FILIPHE DE PAULA NUNES MESQUITA

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE COMPOSTOS HÍBRIDOS
ANTIINFLAMATÓRIOS E ANALGÉSICOS NÃO ESTERÓIDES
DOADORES DE SULFETO DE HIDROGÊNIO NA ARTRITE E DOR
CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

FILIPHE DE PAULA NUNES MESQUITA

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE COMPOSTOS HÍBRIDOS
ANTIINFLAMATÓRIOS E ANALGÉSICOS NÃO ESTERÓIDES
DOADORES DE SULFETO DE HIDROGÊNIO NA ARTRITE E DOR
CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Soraia Kátia Pereira Costa

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Mesquita, Filipe de Paula Nunes.

Avaliação farmacológica de compostos híbridos antiinflamatórios e analgésicos não esteróides doadores de sulfeto de hidrogênio na artrite e dor crônica / Filipe de Paula Nunes Mesquita. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Soraia Katia Pereira Costa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Dor, inflamação e sulfeto de hidrogênio.

Versão do título para o inglês: Pharmacological evaluation of hybrid compounds anti-inflammatory and analgesic nonsteroidal donors of hydrogen sulfide in arthritis and chronic pain.

1. Dor 2. Inflamação 3. Antiinflamatórios 4. Sulfeto de hidrogênio
5. Sinovite 6. Ratos I. Costa, Profa. Dra. Soraia Katia Pereira
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0189/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Filiphe de Paula Nunes Mesquita.

Título da Dissertação: Avaliação farmacológica de compostos híbridos antiinflamatórios e analgésicos não esteróides doadores de sulfeto de hidrogênio na artrite e dor crônica.

Orientador(a): Profa. Dra. Soraia Katia Pereira Costa.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **171** nas fls. **113** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Soraia Kátia Pereira da Costa**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Avaliação farmacológica de compostos híbridos antiinflamatório e analgésicos (não esteroides) doadores de H2 S na artrite e dor crônica*" do qual participam o(s) aluno(s) **Filiphe de Paula Nunes Mesquita** e os pesquisadores **Marcelo Nicolás Muscará** e **Eduardo Ekundi Valentim**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **21.11.2011**, com validade de 4 anos.

São Paulo, 23 de novembro de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

À Deus por primeiramente me ter concedido o dom da vida e a sabedoria necessária para trilhar esse caminho. Mas não só por isso, mas especialmente pelo dom da salvação, por me ter feito seu filho mesmo sem eu merecer.

Aos meus pais João e Damáres pelo amor incondicional e apoio constante em toda a minha vida.

Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Soraia Kátia Pereira Costa, por ter me aceitado prontamente desde o primeiro contato virtual que fizemos e por ter me ajudado, orientado e dado todo o suporte necessário para a realização deste trabalho.

Ao Prof^o Dr^o Marcelo Nicolás Muscará, por toda a ajuda e paciência dispensados a mim na realização deste trabalho.

Ao Prof^o Dr^o Eduardo Ekundi Valentin, pela ajuda para entender o modelo e aspectos relevantes do sulfeto de hidrogênio.

Ao Prof^o John Wallace por ter concedido o ATB-346 para a realização deste trabalho, ao Prof^o Mathew Whiteman por ter cedido o GYY4137, ao Prof^o Gilberto de Nucci e ao técnico Mauro pela ajuda na realização dos experimentos de dosagem de naproxeno e ATB-346 no plasma.

À minha querida amiga e irmã Flávia Neto, que compartilhou absolutamente todas as amarguras, felicidades e infinitas burocracias de um novo pós-graduando recém-chegado a Universidade de São Paulo. Pelas conversas e desabafos profissionais e pessoais, por ter sido a minha família mais perto quando precisei.

À minha querida amiga Karen Tiago que com seu jeito de ser “exótico” (entenda-se feliz e falante) me proporcionou amizade verdadeira à primeira vista, pelas conversas e conselhos experientes em relação ao trabalho e pesquisa. Por ter sempre me ajudado na contagem de células e plotagem dos resultados.

À doce Juliana Florenzano, pelos momentos de diversão e trabalho, pela disposição sempre constante em me ajudar na contagem celular total e diferencial, pelas dicas e conselhos sobre a vida de um pós-graduando e por se importar comigo nos momentos de necessidade.

Ao “compa” Leandro Rodrigues, por compartilhar momentos de alegria e tensão, por sempre me atualizar a respeito dos assuntos referentes ao H₂S e sempre me incentivar a discutir aspectos relevantes do meu trabalho clareando minhas ideias e abrindo possibilidades ao meu trabalho.

À Bruna Caetano, a melhor e mais dedicada ID que tive. Pelos sábados e domingos gastos nos protocolos de dor, pela realização do Von Frey, pela contagem de células e pela disposição sempre presente em fazer o que tivesse necessidade para realização do trabalho.

Aos demais colegas de trabalho do laboratório Elly, Sílvia, Flávia Lira, Cristiane, Agatha e Tuanny que partilharam minhas aflições e alegrias ao longo desta jornada, que me ajudaram na realização de experimentos e entendimento deste trabalho.

À minha querida D. Alice, que me ensinou os passos básicos nos procedimentos *in vivo*, técnicas de manipulação e coleta de amostras e pela alegria sempre contagiante mesmo quando as coisas davam errado (Tem problema não!!).

À Irene Maria Gouvea (Tiazona), que esteve presente do começo ao fim dessa jornada, me auxiliando em todos os experimentos e por mostrar que existe SIM condições de se estabelecer relacionamentos verdadeiros e duradouros de amizade e carinho (to esperando a senhora com a bengalinha na minha futura sala de Prof^o Dr^o).

À Simone Aparecida Teixeira (Super Simon), por me ensinar que apesar do excelente curriculum é possível ser humilde, alegre e cantante (lalalá lalalá, se encaixa em todas né?). Por ser a expert em análises bioquímicas e compartilhar isso com todos que precisam, por nunca se cansar de responder onde estavam os reagentes, qual reagente usar a seguir, calcular doses e etc.

Aos animais usados na pesquisa, que são ferramentas importantes para o desenvolvimento da ciência, mas que apesar de tudo são seres vivos e merecem ser tratados com todo respeito.

Aos meus irmãos, Thiago Mesquita e Cayo Rodrigues que mesmo de longe me deram todo o apoio emocional, financeiro e incentivo que me impulsionaram a continuar.

Aos amados amigos de Natal e São Paulo, pela ajuda, suporte e carinho destinados a mim mesmo longe ou perto.

Por último, mas sem dúvida não menos especial, a minha querida Laika, que com seu amor puro e simples me dá a certeza de que escolhi a profissão certa.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo apoio financeiro indispensável para o sucesso e conclusão desse trabalho.

“Demais, filho meu, atenta: não há limite para fazer livros,
e o muito estudar é enfado da carne.”

Eclesiastes 12:12

RESUMO

Mesquita FPN. Avaliação farmacológica de compostos híbridos anti-inflamatórios e analgésicos não esteróides doadores de sulfeto de hidrogênio na artrite e dor crônica. [dissertação (Mestrado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Apesar do recente conhecimento do papel fisiológico/patológico do sulfeto de hidrogênio (H_2S) em várias condições e sistemas, incluindo na artrite (sinovite) induzida por carragenina (CGN), os mecanismos envolvidos ainda não estão bem estabelecidos. Tampouco se sabe se compostos híbridos antiinflamatórios não esteroides (AINEs) doadores de H_2S possuem vantagens farmacológicas adicionais sobre a dor e inflamação quando comparados aos doadores de H_2S clássicos. Os objetivos deste estudo foram: 1) comparar o efeito farmacológico e gastroprotetor da molécula híbrida ATB-346 (naproxeno e molécula doadora de H_2S) com o AINE clássico naproxeno na artrite experimental induzida por CGN, 2) avaliar os possíveis mecanismos de ação envolvidos na ação anti-inflamatória e analgésica do doador de H_2S , reagente de Lawesson (RL; doador de H_2S), na artrite (sinovite) induzida por CGN e, 3) Padronizar e avaliar funcionalmente o impacto do tratamento agudo do doador de H_2S de liberação lenta, GYY-4137 no modelo de dor crônica induzido por quimioterápico (paclitaxel; PTX). Os resultados deste estudo mostraram que a injeção intra-articular de CGN induziu sinais e sintomas de inflamação das articulações em ratos, de maneira tempo-dependente, que foram caracterizados como comportamentos nociceptivos alterados (alodinia mecânica secundária e score de deambulação), edema da articulação, aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO), altas concentrações de prostaglandina E_2 (PGE_2) e IL- 1β no lavado sinovial somado a proeminente influxo de leucócitos (leucócitos e polimorfonucleares PMN) na membrana sinovial. O pré-tratamento dos ratos com doses crescentes de naproxeno e equimolar ATB-346 foi eficaz de uma forma dependente da dose, na redução do tempo de manifestação dos sinais inflamatórios (edema, influxo celular e MPO) e nociceptivos em comparação com o grupo sinovite respectivamente que foi tratado com veículo. Apesar da proteção anti-inflamatória equipotente entre as moléculas, ATB-346 conferiu proteção ao dano gástrico evidenciado pelo naproxeno. Estes resultados indicam que a ATB-346, apesar de não exercer uma superioridade antiinflamatória e analgésica em relação ao naproxeno, tem uma maior vantagem na medida em que evita danos gástricos dos AINEs comuns, quando administrado de forma aguda. No que diz respeito aos mecanismos protetores (inflamatório e analgésico) do doador de H_2S , o reagente de Lawesson (RL), este estudo demonstrou que o bloqueio de canais de K^+_{ATP} com glibenclamida, canal de Ca^{2+} tipo-L com verapamil, não reverteu o efeito protetor do RL e, portanto, descarta o envolvimento direto desses canais na ação farmacológica de H_2S neste modelo. O antagonismo dos receptores TRPV1 por capasazepina reverteu em parte a resposta inflamatória (atividade MPO) da RL, mas não afetou o efeito anti-nociceptivo d RL,

sugerindo que esses receptores participam do mecanismo protetor do H₂S . O presente estudo também revela pela primeira vez que o envolvimento de pelo menos uma parte da via do GMPc , independentemente dos canais de K_{ATP} , ao passo que o inibidor da guanilato ciclase solúvel, ODQ, reverteu a ação anti-inflamatória do LR . Os resultados com sildenafil, inibidor da fosfodiesterase tipo 5, reforçam esta evidência. Ainda, foi demonstrado pela primeira vez que a relevância do doador de H₂S de liberação lenta GYY-4137, para controlar os sintomas de desconforto térmico (alodinia ao frio) da dor neuropática. Coletivamente, os resultados apresentados neste estudo contribuem para confirmar a utilização potencial de doadores de H₂S na inflamação aguda e também na dor crônica.

Palavras-chave: H₂S. Inflamação. Dor. Artrite. Rato.

ABSTRACT

Mesquita FPN. Pharmacological evaluation of hybrid compounds anti-inflammatory and analgesic nonsteroidal donors of hydrogen sulfide in arthritis and chronic pain. [dissertation (Masters thesis in Pharmacology)] São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 2013.

Despite the recent knowledge of the biological role of hydrogen sulfide (H_2S) in various systems and pathological conditions, such as arthritis (synovitis) induced by carrageenan (CGN), the mechanisms involved are not yet well established. Nor is it known whether hybrid compounds antiinflammatory drugs (NSAIDs) donor of H_2S or H_2S donors simply exert additional pharmacological advantages over the pain and inflammation when compared to classical NSAIDs. This time, the objectives of this study include: 1) comparatively evaluate the pharmacological effect of the hybrid molecule ATB-346 (naproxen and H_2S donor molecule) with the NSAID naproxen in the classic model of acute arthritis (synovitis) experimental CGN induced in rats 2) assess the possible mechanisms involved in the anti-inflammatory and analgesic effects of H_2S donor alone in the same experimental model, and 3) standardize and evaluate the impact of acute treatment with H_2S donor slow release GYY-4137, in the model of chronic pain induced by chemotherapeutic paclitaxel (PTX). The results of this study showed that intra-articular injection of CGN induced signs and symptoms of joint inflammation in rats, time-dependent manner, which were characterized as nociceptive behaviors altered (secondary allodynia score and ambulation), joint swelling, increased myeloperoxidase activity (MPO), high concentrations of prostaglandin E_2 (PGE_2) and IL-1 β in the joint lavage and prominent with concomitant influx of leukocytes (polymorphonuclear leukocytes, PMNs) in the synovium. Pretreatment of rats with increasing doses of naproxen and equimolar ATB-346 was effective in a dose dependent manner, reducing the time equivalent of the inflammatory signs (swelling, and cellular influx MPO) and nociceptive group compared with synovitis the respective control group treated with vehicle ignited. Despite the equipotent antiinflammatory protection between molecules, ATB-346 conferred protection to the gastric damage evidenced by naproxen. These results indicate that the ATB-346, despite the superiority of exerting anti-inflammatory and analgesic equipotent to naproxen, has a greater advantage in that prevents gastric damage of the common NSAIDs, whether administered acutely. With regard to protectors mechanisms (inflammatory and analgesic) from the donor H_2S , Lawesson's reagent (LR), this study demonstrated that blockade of K^+_{ATP} channels with glibenclamide, L-type Ca^{2+} channel with verapamil, did not reverse the protective effect of LR and therefore dismisses the direct involvement of these channels in the pharmacological action of H_2S in this model. The TRPV1 receptor antagonism by capsaizepina reversed in part the inflammatory response (MPO activity) of LR but did not affect the anti-nociceptive effect of LR, suggesting that these receptors participate in the mechanism of H_2S . The present study also revealed for the first time the involvement of at least part of the cGMP pathway regardless of K_{ATP} channels, whereas the soluble guanylate

cyclase inhibitor, ODQ, antiinflammatory action reverses the LR. The findings with sildenafil, phosphodiesterase type 5 inhibitor, reinforce this evidence. Still, it was demonstrated for the first time the relevance of donor H₂S slow release GYY-5137, to control the uncomfortable symptoms (cold thermal allodynia) of neuropathic pain. Collectively, the results presented in this study contribute to confirming the potential use of H₂S donors in acute inflammation and also in chronic pain.

Keywords: H₂S. Inflammation. Pain. Arthritis. Rat

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da síntese e metabolismo endógeno do H ₂ S em células de mamíferos pela ação das enzimas CSE e CBS.....	19
Figura 2. Representação da articulação sinovial (saúdável) do joelho.....	24
Figura 3-A. Efeito do tratamento com ATB-346 na avaliação temporal do edema articular e alodinia mecânica secundária.....	46
Figura 3-B. Efeito do tratamento com ATB-346 no escore de dor referida na 2 ^a h (C) e 4 ^a h (D) de ratos com artrite induzida por carragenina.....	47
Figura 4. Efeitos do ATB-346 no recrutamento de leucócitos na cavidade articular em ratos com artrite induzida pela CGN.....	49
Figura 5. Efeitos do tratamento com o ATB-346 e do Naproxeno sobre a atividade da MPO em estômagos de ratos.....	51
Figura 6. Efeito do bloqueador dos canais de K ⁺ _{ATP} na ação protetora do RL na artrite induzida por CGN em ratos.....	53
Figura 7. Efeito do bloqueador dos canais de Ca ²⁺ tipo-L e bloqueador de receptores TRPV1 na ação protetora do RL na artrite induzida por CGN em ratos.....	55
Figura 8 A-C. Efeito do inibidor da guanilato ciclase solúvel (ODQ) na ação protetora do RL na artrite induzida por CGN em ratos.....	58
Figura 8 D-F. Efeitos comparativos do inibidor da guanilato ciclase solúvel e do inibidor de fosfodiesterase na sinovite induzida por CGN.....	59
Figura 9. Efeito do tratamento com o reagente de Lawesson sobre os níveis de PGE ₂ na membrana sinovial de ratos com sinovite evocada por injeção i.art. da CGN.....	61
Figura 10. Efeito do tratamento com o reagente de Lawesson sobre as concentrações de citocinas IL-1 β e IL-10 na membrana sinovial de ratos com sinovite evocada por injeção i. art. da CGN.....	63
Figura 11. Avaliação do efeito do RL sobre as enzimas GPx, GR e GST na membrana sinovial de ratos com sinovite evocada por injeção i. art. da CGN.....	65
Figura 12. Cinética de liberação de sulfeto no estômago de animais tratados com o ATB e Na ₂ S.....	67
Figura 13. Biodisponibilidade do Naproxeno e ATB-346 no plasma.....	69
Figura 14. Efeito da administração de PTX ou Veículo na evolução temporal da alodinia térmica.....	71
Figura 15. Efeito da administração de PTX ou Veículo na evolução temporal da atividade motora.....	72
Figura 16. Efeito da administração de PTX ou Veículo na evolução ponderal do ganho de peso dos animais.....	73
Figura 17. Efeito do tratamento com o doador de liberação lenta de H ₂ S sobre a dor neuropática estabelecida.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamentos farmacológicos utilizados no estudo de equivalência do ATB.....	32
Tabela 2. Tratamentos farmacológicos para o estudo do mecanismo de ação do H ₂ S.....	33
Tabela 3. Tratamentos farmacológicos utilizados no estudo de dor neuropática.....	34
Tabela 4. Escores de Locomoção.....	37
Tabela 5. Efeito dos bloqueadores de canais iônicos na infiltração leucocitária de ratos com sinovite induzida por CGN.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Artrite Reumatóide
DMARDs	Drogas antirreumáticas modificadoras de doença
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
IL-6	Interleucina 6
MAPK's	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
AINES	Antiinflamatórios não esteroides
AIES	Antiinflamatórios esteroides
COX 2	Ciclooxigenase 2
H ₂ S	Sulfeto de Hidrogênio
CSE	Cistationina- γ -liase
CBS	Cistationina- β -sintase
MST	3-mercaptopiruvato sulfurtransferase
CAT	Cisteína aminotransferase
S ₂ O ₃ ²⁻	Tiosulfato
TST	Cianeto sulfurtransferase
SO ₃ ²⁻	Sulfito
SCN ⁻	Tiocianato
CH ₃ SCH ₃	Metanotiol
LPS	Lipopolissacarídeo
FLA ₂	Fosfolipase A ₂
RL	Reagente de Lawesson
MPO	Enzima mieloperoxidase
i.pl.	Intraplantar
NO	Óxido nítrico
K ⁺ _{ATP}	Canais de potássio dependentes de ATP
TRPV1	Receptores de potencial transitório do tipo V1
TRPA1	Receptores de potencial transitório do tipo A1
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 β
mm	Milímetros
DO	Densidade óptica
GPx	Glutathione peroxidase
GSSG	Glutathione oxidada
GR	Glutathione redutase
CGN	Carragenina
GLIB	Glibenclamida
VER	Verapamil
CPZ	Capsazepina
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalina-1-um
DMSO	Dimetilsulfóxido
i. art.	Intra-articular
sGC	Guanilato ciclase solúvel
IASP	Associação Internacional de Estudos para Dor
PTX	Paclitaxel

