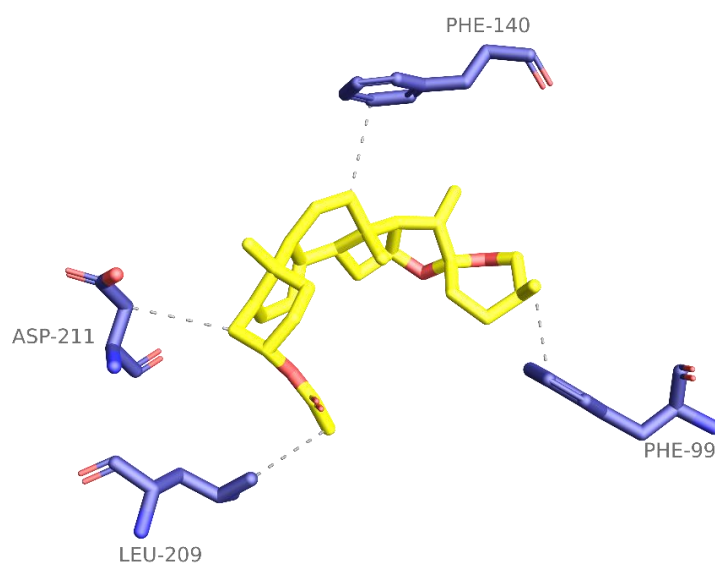
A 1,2-benzopirona (BENZOP) apresentou interações hidrofóbicas com a cadeia lateral dos resíduos PHE-99, ARG-232 e GLU-235 da MPO (figura 20). Interações de mesma natureza podem ser observadas com o ligante cristalográfico e o resíduo PHE-407, indicando que interações hidrofóbicas são importantes para o reconhecimento molecular. Nota-se também o estabelecimento de ligação de hidrogênio na cadeia lateral do resíduo GLN-91.

Por meio de grupos carboxilatos são formadas interações de pontes salinas com a HIS-95 e ARG-232 (figura 20). Interações com o mesmo tipo de resíduo podem ser observadas com o ligante cristalográfico e os resíduos PHE-407 (interações hidrofóbicas), GLN-91 e ARG-239 (ligação de hidrogênio) indicando que estes resíduos são importantes para o reconhecimento molecular.



**Figura 20.** Perfil de interação da 1,2-benzopirona com a MPO. Enzima: azul, ligante: amarelo, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, pontes salinas: barra pontilhada amarela. Ligações de hidrogênio: barra azul.

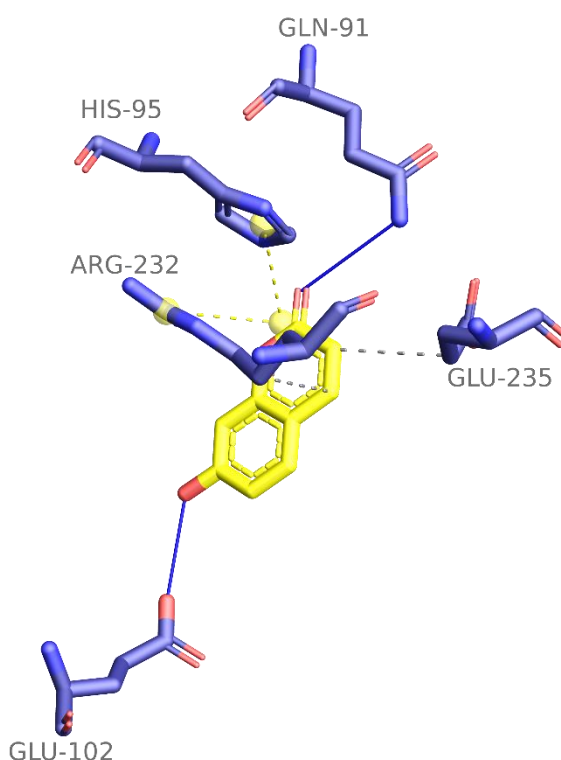
O acetato de diosgenina (DIOACETAT) apresentou interações hidrofóbicas com a cadeia lateral dos resíduos PHE-99, PHE-140, ASP-211 e LEU209 MPO (figura 21). Interações de mesma natureza podem ser observadas com o ligante cristalográfico e o resíduo PHE-407 indicando que interações hidrofóbicas são importantes para o reconhecimento molecular.



**Figura 21 -** Perfil de interação do acetato de hecogenina com a MPO. Enzima: azul, ligante: amarelo, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas.



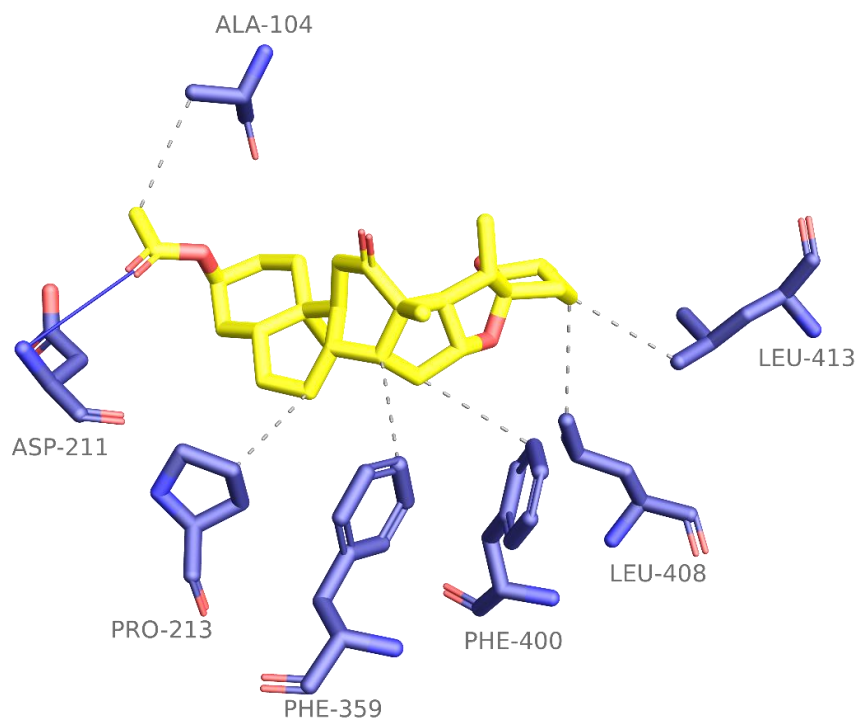
A 7-hidroxicumarina (HIDROXI) apresentou interações hidrofóbicas por meio dos carbonos 5 e 8 respectivamente, com a cadeia lateral dos resíduos ARG-232 e GLU-235 (figura 22). Interações de mesma natureza podem ser observadas com o ligante cristalográfico e os resíduos PHE-407, indicando que interações hidrofóbicas são importantes para o reconhecimento molecular. Além disso, observa-se ligações de hidrogênio nos resíduos GLN-91 e GLU-102. Por meio de grupos carboxilatos são formadas interações de pontes salinas com a HIS-95 e ARG-232.