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Sulfeto de Hidrogênio (H ₂ S)	18
1.2 Farmacologia dos doadores de sulfeto de hidrogênio na inflamação e dor	20
1.3 Inflamação articular	23
1.4 Dor neuropática	26
1.5 Justificativa do estudo.....	28
1.6 Objetivos e estratégias.....	30
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
2.1 Animais e delineamento experimental	32
2.2 Indução da artrite por carragenina	34
2.3 Indução da dor neuropática	34
2.4 Avaliações dos parâmetros inflamatórios	35
2.4.1 Avaliação do diâmetro do joelho (edema)	35
2.4.2 Coleta do fluido sinovial e contagem celular.....	35
2.4.3 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)	36
2.5 Avaliação dos parâmetros nociceptivos.....	36
2.5.1 Avaliação de dor espontânea em animais com artrite.....	36
2.5.2 Avaliação de Alodinia Mecânica – Von Frey.....	37
2.5.3 Avaliação de Alodinia Térmica – Teste da acetona	37
2.5.4 Avaliação da atividade motora – Rota Rod Teste	38
2.6 Avaliações dos parâmetros bioquímicos	39
2.6.1 Análise dos Níveis de PGE ₂ em membrana sinovial.....	39
2.6.2 Determinação da concentração de citocinas IL-1β e IL-10 no lavado sinovial	39
2.6.3 Determinação da atividade da glutathione peroxidase (GPx) em membrana sinovial	40

2.6.4 Determinação da atividade da glutathione redutase (GR) em membrana sinovial	41
2.6.5 Determinação da glutathione S-transferase (GST).....	41
2.7 Determinação das concentrações plasmáticas de naproxeno e ATB346.....	42
2.8 Dosagem de sulfeto total no estômago de animais naive.....	43
2.9 Análise estatística.....	44
3 RESULTADOS	45
3.1 Análise comparativa dos efeitos analgésico e antiinflamatório da molécula híbrida doadora de H ₂ S (ATB-346) e do AINE naproxeno no curso temporal da sinovite (artrite) induzida por CGN	45
3.2 Efeito antiinflamatório comparativo entre a molécula híbrida doadora de H ₂ S (ATB-346) e o AINE naproxeno no influxo de leucócitos (total e diferencial) induzido por CGN na cavidade articular de ratos com sinovite (artrite) 5 h após.....	48
3.3 Análise comparativa do efeito lesivo da molécula híbrida doadora de H ₂ S (ATB-346) e o AINE naproxeno na mucosa estomacal de ratos após 5 h do tratamento.....	50
3.4 Avaliação do mecanismo de ação da resposta inibitória do doador rápido de H ₂ S, reagente de Lawesson, na sinovite induzida por CGN	52
3.4.1 Papel dos canais de potássio dependente de ATP (K_{ATP}) no efeito protetor do RL na inflamação articular e comportamento nociceptivo induzido por CGN	52
3.4.2 Papel dos canais de Ca^{2+} tipo- L e dos canais de potencial transitório do tipo V1 (TRPV1) no efeito protetor do RL na artrite induzida por CGN	54
3.5 Efeito dos bloqueadores de canais iônicos no influxo leucocitário.....	56
3.6 Participação da via da guanilato ciclase solúvel nos efeitos protetores do RL em animais com sinovite induzida por CGN	57
3.7 Análises bioquímicas	60
3.7.1 Concentrações de PGE_2 na membrana articular de ratos com sinovite na presença de doador de H ₂ S.....	60
3.7.2 Avaliação da concentração de citocinas no lavado sinovial de ratos com sinovite tratado com o RL	62
3.8 Cinética de liberação do H ₂ S do ATB-346 e Na ₂ S no estômago	66
3.9 Biodisponibilidade do Naproxeno e ATB-346 no plasma	68

3.10 Análise da evolução temporal no estabelecimento de dor crônica em animais tratados com o quimioterápico Paclitaxel (PTX) e veículo.	70
3.11 Análise do efeito do doador de H ₂ S, GYY 4137, em animais com dor neuropática induzida por Paclitaxel (PTX) estabelecida via testes de alodinia térmica e teste de atividade motora.	74
4 DISCUSSÃO	76
4.1 Estudo comparativo da molécula híbrida AINE doadora de H ₂ S ATB-346 e o AINE naproxeno sobre a sinovite induzida por CGN.....	76
4.2 Avaliação dos mecanismos da ação protetora do doador de H ₂ S, reagente de Lawesson, na inflamação articular (sinovite) evocada por CGN.....	78
4.3 Estudo do efeito do doador de liberação lenta de H ₂ S em modelo de dor neuropática induzida pelo quimioterápico Paclitaxel (PTX).	87
5 CONCLUSÕES	91
6 REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sulfeto de Hidrogênio (H_2S)

O enxofre (S) é um mineral natural encontrado, em particular, próximos às crateras vulcânicas e águas termais, cujo cheiro característico de "ovo podre", causado pelo gás dióxido de enxofre que escapa para o ar é comum. Ademais, o gás sulfeto de hidrogênio (H_2S) é bem conhecido por seus efeitos tóxicos ocupacionais. De acordo com Abe e Kimura (1996), a exposição de trabalhadores que limpavam esgotos à baixas concentrações do H_2S promove redução ou deleção da sensibilidade olfatória, além de induzir hipotensão e ceratoconjutivite. Em casos de intoxicações mais graves com a exposição ao H_2S verificou-se efeitos centrais, que levaram à inconsciência e dificuldade respiratória. Outros sistemas como o sistema cardiovascular, gastrointestinal, renal e a pele também são afetados de forma menos pronunciada (Reiffenstein et al., 1992). O enxofre é um elemento que pertence ao grupo 3 da tabela periódica, o grupo dos calcogênios, possui número atômico 16 e massa atômica 32,065 u, à pressão de 1 atm e temperatura de 20 °C é encontrado no estado físico sólido e possui um cheiro característico de algo podre.

Curiosamente, nos últimos cinco anos, um composto que leva esse elemento em sua composição vem sendo amplamente estudado como um novo gasotransmissor endógeno em mamíferos, através da sua forma de sulfeto de hidrogênio (H_2S) importante na regulação de vários processos fisiológicos e patológicos relacionados ao aparelho cardiovascular, bem como na resposta imune inata.

No que tange à produção do H_2S , sabe-se que ela ocorre via reações não enzimática e enzimática, onde pelo menos quatro tipos foram descritas até o presente. Uma das formas não enzimáticas de produção de H_2S ocorre nos eritrócitos humanos frente ao aumento do estresse oxidativo e hiperglicemia, onde o enxofre é reduzido a partir de uma reação não enzimática (Searcy, Lee, 1998). Na produção enzimática do H_2S , participam desse processo as enzimas Cistationina- γ -liase (CSE), Cistationina- β -sintase (CBS), 3-mercaptopiruvato sulfurtransferase (MST) e a Cisteína aminotransferase (CAT) (vide Figura 2; Wang, 2012).

A enzima CSE é reconhecida como a principal responsável pela produção de H_2S em órgãos e tecidos periféricos, pois de fato sua expressão é abundante nos sistemas cardiovascular e respiratório. Além disso, órgãos como o rim, fígado, útero e pâncreas

exibem a expressão dessa enzima (Wang et al., 2013). A CSE utiliza a cisteína e a homocisteína como substratos para a formação de H_2S . Nesse processo, a forma ativa da vitamina B6 atua como co-fator para a geração de H_2S . A CSE e também a CBS são encontradas somente no citosol das células. A expressão desta forma é mais abundante no sistema nervoso central, especialmente nos astrócitos mais do que nos neurônios do hipocampo e cerebelo. Ao contrário, em tecidos periféricos, como os sistemas cardiovascular e respiratório, a expressão dessa enzima é baixa. De forma semelhante à síntese do H_2S via CSE, a produção de H_2S dependente da CBS também utiliza a cisteína e homocisteína como substratos, e o cofator vitamina B6 (Wang, 2012).

Por seu turno, a geração de H_2S via reação enzimática também depende das enzimas MST e CAT, ambas encontradas no citosol e na mitocôndria, além do sistema nervoso central e periférico. Envolve a participação do co-fator Vitamina B6. A ação enzimática da CAT, com o co-fator vitamina B6, sob a cisteína, leva à geração de 3-mercaptopiruvato (3-MP), que subsequentemente é metabolizado pela ação da MST (e do co-fator Zn)(Shibuya et al., 2009).

Figura 1. Esquema da síntese e metabolismo endógeno do H_2S em células de mamíferos pela ação das enzimas CSE e CBS.

Fonte: Modificado de Wang, 2012

Conforme mencionado acima, a síntese e metabolismo do H_2S pode ocorrer tanto no citosol quanto em organelas, como a mitocôndria, onde as reações de oxidação são comuns. Por exemplo, na mitocôndria duas moléculas do gás formam uma molécula de

tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$): $2\text{HS}^- + \text{O}_2 \rightarrow \text{S}_2\text{O}_3^{2-}$. Este produto, por ação enzimática da sulfato cianeto sulfurtransferase (TST), é catalizado em sulfito (SO_3^{2-}) e tiocionato (SCN^-): $\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + \text{CN}^- \rightarrow \text{SCN}^- + \text{SO}_3^{2-}$ (Caliendo et al. 2010). No citosol, em contrapartida, ocorre principalmente reações de metilação, cujo principal produto formado é o metanotiol (CH_3SH).

O H_2S formado pode ser excretado por vias distintas, tais como respiração, urina (sulfato), nas fezes e em flatulências na forma de sulfeto (Wang, 2012).

1.2 Farmacologia dos doadores de sulfeto de hidrogênio na inflamação e dor

Diante de melhor conhecimento da biossíntese e degradação do H_2S endógeno, vários compostos sintéticos doadores de sulfeto de hidrogênio (de liberação rápida e lenta) foram desenvolvidos e empregados em estudos experimentais e clínicos (Coruzzi et al., 2007). Desde então, a literatura vem demonstrado um papel biológico importante do H_2S no sistema cardiovascular, gastrointestinal e, principalmente, em processos inflamatórios e nociceptivos de controle central e periférico (Yang et al., 2008; Zhao et al., 2001).

Em concentrações fisiológicas no sistema nervoso central, o H_2S e polissulfetos regulam a expressão e função de alguns neurotransmissores (Kimura, 2013) e, por conta disso, seu envolvimento na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (Eto et al., 2002) e mal de Parkinson (Hu et al., 2010) vem sendo proposto. Kimura, Kimura (2004) sugerem que o H_2S exerce ação anti-oxidante no sistema nervoso central em cultura de neuronios submetidas a estresse oxidativo causado por glutamato, enquanto Gong et al, (2011) demonstram que esse gás inibe a neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS) nesse compartimento, sugerindo um papel antiinflamatório. Em cultura primária de células da microglia e astrócitos de roedores, Hu et al, (2007) observaram que o H_2S , tanto endógeno como exógeno, inibe a expressão da iNOS. A adição do doador de H_2S (NaHS) na cultura de células da microglia estimulada com LPS reduziu significativamente a fosforilação da MAPKp38 e, conseqüentemente, a geração do $\text{TNF-}\alpha$. Na cultura de astrócitos estimulada com LPS, o tratamento com NaHS reduziu de maneira concentração-dependente a produção de NO.

No que tange ao papel protetor do H_2S exógeno em modelos de dor e inflamação, os primeiros relatos de trabalhos que empregaram doadores de H_2S clássicos (liberação rápida)

revelaram resultados surpreendentes; porém, muito controversos, mesmo quando se empregava o mesmo modelo experimental. Por exemplo, di Villa Bianca et al, (2010) demonstraram que tanto a injeção intraplantar do doador de H_2S (NaHS), quanto do seu substrato (L-cisteína) induziu edema de pata camundongos. Em contrapartida, no modelo de edema de pata induzido por CGN, Zanardo et al, (2006) relataram que os doadores, NaHS e Na_2S , quando previamente injetados em ratos, reduziram significativamente o edema da pata evocado pela CGN, a níveis comparáveis aos alcançados pelo AINE diclofenaco de sódio, demonstrando assim uma atividade antiinflamatória para o H_2S . Corroborando esses achados, estudo anterior do nosso grupo revelou que, assim como o AINE indometacina, o tratamento i. art. de ratos com o doador de H_2S , reagente de Lawesson (RL), inibiu marcadamente os sinais inflamatórios e nociceptivos da sinovite induzida por CGN (Ekundi-Valentim et al., 2010). A inibição da síntese endógena de H_2S com a DL-Propargylglycine (PGly) não afetou os parâmetros inflamatórios e nociceptivos, muito embora potencializou o número de macrófagos na cavidade articular dos animais com sinovite.

Noutro modelo experimental, de isquemia cerebral em ratos, Qu et al, (2006) observaram que a administração do NaHS aumentou significativamente o processo isquêmico nos animais, indicando novamente um papel pró-inflamatório do H_2S . Todavia, no modelo de isquemia e reperfusão cardíaca em camundongos, o tratamento dos animais com o Na_2S limitou a extensão da lesão e preservou a função do ventrículo esquerdo, conferindo assim um efeito citoprotetor e antiinflamatório para esse gás (Elrod et al., 2007). Estudo posterior de Wallace et al, (2009) reforça as propriedades antiinflamatórias dos doadores de H_2S num modelo de colite induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico em ratos. Segundo esses autores, o mecanismo envolvido é dependente, pelo menos em parte, da síntese de citocinas pró-inflamatórias. Esses mesmos autores observaram que a administração dos inibidores da síntese de H_2S agravava o quadro de colite e, consequentemente, aumentava a taxa de mortalidade.

Investigando-se a resposta nociceptiva, Kawabata et al, (2007) observaram que a administração i.pl. do doador de H_2S (NaHS) induz hipernocicepção mecânica em ratos, a qual foi revertida pela administração de inibidores da síntese de H_2S . Paralelamente, em modelo de nocicepção mecânica inflamatória induzida por LPS Cunha et al, (2008) observaram um efeito antiinflamatório para o H_2S . Segundo esses autores, a

hipernocicepção mecânica induzida pelo LPS foi reduzida pelo tratamento dos animais com o inibidor da síntese endógena de H₂S (PAG), bem como pelo doador exógeno de H₂S (NaHS).

No tocante ao papel antiinflamatório e antinociceptivo do H₂S, alguns grupos de pesquisa vêm desenvolvendo moléculas híbridas de relevância antiinflamatória e analgésica, como os AINES, associada a uma molécula doadora de H₂S. Em termos moleculares, os compostos híbridos antiinflamatórios doadores de H₂S compreendem uma molécula de um AINE conhecida combinada a uma molécula liberadora do H₂S [5 - (4-hidroxifenil)-3H-1,2-dithiole-3-tiona] (ADT-OH). Quando administradas, essas moléculas sofrem metabolização das carboxilesterases, que leva a liberação lenta de H₂S (Sidhapuriwala et al., 2007).

Dentre as moléculas híbridas disponíveis comercialmente, estão os derivados do diclofenaco (S-diclofenaco), ácido acetil-salicílico (S-aspirina) e naproxeno (ATB-346) (Sidhapuriwala et al., 2007; Liu et al., 2011; Wallace et al., 2009). O derivado do naproxeno (ATB-346) é uma das preparações de escolha, pois possui menor toxicidade cardiovascular em relação aos demais AINEs (Kearney et al., 2006). Ademais, o H₂S liberado do composto ATB-346, em baixas concentrações, protege o estômago das lesões do naproxeno e acelera a cicatrização de úlceras pré-existentes (Wallace et al., 2009).

Em modelo de dor visceral, Distrutti et al, (2006) observaram que o composto híbrido doador de H₂S derivado da mesalamina (ATB-429) (reduz a dor visceral em modelo de distensão colorretal em ratos, além de reduzir a magnitude das contrações abdominal nesse mesmo modelo. Além disto, Li et al, (2007) verificaram que o composto híbrido S-diclofenaco reduz a infiltração de leucócitos induzida por LPS no pulmão e fígado dos ratos, enquanto o derivado de mesalamina reduz a infiltração de outra população celular (granulócitos) em modelo de colite em rato (Fiorucci et al., 2007).

Em modelo de neuroinflamação *in vitro* (cultura de células da microglia), tanto o tratamento destas com S-diclofenaco quanto S-aspirina reduz a geração local de TNF- α , IL-6 e geração de NO, sugerindo que tais compostos possuem propriedades antiinflamatórias em células do SNC, tornando-as potenciais candidatos para o tratamento de doenças neurodegenerativas inflamatórias, como o Alzheimer e a doença de Parkinson.

Os mecanismos pelos quais o H₂S confere efeito antiinflamatório e anti-nociceptivo não foram totalmente elucidados, embora vários estudos vêm demonstrando o envolvimento de canais iônicos. Por exemplo, no modelo de distensão colorretal, o efeito protetor do H₂S parece estar relacionado à abertura dos canais de K⁺ dependentes de ATP

(K_{ATP}^+) (Lee et al., 2010) , muito embora ainda não se sabe de que forma isto acontece para abrir os canais de K_{ATP} (Distrutti et al., 2005). Em paralelo, Jiang et al, (2010) observaram que o H_2S interage com resíduos extracelulares de cisteína de rvKir6.1/rvSUR₁ clonados.

A modulação de canais de Ca^{2+} tipo-T e tipo-L, canais de Na^+ , canais de Cl^- e receptores de potencial transientes (ex.: receptores de potencial transitório do tipo V1 [TRPV1] e A1 [TRPA1]) também já foram demonstrados como possíveis mecanismos de ação para a resposta protetora do H_2S na dor e inflamação (Peers et al., 2012). Em termos moleculares, outros estudos sugerem que o efeito antiinflamatório do H_2S provém da inibição de fatores como o NF- κ B e I κ B- α (Gao et al., 2012).

1.3 Inflamação articular

Em geral, a articulação do tipo sinovial envolve movimentos de grande amplitude, na qual os ossos estão protegidos por uma membrana cartilaginosa e um tecido fibroso de alta resistência, que auxilia na proteção da junção (encontro) dos ossos, denominada cápsula articular. Essa estrutura se mantém estável pela ação dos ligamentos, que também são formados por tecidos fibrosos, podendo ser parte da cápsula articular, localizando-se fora ou dentro da mesma. Interiormente, a cápsula ou cavidade articular contém um líquido lubrificante, denominado sinóvia ou líquido sinovial (Cabral, 2006).

Devido à propriedade flexível das articulações, as lesões nessas estruturas são comuns com o tempo/idade, particularmente na articulação do joelho (Figura x), visto tratar-se de uma articulação móvel, que sustenta o peso do corpo. Assim, a estabilidade desta depende quase que inteiramente de seus ligamentos e músculos associados (Cabral, 2006). Desta feita, as mudanças degenerativas nessas articulações ocorrem devido ao desgaste e, também, oriundos de doenças autoimunes (ex.: artrite reumatoide) ou lesões, que podem resultar em processos inflamatórios.

Literalmente, o termo que descreve a inflamação articular é amplamente conhecido como artrite. Do prefixo “artro” (origem grega arthros), que significa articulação, e o sufixo “ite”, que significa inflamação, obtém-se a etimologia da palavra artrite. Substituindo-se o sufixo “ite” pelo sufixo “ose” (degeneração), forma-se a etimologia da palavra artrose. Todavia, o termo artrite é geralmente utilizado para descrever qualquer condição onde ocorra lesão da cartilagem. A inflamação, se presente, instala-se na membrana sinovial.

Figura 2. Representação da articulação sinovial (saudável) do joelho.

Fonte: Modificado de Gladis Franck, 2011

Dependendo do tipo e estágios da artrite, as sintomatologias são comuns, mesmo com a etiologia variada. Desta feita, acabam sendo confundidas entre si e inúmeros sinônimos se aplicam. A proporção da lesão na cartilagem bem como da inflamação na sinóvia pode variar; todavia, sabidamente a artrite reumatóide (AR) representa uma das doenças mais comuns e dolorosas do sistema articular (El Zorkany et al., 2013). Ademais, a osteoartrite e a artrite traumática são de grande ocorrência na população, sendo esta última mais comum aos jovens esportistas, e distingue-se das demais.

A osteoartrite relacionada à articulação do joelho, acomete cerca de 33,6% da população acima dos 65 anos de idade no mundo (Hame, 2013). Ainda segundo Senna (2004) a osteoartrite está presente em 4,14% da população brasileira. Já em relação ao surgimento da artrite de origem traumática, essa é mais comum em pessoas do sexo masculino e está fortemente associada ao desenvolvimento de uma osteoartrite no futuro (Clegg et al., 2010).

Já a AR é uma doença de caráter sistêmico inflamatório crônico e de natureza autoimune de grande complexidade e para a qual ainda não existe terapia que leve a cura (Kloesch et al., 2012). Nessa desordem, as causas são desconhecidas, mas sabe-se que vários componentes do sistema imunológico, como as citocinas, células T e B, quimiocinas, proteinases e outros mais, participam desse processo (Haseeb, Haqqi, 2013).

O tratamento para a AR vem sofrendo mudanças consideráveis nas últimas décadas. Na prática, recomenda-se a terapia inicial com drogas antirreumáticas modificadoras de doença (DMARDs), não biológicas como o metotrexato, azatioprina e ciclosporina. Porém, em casos de refratariedade recomenda-se o emprego de agentes biológicos, tais como

inibidores do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), o tocilizumab (anticorpo monoclonal humanizado anti-IL-6) e o rituximab, um anticorpo monoclonal quimérico anti-proteína de superfície celular CD20, encontrada primariamente em linfócitos B (Shetty et al., 2013). Além disso, o emprego na clínica médica e veterinária da glucosamina e condroitina tem crescido nos últimos anos (Eleotério et al., 2012; Ramiro et al., 2012), bem como a aplicação de inibidores de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK's), que vem sendo discutido como uma das formas complementares à terapia da AR. Todavia, o surgimento dos efeitos adversos desencadeados por tais agentes biológicos tem gerado controvérsias quanto ao uso e custo-benefício (Paunovic, 2013). Compete acrescentar que os agentes biológicos, além de causarem efeitos adversos como febre, calafrios, dor torácica, oscilação de pressão arterial, dispnéia, prurido e/ou urticária, também aumentam a chance de infecções (Nam et al., 2010). Adicionalmente, a terapia biológica gera gastos elevados, dificultando a adesão dos pacientes (Furneri et al., 2012).

Há mais de dez anos, a introdução no mercado dos inibidores seletivos da enzima COX 2 se apresentava como a alternativa mais viável, pois se acreditava que esses AINES seletivos para COX-2 promoveriam menor risco de desconforto e irritações no trato digestório quando comparados aos inibidores não seletivos da COX (Solomon et al., 2011). Porém, essa indicação passou a ser mais criteriosa após relatos de efeitos adversos graves no aparelho cardiovascular, rins e sistema nervoso central (Ferraz-Amaro et al., 2009).

No tratamento farmacológico do tipo sintomático, que tem por objetivo aliviar a sintomatologia da doença, auxiliando no retardo do progresso da doença, usa-se como fármacos de escolha, os AINES não seletivos e, em menor proporção, os seletivos para COX-2 e, os esteroides (AIES), que sabidamente induzem sérios efeitos adversos com a terapia prolongada, que muitos pacientes desconhecem (Ferraz-Amaro et al., 2009).

Em adição à terapia farmacológica, é importante ressaltar que alguns pacientes optam por terapias alternativas ou de suporte, que visam minimizar os sintomas da doença, assegurando maior qualidade de vida do paciente por muito mais tempo. Dentre estas, os banhos sulfurosos datam de longo período, onde os portadores de doenças musculoesqueléticas relatavam melhoras e, até, remissão dos sintomas da doença (Leibetseder et al., 2004). Outros estudos mais antigos sugerem que os banhos sulfurosos são seguros e eficazes na redução dos sintomas e sinais da AR por períodos longos, como três meses (Pratsel et al., 1992; Sukenik et al., 1990). Evidências bioquímicas em plasma

mostram que os banhos sulfurosos reduzem o estresse oxidativo em pacientes com osteoartrite, pois aumentam a atividade das enzimas antioxidantes e melhoram a taxa lipídica no sangue (Ekmekcioglu et al., 2002).

1.4 Dor neuropática

De acordo com a Associação Internacional de Estudos para Dor (IASP, 2011), a dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos que sugerem tal dano. Pode ser classificada quanto ao seu tempo de duração em dor aguda ou crônica. A dor aguda varia de um período rápido podendo chegar até aproximadamente três meses. Esse tipo de dor possui um valor biológico, uma função protetora de fuga e/ou defesa, que alerta o indivíduo sobre alguma alteração e posteriormente geralmente ocorre a, restauração da integridade do organismo. Ela frequentemente resulta de lesão tecidual ou doença, identificáveis facilmente que ao serem solucionadas eliminam a dor, além de ser tida também como um processo autolimitado.

Já a dor do tipo crônica geralmente persiste por um período superior a três meses podendo ser contínua ou recorrente. Não possui valor biológico de alerta para o indivíduo e usualmente não exerce função protetora (Galluzzi, 2007). Persiste além do período razoável de resolução da condição causal ou que acompanha doenças naturalmente crônicas, ou seja, persiste mesmo após a retirada do fator causal sendo considerada por si só como uma doença a ser tratada (Fornasari, 2012).

Em relação a origem da dor crônica, ela pode ser de origem neuropática, funcional e também nociceptiva. A dor crônica do tipo neuropática é um tipo de dor causada por uma lesão ou disfunção do sistema nervoso não podendo ser explicada por um processo de doença individual ou de um único local específico de danos e pode ser resultado de um trauma (síndrome de dor regional complexa, dor pós-operatória crônica (Fanea, Voroneanu 2008), infecção (neuralgia pós-herpética) (Gan et al., 2013), isquemia (neuropatia diabética) (Li et al., 2013) ou pode ser quimicamente induzida, por exemplo, como resultado de quimioterapia. Além do mais, a dor neuropática pode ser dividida em periférica, central ou mista (central e periférico) (Saha et al., 2012).

A dor neuropática induzida quimicamente por um antineoplásico como o Paclitaxel (PTX) é um grave problema a ser resolvido, pois se constitui como causa da não continuidade do tratamento, redução da dose do fármaco ou até mesmo hospitalização dos pacientes (Aoki et al., 2012).

Sabe-se ainda que a dor do câncer pode ser influenciada pelo tipo de câncer, localização e extensão do mesmo (Yamaguchi et al., 2012). Na Europa, por exemplo, a prevalência da dor severa a moderada em pacientes com câncer está próxima de 56% e nesses pacientes, cerca de 39% apresentam componentes de dor, característicos de dor neuropática (Virginie Piano et al., 2013).

Nas próximas três décadas, espera-se um aumento do número de casos de câncer ao redor de 20% nos países desenvolvidos e de 100% nos países em desenvolvimento. Atualmente, mais da metade dos nove milhões de casos novos de câncer ocorre nos países em desenvolvimento (Pimenta et al., 1997).

Em relação a fisiopatologia da dor crônica, sabe-se que ela tem início nos neurônios sensitivos primários, que vão detectar e converter estímulos nociceptivos em atividade elétrica. Posteriormente, essa resposta é conduzida pelos axônios dos nervos periféricos até as raízes dorsais e depois para o corno posterior da medula espinal. As fibras A β são as responsáveis pela transmissão dos sinais dos mecanorreceptores de baixo limiar e as fibras do tipo C (não mielinizadas) junto com as fibras do tipo A δ (mielinizadas) são as responsáveis pela transmissão dos estímulos nociceptivos (Klusakova et al., 2009). O estímulo então segue através de neurônios da medula espinal que vão se projetar no tálamo e núcleos do tronco.

A fisiopatologia da dor crônica ainda não é algo totalmente elucidado. Sabe-se, porém, que pode acontecer a nível periférico ou central. As alterações resultantes no sistema nervoso periférico são caracterizadas como sensibilização de terminações nervosas sensitivas em quadros como os de dor neuropática. Um dano tecidual vai resultar em diversas alterações químicas através da liberação de íons de potássio, substância P, peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP), bradicinina, prostaglandinas e outros mediadores liberados de maneira intracelular como íons H⁺ e ATP (Chen et al., 2004). Essas substâncias vão agir aumentando a sensação dolorosa nos nociceptores.

A PGE₂ possui um importante papel na transmissão da sensação dolorosa, reduzindo o limiar de nocicepção ao se ligar com seus receptores específicos que por sua vez estão acoplados com quinases citoplasmáticas. O receptor de PGE₂ ativado vai ativar a adenilato

ciclase, aumentando as concentrações de AMPc no interior da célula que por sua vez vai ativar a proteína quinase-A depende de AMPc que irá abrir canais de Na^+ propagando o impulso nervoso. Além do mais pode ocorrer a produção de fatores como IL-1 β e TNF- α . A COX-2 é uma importante fonte de produção de PGE_2 que vai aumentar ainda mais a transmissão dolorosa. Bradicininas e leucotrienos também podem, de maneira direta, agir sobre os nociceptores, sensibilizando-os (Woolf, 2004).

A sensibilização a nível central, também ocorre em quadros de dor neuropática, sendo caracterizada por um aumento da excitabilidade na transmissão de neurônios nociceptivos (Schaible, Richter 2009). Primeiramente um forte estímulo nociceptivo chega aos neurônios aferentes secundários no corno dorsal causando uma abundante liberação de glutamato e outros peptídeos. A ativação dos receptores AMPA de glutamato vai causar despolarização da membrana plasmática, remover os íons magnésio que estavam bloqueando os receptores NMDA, causando assim sua ativação (Woolf, 2004).

Os receptores NMDA nos neurônios aferentes secundários, vão ter papel importante na sensibilização central. Esses receptores são permeáveis aos íons cálcio que além de contribuir para a despolarização de neurônios de segunda ordem vão atuar como mensageiros ativando quinases dependente do cálcio/calmodulina. Essas quinases são responsáveis pela fosforilação dos receptores NMDA e consequente alteração da transmissão neuronal (Malik, Stillman 2009).

As alterações mais drásticas ocorrem quando neurônios de segunda ordem sofrem alterações genéticas, resultando em plasticidade neuronal alterada. Já foi observado em pacientes humanos e roedores que neurônios nociceptivos e fibras nervosas de baixo limiar que chegam até as laminae superficial e profunda do corno dorsal, respectivamente, vão passar por um processo de rearranjo físico na medula espinal aumentando a sensibilidade à dor. Esse processo ainda não é completamente elucidado e não se sabe como revertê-lo (Fornasari, 2012).

1.5 Justificativa do estudo

A relevância social e econômica das doenças articulares, em particular da AR, é alta no mundo inteiro, artrite reumatoide (AR) é uma doença com alta incidência e prevalência mundial que afeta cerca de 1-2% da população ao redor do mundo, sendo que,

aproximadamente, 15% destes apresentam manifestações graves da doença (Walsh et al., 2005). No cenário brasileiro a prevalência dessa doença atinge em torno de 0,46% da população, podendo causar danos sociais e econômicos significativos (Senna et al., 2004). De fato, recente boletim do Sistema Único de Saúde (DATASUS, 2011) registrou 19.978 internações de pacientes com quadros clínicos de AR e outras poliartropatias inflamatórias, totalizando um dispêndio dos cofres públicos por volta de R\$ 13.830.164,88. Cabe ressaltar que nesse montante não estão incluídos os custos com medicamentos dispensados no ambulatório SUS. A alta prevalência e tratamentos pouco eficazes em pacientes que possuem dor crônica do tipo neuropática, admitindo-se que, apesar de todas as possibilidades terapêuticas, ainda é muito difícil ter uma remissão completa da dor neuropática. Somente 30 a 50% dos pacientes apresentam uma redução da dor clinicamente importante (Gilron et al., 2006). Percebe-se que novas opções terapêuticas mais eficazes, bem como estudos de mecanismos fisiopatológicos são ainda necessários, em vista dos efeitos adversos dos fármacos utilizados bem como o elevado custo para as classes terapêuticas mais novas.

Admitindo-se o potencial benéfico e protetor dos banhos sulfurosos, bem como dos doadores de H_2S (exógeno) em modelos experimentais de dor e inflamação, incluindo do nosso grupo (Ekundi-Valentim et al., 2010), acreditou-se ser pertinente aprofundar esse conhecimento, comparando o efeito da molécula híbrida doadora de H_2S associada ao AINE naproxeno (ATB-346) e o naproxeno isolado, bem como averiguar os mecanismos envolvidos no efeito protetor do doador de H_2S em nosso modelo experimental, além de observar se o doador de liberação lenta de H_2S , GYY 4137, é eficaz em modelo de dor neuropática induzida por quimioterápico.

Acredita-se que a execução do presente projeto contribuiu para o melhor conhecimento do papel biológico desse gás, além de acrescentar informações na área de farmacologia da inflamação e dor, no que tange ao potencial de emprego de novos fármacos antiinflamatórios e analgésicos no tratamento de condições inflamatória/dolorosa aguda e crônica.

1.6 Objetivos e estratégias

Diante do exposto, os objetivos deste estudo foram:

1. Avaliar comparativamente o efeito do AINE naproxeno em relação ao efeito da molécula híbrida AINE (naproxeno) doadora de H₂S (ATB-346) no modelo de sinovite induzida por CGN, concomitantemente com as possíveis ações irritantes de ambas no estômago;
2. Caracterizar farmacologicamente os possíveis mecanismos envolvidos na ação protetora do doador de H₂S de liberação rápida, sobre os sinais e sintomas da sinovite induzida por CGN;
3. Avaliar o possível efeito do tratamento agudo com o doador de liberação lenta GYY 4137, na dor crônica induzida por quimioterápico.

Estratégias:

Para atingir tais objetivos, empregou-se modelos de doenças em ratos já estabelecidos na literatura e grupo, e ensaios funcionais (*in vivo*) e bioquímicos (*in vitro*), a saber:

- I. Nas avaliações nociceptivas, empregou-se o teste de Von Frey para o registro da alodinia secundária, o teste de escore de deambulação para o registro de dor referida, o teste tópico (cutâneo) com acetona para avaliar a alodinia térmica ao frio e, por fim, o teste Rota Rod para avaliar a atividade motora;
- II. A mensuração da inflamação articular (edema) foi realizada com o auxílio do paquímetro digital. A quantificação da população de células inflamatórias no lavado sinovial, bem como a atividade da enzima MPO na sinóvia e estômago, marcador de neutrófilo, foi realizada via contagem de células com base na morfologia destas e o ensaio colorimétrico (Bradley et al., 1982), respectivamente.
- III. Avaliou-se a concentração de PGE₂ e citocinas (IL-1b e IL-10) na cavidade articular (sinóvia) via ensaio imunoenzimático (Elisa). A atividade de algumas enzimas

antioxidantes (GR, GPx e GST) foi realizada na sinóvia via reações de redução e outras, usando-se co-fatores;

- IV. A biodisponibilidade (cinética) das moléculas ATB-346 e do naproxeno foi realizada com o auxílio de cromatografia líquida acoplado ao espectrômetro de massa (HPLC-MS-MS), usando-se o diclofenaco como padrão interno.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e delineamento experimental

Os experimentos foram realizados de acordo com o certificado aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (protocolo nº 171, fls 113, livro nº 2/2011) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEEa-ICB/USP). Neste estudo foram utilizados ratos machos Wistar, com 6 a 8 semanas (160 a 300g) de idade, obtidos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os animais foram mantidos, em grupos de cinco, em caixas plásticas com água e ração *ad libitum* no Biotério do Departamento de Farmacologia, com temperatura e ciclo de iluminação controlados (22°C; claro/escuro, 12/12hs).

Na comparação entre os efeitos do AINE naproxeno e da molécula híbrida doadora de H₂S (ATB-346) foram empregadas as doses de 0.3, 1.0, 3.0 e 10 mg/kg de naproxeno e os seus equivalentes molares de ATB-346 0.48, 1.6 , 4.8 e 16 mg/kg. Ambas foram administradas por via oral (v.o) 60 min antes da injeção i.art. de CGN e diluídas em CMC 0,2 %.

Tabela 1. Tratamentos farmacológicos utilizados no estudo de equivalência do ATB

Fármaco/Droga	Dose	Via	Referências
Naproxeno	0,3; 1,0; 3,0 e 10 mg/kg	v.o. – 60 min	O objetivo foi utilizar doses baixas e altas do AINE
ATB-346	0,48; 1,6; 4,8 e 16 mg/kg.	v.o. – 60 min	O objetivo foi utilizar doses baixas e altas do doador híbrido

Para avaliar o papel dos canais de K^+ dependentes de ATP (K^+_{ATP}), canais de Ca^{2+} tipo-L, dos receptores TRPV1 e da via da guanilato ciclase solúvel no mecanismo protetor do H_2S usou-se o esquema terapêutico conforme tabela abaixo.

Tabela 2. Tratamentos farmacológicos para o estudo do mecanismo de ação do H_2S

Fármaco/Droga	Dose	Via	Referências
Carragenina (CGN)	3% (50 μ l/cavidade)	i.art.	Ekundi-Valentim et al, (2010)
Reagente de Lawesson (RL)	3,6 μ mol/cavidade	i.art. - 60 min	Ekundi-Valentim et al, (2010)
Glibenclamida (GLIB)	40 mg/kg	i.p. – 45 min	Zanardo et al, (2006)
Verapamil (VER)	25 mg/kg	i.p. - 60 min	Sirmagul et al, (2004)
Capsazepina (CPZ)	25 μ g/kg	s.c. – 60 min	Wick et al, (2006)
1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3- a]quinoxalina-1-um (ODQ)	2 mg/kg	i.p. – 30 min	Jesse et al, (2008).

Para o modelo da dor neuropática induzida por quimioterápico (PTX), o esquema de tratamento utilizado foi do tipo terapêutico, ou seja, somente 12 dias após a administração da primeira dose de PTX e tendo sido comprovado o estabelecimento da hiperalgesia neuropática pela administração repetitiva de quatro doses do fármaco, os animais receberam então por via intra-peritoneal (i.p.) o doador de H_2S , GYY 4137, na dose de 50 mg/kg, diluído em solução salina (Li et al., 2009).

Tabela 3. Tratamentos farmacológicos utilizados no estudo de dor neuropática

Fármaco/Droga	Dose	Vias de administração e esquema terapêutico	Referências
Paclitaxel (PTX)	2 mg/kg	i.p. 4 aplicações em dias alternados	Okubo et al, 2011
Veículo (25 % Cremophor, 25% etanol e 50% Salina)	2 ml/kg	i.p. 4 aplicações em dias alternados	Okubo et al, 2011
GY 4137	50 mg/kg	i.p. Aplicação única no 12º dia	Li et al, 2009

2.2 Indução da artrite por carragenina

O modelo de sinovite (artrite aguda) induzida por CGN foi realizado, de acordo com Ekundi-Valentim et al, (2010). Para isto, os animais foram submetidos à anestesia transitória, por via inalatória, com a mistura de isoflurano em oxigênio (3 %; Matrix Medical, Orchard Park, NY, USA). Com o auxílio de uma seringa e agulha (30G; BD Franklin Lakes, NJ, USA), foi realizada a injeção intra-articular (i. art.) CGN (50 µl; 3 %) ou seu veículo salina (50 µl) no joelho esquerdo. A seguir, os animais foram submetidos aos testes experimentais (itens 2.3.1, 2.4.1 e 2.4.2) e, depois submetidos à eutanásia 4 h depois com uma concentração alta de isoflurano (5 %), seguida de deslocamento cervical.