**Figura 22.** Perfil de interação da 7-hidroxicumarina com a MPO. Enzima: azul, ligante: amarelo, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas, pontes salinas: barra pontilhada amarela. Ligações de hidrogênio: barra azul.

O acetato de hecogenina (HECOACETAT) apresentou interações hidrofóbicas com a cadeia lateral dos resíduos ALA-104, PRO-213, PHE-390, PHE-400, LEU-408,

LEU-413 da MPO (figura 23). Interações de mesma natureza podem ser observadas com o ligante cristalográfico e o resíduo PHE-407, indicando que interações hidrofóbicas são importantes para o reconhecimento molecular. Além disso, observa-se ligação de hidrogênio com o resíduo ASP-211.



**Figura 23.** Perfil de interação do acetato de hecogenina com a MPO. Enzima: azul, ligante: amarelo, ligações hidrofóbicas: barras pontilhadas cinzas.

## 6. DISCUSSÃO

Modelos de animais têm sido amplamente usados por várias décadas para estudar a artrite e contribuíram de maneira excelente para desvendar mecanismos de patogênese e validar novos alvos para o tratamento. Os princípios básicos da terapêutica clínica na artrite reumatoide são prevenir e/ou controlar a lesão articular, a perda de função e o controle da dor, elevando ao máximo a qualidade de vida do paciente (BÉRTOLO et al., 2007).

O presente trabalho estudou pela primeira vez o efeito da administração via oral dos compostos isolados 1,2-benzopirona, 7-hidroxicumarina, acetato de diosgenina e acetato de hecogenina no modelo de artrite experimental induzida por zimosan. O zimosan é um polissacarídeo insolúvel obtido da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que quando injetado intra-articular induz inflamação na articulação (ROCHA et al., 2009).

O modelo de artrite induzida por zimosan é vastamente empregado em pesquisas pelo fato de mimetizar as principais características clínicas verificadas na artrite reumatoide em humanos. Da mesma forma, este teste apresenta fácil execução, boa reprodutibilidade dos dados e permite a obtenção de resultados fidedignos em um breve período (CARMO, 2015).

A dor articular resulta, principalmente, de efeitos diretos e indiretos de mediadores inflamatórios, tais como, histamina, eicosanoides, Fator Ativador de Plaquetas (PAF), neuropeptídios, óxido nítrico e principalmente citocinas e prostaglandinas que sensibilizam fibras nociceptivas primárias que inervam a articulação inflamada (MCDUGALL, 2006; SCHAIBLE; EBERSBERGER; VON BANCHET, 2002; SCHAIBLE; GRUBB, 1993).

Neste trabalho o pré-tratamento com a 1,2-benzopirona reduziu a hipernocicepção articular até a terceira hora do teste. Em 2016 Mello e colaboradores identificaram que a 1,2-benzopirona foi capaz de inibir diversos parâmetros inflamatórios, como os níveis de IL-17A, IL-6, TNF e, IFN- $\gamma$  além de ter sido capaz de promover o aumento da interleucina anti-inflamatória IL-10. Em 2014 AHMAD e colaboradores identificaram a citocina IL-10 como um importante mediador anti-inflamatório, capaz de inibir a liberação de citocinas e interleucinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-12) por monócitos e macrófagos.

Estes relatos, apontam possíveis mecanismos da 1,2-benzopirona, atuando principalmente na imunomodulação de diversos componentes importantes no processo inflamatório, provavelmente por vias periféricas.

Uma breve síntese de IL-6 contribui para a defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos e lesões teciduais induzindo reações de fase aguda e respostas hematopoiéticas. Contudo, a produção persistente e ao mesmo tempo descontrolada de IL-6 pode levar ao desenvolvimento de várias doenças imunomediadas. O fato da artrite reumatóide ser uma doença crônica com inflamação articular e sistêmica resultante das anormalidades imunológicas, verificou-se que a IL-6 desempenha um papel fundamental no desenvolvimento desta doença. Diversos ensaios clínicos em várias partes do mundo do tocilizumabe, um anticorpo humanizado anti-IL-6, provaram sua eficácia e segurança tolerável quer como monoterapia ou em combinação com drogas antirreumáticas modificadoras da doença. Como resultado, é usado atualmente como primeira linha biológico para o tratamento da AR moderada a grave em mais de 100 países (YOSHIDA, 2014).

Além disso, a IL-1 é a principal citocina da inflamação local e sistêmica. Com o advento de terapias direcionadas específicas para a IL-1, uma lista abrangente de doenças revelou o papel patológico da inflamação mediada por IL-1. Já o TNF-alfa é a citocina inflamatória mais rapidamente produzida *in vivo*. Se a rápida liberação é bloqueada são reduzidos os níveis séricos de outras citocinas pro-inflamatórias, tais como a IL-1 beta e IL-6 (FELDMANN E MAINI, 2001), sugerindo assim que o TNF-alfa coordena boa parte da resposta *in vivo* de citocinas à lesão e funciona como um alerta. Diante disto, esses achados sugerem novamente uma possível atuação da 1,2-benzopirona sobre mediadores da inflamação por vias periféricas.