2.3 Indução da dor neuropática

O modelo de dor neuropática foi induzido, conforme Okubo et al, (2011). O fármaco anti-neoplásico Paclitaxel (PTX) foi administrado pela via intra-peritoneal (i.p., 2 mg/kg) em dias alternados (dia 1, 3, 5 e 7) aos ratos, resultando num total de quatro aplicações. A droga foi dissolvida em uma solução contendo 50 % de Cremophor e 50 % de Etanol até atingir uma concentração de 4 mg/ml. Antes da injeção, a droga foi novamente diluída com solução

salina até atingir uma concentração de 2 mg/ml, para então ser injetada (Aoki et al., 2012). Os experimentos de curso temporal foram realizados até o 12º dia onde então os animais foram utilizados nos ensaios e experimentos relativos a ação do doador de H₂S, GYY 4137, como descrito nos itens a seguir.

2.4 Avaliações dos parâmetros inflamatórios

2.4.1 Avaliação do diâmetro do joelho (edema)

Com o auxílio do paquímetro digital (Starret 727) em um ambiente isento de barulho e com pouca luz, a medida do diâmetro articular (em mm) do joelho esquerdo de cada animal foi realizada, em triplicata, antes (basal) e 4 h após a injeção i.art. de CGN, conforme o estudo prévio do grupo (Ekundi-Valentim et al., 2010). A média das três leituras final foi subtraída da média inicial e esse resultado expresso como Δ em milímetros (mm).

2.4.2 Coleta do fluido sinovial e contagem celular

Após a eutanásia dos animais, com o auxílio de uma seringa (0,3 ml, BD Micro-Fine insulin syringe, EUA e agulha ultrafina 30 G) contendo salina estéril (0,1 ml), o espaço i.art. do joelho dos animais foi lavado de acordo (Ekundi-Valentim et al., 2010). O volume injetado foi coletado juntamente com o fluido sinovial e as amostras desse lavado foram utilizadas para contagem de células (total e diferencial) ou armazenadas em freezer (-80 °C).

Amostras de 20 μ l do fluido sinovial obtidas foram diluídas em solução PBS (200 μ l). Para a contagem total, o volume de 10 μ l da amostra diluída do lavado articular foi diluído em no volume de 190 μ l da solução de Turk 20%. A seguir, o volume de 10 μ l dessa mistura foi disposto em câmara de Neubauer, e submetida à contagem total de células, que foi expressa como número de células x 10⁴/ml.

A contagem diferencial dos leucócitos no lavado dos joelhos foi realizada por técnica de citocentrífuga (MOD 2400; Fanem, Brasil) e as lâminas foram coradas com May-Grunwald-Giemsa modificado (Rosenfeld, 1947), sendo as células diferenciadas de acordo com sua morfologia. Os resultados foram expressos como número de células (x10⁴) por

cavidade e os tipos celulares foram quantificados sob microscopia óptica de acordo com a morfologia destas.

2.4.3 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A avaliação da atividade da enzima MPO, uma medida indireta da infiltração leucocitária, foi realizada na amostra do tecido da membrana da capsula articular dos animais. Cada amostra foi pesada e homogeneizada em tampão fosfato de potássio (K_2PO_4 , 5 mM, pH 6,0) contendo 0,5 % do detergente e brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB; 50mg/1ml) e, posteriormente, foi aquecida (60 °C) 2 h para inativação da catalase endógena. Após centrifugação dessas amostras (10.000 g, 5 min), um volume de 10 µl do sobrenadante foi coletado e disposto em microplaca, juntamente com 200 µl do tampão K_2PO_4 (5 mM, pH 6,0) contendo a solução dihidroclorato de *o*-dianisidina (0,164 mg/ml) e água oxigenada (0,0005 %). A medida de densidade óptica, em comprimento de onda de 460 nm, foi feita em leitor de ELISA (Expectra Max Plus 384, Sunyvale, CA, EUA) durante 10 min, em intervalos regulares de 11 s. A atividade de MPO foi expressa em unidade de MPO/g de tecido, onde uma unidade de MPO é definida como aquela capaz de degradar 1 µmol de H_2O_2 por minuto (Bradley et al., 1982).

2.5 Avaliação dos parâmetros nociceptivos

2.5.1 Avaliação de dor espontânea em animais com artrite

A avaliação da dor espontânea nos diferentes grupos experimentais com sinovite foi realizada baseando-se no padrão de mudança no comportamento de locomoção dos animais antes e após a indução da artrite, via teste de locomoção, de acordo (Ekundi-Valentim et al., 2010). O animal foi deixado livremente, durante 5 minutos, sob uma superfície lisa (120 x 60 cm) em uma sala isenta de barulho mediante o olhar de um observador alheio aos tratamentos. Nesse período, o observador atribuiu os escores de 0 a 3 correspondentes as alterações no comportamento de deambulação/locomoção de cada animal (Ekundi-Valentim et al., 2010; Otsuki et al., 1986).

Tabela 4. Escores de Locomoção

Escore	Comportamento de locomoção
0	Normal e contínuo com as 4 patas
1	Distúrbio leve na locomoção (andar mancando)
2	Recolhe intermitentemente a pata injetada
3	Pata injetada recolhida na maior parte do tempo

2.5.2 Avaliação de Alodinia Mecânica – Von Frey

O teste de alodinia (Von Frey, 1897) foi realizado com pequenas modificações de acordo com o estudo anterior do grupo (Ekundi-Valentim et al., 2010). Os animais foram colocados em caixas de acrílico com assoalho de arame não maleável na forma de rede durante 15-30 min. As alterações nos limiares nociceptivos foram avaliadas exercendo-se uma pressão linearmente crescente no centro da superfície plantar da pata do animal até a observação do comportamento de remoção dessa pata (flinches). A intensidade de hipernocicepção (em gramas) foi determinada 3 vezes em cada tempo e a medida final foi quantificada pela diferença entre a resposta obtida antes (tempo 0 h) e depois a injeção de CGN (4 h). Os resultados foram expressos como Δ de reação (em gramas).

No modelo de dor neuropática, nos teste de evolução temporal realizaram-se medidas a cada 3 dias, ou seja, nos dias 3, 6, 9 e 12 (o último dia de execução do protocolo) (Deng et al., 2012). No último dia (12º dia), foi realizada uma medida basal dos animais e posteriormente mais duas medidas, uma após a 2ª e 4ª hora depois da aplicação do doador de H₂S, GYY 4137.

2.5.3 Avaliação de Alodinia Térmica – Teste da acetona

A realização do teste da acetona foi conforme descreveu (Deng et al., 2012) com pequenas modificações. Os mesmos animais que realizaram o teste da avaliação da alodinia mecânica foram submetidos ao teste da acetona. Porém essa avaliação foi realizada na pata direita dos animais. Na superfície plantar direita de cada animal foi colocada em contato, com o auxílio da seringa e agulha (30G; BD Franklin Lakes, NJ, USA), 50 µl de acetona a 100 %

(Sakurai et al., 2009). A ponta da agulha em momento algum chegou a tocar a superfície plantar do animal, um cuidado para que a aplicação de acetona não inadvertidamente resultasse na estimulação mecânica da pata com a ponta da agulha. Os animais foram observados por 40 s, e o teste foi repetido 3 vezes, ocorrendo um intervalo entre cada repetição do teste de cerca de 3 a 5 min. Comportamentos que foram quantificados e classificados como comportamento nociceptivo incluíram a retirada da pata estimulada do solo, elevação da pata estimulada, lambidas na pata estimulada e repetitivo pisar na pata estimulada. Nos testes de evolução temporal foram realizadas medidas a cada 4 dias (Deng et al., 2012). No último dia, foi realizada uma medida basal dos animais e posteriormente mais duas medidas, uma após a 2ª e 4ª hora depois da administração do doador de H₂S, GYY 4137.

2.5.4 Avaliação da atividade motora – Rota Rod Teste

A avaliação da atividade motora foi realizada com o aparelho Rota Rod para ratos, Insight – Pesquisa e Ensino. Os animais foram previamente habituados ao aparelho, onde por 3 dias consecutivos foi realizado um treino por dia para habituação, afim de evitar estresse aos animais na hora da realização do teste. Foi realizada uma medida basal no dia 0, antes dos animais receberem qualquer tipo de tratamento. No modelo de dor neuropática, nos experimentos de evolução temporal, os testes foram realizados nos dias 3, 6, 9 e 12, onde então os animais foram colocados no aparelho em rotação a 37 RPM. Ao cair da barra de rolagem, um sensor parava o cronometro e o visor indicava o tempo que o animal permaneceu no aparelho. Esse tempo foi anotado e utilizado para análise dos dados. No 12º dia, foi realizada uma medida basal, antes da administração do doador de H₂S e duas medidas posteriores na 2ª e 4ª após a administração do doador.

2.6 Avaliações dos parâmetros bioquímicos

2.6.1 *Análise dos Níveis de PGE₂ em membrana sinovial*

Amostras da membrana sinovial foram homogeneizadas em tampão fosfato 100mM, pH 7,4 contendo 1 mM EDTA e 10 µM indometacina (1:5) e centrifugadas (300 g, 10 min). Um volume de 100 µl de cada amostra do sobrenadante coletado e uma curva padrão de PGE₂ (concentrações de 7,8 a 1.000 pg/ml) foram aplicadas em placa pré-tratada com o anticorpo IgG policlonal anti-rato, juntamente com o anticorpo monoclonal de PGE₂ e o marcador de acordo com as instruções do fabricante (Cayman Chemicon, EUA). Em seguida, a placa foi incubada durante 18 h, à temperatura de 4 °C. Essa medida é baseada na competição entre a PGE₂ da amostra e um conjugado de PGE₂-acetilcolinesterase (PGE₂ “Tracer”) para uma quantidade de anticorpo monoclonal de PGE₂.

A placa foi lavada 5 vezes com a solução de lavagem (300 µl) e, depois, incubada com 200 µl do substrato “Ellman’s reagent”. A leitura da absorbância gerada a cada 15 s foi realizada em espectrofotômetro (Espectra Max plus 384, Molecular Devices, EUA) no comprimento de onda de 405 nm durante 1 h. Os resultados foram expressos em pg PGE₂/ml.

2.6.2 *Determinação da concentração de citocinas IL-1β e IL-10 no lavado sinovial*

Amostras de lavado sinovial dos diferentes grupos foram centrifugadas a 3000 g e os sobrenadantes obtidos foram utilizados para a determinação da concentração das citocinas IL-1β e IL-10, via ensaio de ELISA, conforme instruções do fabricante (eBioscience, EUA). Para isto, placas de 96 poços foram tratadas com o anticorpo monoclonal (100 µl) anti-IL-1β ou anti-IL-10 diluído em tampão fosfato salina (PBS, pH 7,4), por um período de 18 h, à 4 °C. Após uma série de 4 lavagens com o tampão PBS contendo 0,05 % de Tween 20, as placas foram preenchidas com a solução de bloqueio (200 µl/poço; 3 % gelatina em PBST, Sigma) e incubadas em estufa à 37 °C por 3 h. Após um novo ciclo de lavagens, 100 µL das amostras (diluídas 1:10 em tampão PBS contendo 0,1 % de BSA) ou dos padrões das citocinas

recombinantes foram adicionados à cada placa. As placas foram mantidas em temperatura à 4 °C por 18 h. Após novo ciclo de lavagens, 100 µL do anticorpo secundário específico biotilado foram acrescidos aos poços das placas e mantidos em temperatura ambiente por 2 h. Cada placa foi submetida a novo ciclo de lavagem e o volume de 100 µL de estreptavidina conjugada com peroxidase foi adicionado em cada poço e as placas foram mantidas em temperatura ambiente (22 °C) por 30 min. Após novo ciclo de lavagem das placas, a reação foi revelada pela adição de 100 µL da solução de 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico (2 N) em cada poço.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro Spectra Max plus 384 (Molecular Devices, EUA) em comprimento de onda de 450 nm com correção para 570 nm. As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com as citocinas recombinantes. As curvas padrões para IL-1β e IL-10 foram efetuada nas concentrações de 0 pg/mL (diluinte do kit), 15,625 pg/mL, 31,25 pg/mL, 62,5 pg/mL, 125 pg/mL, 250 pg/mL, 500 pg/mL, 1000 pg/mL, 2000 pg/mL e 4000 pg/mL.

2.6.3 Determinação da atividade da glutathione peroxidase (GPx) em membrana sinovial

A determinação da atividade da GPx foi realizada de acordo com o método de Flohé (1984). Este método baseia-se na medida indireta da atividade da GPx por meio de uma reação associada com a glutathione redutase (GR). A glutathione oxidada (GSSH), produzida pela redução do terc-butil hidroperóxido na presença de GPx, é reciclada para gerar seu estado reduzido através da GR e NADPH (vide reação abaixo).

Para isto, amostras de membrana sinovial dos diferentes grupos foram homogeneizadas em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) e centrifugadas (10.000 g, 10 min a 4 °C) na proporção de 1 g de tecido para 1 ml de tampão. A seguir, o volume de 30 µL do sobrenadante foi incubado (5 min, à 37 °C) com a mistura de tampão fosfato (145 µL 0,05 M

pH 7,0 + EDTA 0,1 M), glutathiona reduzida (5 μ L GSH 80 mM) e glutathiona redutase (0,048 U, 5 μ L da solução 0,0096 U/ μ L) em microplaca de quartzo. Em seguida, adicionou-se 5 μ L de terc-butil hidroperóxido 0,46 % e 10 μ L de NADPH 1,2 mM. A leitura de absorbância foi monitorada numa onda de comprimento de 340 nm por 10 min à 37 °C. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados foram expressos como μ mol GSH/min/mg proteína.

2.6.4 Determinação da atividade da glutathiona redutase (GR) em membrana sinovial

A determinação da atividade da glutathiona redutase (GR) em membrana sinovial foi realizada de acordo com o método de Carlberg e Mannervik, (1985). O método baseia-se na medida direta da atividade da GR, que utiliza o NADPH como co-fator na redução da GSSG em GSH. A oxidação de NADPH a NADP^+ é acompanhada pelo decaimento da absorbância a 340 nm, 37 °C (vide reação abaixo). Para isto, dez microlitros de amostra (obtida conforme item 2.6.3) foram adicionados ao volume de 190 μ L de meio de reação (tampão fosfato 0,05 M, contendo EDTA 50 mM; glutathiona oxidada (GSSG, 20 mg/ml e NADPH 5 μ M) em microplaca de quartzo.

O decréscimo dos valores de absorbância foi monitorado a 340 nm por 30 min à 37 °C. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados foram expressos como μ mol NADPH/min/mg proteína.

2.6.5 Determinação da glutathiona S-transferase (GST)

O método baseia-se na formação de um complexo entre a GSH e o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), catalisada pela GST (vide reação abaixo). O aumento de absorbância é diretamente proporcional à atividade da GST na amostra (Habig, 1974).

Para tanto, cada cavidade da microplaca de quartzo foi preenchida com o volume de 10 μ L de amostra diluída (1:3) em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) e em 180 μ L de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) contendo CDBN (0,1 M, 5 μ L). Essa mistura foi pré-incubada (10

min) à temperatura ambiente e, em seguida, adicionou-se a glutathiona reduzida (GSH, 15 µL, 0,1 M). A absorbância nas amostras foi monitorado numa onda de 340 nm por 15 min à 25 °C. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados foram expressos como µmol GSH conjugada/min/mg proteína.

2.7 Determinação das concentrações plasmáticas de naproxeno e ATB346

A fim de comparar a biodisponibilidade oral do naproxeno a partir dos compostos testados, os grupos de ratos receberam doses equimolares de naproxeno (10 mg / kg, po) ou ATB- 346 (16 mg / kg, v.o. ou i.v.), e em tempo determinados (até 6 h após a administração) , amostras de sangue foram coletadas da aorta abdominal descendente em tubos contendo EDTA. O plasma foi obtido por centrifugação dos tubos (2000 g a 4 °C durante 10 min), e as concentrações de naproxeno foram medidas por meio de cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a espectrometria de massa (HPLC- MS-MS) utilizando diclofenaco como padrão interno.

A cromatografia foi realizada na coluna analítica Genesis Lightn C8 4 µm (100 x 2,1 mm ID). O método tinha um tempo de corrida cromatográfica de 2,5 min e de uma curva linear de calibração durante o intervalo de 1-180 µg/ml ($r^2 > 0,9965$; limite de quantificação: 1 µg/ml) .

Para 100 µl de alíquotas do plasma (ou de padrões de calibração) foram sucessivamente adicionados 50 µl da solução de padrão interno (50 µl/ml de diclofenaco), 500 µl de água de qualidade para HPLC, 20 mL de ácido fórmico. Após agitação no vórtex durante 10 s, os compostos de interesse foram extraídos com 4 ml de dietil éter-hexano (80:20, v/v) e vortexados durante 40s, a camada orgânica superior foi transferida para tubos limpos e o solvente foi evaporado sob uma corrente suave de N₂ a 40 °C. O resíduo seco foi novamente dissolvido em 2 ml de fase móvel (80:20 v/v de acetonitrilo: solução aquosa

contendo 1 mM de ácido acético e 1 mM acetato de sódio). As amostras foram transferidas para microtubos de vidro, cobertas, colocados em um amostrador automático.

O sistema de HPLC LC10AD (Shimadzu, Kyoto, Japão) consiste em uma bomba (operada à temperatura ambiente) e um amostrador automático (mantido a 7°C), programado para injetar 10 µl. MS foi realizada numa Sciex API 3000 estágio triplo quadrupolo MS (Applied Biosystems, Foster City, CA) equipado com uma fonte de APPI, operando em modo negativo utilizando nitrogênio como gás de colisão. Os íons foram monitorados numa reação múltipla, e as transições m/z 170,00 e 229,10 $\rightarrow$ m/z 296,10 251,90 $\rightarrow$ foram usadas para a quantificação do naproxeno e diclofenaco (padrão interno), respectivamente. Os dados foram obtidos do software Analyst (versão 1.3.1, Applied Biosystems, Cheshire, UK) e as curvas de calibração para o analito foram construídas através de uma média ponderada ($1/x^2$) dos mínimos quadrados de regressão linear da relação pico-área do naproxeno-diclofenaco. Índices de pico da área de amostra desconhecidos foram então interpolados a partir da curva de calibração para obter os valores de concentração do naproxeno.

2.8 Dosagem de sulfeto total no estômago de animais naive

A dosagem de sulfeto total foi realizada via metodologia colorimétrica (formação do azul de metileno; Stipanuk, Beck 1982) com pequenas modificações feitas pelo nosso grupo (Ekundi-Valentim et al., 2010; Rodrigues, 2012). No homogenato do fluido sinovial foi adicionado Na₂S (400 mM), ATB-346 (640 mM) ou branco (PBS contendo 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH7,4). A seguir, 400 µl desse homogenato (em duplicata) foram dispostos em tubos de vidro (10 ml). Paralelamente, tubos de plástico (2 ml) contendo papel filtro (1 x 3 cm) embebido em acetato de zinco (200 µl; 1 %) foram inseridos no interior de cada tubo de vidro, ao qual foi submetido uma descarga gasosa de nitrogênio (~20 s) e fechado hermeticamente.

A dosagem de H₂S nas amostras foi realizada em intervalos crescentes de tempo de 5, 10, 20, 30, 60, 90 e 120 min, numa temperatura de 37 °C. Ao final de cada período, adicionou-se à cada tubo o HCl (500 µl; 8,5 M). Os tubos plásticos contidos no interior dos tubos de vidro foram então removidos e, em cada tubo, adicionou-se o volume de 200 µl da solução de ácido tricloroacético (10 %), cloridrato de N, N-dimetil-p-

fenilenodiamina (10 mM em HCl 7,2 M) e cloreto férrico (15 mM em HCl 1,2 M) na proporção de 2:1:1.