O pré-tratamento com a 7-hidroxicumarina produziu resultados bastante destacáveis, visto que a dose de 90mg/kg reduziu a hipernocicepção articular induzida por zimosan até a quinta hora do teste. Alguns estudos com a 7-hidroxicumarina demonstram uma ampla gama de efeitos farmacológicos, tais como atividade antioxidante, antitumoral e atividade antiproliferativa (RAMESH, 2006; LOPEZ-GONZALEZ et al., 2004; STEFANOVA et al., 2004), que parece ser mediada pelo seu efeito de inibição de proteínas quinases. Além disso, foi confirmada a capacidade da 7-hidroxicumarina em reduzir mediadores inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e PGE<sub>2</sub> (LIMA et al, 2010). Da mesma forma, um estudo realizado recentemente, a fim de investigar os efeitos antinociceptivos, anti-inflamatórios e antipiréticos da 7-

hidroxycumarina, em modelos animais, pesquisadores obtiveram efeitos antinociceptivos e anti-inflamatório prolongados, em associação com a sua baixa atividade ulcerogênica (BARROS et al, 2010). Estes dados reafirmam o perfil de resposta da 7-hidroxycumarina encontrado nos testes de artrite induzida por zimosan neste trabalho.

Não existem muitos relatos na literatura sobre atividades biológicas do acetato de diosgenina. Neste trabalho, a administração oral com acetato de diosgenina promoveu a redução da hipernocicepção articular induzida pelo zimosan de maneira significativa. Corroborando com nossos achados, Wang e colaboradores (2015) identificaram que a diosgenina inibiu a produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandina E2 (PGE2) induzida pela interleucina-1-beta (IL-1 $\beta$ ). Além disso, em seus estudos a diosgenina inibiu significativamente a expressão de metaloproteinase 3 (MPO-3), MPO-13, óxido nítrico sintase (iNOS) induzida por IL-1 $\beta$  e ciclooxigenase-2 (COX-2) em condrócitos na osteoartrite humana.

A redução de importantes componentes da inflamação evidencia o papel fundamental da diosgenina atuando por imunomodulação, provavelmente por vias periféricas. Ainda neste sentido, alguns outros pesquisadores relataram que a diosgenina reduz a produção de mediadores inflamatórios ao inibir a ativação de CK2, JNK, NF $\kappa$ -B e AP-1 (JUNG et al., 2010; SHISHODIA, AGGARWAL, 2006), deste modo, contribuindo para os achados obtidos neste trabalho.

Da mesma forma, existem poucos relatos na literatura de atividades biológicas do acetato de hecogenina. Em nossos testes, a administração via oral do acetato de hecogenina provocou uma redução significativa da hipernocicepção articular induzida pelo zimosan, destacando-se a dose de 30mg/kg com efeito significativo na primeira e terceira hora. Quintans-júnior e colaboradores em 2014, identificaram a presença de mecanismos imunomodulatórios de citocinas no efeito anti-hiperalgésico do acetato de hecogenina. Por meio de experimentos em animais, demonstraram a capacidade do composto de modular o corno dorsal da medula espinhal e inibir a expressão de IL-1 $\beta$ , diminuindo assim uma das principais citocinas presentes no processo inflamatório.

Recentemente, Araújo (2017) e colaboradores identificaram uma importante ação antinociceptiva do acetato de hecogenina em modelos de dor inflamatória orofacial induzida por formalina. A primeira fase deste teste caracteriza-se por apresentar uma ativação direta das terminações nervosas nociceptivas tipo C,

liberando neuropeptídeos, como substância P, liberação de glutamato nas áreas de dor do SNC e manejo de 5-HT. Já a segunda fase, conhecida por dor inflamatória é caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, serotonina, histamina, citocinas, entre outros sistemas de neurotransmissores. Em seus experimentos, o acetato de hecogenina apresentou uma importante ação antinociceptiva em ambas as fases, sugerindo um possível mecanismo de ação por meio de receptores opioides ou por inibição de mediadores da inflamação por vias periféricas.

Por fim, para descartar a hipótese de que algum prejuízo na resposta motora ou comprometimento neurológico seria responsável pela ausência de resposta nos testes nociceptivos após a administração das moléculas, seus efeitos sobre a função motora foram avaliados. Nossos resultados mostraram que a 1,2-benzopirona, 7-hidroxycumarina, acetato de hecogenina e acetato de diosgenina não induziram comprometimento na coordenação motora demonstrado no teste de campo aberto e rota-rod. Esses resultados validam a especificidade da antinocicepção sugerida pelos testes nociceptivos.

Com o intuito de verificar a afinidade destas moléculas pelas enzimas COX-1, COX-2 e mieloperoxidase (MPO), foi realizado ensaio *in silico* pela técnica de acoplamento molecular. Os resultados evidenciaram uma afinidade dos compostos frente as enzimas. Os dados mostraram que as moléculas interagem com o sítio ativo das enzimas, por vezes, preservando a natureza das interações intermoleculares, por vezes, mantendo padrões iguais, tais como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, empilhamento *pi* e pontes salinas.

Dentre estas diversas interações vale destacar para a molécula 1,2-benzopirona (BENZOP) interações hidrofóbicas com LEU-359 e GLN-172 da COX-1. Para a COX-2 Interações hidrofóbicas também foram observadas nos resíduos LEU-321, TRP-356 e TYR-354. Estes dados apontam interações hidrofóbicas como importantes para o reconhecimento molecular, visto que também são observadas interações de mesma natureza entre o ligante cristalográfico e as enzimas. Além disso, a 1,2-benzopirona apresenta ligações de hidrogênio com a cadeia lateral do resíduo TYR-356. O ligante cristalográfico também interage com este resíduo, indicando assim que a interação com este aminoácido é importante para o reconhecimento molecular.

Para o acetato de diosgenina (DIOACETAT) e a COX-1 interações hidrofóbicas com resíduos PRO-53, ILE-58, VAL- 85, LEU-81, THR-80. Nota-se também o acetato de diosgenina realizando interação hidrofóbica com a cadeia lateral do resíduo GLN-161 na COX-2. Interações de mesma natureza são observadas com os respectivos ligantes cristalográficos, reafirmando a importância de interações hidrofóbicas para o reconhecimento molecular.

Para o acetato de hecogenina (HECOACETAT) interações hidrofóbicas com os resíduos LEU-84, LEU-81, TRP-69, ARG-52 da COX-1. Interações de mesma natureza foram observadas com o ligante cristalográfico e os resíduos LEU-352, TRP-387, VAL-349 e ALA-527. Observou-se também ligações de hidrogênio entre o ligante cristalográfico e o resíduo ARG-120, demonstrando assim a importância de interações com os resíduos LEU, ARG e TRP para o reconhecimento molecular. Da mesma forma, na COX-2 foi observada ligação de hidrogênio com ASN-72 e interações hidrofóbicas com ASN-72, LYS-327 e GLN-319. Interações de mesma natureza são observadas com o ligante cristalográfico e o resíduo VAL-350, demonstrando a importância da natureza e do padrão de interações para o reconhecimento molecular.

Para a 7-hidroxicumarina (HIDROXI) interações hidrofóbicas com resíduos GLN-172, LEU-359 da COX-1. Além disso, a 7-hidroxicumarina apresentou interações hidrofóbicas com resíduos LEU-321, VAL-318, TYR-354, TRP-356 da COX-2. Interações de mesma natureza foram observadas com os ligantes cristalográficos em ambos os alvos, dando destaque para interações de mesma natureza com o ligante cristalográfico e o resíduo VAL-350 na COX-2. Ainda neste sentido, o ligante interage por meio de ligação de hidrogênio com o resíduo TYR-356, demonstrando mais uma vez não só a importância deste tipo de interação para o reconhecimento molecular, mas também a presença destes dois resíduos como cruciais para a interação.

Nos ensaios com a mieloperoxidase vale destacar para a 1,2-benzopirona interações hidrofóbicas com PHE-99, ARG-232 e ligação de hidrogênio com GLN-91. Para o acetato de diosgenina, interações hidrofóbicas com PHE-99, PHE-140. Para a 7-hidroxicumarina interações hidrofóbicas com ARG-232. Para o acetato de hecogenina interações hidrofóbicas com PHE-390, PHE-400. Interações de mesma natureza, ou com o mesmo padrão, foram observadas nas interações entre o ligante cristalográfico e o sítio ativo da enzima evidenciando uma importância destas interações para o reconhecimento molecular na mieloperoxidase.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostram uma importante ação antinociceptiva da 1,2-benzopirona, 7-hidroxicumarina, acetato de diosgenina e acetato de hecogenina no modelo de artrite experimental induzida por zimosan. Teste de campo aberto e rota-rod validam a especificidade da antinocicepção sugerida pelos testes nociceptivos. Ensaio *in silico* sugere uma afinidade destas moléculas com as enzimas COX-1, COX-2 e MPO. Mais estudos são necessários para identificar os possíveis mecanismos de ação.



## REFERÊNCIAS

- ALETAHA, D.; SMOLEN, J. S. Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis. *Journal of the American Medical Association*. v. 320, n. 13. 2018.
- AHMAD, S. F.; ZOHEIR, K. M. A.; ABDEL-HAMIED, H. E.; ATTIA, S. M.; BAKHEET, S. A.; ASHOUR, A. E.; ABD-ALLAH, A. R. A. Grape seed proanthocyanidin extract protects against carrageenan-induced lung inflammation in mice through reduction of pro-inflammatory markers and chemokine expressions. *Inflammation*, v. 37, n. 2, p. 500–511, 2014.
- ANDREASSON, K. Emerging roles of PGE2 receptors in model of neurological disease. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, v. 91, p. 104-112, 2010.
- ALVAREZ, J.; SCHOICHET, B. *Virtual Screening in drug discovery*. New York: CRC Press, 2005.
- BALSA, A. et al. Influence of HLA DRB1 alleles in the susceptibility of rheumatoid arthritis and the regulation of antibodies against citrullinated proteins and rheumatoid factor. *Arthritis Res Ther*. v. 12, n. 2, p. R62, 2010.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M., *Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos*, 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2015. 608 p.
- 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, anti-inflamatórios e anti-trombóticos. *Química Nova*, v.25, n.1, p. 129-148, 2002.
- BARREIRO, E. J. *A química medicinal e o paradigma do composto-protótipo*. Revista Virtual de Química. Rio de Janeiro, v.1, n.1, p. 26-34, 2009.
- BARROS, T.A.; et al. J. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-hydroxycoumarin in experimental animal models: potential therapeutic for the control of inflammatory chronic pain. *Pharm. Pharmacol*. v. 62, n. 2, p. 205-13, 2010.
- BASBAUM, A. I.; WOOLF, C. J. Pain. *Curr Biol*. v. 9, n. 12, p. 429-31. 1999.
- BATLOUNI, M. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Cardiovascular, Cerebrovascular and Renal Effects. *Arq. Bras. Cardiol*. v. 24, p. 522-529, 2010.
- BERMAN, H. M. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.
- BRATS. *Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde*. Ano VI nº 19. 2012.
- BRASIL. *Ministério do meio ambiente*. Biodiversidade. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade.html>>. Acesso em 19 de fev.2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. *Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos*. 2016. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica\\_programa\\_nacional\\_plantas\\_medicinais\\_fitoterapicos.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf)>. Acesso em 17 de fev. 2019.