A seguir, a solução foi incubada por 20 min (37 °C) e, após este período, acrescentou-se nas amostras os volumes de 600 µl de álcool butílico e 50 µl de solução saturada de Nau foram adicionados. Após a centrifugação dessas amostras (10.000 g, 10 min), coletou-se 200 µl do sobrenadante (em duplicata) e aplicou-se em placa de 96 poços para leitura em leitor de microplaca (670 nm; Spectra Max plus 384, Sunnyvale, CA, EUA).

2.9 Análise estatística

Os dados obtidos no modelo de sinovite induzida por CGN foram expressos como média $\pm$ E.P.M. para valores de n animais/amostras. A análise estatística foi realizada via ANOVA (software Prism 4.0), seguida de pós-teste (Teste Bonferroni para comparações múltiplas). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. O teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de Dunn foi usado para comparações entre os grupos. $p < 0.01$ e $P < 0.001$ foram considerados significativos. Foi utilizado também o teste T, não paramétrico para entre grupos. $^{\&}p < 0.05$ vs. grupo veículo CGN foi considerado significativo. Outro teste utilizado foi One-way ANOVA seguido pelo teste de Dunnet. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ vs. grupo veículo CGN na contagem celular para comparações entre os grupos.

Os dados obtidos do modelo de dor neuropática foram analisados em forma de área sob a curva e foram expressos como média $\pm$ S.E.M. para valores de n animais/amostras. A análise estatística foi realizada via ANOVA (software Prism 4.0), seguida de pós-teste (Bonferroni).

3 RESULTADOS

3.1 Análise comparativa dos efeitos analgésico e antiinflamatório da molécula híbrida doadora de H₂S (ATB-346) e do AINE naproxeno no curso temporal da sinovite (artrite) induzida por CGN

Conforme esperado, a injeção i. art. de CGN no joelho de ratos promoveu edema articular bem como comportamentos de dor espontânea e alodinia mecânica secundária de forma tempo-dependente quando avaliado ao longo de 5 h em relação ao veículo da CGN (Figura 3-A, Painéis A, B e Figura 3-B Painéis C e D). O pré-tratamento de ratos com doses equimolares de ATB (0,48; 1,6; 4,8 e 16 mg/kg; v.o, -60 min.) e naproxeno (0,3; 1,0; 3,0 e 10 mg/kg; v.o, -60 min) reduziu ($P<0.05$ – $P<0.001$) de forma semelhante, e com perfil dependente da dose, o edema articular (Painel A) induzido por CGN nos intervalos de 3 e 5 h pós indução (Figura 3-A, painel A).

Nas doses mais elevadas ATB-346 (4,8 e 16 mg/kg) e naproxeno (3,0 e 10 mg/kg) também inibiram significativamente o comportamento de dor referida (escore) nos intervalos de 3 e 5 h após a indução (Figura 3B) bem como a alodinia mecânica secundária induzida pela CGN nos intervalos de 2 e 4 h pós indução (Figura 3-B painel C), quando comparado ao grupo controle artrite (painéis B e C). O padrão de inibição das medidas nociceptivas foi mais consistente com as maiores doses do naproxeno em relação ao ATB-346, embora essa diferença não tenha sido significativa.

Figura 3-A. Efeito do tratamento com ATB-346 na avaliação temporal do edema articular (A) e alodinia mecânica secundária (B) de ratos com artrite induzida por carragenina. A figura mostra a evolução do edema articular no período de 5h após a injeção i.art. de CGN, da alodinia mecânica secundária no período de 4h após a injeção i.art. de CGN. As barras abertas mostram o efeito da injeção i.art. da salina, as negras representam os animais controle com artrite tratados com o veículo CMC (1 ml/kg, v.o., n=14). As barras listradas e xadrezes ilustram o efeito dos tratamentos com doses crescentes de naproxeno (0,3 – 4,8 mg/kg, v.o.; n= 8-14) e ATB-346 (0,48 – 4,8 mg/kg, v.o.; n= 8-14), respectivamente. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM para n = animais. Aplicou-se o teste ANOVA duas vias plus teste de Bonferroni para comparações múltiplas. ###P<0.001 vs. Sham; *P<0.05, **P<0.01 e ***P<0.001 vs. Veículo; φP<0.05 vs. 0.3 mg/kg Naproxeno; φφφP<0.001 vs. 3 mg/kg Naproxeno.

Figura 3-B. Efeito do tratamento com ATB-346 no escore de dor referida na 2ªh (C) e 4ª h (D) de ratos com artrite induzida por carragenina. A figura mostra a evolução do escore de dor referida no período de 5h após a injeção i.art. de CGN. Os círculos abertos mostram o efeito da injeção i.art. da salina, os quadrados abertos representam os animais controle com artrite tratados com o veículo CMC (1 ml/kg, v.o., n=14). Os triângulos e losângulos ilustram o efeito dos tratamentos com doses crescentes de naproxeno (0,3 – 4,8 mg/kg, v.o; n= 8-14) e ATB-346 (0,48 – 4,8 mg/kg, v.o; n= 8-14), respectivamente. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM para n = animais. As diferenças das médias de escore (dor espontânea) foram analisadas por teste estatística não paramétrico (Kruskal-Wallis + Dunn). ##P<0.01 e ###P<0.001 vs. Sham; *P<0.05, **P<0.01 e ***P<0.001 vs. veículo.

3.2 Efeito antiinflamatório comparativo entre a molécula híbrida doadora de H₂S (ATB-346) e o AINE naproxeno no influxo de leucócitos (total e diferencial) induzido por CGN na cavidade articular de ratos com sinovite (artrite) 5 h após.

A injeção i. art. de CGN no joelho de ratos promoveu um aumento significativo na contagem de leucócitos total no lavado articular desses animais em relação ao lavado articular obtido do grupo sham 5 h após a indução (Figura 4, painel A). A análise de células diferenciais no lavado dos animais com sinovite revelou uma grande população de neutrófilos (Figura 4, painel B) seguido de linfócitos (Figura 4, painel C) e células mononucleares (Figura 4, painel D) quando comparado ao grupo controle veículo. A contagem de eosinófilos no lavado articular dos animais com sinovite não diferiu estatisticamente da contagem obtida no lavado articular do grupo controle veículo (dados não demonstrados).

Doses equimolares de naproxeno e ATB-346 quando administradas 60 minutos da indução da sinovite inibiram de forma semelhante, e de maneira dependente da dose, o influxo de células totais e diferencial (neutrófilos, linfócitos, mononucleares) quando comparado ao grupo com sinovite tratado com o veículo. Curiosamente, na dose de 1,6 mg/kg, o ATB-346 não inibiu o número de células totais e tampouco diferenciais; ao contrário das demais doses menores ou maiores, o influxo de células foi quase equiparado ao grupo sinovite tratado com o veículo. . Da mesma forma, na maior dose do naproxeno (10 mg/kg), a resposta inibitória sobre a população de células totais e diferenciais foi inferior às menores doses desse composto (Figura 4, painéis A-D).

Figura 4. Efeitos do ATB-346 no recrutamento de leucócitos na cavidade articular em ratos com artrite induzida pela CGN. Os animais foram pré-tratados com ATB-346 (0,48 mg/kg v.o.; n= 8; 1,6 mg/kg v.o.; n= 14 ; 4,8 mg/kg v.o.; n= 8; 16 mg/kg v.o.; n=8), Naproxeno (0,3 mg/kg v.o.; n= 8; 1,0 mg/kg v.o.; n= 14; 3 mg/kg v.o.; n= 8, 10 mg/kg v.o.; n= 8) e Veículo+CGN (n=14). Os dados são expressos como média $\pm$ SEM para n = animais. . Foi aplicado o teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Dunnet. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. grupo veículo CGN, #p<0.05 vs. grupo Sham

3.3 Análise comparativa do efeito lesivo da molécula híbrida doadora de H₂S (ATB-346) e o AINE naproxeno na mucosa estomacal de ratos após 5 h do tratamento

Ratos tratados com o naproxeno (10 mg/kg, v.o.; - 60 min) exibiram aumento da atividade da MPO no estômago, , embora não significativo, em relação ao grupo controle, que recebeu o veículo (CMC). O grupo tratado com a dose equimolar do ATB-346 (16 mg/kg, v.o.; - 60 min) exibiu atividade da MPO na mucosa estomoccal semelhante ao grupo controle correspondente (Figura 5).

Figura 5. Efeitos do tratamento com o ATB-346 e do Naproxeno sobre a atividade da MPO em estômagos de ratos. Os animais foram tratados com ATB-346 (16 mg/kg v.o; n= 6), naproxeno (10 mg/kg v.o; n=6) ou veículo CMC (1ml/kg, v.o., n=4). Os dados são expressos como média $\pm$ SEM para n= animais. Teste estatístico One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Bonferroni.

3.4 Avaliação do mecanismo de ação da resposta inibitória do doador rápido de H₂S, reagente de Lawesson, na sinovite induzida por CGN

3.4.1 Papel dos canais de potássio dependente de ATP (K_{ATP}) no efeito protetor do RL na inflamação articular e comportamento nociceptivo induzido por CGN

Conforme estudo anterior do grupo (Ekundi-Valentim et al, 2010) e o item 3.1 – A deste estudo, a injeção i.art da CGN (50 µl/cavidade a 3%, Fig 1, n=18) aumentou significativamente o diâmetro da articulação (edema) do joelho bem como a atividade da MPO na membrana sinovial de ratos (Figura 6, Paineis B e C), sendo essas respostas significativamente reduzidas pela tratamento local com o RL (3,6 µmol/cavidade, - 60 min, n= 7). Concomitantemente, a sinovite evocada pela CGN reduziu marcadamente o limiar de força (g) de retirada da pata (alodinia táctil secundária) quando comparado com o grupo controle injetado via i. art. com a salina (-29,09 g CGN e -1,22 salina, respectivamente; n=18 e n=5) sendo esta resposta substancialmente inibida pelo RL (Figura 5, painéis A-C).

A figura 6 (painéis A, B e C) também ilustra que o pré-tratamento (i. p., - 45 min) farmacológico dos animais com a glibenclamida, um bloqueador de canais de K_{ATP} (GLIB, 40 mg/kg, i.p., - 45 min; n=18; Zanardo et al., 2006), não afetou, de forma significativa, o comportamento nociceptivo (alodinia) e tampouco os parâmetros inflamatórios (edema articular, atividade de MPO) frente à injeção i.art. de CGN nos animais (Figura 6, painéis A, B e C; n=18). A combinação de tratamentos com a glibenclamida e RL, nas mesmas doses citadas acima, não promoveu resposta aditiva na inibição dos sinais inflamatório e nociceptivo frente ao tratamento isolado com o RL comparado com a resposta obtida no grupo tratado com cada substância isolada (Figura 6, painéis A, B e C).

Em ratos pré-tratados com o veículo da glibenclamida (DMSO 100%, 1ml/kg, i.p.; n= 16, - 45 min), o edema articular ($\Delta 3,6 \pm 0,2$; n=16), atividade de MPO ($37,0 \pm 5,9$ U/g; n=16) na membrana sinovial e a alodinia secundária ($\Delta -28,3 \pm 1,9$ g; n= 16) evocada pela CGN não diferiu estatisticamente dos mesmos parâmetros: edema articular ($3,05 \pm 0,6$ mm; n=18), atividade de MPO ($42,1 \pm 6,5$ U/g; n=18) e alodinia secundária ($- 26,3 \pm 3,7$; n= 18) em ratos com sinovite induzida por CGN controle sem co-tratamentos com veículo ou agente testes.

Figura 6. O bloqueador dos canais de K^+_{ATP} , glibenclamida, não reverte o efeito antiinflamatório e antinociceptivo do RL na sinovite induzida por CGN em ratos. As barras negras ilustram as respostas nociceptiva (painel A), o edema articular (painel B) e a atividade de MPO (painel C) na sinóvia de animais com sinovite pré-tratado com o veículo, enquanto as barras aberta, azul escuro e azul claro representam as mesmas respostas em animais com sinovite pré-tratados com o RL (3,6 μ mol/articulação, -60 min; n=7), glibenclamida (Glib 40 mg/kg, i.p.; n=18) e a mistura de glibenclamida e o RL (n=7), respectivamente). Os dados são expressos como média $\pm$ SEM para n = animais. *P <0,05 vs. carragenina (CGN, n=18). (One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Bonferroni).

3.4.2 Papel dos canais de Ca^{2+} tipo- L e dos canais de potencial transitório do tipo V1 (TRPV1) no efeito protetor do RL na artrite induzida por CGN

Conforme demonstrado anteriormente (Fig 6, A-C), o pré-tratamento com o RL (3,6 μ mol/cavidade, - 60 min; n=8) inibiu significativamente os parâmetros inflamatório e nociceptivo evocado pela CGN no modelo de sinovite de joelho em ratos (Figura 7 painéis A, B e C; n=8). O pré-tratamento de ratos com o bloqueador de canais de Ca^{2+} tipo-L, Verapamil (Ver 25mg/kg, i.p.; - 60 min; n=8) não afetou, de forma significativa, o edema articular no joelho e tampouco o aumento da atividade de MPO induzida pela injeção i. art. de CGN quando comparado ao grupo controle sinovite pré-tratado com o veículo (Figura 7, painéis B e C n=8); todavia, o tratamento com o Ver promoveu inibição da alodinia semelhante à resposta obtida com o RL. O tratamento simultâneo do RL e VER promoveu sinergismo do efeito inibitório do RL sobre a alodinia evocada pela CGN em relação ao grupo controle com sinovite tratado com o veículo ou tratado com o RL ou verapamil isoladamente. Esse mesmo tratamento com a mistura de RL e Ver reduziu significativamente o edema articular, bem como a atividade da MPO na membrana sinovial de ratos com sinovite ao mesmo nível de inibição do Ver ou RL sozinho (Figura 7, painéis B e C; n=8).

Em relação aos bloqueadores dos receptores TRPV1 o pré-tratamento de ratos com o antagonista desses receptores, Capsazepina (CPZ, 25 μ g/kg, s.c., -60 min; n=8) promoveu inibição da alodinia semelhante à resposta obtida com o RL atuando do mesmo modo na formação do edema, porém não afetou, de forma significativa, o aumento da atividade de MPO induzida pela injeção i. art. de CGN quando comparado ao grupo controle sinovite pré-tratado com o veículo (Figura 7, painéis B e C n=8); O tratamento simultâneo do RL e CPZ não promoveu inibição aditiva da alodinia nem do edema em ratos com artrite quando comparado ao grupo com artrite pré-tratado com a CPZ ou RL isoladamente (Figura 7, painéis A-B). Nota-se, contudo, que a mistura de tratamentos aumentou significativamente a atividade da MPO (Figura 7, painel C; n=8).

Figura 7. O bloqueador dos canais de Ca^{2+} tipo-L, Verapamil e dos receptores TRPV1, Capsazepina não reverte o efeito antiinflamatório e anti-nociceptivo do RL na sinovite induzida por CGN em ratos. As barras negras ilustram as respostas nociceptiva (painel A), o edema articular (painel B) e a atividade de MPO (painel C) na sinóvia de animais com sinovite pré-tratado com o veículo, enquanto as barras abertas, verde escuro e verde claro representam as mesmas respostas em animais com sinovite pré-tratados com o RL (3,6 μmol /articulação, -60 min; n=8), Verapamil (25 mg/kg, i.p., n=8 e a mistura de Verapamil e o RL (n=8), e as barras amarelo escuro e amarelo claro representam as mesmas respostas em animais com sinovite pré-tratados com Capsazepina (25 μg /kg, sc, n=8) e a mistura de Capsazepina e o RL (n=8), respectivamente. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM para n = animais. *P < 0,05 vs. carragenina (CGN, n=8). (One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Bonferroni).

3.5 Efeito dos bloqueadores de canais iônicos no influxo leucocitário

Conforme esperado, o grupo de animais que recebeu CGN (n=8) apresentou um grande aumento na contagem de células total e de neutrófilos quando comparado ao grupo tratado com RL (n=8). Além disso, nos grupos onde houve co-tratamento com o RL (Ver + RL + CGN, CPZ + RL + CGN e ODQ + RL + CGN) observou-se diferença significativa em relação ao grupo CGN. O grupo tratado com VER (Ver + CGN, n=8) e o grupo tratado com ODQ (ODQ + CGN, n=9) também apresentaram diferença significativa, porém o grupo tratado com CPZ (CPZ + CGN, n=8), não apresentou diferença significativa em relação ao grupo CGN. Na contagem de macrófagos não foi observada diferença entre os grupos estudados, no tempo avaliado.

Tabela 5. Efeito dos bloqueadores de canais iônicos na infiltração leucocitária de ratos com sinovite induzida por CGN. Os animais foram tratados com RL, CPZ e VER antes da injeção i.art. de CGN. Quatro horas depois a contagem celular total e diferencial foi realizada. Os dados estão expressos como a média $\pm$ e.p.m para n animais. * $P < 0,05$ vs. CGN.(n=8) (One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Bonferroni). * Não foi possível realizar a contagem.

Grupos	Total	Neutrófilos	Macrófagos
CGN	116 $\pm$ 30	103,3 $\pm$ 15	1,1 $\pm$ 0,6
LR + CGN	58 $\pm$ 28*	10,6 $\pm$ 4*	0,5 $\pm$ 0,3
Ver + CGN	90,2 $\pm$ 9 *	56,9 $\pm$ 5*	0,6 $\pm$ 0,4
Ver + LR + CGN	80,6 $\pm$ 12*	42,4 $\pm$ 11*	0,3 $\pm$ 0,2
CPZ + CGN	156 $\pm$ 36	145 $\pm$ 32	6,7 $\pm$ 3,5
CPZ + LR + CGN	77 $\pm$ 28*	11,9 $\pm$ 5*	0,4 $\pm$ 0,2

3.6 Participação da via da guanilato ciclase solúvel nos efeitos protetores do RL em animais com sinovite induzida por CGN

Conforme esperado, a injeção i.art da CGN (50 μ l/cavidade a 3%, Fig 10, n=5) aumentou significativamente o diâmetro da articulação (edema) do joelho dos animais, a atividade da MPO na membrana sinovial também foi aumentada além de ocorrer redução no limiar de força (g) de retirada da pata (alodinia táctil), e o tratamento prévio com o RL (3,6 μ mol/cavidade, - 60 min, n=6), na articulação bloqueou parcialmente esses sinais e sintomas (Figura 9). Em contrapartida, o pré-tratamento (i.art.) com, inibidor da guanilato ciclase solúvel (ODQ, 2 mg/kg, i.p., -30 min; n=5), não afetou de maneira significativa o comportamento nociceptivo (alodinia; Figura 8, Painel A) e tampouco o edema articular (Figura 9, Painel B) e atividade de MPO (Figura 8, Painel C) no modelo de sinovite evocado por CGN em relação ao grupo tratado com o veículo. A combinação dos tratamentos com o ODQ e o RL (n=5), nas mesmas doses isoladas, não promoveu efeito aditivo sobre a resposta protetora do RL na alodinia (Figura 8, painéis A, B e C). Todavia, o tratamento simultâneo do ODQ com o RL reverteu o efeito inibitório conferido ao RL sobre o edema articular e aumento da atividade da MPO em animais com sinovite evocado por CGN.