BOSTAN, M.; CONSTANTIN, M.C.; NICOLAU, A.; HIRT, M.; GALATIUC, C.; MATEI, I et al. Study of chemotactic activity developed by neutrophils from rheumatoid arthritis patients. *Roumanian archives of Microbiology and Immunology*. v. 61, n. 4, p. 243-58, 2002.

CAMPI, L. B. *Avaliação de alodínia e hiperalgesia cefálica e extracefálica associadas às disfunções temporomandibulares dolorosas*. Dissertação Mestrado. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp, 2015.

CARMO, L.D. *Proteínas isoladas do látex de Himatantus drasticus (mart.) plumel apocynaceae reduzem a resposta inflamatória e nociceptiva na artrite induzida por zymosan em camundongos*. 2015. 91 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2015.

CALVINO, B.; GRILO, R. M. Central pain control. *Joint Bone Spine*, v. 73, n. 1, 2006.

CARVALHO, Y.M.B.G.; MENEZES, P.P.; SOUSA, B.M.H.; LIMA, B.S.; TRINDADE, I.A.S.; SERAFINI, M.R.; PEREIRA, E.W.M.; REZENDE, M.M.; QUINTANS, J.S.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; NAKAMURA, C.V.; SILVA-JÚNIOR, E.F.; CRISPIM, A.C.; AQUINO, T.M.; ARAÚJO, A.A.S. Inclusion complex between b-cyclodextrin and hecogenin acetate produces superior analgesic effect in animal models for orofacial pain. In: *Biomedicine & Pharmacotherapy*. v. 93, p. 754-762, 2017.

CASCÃO, R.; ROSÁRIO, H.S.; SOUTO-CARNEIRO, M.M.; FONSECA, J.E. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. *Autoimmunity Reviews*. 2010.

CASTRO, A.S.; CAVALCANTE, A. Flores da Caatinga. Campina Grande: INSA, 2010.

CHOY, E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, v. 51, p. 3-11, 2012.

CROSS, A.; BAKSTAD, D.; ALLEN, J.C.; THOMAS, L.; MOOTS, R.J. EDWARDS, S.W. Neutrophil gene expression in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology*. v. 12, p.191-202, 2005.

CRUVINEL, W. M. et al. Sistema imunitário - Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev. Bras. Reumatol.* v. 50, n. 4, 2010.

CUNHA, T.M., et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v. 37, p. 401–07, 2005.

CUNHA, F.Q. et al. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, v. 107, n. 3, p. 660-664, 1992.

DOBASIC, D.; YANG, Y.; MULJADI R. C.; et al. Endogenous myeloperoxidase is a mediator of jointinflammation and damage in experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol*; v. 66, p. 907–17, 2014.

DOMINGO, D.; LÓPEZ-BREA, M. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia.* v. 16, n. 4, p. 385-393, 2003.

DUNHA N.W.; MIYA T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc.* v. 46, p. 208-209, 1957.

FAZAL, S. A. et al. A Clinical Update and Global Economic Burden of Rheumatoid Arthritis. *Bentham Science Publishers.* v. 18. p. 98-109. 2018.

FERNANDES, C M.; PEREIRA TEIXEIRA, C. F.; LEITE, A. C.; ROCHA, F. A. The snake venom metalloproteinase BaP1 induces joint hypernociception through TNF-alpha and PGE2-dependent mechanisms. *Br J Pharmacol.* v. 151, n. 8, p. 1254-61, 2007.

FELDMANN, M.; MAINI, R.N. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol.* v. 19, p. 163-96, 2001.

FELDMANN, M.; BRENNAN, F.M.; CHANTRY, D.; HAWORTH, C.; TURNER, M.; ABNEY, E. et al. Cytokine production in the rheumatoid joint: implications for treatment. *Annals of the Rheumatic Diseases.* 1990; 49 Suppl 1: 480-6, 1990.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, v. 110, n. 3, p.1227-1231, 1993.

FERRIN, T.E.; HUANG, C.C.; JARVIS, L.E.; LANGRIDGE, R. The Midas display system, *J. Mol. Graf.*, v. 6, p. 13-27, 1988.

FORBES, LV; SJÖGREN, T; AUCHÈRE, F; JENKINS, DW; THONG, B; LAUGHTON, D; HEMSLEY, P; PAIRAUDEAU, G; TURNER, R; ERIKSSON, H; UNITT, JF; KETTLE, AJ. Potent reversible inhibition of myeloperoxidase by aromatic hydroxamates. In: *J Biol Chem.* v. 288, n. 51, p. 36636–36647, 2013.

FOGLIO, M. A.; Queiroga, C. L.; SOUSA, I. M. de O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: um modelo multidisciplinar. In: *Revista MultiCiência.* 2006.

FURTADO, S. C.; MERINI, L.R.; GUIMARÃES, M.R.; GALVÃO, J.R.; BARCELLOS, J. F. M. Citocinas pró-inflamatórias em artrite induzida por adjuvante: uma revisão

da ação imunomoduladora de substâncias bioativas. *Scientia Amazonia*, v. 1, n. 3, p. 27-39, 2012.

GAMA, K. B.; QUINTANS, J. S. S.; ANTONIOLLI, Â. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; SANTANA, W. A.; BRANCO, A.; SOARES, M. B. P.; VILLARREA, C. F. Evidence for the Involvement of Descending Pain-Inhibitory Mechanisms in the Antinociceptive Effect of Hecogenin Acetate. In: *Journal of Natural Products*. 2013.

GERN, R. M. M.; WISBECK, E.; RAMPINELLI, J. R.; NINOW, J. L.; FURLAN, S. A. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. *Bioresource Technology*, Essex, v. 99, n. 1, p. 76-82, 2008.

GOLAN, D. E. *Principios de farmacologia: a base fisiopatologica da farmacoterapia*. 2 ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2009.

GULLO, A.; BIANCO, N.; BERLOT, G. Management of severe sepsis and septic shock: challenges and recommendations. *Crit. Care. Clin.* v. 22, n. 3, p. 489-501, 2006.

GUPTA, K.; BARRY S.; SELINSKY AND PATRICK J. LOLL. 2.0 A° structure of prostaglandin H2 synthase-1 reconstituted with a manganese porphyrin cofactor. *Acta Cryst.* v. 62, p. 151–156, 2006.

HELGELAND, L. The Action of Vitamin K and Coumarin Anticoagulants. *Biochemical Education*. v. 8, n. 3, p. 66-69, 1980.

HUANG, Q.C.; HUANG, R.Y. The cyclooxygenase-2/thromboxane A2 pathway: a bridge from rheumatoid arthritis to lung cancer? *Cancer lett.* v. 354, n. 1, p. 28-32, 2014.

INICHIELLO E, SEMERANO L, BOISSIER M-C. *Time trends in the incidence, prevalence, and severity of rheumatoid arthritis: a systematic literaturereview*. In: *Joint Bone Spine*. 2016; 83(6):625–30.

JUNG, D.H.; PARK, H.J.; BYUN, H.E.; Park; Y.M.; KIM, T.W.; KIM, B.O.; UM S.H.; PYO, S. *Diosgenin inhibits macrophage-derived inflammatory mediators through downregulation of CK2, JNK, NF-kappaB and AP-1 activation*, *Int. Immunophar-macol.* v.10, p.1047–1054, 2010.

KAWASE, M.; VARU, B.; SHAH, A.; MOTOHASHI, N.; TANI, S.; SAITO, S.; DEBNATH, S.; MAHAPATRA, S.; DASTIDAR, S.G.; CHAKRABARTY, A.N. Antimicrobial activity of new coumarin derivatives. *Arzneimittelforschung*. v. 51, n. 1, p. 67-71, 2001.

KAYSER, O.; KOLODZIEJ, H. Z. Antibacterial activity of simple coumarins: structural requirements for biological activity. *Naturforsch.* v. 54, p. 169-174, 1999.

KIKUCHI, J. et al. Peripheral blood CD4(+) CD25(+) CD127(low) regulatory T cells are significantly increased by tocilizumab treatment in patients with rheumatoid

arthritis: increase in regulatory T cells correlates with clinical response. *Arthritis Res Ther.* v. 17, n. 1, p. 10, 2015.

KOROLKOVAS, A. *Essentials of Medicinal Chemistry*. 2ed. New York: Wiley, 1988.

KUNTZ, I.D.; BLANEY, J.M.; OATLEY, S.J.; LANGRIDGE, R.; FERRIN, T.E. A geometric approach to macromolecule–ligand interactions. *J. Mol. Biol.*, v.161 p. 269–288, 1982.

LANG, P. T. et al. *DOCK 6.7 User's Manual.*, 2015.

LAURINDO, I. E. M.; PINHEIRO G. R. C.; XIMENES A. C.; et al: Consenso brasileiro para o diagnóstico e tratamento da artrite reumatóide. *Rev Bras Reumatol.* v. 42, n. 6, p. 355-61, 2002.

LEFKOWITZ, D. L.; MILLS, K.; LEFKOWITZ, S. S. et al. *Neutrophil-macrophage interaction: a paradigm for chronic inflammation.* *Med Hypotheses.* v. 44, p. 58–62. 1995.

CAMPOS-LIMA, T.; LOTUFO, C. M. C. *Avaliação morfológica e funcional do sistema sensorial nociceptivo em prole de ratas com Diabetes mellitus.* Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, 2013.

LIMA, F.O.; et al. Mechanisms involved in the antinociceptive effects of 7-hydroxycoumarin. *J. Nat. Prod.*, 2011.

LOPEZ-GONZALEZ, J.S.; PRADO-GARCIA, H.; AGUILAR-CAZARES, D.; MOLINA-GUARNEROS, J.A.; MORALES-FUENTES, J.; MANDOKI, J.J. Apoptosis and cell cycle disturbances induced by coumarin and 7-hydroxycoumarin on human lung carcinoma cell lines. *Lung Cancer.* v. 43, n. 3, p. 275-83, 2004.

LORENZETTI, B. B. et al. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. *Eur. Cytokine Netw.* v. 13, n 4, 2002, p. 456-461.

LUCETTI, E. C. P. *Efeitos centrais da cumarina (1,2-Benzopirona): estudo comportamental e neuroquímico em córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos.* 2010. 89 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

MACHADO, D. G; KASTER, M. P.; BINFARÉ, R. W.; DIAS, M.; SANTOS, A. R. S; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; RODRIGUES, A. L. S. Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molles* L. in mice: Evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Progress in neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 31, p. 412 – 428, 2007.

MARCOLAN M; MARTINS, P. A.; LIMA, C. R. G. de; MAGINI, M. R. R.; OLIVERIA H. P. M. de; CODOGNOTO, L. *Influência do solvente no sinal de fluorescência da 7-hidroxycumarina.* In: Anais XII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VIII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba 2008.

MCDUGALL J.J.; LARSON S.E. Nociceptin/orphanin FQ evokes knee joint pain in rats via a mast cell independent mechanism. *Neurosci Lett.* v. 398, p. 135–138, 2006.

MELLO, Silvana V. G. V. de. *Estudo do Efeito Anti-Inflamatório da Ageratum Conyzoides L., suas frações E compostos isolados*. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2016.

MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L. *As dores. Neurociências da Mente e do Comportamento*. 1. ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

MENEZES, M. S. S. *Efeito da olmesartana na inflamação intra-articular induzida por zymosan*. Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em saúde e sociedade. Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. 2016.

MENG, X. et al. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer Aided-Drug Design*, [S.l.], v. 7, n. 2, p. 146-157, 2011.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Pain Terms - A Current List with Definitions and Notes on Usage. *Classification of Chronic Pain*. 2. ed. Seattle, p. 209-214, 1994.

MILLER, M.C. et al. Membrane type 1 matrix metalloproteinase is a crucial promoter of synovial invasion in human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* v. 60, n. 3, p. 686-97, 2009.