Conforme demonstrado na figura 8E, o tratamento com o inibidor da fosfodiesterase do tipo 5, sildenafil, isoladamente reduziu parcialmente o edema evocado pela CGN na articulação dos animais, mas não interferiu na alodinia mecânica (Figura 8D). Administrado concomitantemente com o RL, esse efeito antiinflamatório foi mais pronunciado; entretanto, novamente não afetou o comportamento nociceptivo. Em relação a atividade da MPO o sildenafil sozinho não reduziu esse parâmetro, porém quando foi co-administrado com RL houve redução (Figura 8F).

Figura 8 (painéis A-C). O inibidor da guanilato ciclase solúvel reverte parcialmente o efeito antiinflamatório do RL, porém não reverte o efeito e anti-nociceptivo do RL na sinovite induzida por CGN em ratos. As barras negras ilustram as respostas nociceptiva (painel A), o edema articular (painel B) e a atividade de MPO (painel C) na sinóvia de animais com sinovite pré-tratado com o veículo, enquanto as barras aberta, vermelho escuro e vermelho claro representam as mesmas respostas em animais com sinovite pré-tratados com o RL (3,6 μ mol/articulação, -60 min; n=8), ODQ (2 mg/kg, i.p., n=5) e a mistura de ODQ e o RL (n=5), respectivamente. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM para n = animais. *P <0,05 vs. carragenina (CGN, n=8). (One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Bonferroni).

Figura 8 (painéis D-E). Efeitos comparativos do inibidor da guanilato ciclase solúvel e do inibidor de fosfodiesterase na sinovite induzida por CGN. As barras brancas, negras, xadrezes, listradas verticalmente, listradas transversais e pontilhadas ilustram a porcentagem de edema articular (painel D) e a alodinia (painel E) em ratos com sinovite tratados com o RL (3,6 μ mol/articulação, -60 min; n=8), ODQ (2 mg/kg, i.p., n=5), a mistura de ODQ e o RL (n=5), o sildenafil sozinho (3 mg/kg; v.o.; -45 min, n=5) e associado ao RL, respectivamente. Os dados são expressos em porcentagem do efeito da CGN isoladamente. Os dados estão apresentados como média da porcentagem em $\pm$ SEM para n = animais. *P < 0,05 vs. carragenina e ##P < 0.01 vs. RL (One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Bonferroni).

3.7 Análises bioquímicas

3.7.1 Concentrações de PGE_2 na membrana articular de ratos com sinovite na presença de doador de H_2S .

No grupo de animais com sinovite induzida pela injeção i.art. de CGN (50 μ l/cavidade a 3%, Fig 9, n=7), a concentração de PGE_2 mensurada no homogenato da membrana sinovial foi estatisticamente maior do que o valor encontrado no grupo controle, que recebeu a injeção i.art. de salina (50 μ l/art, i.art., n=5). O pré-tratamento dos animais com o RL não foi capaz de diminuir a concentração elevada de PGE_2 na cavidade articular de ratos com sinovite (Figura 9; n=7).

Figura 9. Ausência de efeito do RL sobre o aumento de PGE₂ na membrana sinovial de ratos com sinovite evocada por injeção i. art. da CGN. O grupo controle foi injetado i. art. com a salina (50 µl/art, i.art., n= 5), enquanto o grupo com sinovite recebeu a CGN (50 µl, 3%, i.art., n=7) na presença (ou não) do LR (3,6 µmol/art, i.art., n=7). Após 4 h da indução, os níveis de PGE₂ foram mensurados no homogenato da membrana sinovial. Os dados estão expressos como a média ± e.p.m para n animais. *P<0,05 vs. CGN. (One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Bonferroni).

3.7.2 Avaliação da concentração de citocinas no lavado sinovial de ratos com sinovite tratado com o RL

Conforme demonstrado anteriormente por nosso grupo (Ekundi-Valentin et al., 2010), observa-se um aumento significativo da IL-1 β nos animais com sinovite induzida por CGN (50 μ l/cavidade a 3%, Fig 10-A, n=4), a qual foi reduzida pelo tratamento com RL (3,6 μ mol/art, i.art., Figura 10-A, n=5). Em contrapartida, a concentração de IL-10 nos animais com sinovite induzida por CGN (50 μ l/cavidade a 3%, Fig 10-B, n=4) foi menor quando comparado ao grupo tratado com o RL (3,6 μ mol/art, i.art., Figura 10-B, n=5).

Figura 10. Efeito do RL sobre o aumento de IL-10 e diminuição de IL-1 β no lavado sinovial de ratos com sinovite evocada por injeção i. art. da CGN. O grupo sinovite foi injetado i. art. com a CGN (50 μ l, 3%, i.art., n=7) na presença (ou não) do LR (3,6 μ mol/art, i.art., n=7). Após 4 h da indução, os níveis de IL-10 e IL-1 β foram mensurados no homogenato da membrana sinovial. Os dados estão expressos como a média $\pm$ e.p.m para n animais. *P<0,05 vs. CGN. (Teste t para comparação entre os grupos).

3.7.3 Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e da glutathione S-transferase (GST).

Analisando o homogenato da membrana sinovial de ratos com sinovite evocada pela injeção i.art. de CGN (50 µl/cavidade a 3%, Fig 11, n=9) observou-se nesse grupo um pequeno aumento na expressão da GR em relação ao grupo salina (50 µl/cavidade, i.art., Fig 11, n=5) já no grupo tratado com RL (3,6 µmol/art, i.art., Fig 11, n=8), não houve diferença em relação ao grupo salina. Na expressão da enzima GPx não houve diferença significativa entre os grupos. Em relação a enzima GST, os grupos tratados com CGN e RL mostraram uma redução significativa em relação ao grupo salina

Figura 11. Avaliação do efeito do RL sobre as enzimas GPx, GR e GST na membrana sinovial de ratos com sinovite evocada por injeção i. art. da CGN. O grupo controle foi injetado i. art. com a salina (50 $\mu\text{l}/\text{art}$, i.art., n= 5), enquanto o grupo com sinovite recebeu a CGN (50 μl , 3%, i.art., n=7) na presença (ou não) do LR (3,6 $\mu\text{mol}/\text{art}$, i.art., n=7). Após 4 h da indução, os níveis de GPx, GR e GST foram mensurados no homogenato da membrana sinovial. Os dados estão expressos como a média $\pm$ e.p.m para n animais. * $P < 0,05$ vs. CGN. (One-way ANOVA seguido do teste de comparação múltipla Bonferroni).

3.8 Cinética de liberação do H₂S do ATB-346 e Na₂S no estômago

A figura 12 demonstra que o Na₂S, quando administrado pela via oral, promoveu alta liberação de sulfeto total no estômago dos animais durante os primeiros 20 min da administração. Ao contrário, a administração pela via oral do ATB-346 evocou liberação baixa, porém constante do sulfeto total no estômago dos animais (Figura 12) em relação ao controle.

A Figura 13-B mostra os perfis cinéticos de concentrações plasmáticas do naproxeno e ATB-346 após a administração oral de 10 mg/kg (v.o) e 16 mg/kg (v.o ou i.v.) nas primeiras 6h após a administração. Com base nos valores médios das áreas sob a curva calculadas, a biodisponibilidade do naproxeno administrado oralmente a partir da análise da biodisponibilidade do ATB-346 é aproximadamente de 23 % em relação à observada após a sua administração i.v. (42,5 versus 183,2 µg·h/ml, respectivamente), e aproximadamente 37 % da biodisponibilidade do naproxeno após administração oral (113,9 µg·h/ml).

Figura 12. Cinética de liberação de sulfeto no estômago de animais tratados com o ATB e Na_2S . Os estômagos dos animais foram tratados com o doador híbrido ATB-346 (640mM), Na_2S (400mM) ou o veículo (PBS, 100 μl). Nos tempos assinalados de 5, 10, 20 ate 120 min foi mensurado o conteúdo de sulfeto total. Cada amostra, em cada tempo foi analisada como um pool do estômago de dois animais.

3.9 Biodisponibilidade do Naproxeno e ATB-346 no plasma

A Figura 13 mostra os perfis cinéticos de concentrações plasmáticas do naproxeno e ATB-346 após a administração oral de 10 mg/kg (v.o) e 16 mg/kg (v.o ou i.v.) nas primeiras 6h após a administração. Com base nos valores médios das áreas sob a curva calculadas, a biodisponibilidade do naproxeno administrado oralmente a partir da análise da biodisponibilidade do ATB-346 é aproximadamente de 23% em relação à observada após a sua administração i.v. (42,5 versus 183,2 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$, respectivamente), e aproximadamente 37% da biodisponibilidade do naproxeno após administração oral (113,9 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$).

Figura 13. Biodisponibilidade do Naproxeno e ATB-346 no plasma. Os animais foram tratados com o doador híbrido ATB-346 (16 mg/kg, v.o ou i.p) e com o naproxeno (10 mg/kg, v.o. Nos tempos determinados de até 6h foi mensurada a concentração de cada droga no plasma.

3.10 Análise da evolução temporal no estabelecimento de dor crônica em animais tratados com o quimioterápico Paclitaxel (PTX) e veículo.

Conforme o esperado a administração de quatro doses do quimioterápico PTX promoveu aumento da sensibilidade térmica (Fig 14-A), no grupo tratado com PTX (2mg/kg, i.p., n=10) a partir do quarto dia, que se manteve até o final do experimento (12º dia). Em relação aos animais tratados com o veículo (1 ml/kg, i.p., n=5) nota-se uma ligeira queda no limiar nociceptivo ao frio no quarto dia, mas que não se manteve e voltou a valores próximos ao basal no oitavo e décimo segundo dia. Na análise de área sob a curva (AUC) foi possível observar diferença entre os grupos veículo em relação ao grupo PTX (Fig 14-B).

Em relação a atividade motora (Fig 15-A), o PTX (2mg/kg, i.p., n=10) promoveu a partir do terceiro dia um decréscimo na atividade motora dos animais o que foi evidenciado por um menor tempo de permanência desses no aparelho e que foi diminuindo em cada medição até o décimo segundo dia. Em relação aos animais que foram tratados com o veículo (1 ml/kg, i.p., n=8) observou-se que os mesmos tiveram um pequeno aumento da atividade motora a partir da segunda medição e que se manteve constante até o último dia do experimento (12º). E quando foi analisada a área sob a curva (AUC) foi possível observar diferença entre o grupo veículo e o grupo PTX (Fig 15-B).

Sobre a evolução ponderal do ganho de peso (Fig 16-A), pôde-se observar que no grupo tratado com PTX (2mg/kg, i.p., n=10) os animais tiveram um pequeno aumento do peso no terceiro dia. Porém, nos dias 5, 7, e 9 os animais não ganharam peso tendo permanecidos com pesos próximos aos medidos no dia 3. No dia 11 houve um pequeno aumento não significativo de peso. Em relação ao grupo tratado com o veículo (1 ml/kg, i.p., n=5) notou-se um perfil, onde o peso ponderal dos animais aumentou de maneira contínua e gradativa ao longo do experimento até o dia 11 onde realizou-se a última pesagem. E analisando-se a área sob a curva (AUC) foi possível observar diferença entre os grupos veículo e o grupo PTX (Fig 16-B).

Figura 14. Efeito da administração de PTX ou Veículo na evolução temporal da alodinia térmica. Os animais foram tratados com o quatro doses em dias alternados com o quimioterápico Paclitaxel (2mg/kg, i.p., n=10) ou com o veículo da droga (1 ml/kg, i.p., n= 5) no mesmo esquema de tratamento. Foi administrado 50 μ l de acetona 100% na superfície plantar de cada animal. Foram realizados os testes de alodinia térmica nos dias 0, 4, 8 e 12 e o Δ dos valores aferidos foi em relação a medida basal de cada animal, no gráfico de representação temporal. Na análise de área sob a curva (AUC) os dados foram expressos como média $\pm$ SEM para n = animais e foi aplicado o teste t para comparação entre os grupos * P <0,05 vs PTX.

Figura 15. Efeito da administração de PTX ou Veículo na evolução temporal da atividade motora. Os animais foram tratados com o quatro doses em dias alternados com o quimioterápico Paclitaxel (2mg/kg, i.p., n=10) ou veículo da droga (1ml/kg, i.p., n= 5) no mesmo esquema de tratamento. Foram realizados os testes de atividade motora nos dias 0, 3, 6, 9, e 12 e o Δ dos valores aferidos foi em relação a medida basal de cada animal, no gráfico de representação temporal. No gráfico de AUC os dados foram expressos como média $\pm$ SEM para n = animais e foi aplicado o teste t para comparação entre os grupos * P <0,05 vs PTX.

Figura 16. Efeito da administração de PTX ou Veículo na evolução ponderal do ganho de peso dos animais. Os animais foram tratados com o quatro doses em dias alternados com o quimioterápico Paclitaxel (2mg/kg, i.p., n=10) ou com o veículo da droga (1 ml/kg, i.p., n=5) no mesmo esquema de tratamento. Foi realizada a pesagem dos animais nos dias 0, 3, 5, 7 e 11 onde o Δ dos valores aferidos foi em relação a medida basal de cada animal, no gráfico de representação temporal. No gráfico de AUC os dados foram expressos como média $\pm$ SEM para n = animais e foi aplicado o teste t para comparação entre os grupos * P < 0,05 vs PTX.

3.11 Análise do efeito do doador de H₂S, GYY 4137, em animais com dor neuropática induzida por Paclitaxel (PTX) estabelecida via testes de alodinia térmica e teste de atividade motora.

Após doze dias desde a primeira injeção do PTX realizou-se o tratamento de um grupo de animais com o doador de liberação lenta de H₂S, GYY 4137 (50mg/kg, i.p., n=5). Em relação ao teste de atividade motora (Fig 17-A), não foi observada diferença significativa nas medições da 2ª e 4ª hora tendo os animais permanecido em média a mesma quantidade de tempo no aparelho. No teste de alodinia térmica ao frio (acetona) (Fig 17-B), os animais tratados com GYY 4137 apresentaram uma redução não significativa do limiar nociceptivo ao frio na 2ª hora que reduziu de maneira significativa na 4ª h.

Figura 17. Efeito do tratamento com o doador de liberação lenta de H_2S sobre a dor neuropática estabelecida. No 12º dia após a primeira aplicação de PTX os animais foram tratados com o doador de H_2S , GYY 4137 (50mg/kg, i.p., n = 5). As avaliações de alodinia térmica e atividade motora foram realizadas na 2ª e 4ª hora após a aplicação dos tratamentos. Os dados foram expressos como média $\pm$ SEM para n = animais e foi aplicado o teste One-way ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni.

4 DISCUSSÃO

4.1 Estudo comparativo da molécula híbrida AINE doadora de H₂S ATB-346 e o AINE naproxeno sobre a sinovite induzida por CGN

O emprego de modelos animais *in vivo* para diferentes doenças, incluindo a artrite reumatoide (AR) e outros tipos de doenças ósseo-articulares tem se mostrado, de longa data, ferramenta eficiente para a caracterização de novas drogas, pois auxilia na compreensão de mecanismos fisiopatológicos dessas doenças bem como dos mecanismos de ação de potenciais fármacos.

Por outro lado, o emprego de ensaios *in vitro*, tais como culturas de diferentes linhagens celulares (ex.: condrócitos, astrócitos, células musculares brônquicas e etc) vem superando os clássicos ensaios *in vivo*, pois também contribuem para a compreensão de processos patológicos além da vantagem de redução de custos. Todavia, sabe-se que o mecanismo funcional operante no sistema *in vivo* é bem mais complexo do que os sistemas *in vitro* e, em particular, no contexto da mudança (*turnover*) de um estado fisiológico (saudável) para um estado patológico (doença). Consequentemente, o emprego de modelos experimentais *in vivo*, embora complexo e dispendioso em termos financeiro e de tempo, é fundamental para estudar o efeito de novas ferramentas farmacológicas (potenciais fármacos), como o que foi utilizado neste estudo.

Nesse sentido, em estudo anterior do grupo (Ekundi-Valentim et al., 2010), demonstrou-se, pela primeira vez, que a indução do modelo experimental de artrite aguda (sinovite) evocada pela CGN foi marcadamente reduzida pela administração exógena profilática do doador de H₂S (RL), sugerindo que esse gás representa potencial terapêutico (ou complementar) para o tratamento da inflamação das articulações ou alívio dos seus sintomas.

Por seu turno, estudos paralelos vêm admitindo que moléculas híbridas contendo AINES clássicos (ex.: naproxeno, diclofenaco etc.) e uma porção doadora de H₂S desempenham papéis protetores superiores aos AINES ou doadores de H₂S isolados no tocante ao controle dos processos nociceptivos e inflamatórios em diferentes modelos (Blackler et al., 2012; Campolo et al., 2013). Ademais, admite-se que essa porção doadora de

sulfeto proporciona maior efeito gastroprotetor aos AINEs (Fiorucci et al., 2007; Wallace et al., 2007). De fato, o naproxeno (e outros AINEs não seletivos) possui efeito adverso (irritante) sobre o trato digestório, pois inibe de maneira não seletiva a enzima ciclooxigenase I (COX-I), importante para síntese das prostaglandinas (PGE₂ e PGI₂), que exercem papéis gastroprotetores. Assim, na terapia de longa duração para a AR, o naproxeno e outros AINEs são amplamente utilizados na terapia e, portanto, responsáveis por induzir efeitos irritantes e úlceras gástricas (Levy et al., 2008; Malfait, Schnitzer, 2013; Pöllmann e Feneberg, 2008)

Existem, pelo menos, sete moléculas (Kashfi, Olson, 2013; Kodela et al., 2012) híbridas desenvolvidas por diferentes grupos de pesquisa e, até o presente momento, algumas destas já se encontram disponíveis comercialmente para o emprego em estudos experimentais (ATB-337, ATB 229 e ATB-346) e outras estão sendo testadas em estudos pré-clínicos, como o ATB-346 (Second European Symposium on Hydrogen Sulfide, 2013). Essa molécula híbrida ATB-346 desenvolvida pelo grupo farmacêutico Antibe Therapeutics Inc., cuja estrutura química compreende o AINE naproxeno e a molécula doadora de H₂S (Wallace et al., 2007), tem se mostrado promissora no tratamento de doenças inflamatórias, pois aliada a essa importante ação analgésica e anti-inflamatória, exerce também um efeito protetor gástrico importante quando comparado ao uso isolado do naproxeno (Distrutti et al., 2006; Fiorucci et al., 2007; Lee et al., 2013; Wallace et al., 2010).

De posse desse conhecimento, priorizou-se neste estudo avaliar de forma comparativa, usando doses equimolares crescentes do naproxeno isolado e da molécula ATB-346, o efeito antiinflamatório e analgésico destes sobre o curso temporal da sinovite induzida por CGN ao longo de 5 h em ratos. Revelou que, nas doses mais elevadas, ambas as moléculas administradas profilaticamente, pela via oral, inibem de forma significativa e dependente da dose, o edema articular, o influxo de leucócitos na cavidade articular e, também, a alodinia mecânica secundária e dor referida (escore). Nota-se que, na 5ª h pós indução da sinovite, o efeito antiinflamatório e analgésico do naproxeno, nas doses mais elevadas, mostrou-se ligeiramente superior ao do ATB-346, embora esta diferença não seja estatisticamente significativa. Estes achados indicam que, ao contrário dos estudos de literatura (Blackler et al., 2012; Campolo et al., 2013; Wallace et al., 2010), o emprego profilático do ATB-346 não se mostrou superior ao efeito analgésico e antiinflamatório do naproxeno neste modelo experimental. Por outro lado, cabe ressaltar que a análise do efeito

terapêutico (durante o curso da sinovite) não foi avaliada ainda e, neste caso, poderá revelar resultados mais interessantes e que serão considerados em estudo futuro.