MONTANARI, C. A. *Química Medicinal: métodos e fundamentos em planejamento de fármacos*. 1 ed. São Paulo: EDUSP, v.1, 2011.

MONTECUCCO, F.; STEFFENS, S.; BURGER, F.; DA COSTA, A.; BIANCHI, G.; BERTOLOTTI, M. et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1alpha) on human neutrophils through defined signalling pathways. *Cellular Signalling*. v. 20, n. 3, p. 557-68. 2008.

MOTA, L. M. H. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide. *Rev Bras Reumatol.* v. 52. p. 135-174. 2012.

MOTA, L.M. Da; CRUZ, B.A.; BRENOL, C.V.; PEREIRA, I.A.; FRONZA L.S.; BERTOLO M.B., et al. Concensus of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and early assessment of rheumatoid arthritis. In: *Rev Bras Reumatol.* v. 51, p. 199-219, 2011.

NIHCE. NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CLINICAL EXCELLENCE. *Rheumatoid arthritis: The management of rheumatoid arthritis in adults*. London, p. 1-35, 2009.

NOBACK, et al. The human nervous system: structure and function. *Pain and temperature*. 5ª ed., Williamns & Wilkins, New York. p. 123-137, 1996.

NOGUEIRA, T. M. O. *Caracterização da atividade antinociceptiva do extrato metanólico de Adiantum latifolium Lam. em modelos experimentais de dor inflamatória*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em biotecnologia em saúde e medicina investigativa. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador -Bahia. 2016.

ODOBASIC, D. et al.; Endogenous myeloperoxidase is a mediator of joint inflammation and damage in experimental arthritis. *Arthritis Rheumatol.* v. 66, n. 4, p. 907-17, 2014.

OLIVEIRA, A.V. *Análise dos gastos do Ministério da Saúde com medicamentos para tratamento da artrite reumatoide no Brasil no período 2010 a 2014*. Universidade de Brasília. Brasília, 2015.

ORLANDO, B. J.; LUCIDO, M. J.; MALKOWSKI, M.G. The structure of ibuprofen bound to cyclooxygenase-2. *Journal of Structural Biology.* 189 (2015) p. 62–66.

PEDERSEN, L. H., SCHEEL-KRUGER, J. et al. Amygdala GABA-A receptor involvement in mediating sensory-discriminative and affective-motivational pain responses in a rat model of peripheral nerve injury. *Pain*, v. 127, n. 1-2, p. 17-26, 2007.

PEI, J.; WANG, Q.; LIU, Z.; LI, Q.; YANG, K.; LAI, L. PSI DOCK: towards highly efficient and accurate flexible ligand docking. *Proteins*, v. 62, n. 4, p. 934-946, 2006

PETTERSEN, E.F.; GODDARD, T.D.; HUANG, C.C.; COUCH, G.S.; GREENBLATT, D.M.; MENG, E.C.; FERRIN, T.E. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, v. 25, p. 1605–1612, 2004.

PIAUILINO, C. A. *Investigação comparativa da atividade antinociceptiva do 2-feniletanol livre e complexado com  $\beta$ -ciclodextrina em modelos de nocicepção aguda e dor neuropática*. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia –RENORBIO, Ponto Focal, Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina, 2017.

PINTO, L.G.; CUNHA, T.M.; VIEIRA, S.M.; LEMOS, H.P.; VERRI, W.J.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain*. v. 148, n. 2, p. 247-256, 2010.

QUINTANS, J.S; BARRETO R.S, DE LUCCA W Jr; VILLARREAL, C.F; KANETO, C.M; SOARES M.B; BRANCO, A.; ALMEIDA J. R; TARANTO, A. G; ANTONIOLLI, A. R; FREITAS, R. M; QUINTANS, L. J Jr. Evidence for the Involvement of Spinal Cord-Inhibitory and Cytokines Modulatory Mechanisms in the Anti-Hyperalgesic Effect of Hecogenin Acetate, a Steroidal Sapogenin-Acetylated, in Mice. In: ***Molecules***. v. 19, n. 6, p. 8303–8316, 2014.

RAMESH, B.; PUGALENDI, K.V. Antihyperglycemic effect of umbelliferone in streptozotocin-diabetic rats. *J Med Food*. 2006 Winter;9(4):562-6, 2006.

REBELO, Ana I. de M. A. *Diosgenina e derivados oxidados: potenciais agentes antitumorais e antifúngicos*. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade da Beira Interior. Covilhã, 2011.

ROCHA, A. P. C. *et al.* Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. v. 57, p. 94 – 105, 2007.

RODRIGUES, R. P. *et al.* Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos. *Revista Virtual de Química*, [S.l.], v. 4, n. 6, 2012.

SACHS, D. *et al.* Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and interleukin-8 induce persistent mechanical nociceptor hypersensitivity. *Pain*, v. 96, n.1-2, p. 89-97, 2002.

SALENTIN, S.; SCHREIBER, S.; HAUPT, V. J.; ADASME, M. F.; SCHROEDER, M. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. In: *Nucleic Acids Res.* v. 43, p. 443-447, 2015.

SALTER, R. B. *Distúrbios e lesões do sistema músculo-esquelético*. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1985.

SANTOS, E. S. dos; MACÊDO L. de S.; MATIAS, E. C.; BARBOSA, Maildon Martins. Resposta da cultura do inhame à fertilização com macro e micronutrientes em um Argissolo Vermelho-Amarelo Distrófico arênico. In: *Revista. Tecnol. & Ciên. Agropec.* João Pessoa, v. 3, n. 3, p. 39-46, 2009. Acesso em 19 de fev. 2019.

SCHAIBLE, H. G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. *Langenbecks Arch Surg.* v. 389, n. 4, p. 237-43, 2004.

SCHAIBLE, H.G.; EBERSBERGER, A.; VON BANCHET, G.S. Mechanisms of pain in arthritis. *Ann N Y Acad Sci*, v. 966. p. 343-54, 2002.

SCHAIBLE, H. G.; GRUBB. B.D. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain*. v. 55, n. 1, p. 5-54, 1993.

SCHRÖDINGER. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3*, 2009.

SEIFERT, M. H. J.; WOLF, K; VITT, D. Virtual high-throughput in silico screening. *Biosilico*. v. 1, n. 4, p. 143-149, 2003.

SHISHODIA, S.; AGGARWAL, B.B. Diosgenin inhibits osteoclastogenesis, invasion, and proliferation through the downregulation of Akt, I kappa B kinase activation and NF-kappa B-regulated gene expression. In: *Oncogene*, v. 25, p. 1463–1473, 2006.

SHOICHET, B.K. KUNTZ, I.D. BODIAN, D.L. Molecular docking using shape descriptors, In: *J. Comput. Chem.* v. 13 p. 380-397, 1992.



STEFANOVA, T. H. et al. Antitumor and immunomodulatory effect of coumarin and 7-hydroxycoumarin against Sarcoma 180 in mice. *J Exp Ther Oncol*. 2007.

SILVA, C.O. *Características anatômicas e fisiológicas de Typha domingensis Per. Submetida a concentrações crescentes de arsênio*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras. 2014.

SILVA JUNIOR, F.S.; ROCHA, F.A.C. Artrite induzida por zymosan em ratos mecanismos envolvidos na hipernocicepção e na lise da cartilagem articular. *Acta Reum Port.*, v. 31, p. 143-149, 2006.

SIMMONDS, R.E.; FOXWELL, B.M. NF- $\kappa$ B and its relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology*. v. 47, p. 584-90, 2008.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. *Rheumatoid arthritis*. *Lancet*. v. 388, p. 2023-38. 2016.

SINGH, M.; HAMID, AA.; MAURYA, AK; PRAKASH O.; KHAN, F.; KUMAR, A.; AIYELAAGBE, OO; NEGI, AS, BAWANKULE, DU. Synthesis of diosgenin analogues as potential anti-inflammatory agents. In: *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. v. 143, p. 323-333, 2014

SIQUEIRA FILHO, J. A. A extinção inexorável do Rio São Francisco. SIQUEIRA FILHO, J. A. (Org.) In: *Flora das Caatingas do Rio São Francisco: História Natural e conservação*. 1. ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio Editorial, 2012.

STAHL, E. A. et al. Genome-wide association study metaanalysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet*. v. 42, n. 6, p. 508-14, 2010.

SWEENEY, S. E.; FIRESTEIN, G. S. Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation. *Int. J Biochem Cell Biol*. v. 36, n. 3, p. 372–378, 2004.

TAYLOR, P. C.; MEHTA, P.; TULL, T. Aetiopathology of rheumatoid arthritis. *MEDICINE*, v. 38, n. 4, p. 163-166, 2010.

TIMONEN, J.M.; et al. Synthesis and anti-inflammatory effects of a series of novel 7-hydroxycoumarin derivatives. *Eur. J. Med. Chem*. v. 46, n. 9, p. 3845-50, 2011.

USNAYO, M.J.G. et al. Estudo da frequência dos alelos de HLA-DRB1 em pacientes brasileiros com artrite reumatoide. *Rev. Bras. Reumatol*. v. 51, n. 5, p. 474-483, 2011.

VASCONCELOS, J.F.; TEIXEIRA, M.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; NUNES, X.P.; GIULIETTI, A.M.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M.B.; Effects of umbelliferone in a murine model of allergic airway inflammation *Eur. J. Pharmacol*. v. 609, p. 126–131, 2007.

VITOR, A. O. P., E. L. Psicofarmacologia da dor: uma revisão bibliográfica. *R. Eletr. de Com. Inf. Inov. Saúde*. v. 2, n. 1, p. 87-96, 2008.

- WANG, W.; JIAN, Z.; GUO, J.; NING, X. *Increased levels of serum myeloperoxidase in patients with active rheumatoid arthritis*. v. 117, n. 1, 2014.
- WANG, L.; MA, T.; ZHENG, Y.; LV, S.; LI, Y.; LIU, S. Diosgenin inhibits IL-1 $\beta$ -induced expression of inflammatory mediators in human osteoarthritis chondrocytes. In: *Int J Clin Exp Pathol*. v. 8, n. 5, p. 4830–4836, 2015.
- WATKINS, L.R. et al. Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) hyperalgesia. *Brain Res.*, v. 692, n.1-2, 1995, p. 244-250.
- WERMUTH, C. G. Strategies in the search for new leads compounds or original working hypothesis. In: WERMUTH, C. G. *The Practice of Medicinal Chemistry*. 2 ed. San Diego: Academic Press, p.69-89, 2003d.
- WIPKE, B.T.; ALLEN, P.M. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol*. v. 167, n. 3, p. 1601-8, 2001.
- VAZ, A. E.; FARIA JUNIOR, W. A.; LAZARSKI, C. F. S.; CARMO, H. F.; ROCHA SOBRINHO, H.M. *Perfil epidemiológico de pacientes portadores de artrite reumatoide em um hospital escola de medicina em Goiânia, Goiás, Brasil*. Medicina (Ribeirão Preto). v. 46, p. 141–53, 2013.
- VOGELPOEL, L.T.C. et al. Control of cytokine production by human Fc gamma receptors: implications for pathogen defense and autoimmunity. *Front Immunol*. v. 6, p. 79, 2015.
- VONKEMAN, H., E.; van der LAAR, M., A., F., J. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Adverse Effects and Their Prevention. *Semin Arthritis Rheum*, v. 39, p. 294-312, 2010.
- YOSHIDA, Y.; TANAKA, T. Interleukin 6 and Rheumatoid Arthritis. *Biomed Res Int*. 2014.
- ZARBOCK, A.; LEY, K. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *The American journal of Pathology*. v. 172, n. 1, p. 1-7, 2008.
- ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, v. 16, n. 2, p. 109-10, 1983.