Interessantemente, acrescenta-se que a análise da atividade de MPO no estômago dos animais tratados com o naproxeno ou ATB-346 revelou que, mesmo quando administrado de forma aguda, o naproxeno aumentou a atividade de MPO no estômago dos animais em relação ao grupo sham ou tratado com o ATB-346. Considerando-se esse fato, conclui-se que o que o ATB-346, embora não exerça vantagem em relação ao naproxeno no que tange aos efeitos analgésico e antiinflamatório, sobrepuja grandemente o efeito irritante do AINE clássico mesmo quando administrado agudamente em animal sem irritação gástrica. Portanto, sugere-se que o ATB-346 possui maior tolerância e indicação para terapias prolongadas de doenças inflamatórias crônicas, como a AR, ou ainda naqueles casos de indivíduos com histórico de irritações ou úlceras gástrica.

Curiosamente, o teste de biodisponibilidade (cinética) demonstrou que a molécula híbrida doadora de H_2S , ATB-346, possui liberação baixa e constante de H_2S quando administrado por v.o. em relação ao Na_2S , excluindo-se assim a desvantagem da liberação rápida e potencialmente tóxica do H_2S , conforme observado com as moléculas clássicas doadoras de H_2S , como o Na_2S e RL. Este resultado reforça os estudos anteriores, nos quais sugere-se que o H_2S liberado da molécula ATB-346 no estômago é captado pelo tecido, onde exerce então suas funções gastroprotetoras (Fiorucci et al., 2005; Wallace et al., 2007).

Por fim, conclui-se que neste modelo experimental, a ausência de superioridade antiinflamatória do ATB-346 em relação ao naproxeno pode estar relacionado à sua biodisponibilidade, pois como se pôde perceber, quando o ATB-346 é administrado pela via oral, como neste trabalho, a biodisponibilidade dessa droga foi menor no plasma dos animais em relação ao naproxeno e, portanto, isto pode levar a uma menor ação antiinflamatória da mesma nos períodos avaliados.

4.2 Avaliação dos mecanismos da ação protetora do doador de H_2S , reagente de Lawesson, na inflamação articular (sinovite) evocada por CGN

Diante do conhecimento prévio do grupo, o qual revelou que o modelo de artrite aguda (ex.: sinovite) descrito acima compartilha características importantes da AR em humanos, como o infiltrado de células inflamatórias na membrana sinovial e cavidade

articular, edema articular, aumento de citocinas pro-inflamatórias (IL-1 β), dor referida e alodinia mecânica secundária, e que o tratamento profilático com o doador clássico de H₂S (RL) reduz, de forma significativa, todos esses fenômenos (Ekundi-Valentim et al., 2010), investiu-se adiante no conhecimento dos mecanismos de ação envolvidos nesta ação.

Averiguou-se *a priori* a participação dos canais iônicos, inicialmente os canais de K⁺ dependentes de ATP (K⁺_{ATP}). Tal hipótese partiu da premissa que os primeiros estudos de mecanismos de ação desse gás revelaram que o bloqueio dos canais de K⁺_{ATP} (ex.: glibenclamida) reverteu a ação anti-nociceptiva de doadores híbridos de H₂S (ATB-429) em modelo animal de distensão colorretal e colite (Distrutti et al., 2006), bem como suprimiu o efeito antiinflamatório de outros doadores de H₂S (NaHS and Na₂S) sobre o edema de pata evocado pela CGN em ratos (Zanardo et al., 2006). Neste último, o efeito protetor dos doadores de H₂S nesses modelos experimentais foi mimetizado por ativadores dos canais de K⁺_{ATP}.

Os canais de K⁺_{ATP} estão espalhados por todo o corpo. Podem ser encontrados no sistema nervoso central, em células da microglia, onde tem importante participação em processos neurodegenerativos através do controle da atividade da microglia (Rodríguez et al., 2013) e em células β do pâncreas, onde possuem papel regulador importante sobre a secreção de insulina e balanço antioxidante (Drews, Düfer, 2012). Esses canais também tem importante papel em processos nociceptivos, onde atuam no final da via antinociceptiva dos opióides a níveis supraespinal, espinal e periférico, via mecanismo de hiperpolarização de membranas celulares e redução ou interrupção da excitabilidade das membranas e, conseqüentemente, da transmissão de impulsos nociceptivos (Afify et al., 2013). Além disso, sabe-se que esses canais tem importante papel no sistema vascular, sendo encontrados em células do endotélio vascular, células da musculatura lisa vascular, onde participam de inúmeros processos fisiológicos, sendo um dos mais importantes a regulação do tônus vascular (Shi et al., 2012).

Segundo Peers et al, (2012), o H₂S interage com resíduos de cisteína (receptores de sufoniluréia) presentes nos canais K⁺_{ATP}, ativando-os. Isto pode resultar em hiperpolarização que, no caso dos vasos, induz conseqüente alteração vascular, tal como vasodilatação. No presente estudo, entretanto, o tratamento com glibenclamida *per se* não afetou de forma significativa a inflamação articular e alodinia evocada por CGN nos animais. Ainda, esse tratamento com a glibenclamida, na mesma dose efetiva proposta por outros autores

(Zanardo et al., 2006), não bloqueou os efeitos anti-nociceptivo e antiinflamatório do RL na sinovite induzida por CGN em relação ao grupo com sinovite tratado somente com o RL. Coletivamente, estes resultados são indicativos que os canais de K_{ATP}^+ não parecem mediar os mecanismos protetores do RL sobre a alodinia mecânica e, tampouco, dos sinais e sintomas de inflamação articular (edema e migração de leucócitos para a cavidade sinovial) em nosso modelo de artrite, pelo menos quando avaliado no intervalo de 4h. Achados de Wallace et al, (2007) reforçam estes e mostram que a ação antiinflamatório do H_2S na mucosa gástrica ocorre independentemente da ativação dos canais de K_{ATP} .

Outrossim, postula-se que o H_2S atua como molécula sinalizadora em canais de Ca^{2+} e de potencial transiente TRPs (ex.: vanilóides - TRPV1). Por exemplo, a administração de NaHS em cultura de astrócitos induziu consequente aumento no influxo de Ca^{2+} (Nagai et al., 2004). Segundo Kimura et al, (2005), o H_2S também aumenta as concentrações intracelular de Ca^{2+} em células da glia e em neurônios, atuando como modulador da transmissão sináptica dessas células.

É de conhecimento que os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem estão amplamente distribuídos pelo corpo, podendo ser encontrados em praticamente todos os tipos celulares excitáveis e, por conta disto, exercem importante papel em diversos sistemas e processos fisiológicos, como no sistema imunológico, onde participam de processos como proliferação e sobrevivência de linfócitos T (Badou et al., 2013). Ademais, os canais de Ca^{2+} regulam os processos nociceptivos associados ou não à inflamação, pois estão amplamente distribuídos no gânglio da raiz dorsal, lâminas I e II do corno dorsal e, também, em outras regiões do sistema nervoso central. Portanto, são alvos terapêuticos de vários fármacos para o tratamento da dor, além de controle vascular e, portanto, de relevância em muitos estudos farmacológicos e patologias (Rahman, Dickenson, 2013). De fato, o bloqueador dos canais de Ca^{2+} do tipo L (verapamil) reduziu a hiperplasia de células caliciformes, hipersecreção de muco e o infiltrado de células inflamatórias no pulmão, aliviando os sintomas de bronquite (Khakzad et al., 2012). O verapamil também inibiu a nocicepção somática e visceral em modelo de distensão coloretal induzida por balão de látex em ratos (Hara et al., 1998). Empregando outro bloqueador desses canais (nimodipina), Ahmadi et al, (2012) observaram importante analgesia em modelo de dor neuropática diabética, reforçando assim o papel relevante dos canais de Ca^{2+} do tipo L no controle da dor inflamatória ou não.

Corroborando estes estudos prévios, os resultados deste estudo revelaram que o bloqueio dos canais de Ca^{2+} tipo L com o verapamil, *per se*, reduziu os parâmetros inflamatórios (ex.: edema articular, atividade da MPO e o influxo de neutrófilos na cavidade articular), bem como a alodinia mecânica em ratos com sinovite em relação ao respectivo grupo controle. Como esperado, o pré-tratamento com o RL reduziu os sinais e sintomas da artrite evocada pela CGN, e o co-tratamento com o verapamil também promoveu redução dos sinais e sintomas inflamatórios da sinovite induzida por CGN (edema, atividade da MPO e influxo de células); todavia, este efeito não foi superior à resposta evocada pelo RL ou verapamil isoladamente. Por outro lado, essa combinação de tratamentos revelou um efeito inibitório aditivo sobre a alodinia secundária na pata ipsilateral dos animais com sinovite. Assim, acredita-se que o efeito aditivo anti-nociceptivos do RL e verapamil neste modelo de sinovite evocado por CGN são regulados por mecanismos distintos, ao contrário do efeito antiinflamatório de ambos os compostos. Achados experimentais de Omote et al, (1995) vêm de encontro a este e mostram que o tratamento conjunto do verapamil e um anestésico local (lidocaína ou tetracaína) promoveu efeito analgésico e bloqueio motor bem mais potente e prolongado do que esses fármacos isoladamente.

Em continuidade ao estudo e de posse do conhecimento da literatura que o H_2S interage com os receptores de potencial transiente ou transitório TRPs (Bhatia et al., 2005; Hsu et al., 2013; Takahashi et al., 2012), averiguou-se nesta etapa a contribuição dos TRPV1, tendo em visto a conhecida participação desses receptores em dor inflamatória e hiperalgesia em vários estudos que empregam agentes exógenos ou mediadores endógenos (Costa et al., 2007; Szallasi et al., 2007; Zanchet, Cury, 2003). Nesse sentido, há mais de quinze anos, a estrutura molecular e mecanismo de ativação dos receptores TRP vanilóides (TRPV1) foram caracterizados por Caterina et al, (1997), os quais revelaram a importância desses receptores em processos nociceptivos, especialmente relacionados ao estímulo térmico (calor). Esses receptores são estruturalmente formados por três domínios, sendo um intracelular N e C, além de uma região transmembrana. A ativação desses receptores em neurônios sensitivos da periferia leva à liberação de mediadores pro-inflamatórios, que vão sensibilizar células nervosas e a produção de potenciais de ação, que se propaga para o sistema nervoso central (Morales-Lázaro et al., 2013). Assim, antagonistas de TRPV1 são eficazes em combater a dor e, em muitos casos, a inflamação associada induzida por agentes, como a CGN. Por exemplo, Jhaveri et al, (2005) observaram que a injeção

intraplantar de CGN induziu inflamação associada com hiperlagesia térmica e mecânica, a qual foi reduzida pela iodo-resiniferatoxina, um antagonista dos TRPV1. Outro estudo, dessa vez utilizando um agonista TRPV1 (Palvanil), que tem a capacidade de dessensibilizar rapidamente esses receptores provou ser eficaz em reverter o edema e hiperlagesia térmica em camundongos injetados com CGN na pata (Luongo et al., 2012).

Igualmente, este estudo revelou que, assim como o RL, o pré-tratamento dos animais com a CPZ, um antagonista de receptores TRPV1, inibiu significativamente a alodinia mecânica e o edema articular. Curiosamente, apesar dessa redução de edema, a CPZ não inibiu o influxo de células inflamatórias na cavidade sinovial de ratos com artrite induzida por CGN, quando analisado a atividade de MPO na membrana sinovial e o conteúdo de leucócitos total e diferencial no lavado articular. Verificou-se ainda que o tratamento concomitante dos animais com o RL e CPZ não promoveu redução aditiva ou reversão da resposta inibitória do RL sobre os parâmetros inflamatórios e nociceptivos da sinovite frente à CGN. Ao contrário, o tratamento com a mistura de CPZ e RL potencializou o influxo de células para a cavidade articular nos animais com sinovite. Os mecanismos para tal discrepância não estão muito claros, embora estes resultados vão de encontro a outros estudos da literatura e do grupo. Nesse sentido, sabe-se que o bloqueio de receptores de taucininas ou a degeneração de fibras sensoriais e consequente depleção de neuropeptídeos (e receptores TRPs) nessas fibras pelo tratamento neonatal com a capsaicina reduz marcadamente o extravasamento plasmático evocado por poluentes ambientais; porém, ao contrário, esses tratamentos potencializaram a atividade de MPO bem como a contagem celular no pulmão dos animais expostos ao poluente (Teles et al., 2009, 2010). Tais achados sugerem que o bloqueio de neuropeptídeos exerce ação protetora sobre o controle nociceptivo; entretanto, a ausência destes em outros tecidos e células (leucócitos, endotélio) parece comprometer a resposta imunológica inata, visto que interfere grandemente na expressão de moléculas de adesão e transmigração de leucócitos. Além disto, afeta genes precursores (ex.: PPT-I) das neurocininas e seus receptores (Barabas, Stucky, 2013; Smith, Nilius, 2013).

Com base nesse raciocínio, nossos resultados reforçam, pelo menos em parte, a sugestão de que a depleção/redução de neuropeptídeos via bloqueio de receptores TRPV1 em fibras nervosas sensoriais exerce efeito anti-nociceptivo na sinovite induzida por CGN, indicando a participação dos TRPV1 nesse modelo. Curiosamente, Hutter et al, (2005)

mostraram que a CPZ foi capaz de diminuir inúmeros parâmetros inflamatórios como a formação de edema em modelo de pancreatite porém não teve efeito no extravasamento plasmático o que vem de encontro aos achados desse estudo.

O H_2S , assim como o NO, evoca potente efeito relaxante em vasos sanguíneos; porém, os mecanismos de ação envolvidos nessa ação são distintos, pois enquanto o NO ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), o efeito do H_2S é regulado via ativação de canais de K^+_{ATP} (Sun et al., 2011). Apesar desse conhecimento e dos achados deste estudo que mostram que os efeitos antiinflamatório/anti-nociceptivo do doador de H_2S , RL, na sinovite induzida por CGN ocorrem independentemente da ativação de canais K^+ (hiperpolarização), conforme demonstrado em outros modelos (Kubo et al., 2007; Rashid et al., 2013), avaliou-se adiante mecanismos intracelulares dependentes da ativação da via NO/guanilil (ou guanilato) ciclase solúvel (GCs) face às atraentes evidências de um possível *cross talk* entre o H_2S e o NO em diversos tecidos (Bucci, Cirino 2011; Filipovic et al., 2012; Yoon et al., 2011).

Nesse sentido, resultados do grupo revelaram recentemente que a elevação da expressão e atividade da iNOS bem como de peroxidação lipídica (TBARs) no pulmão de animais com asma experimental alérgica foi substancialmente reduzida pelo tratamento com um doador de H_2S , o NaHS (Benetti et al., 2013). Ademais, Colleta et al, (2012) observaram que esses dois gasotransmissores agem conjuntamente no aumento e manutenção intracelular de GMPc e, conseqüentemente, nos processos de angiogênese e vasodilatação. Já foi relatada também uma interação desses gases no trato gastrointestinal, onde o tratamento conjunto com doador de H_2S (NaHS) e de NO (SNAP) inibiu significativamente a função das células intersticiais de Cajal do intestino via modulação do influxo de cálcio intracelular em relação ao tratamento com tais moléculas isoladas (Yoon et al., 2011).

A guanilato ciclase solúvel (GCs), considerada enzima alvo do NO, converte o trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), o qual regula uma variedade de respostas, incluindo o relaxamento das células musculares lisas vasculares, neurotransmissão e metabolismo celular via proteínas quinases dependentes. Cabe ressaltar que a GCs pode ser ativada por mecanismos independentes de NO, como o bicarbonato (Sun et al., 2009), monóxido de carbono (CO) (Ibrahim et al., 2010), oxigênio

molecular (O_2) (Dada et al., 2013) e drogas ativadoras de GCs, independentes de NO como o BAY 58-2667 (Irvine et al., 2012) e BAY 60-2770 (Mendes-Silverio et al., 2012).

Compete acrescentar que o NO interage com radicais sulfidríla ($-SH$), podendo formar nitrosotiol, além da conhecida afinidade por grupo heme encontrado nas enzimas GC, COXs e NOS (Bruckdorfer, 2005). Nesse sentido, a via do NO-GCs-GMPc tem sido envolvida em diversas doenças inflamatórias (ou não), tais como a diabetes *mellitus*, hipertensão arterial e pulmonar, disfunção erétil, colite, asma e dor neuropática, dentre outras (Costell et al., 2012; Lasker et al., 2013; Ott et al., 2012; Papapetropoulos et al., 2006; Schmidtke et al., 2006; Stasch, Evgenov, 2013; Steinbrecher et al., 2012).

Neste estudo, o envolvimento da GCs nas respostas antiinflamatória e anti-nociceptiva do RL foi avaliada com o auxílio da ferramenta farmacológica ODQ, um conhecido inibidor da GCs. Surpreendentemente, os resultados deste tratamento revelaram uma reversão parcial do efeito anti-nociceptivo (alodinia mecânica) do RL concomitantemente à reversão total ($P < 0.05$) dos efeitos antiinflamatórios (ex.: edema, MPO e influxo celular) no joelho de ratos com sinovite induzida por CGN quando comparado ao efeito do grupo com sinovite tratado somente com o RL. O pré-tratamento com o ODQ *per se* não influenciou nenhum dos parâmetros avaliados. Estes resultados são indicativos que o efeito protetor do H_2S contra a sinovite induzida por CGN é altamente dependente da ativação da GCs e, portanto, reforça recentes estudos na literatura. Ademais, outros estudos mostram que metabólitos da enzima Heme Oxigenase, como o CO, reduzem o rolamento, adesão e a migração de leucócitos para o local da inflamação em ratos com inflamação induzida por CGN, via mecanismo dependente, em parte, da ativação da GCs (Freitas et al., 2006; Fernandes, Assreuy, 2004).

Neste estudo, as evidências apontam para a sugestão de que o gás H_2S exerce seus efeitos via ativação (direta) da GCs, visto que os resultados com o sildenafil, um inibidor da fosfodiesterase 5, cujo mecanismo proporciona maior disponibilidade da GCs, mimetizaram e não reverteram, em grande parte, os efeitos protetores do doador de H_2S RL sobre os sinais inflamatórios (ex.: edema e MPO), mas não a nocicepção, em nosso modelo, muito embora outros estudos mostraram que a inibição de ativadores da GCs, como o NO, evoca antinocicepção (Camargo et al., 2013). Ainda, outros sugerem, como o nosso, que o bloqueio da via da GCs representa um dos principais mecanismos da ação antiinflamatória do fitoterápico *Pfaffia glomerata* (Ginseng brasileiro) no modelo de edema de pata induzido por

CGN (Teixeira et al., 2006). Apesar destes achados, não está bem claro se o sítio de ligação do H₂S enzima é o mesmo para a ligação do NO (porção heme proteica) ou outro sítio. Não se pode excluir, também, que essa ação do H₂S sobre a ativação da GCs seja apenas modulatória e dependente de outros mediadores endógenos, capazes de ativá-las. Cabe ressaltar que essa sugestão de possível função dual do H₂S (ligante e modulador da GCs) já foi demonstrada para o O₂ (Dada et al., 2013). Todavia, estudos futuros se fazem necessários para estabelecer tal sugestão.

Durante a inflamação, está bem estabelecida que a ativação da cascata do ácido araquidônico, via ação das COX, resulta na geração de mediadores lipídicos, tais como as prostaglandinas, importantes na modulação desse processo. Por seu turno, a correlação entre o NO formado via iNOS e a geração de mediadores lipídicos álgicos (ex.: PGE), bem como radicais livres foi relatado em modelos de inflamação (Salvemini et al. 2013; Salvemini, Masferrer., 1996), onde a dor representa um dos sinais característicos. Nesse âmbito, as prostaglandinas E (e seus receptores) participam ativamente (Melin et al., 2013). Dentre as PGs formadas na dor inflamatória, destaca-se a PGE₂ cujos efeitos são regulados via receptores acoplados a proteína G (EP1, EP2, EP3, EP4), amplamente expressos nos neurônios sensoriais periféricos e na medula espinhal (Dray, Read, 2007).

No presente estudo, verificou-se que 4 h após a ingestão da CGN as concentrações da PGE₂ aumentaram significativamente na sinóvia do joelho dos animais com sinovite; todavia, o pré-tratamento dos animais com o RL não inibiu a concentração elevada de PGE₂, sugerindo que no período avaliado, a atividade anti-nociceptiva do doador de H₂S, RL, não está relacionada à redução dos níveis desse eicosanóide. Estes resultados contrastam com os dados obtidos por Li et al, (2013), os quais revelaram que o doador de liberação lenta de H₂S, GYY 4137, inibe o aumento de PGE₂ em cultura de sinoviócitos e condrócitos humanos articulares *in vitro*. em contrapartida e, de acordo com nossas evidências, Ademais, Ang et al, (2011) observaram que o doador de H₂S de liberação rápida, hidrossulfeto de sódio (NaHS), não reduziu o aumento dos níveis de PGE₂ em modelo de sepsis provocada por perfuração cecal. Os mecanismos para tal discrepância não estão claros; porém, é plausível sugerir que as discrepâncias farmacocinéticas entre essas moléculas (liberação rápida e lenta de H₂S) podem contribuir grandemente para isto, somado ao fato que a metabolização das prostaglandinas *in vivo* ocorre mais rapidamente do que *in vitro* (Bothwell et al., 1982).

De acordo com os dados prévios do grupo (Ekundi-Valentim et al, 2010), neste modelo de sinovite (artrite aguda) induzida por CGN, a sinóvia inflamada dos animais produz grande concentração da citocina pró-inflamatória IL-1 β , a qual encontra-se associada à baixa produção da citocina anti-inflamatória IL-10. Importaneamente, o tratamento com o RL reduziu o aumento da geração de IL-1 β e, ao contrário, estimulou a geração de IL-10 e, assim, confirmam a importância do H₂S no controle da gênese de citocinas anti- e pró-inflamatória na artrite aguda e, também, na modulação das respostas nociceptivas, conforme demonstrado em outros estudos (Lee et al., 2013).

A transcrição de genes da IL-1 β possui várias vias, sendo as as vias dos fatores de transcrição AP-1 (Choi, Lee, 2010) e NF- κ B (Koenders et al., 2006) exemplos destas. Em ratos com sinovite induzida por CGN, dados não publicados do grupo revelaram que a expressão do NF- κ B, mas não de AP-1, aumentou na sinóvia de animais com sinovite; todavia, o tratamento com o RL não afetou o aumento na expressão desse fator, excluindo a participação dessas vias na ação antiinflamatória e antinociceptiva do RL.

A inflamação induzida por CGN obedece a um padrão multifatorial bem conhecido, pois envolve citocinas pró-inflamatórias e PGs, além da participação de NO (dependente de iNOS) e outras espécies reativas produzidas e liberadas (ex.: OH, H₂O₂) por células inflamatórias ativadas com capacidade fagocítica, tais como os neutrófilos e macrófagos (Barbosa et al., 2012; Borghi et al., 2013). Nesse contexto, o H₂O₂ pode atuar como substrato para outras enzimas (ex.: MPO) e gerar outros compostos oxidantes, além de suas próprias ações lesivas. Assim, considerando que o tecido inflamado (sinóvia) e a cavidade articular dos animais com sinovite exibiram um aumento significativo na população de neutrófilos (e macrófagos), possivelmente devido ao estresse oxidativo, postulou-se que um dos mecanismos protetores (antiinflamatório) do RL poderia também estar associado à ativação de sistemas antioxidantes, visto que a natureza química do H₂S favorece sua reação com espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) (Morel et al., 2012; Yan et al., 2006).

Compete acrescentar que a redução das concentrações de glutathiona está associada ao aumento de estresse oxidativo, sendo o H₂S capaz de re-estabelecer a disponibilidade da glutathiona via aumento da atividade do transportador de cisteína, um substrato importante para a formação da glutathiona (Kimura, 2013). Em contrapartida, estudos sugerem que em

doenças inflamatórias, como a AR, as defesas antioxidantes parecem estar reduzidas ou deficientes (Pinto et al., 2012; Ramakrishnan et al., 2010).

A fim de avaliar o papel das defesas antioxidantes na sinovite induzida pela CGN e a correlação com o doador de H_2S , RL, mensurou-se as atividades de algumas enzimas antioxidantes de interesse, a saber: GSH-R, GSH-Px e GSH-ST na membrana sinovial inflamada dos animais. A GSH-ST pertence a uma família de isoenzimas, cujos substratos endógenos incluem produtos tóxicos formados em lesões tissulares (ex.: hidroperóxidos e peróxidos lipídicos) e xenobióticos (Hayes, Pulford 1995; Lan et al., 2009). Neste estudo, a análise da atividade dessas enzimas revelou que os ratos com sinovite exibiram menor atividade da GSH-ST, enquanto a GSH-R mostrou-se aumentada e a GSH-Px não foi alterada em comparação ao grupo controle, injetado com a salina. Desta feita, pode-se interferir que outros mecanismos, como a via da catalase, possa estar envolvida. Curiosamente, a atividade da GSH-R, importante enzima envolvida no controle do estresse oxidativo, na sinóvia inflamada mostrou-se aumentada quando comparado ao controle. O tratamento com o RL reverteu parcialmente esse aumento de atividade. Tais resultados contrastam outros da literatura (Aboubakr et al, 2013) que mostram em modelo de estresse induzido por lesão da mucosa gástrica o efeito antioxidante do doador de H_2S (NaHS) via aumento da glutathiona reduzida. No sistema nervoso central demonstrou-se que o H_2S exerce atividade antioxidante via mecanismos protetores, como o aumento dos níveis de glutathiona, ativação de canais de K^+_{ATP} e pela reação direta com radicais livres (Jia et al., 2013).

4.3 Estudo do efeito do doador de liberação lenta de H_2S em modelo de dor neuropática induzida pelo quimioterápico Paclitaxel (PTX).

O paclitaxel (PTX) é um dos agentes quimioterápicos mais poderosos utilizados para o tratamento do câncer de mama, ovário, carcinoma pulmonar, bexiga, próstata, melanoma, esôfago, bem como de outros tipos de cânceres de tumor sólido (Sheihet et al., 2012). Todavia, apesar dess emprego amplo, o PTX frequentemente induz neurotoxicidade, geralmente traduzida na forma de neuropatias periféricas dolorosas associadas a formigamentos, queimações, ardências e alodinia ao frio (Argyriou et al., 2008; Paice, 2011). Por conta disso, esse fármaco, além do seu emprego primário como quimioterápico, é

também usado como ferramenta farmacológica para a indução e estudo farmacológico da dor neuropática em animais (Aoki et al., 2012; Katsuyama et al., 2013).

Os resultados deste estudo mostram que o modelo proposto afetou o ganho de peso dos animais, bem como alterou a atividade nociceptiva (alodinia térmica) e motora. Para a avaliação motora empregou-se o teste de Rota Rod, que mostrou uma diminuição relativamente constante até o último dia do experimento (12º dia) quando comparado com o veículo do PTX. Este resultado demonstra que os animais submetidos ao modelo de dor neuropática exibiram maior desconforto na mobilidade, possivelmente devido à dor e que pôde ser representado por uma menor capacidade motora quantificada pelo menor tempo de permanência no aparelho rota Rod.

O teste do Rota Rod é uma importante ferramenta que auxilia na observação dos parâmetros motores do animal indicando ou não uma alteração motora adquirida por alguma lesão mecânica ou, no caso deste estudo, sensibilidade/lesão química provocada pelo quimioterápico. Em modelo semelhante ao realizado neste estudo, Cavaletti et al, (1997) observaram que os animais tratados com PTX mostraram diminuição da atividade motora, através do teste Rota Rod, 11 dias após a primeira administração do quimioterápico. Além disso, Boyle et al, (1999) também em modelo de dor crônica do tipo neuropática induzida por PTX observaram que os ratos que receberam essa droga reduziram o tempo de permanência no aparelho quando comparados ao grupo de animais tratados com veículo e ao grupo tratado com o PTX + Glutamato.

Assim, conclui-se que as medidas funcionais no modelo de neuropatia induzido por PTX neste estudo ssemelha-se aos demonstrados na literatura e, também, em estudos clínicos onde pacientes sujeitos ao tratamento com o quimioterápico PTX desenvolvem alterações motoras e musculares (Rowinsky et al., 1993) evidenciadas por axonopatias distal ou desnervação proximal devido a altas doses do quimioterápico e, também, ao tratamento prolongado (Freilich et al., 1996). Porém o mecanismo exato pelo qual esses eventos ocorrem não é conhecido (Polomano et al., 2001).

No que tange à alodinia térmica ao frio, um sintoma também comum em pacientes com dor neuropática (Zhao et al., 2012), os estudos experimentais que empregam diferentes formas de indução desse sintoma mostram a mensuração significativa de alodinia térmica nos animais, via emprego do teste da acetona (Choi et al., 1994; Zhao et al., 2012), conforme demonstrado também aqui. Observou-se neste estudo que grupo submetido ao tratamento

com o PTX exibiu menor limiar de sensibilidade ao estímulo térmico frio (acetona) em relação ao grupo veículo do PTX e ao grupo salina, logo a partir da primeira semana da indução. Corroborando estes dados, Deng et al, (2012) observaram um aumento da sensibilidade térmica à acetona já após a primeira aplicação do PTX em modelo semelhante. Já Flatters e Bennett (2004) trabalhando também com neuropatia induzida por PTX em ratos com nos mesmo esquema terapêutico que o realizado nesse trabalho. Além disso, Nieto et al, (2008) observaram que em camundongos tratados com PTX, o tempo de manifestação dos comportamentos nociceptivos (lamber e morder a pata) estimulada era maior do que nos animais controle.

A análise de ganho de peso entre o grupo submetido ao tratamento com PTX e o grupo veículo foram observadas diferenças significativas que sugerem que a dor nos animais foi suficientemente grande para causar inibição do apetite desses. Sabe-se que um dos efeitos do tratamento com o PTX pode ser caracterizado como intoxicações específicas evidenciadas por neutropenia, porém podem ocorrer intoxicações generalizadas, onde percebe-se uma perda de peso significativa nos pacientes (Song et al., 2004). Dados similares aos nossos já foram descritos na literatura. Carozzi et al, (2009) observaram que ratos tratados com PTX apresentaram diminuição do ganho de peso quando comparados ao grupo controle e que essa perda de peso foi mais acentuada quando o PTX foi combinado com a cisplatina, outro quimioterápico.

Por seu turno, apesar de muitos estudos investigarem métodos e alternativas para aliviar a neurotoxicidade induzida por fármacos antineoplásicos como o PTX, até hoje não existem tratamentos eficazes para a neuropatia causada por essas drogas. Várias alternativas foram propostas para tal, como o uso de bloqueadores de canais de Na^+ voltagem-dependentes (Nieto et al., 2008), agonistas canabinóides (Burgos et al., 2012), uso de análogos de prostaglandina E_1 (Gauchan et al., 2009), a administração de um derivado da calcitonina (Aoki et al., 2012) e também inibidores das enzimas formadoras de sulfeto de hidrogênio (Okubo et al., 2011). Como já relatado anteriormente sabe-se que esse gás possui propriedades antinociceptivas em diversos modelos experimentais, porém pouco se sabe sobre o papel do sulfeto de hidrogênio na dor neuropática.

Alguns estudos caracterizam o H_2S como um agente pró-nociceptivo em modelos de dor neuropática, atuando principalmente em canais de Ca^{2+} do tipo-T. Um estudo observou que ratos submetidos ao corte de nervo espinhal na altura da L5 apresentaram dor

neuropática, e que a mesma foi fortemente inibida pela administração de inibidores da CSE, enzima formadora de H_2S . Além disso, o H_2S mostrou-se como um potente ativador dos canais de $Ca_v3.2$ tipo-T sendo responsável pela manutenção do processo doloroso crônico (Takahashi et al., 2010). Sabe-se que esses canais tem importante participação no processo nociceptivo crônico e que alguns agentes, como o Zn^{2+} , são responsáveis pela inibição de tais canais e que o H_2S atua quelando o Zn^{2+} o que favorece a abertura desses canais, especialmente o canal do tipo $Ca_v3.2$, sendo esse gás então responsável pela propagação e manutenção da sensação dolorosa em neuropatias crônicas (Sekiguchi, Kawabata, 2013).

Curiosamente, os achados preliminares deste estudo mostram que o tratamento com o doador de liberação lenta de H_2S , GYY 4137, inibiu de forma tempo-dependente a alodinia térmica ao frio, sendo essa inibição significativa 4 h após a administração da droga. Todavia, não foi capaz de afetar significativamente a atividade motora incapacitada dos animais com dor neuropática. Não existem relatos na literatura que suportem esses dados, sendo este um dado inédito até o momento. Todavia, os mecanismos envolvidos em tal efeito estão ainda sob investigação.

5 CONCLUSÕES

1. Este presente estudo produziu resultados comparativos e, até então originais, dos efeitos anti-inflamatório e analgésico da molécula híbrida AINES doadora de H₂S ATB-346 na artrite experimental induzida por CGN em ratos. Descreveu ainda a cinética e ação protetora no estômago desta molécula em relação ao naproxeno, até então desconhecida em tratamento agudo;

2. Apresentou estratégias farmacológicas de mecanismos de ação que, diferentemente dos achados de literatura, mostram que os canais de K^{+ATP} e Ca²⁺ tipo L não participam diretamente das respostas inibitórias do doador de H₂S (RL) sobre o quadro agudo da artrite (alodinia, edema e influxo celular na articulação).

3. Ao contrário, verificou-se que a via da GCs participa dos mecanismos antiinflamatórios do RL, enquanto os TRPV1 parecem modular os efeitos antinociceptivos.

4. Os mecanismos de sinalização molecular/intracelular envolvidos na resposta do RL não parecem depender da inibição geração de PGE2 e, tampouco, da ativação das vias do NFkB e AP-1.

5. Por fim, as análises preliminares no modelo de dor neuropática por quimioterápico estimula estudos futuros com o emprego do doador de H₂S de liberação lenta, GYY 4137, na dor crônica, até então desconhecida na literatura.

6 REFERÊNCIAS

- Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci*. 1996;16:1066–71.
- Aboubakr EM, Taye A, El-Moselhy MA, Hassan MK. Protective effect of hydrogen sulfide against cold restraint stress-induced gastric mucosal injury in rats. *Arch Pharm Res*. 2013 Jul 1.
- Afify EA, Khedr MM, Omar AG, Nasser SA. The involvement of KATP channels in morphine-induced antinociception and hepatic oxidative stress in acute and inflammatory pain in rats. *Fundam Clin Pharmacol*. 2013 Dec;27(6):623-31.
- Ahmadi S, Ebrahimi SS, Oryan S, Rafieenia F. Blockades of ATP-sensitive potassium channels and L-type calcium channels improve analgesic effect of morphine in alloxan-induced diabetic mice. *Pathophysiology*. 2012 Jun;19(3):171-7.
- Ang SF, Sio SW, Moochhala SM, MacAry PA, Bhatia M. Hydrogen sulfide upregulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E metabolite in sepsis-evoked acute lung injury via transient receptor potential vanilloid type 1 channel activation. *J Immunol*. 2011 Nov 1;187(9):4778-87.
- Aoki M, Mori A, Nakahara T, Sakamoto K, Ishii K. Effect of synthetic eel calcitonin, elcatonin, on cold and mechanical allodynia induced by oxaliplatin and paclitaxel in rats. *Eur J Pharmacol*. 2012 Dec 5;696(1-3):62-9.
- Argyriou AA, Koltzenburg M, Polychronopoulos P, Papapetropoulos S, Kalofonos HP. Peripheral nerve damage associated with administration of taxanes in patients with cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008 Jun;66(3):218-28.
- Badou A, Jha MK, Matza D, Flavell RA. Emerging Roles of L-Type Voltage-Gated and Other Calcium Channels in T Lymphocytes. *Front Immunol*. 2013 Aug 30;4:243.Review.
- Barabas ME, Stucky CL. TRPV1, but not TRPA1, in primary sensory neurons contributes to cutaneous incision-mediated hypersensitivity. *Mol Pain*. 2013 Mar 4;9:9.
- Barbosa KP, Santos LA, Ribeiro EL, Fragoso IT, Rocha SW, Nunes AK, França ME, Silva BS, Silva AK, Donato MA, Gomes FO, Silva TG, Pitta IR, Pitta MR, Lima MC, Uchôa FD, Galdino SL, Peixoto CA. Reduction of carrageenan-induced acute pulmonary inflammation in mice by novel thiazolidinedione derivative LPSF/RA-4. *Eur J Pharmacol*. 2013 Sep 12.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Benetti LR, Campos D, Gurgueira SA, Vercesi AE, Guedes CE, Santos KL, Wallace JL, Teixeira SA, Florenzano J, Costa SK, Muscará MN, Ferreira HH. Hydrogen sulfide inhibits oxidative stress in lungs from allergic mice in vivo. *Eur J Pharmacol*. 2013 Jan 5;698(1-3):463-9.

Bhatia M, Wong FL, Fu D, Lau HY, Moolchhala SM, Moore PK. Role of hydrogen sulfide in acute pancreatitis and associated lung injury. *FASEB J*. 2005 Apr;19(6):623-5.

Blackler R, Syer S, Bolla M, Ongini E, Wallace JL. Gastrointestinal-sparing effects of novel NSAIDs in rats with compromised mucosal defence. *PLoS One*. 2012;7(4):e35196.

Borghi SM, Carvalho TT, Staurengo-Ferrari L, Hohmann MS, Pinge-Filho P, Casagrande R, Verri WA Jr. Vitexin inhibits inflammatory pain in mice by targeting TRPV1, oxidative stress, and cytokines. *J Nat Prod*. 2013 Jun 28;76(6):1141-9.

Bothwell W, Verburg M, Wynalda M, Daniels EG, Fitzpatrick FA. A radioimmunoassay for the unstable pulmonary metabolites of prostaglandin E1 and E2: an indirect index of their in vivo disposition and pharmacokinetics. *J Pharmacol Exp Ther*. 1982 Feb;220(2):229-35.

Boyle FM, Wheeler HR, Shenfield GM. Amelioration of experimental cisplatin and paclitaxel neuropathy with glutamate. *J Neurooncol*. 1999 Jan;41(2):107-16.

Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol*. 1982 Mar;78(3):206-9.

Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med*. 2005 Feb-Apr;26(1-2):3-31.

Bucci M, Cirino G. Hydrogen sulphide in heart and systemic circulation. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2011 Apr;10(2):103-8.

Burgos E, Gómez-Nicola D, Pascual D, Martín MI, Nieto-Sampedro M, Goicoechea C. Cannabinoid agonist WIN 55,212-2 prevents the development of paclitaxel-induced peripheral neuropathy in rats. Possible involvement of spinal glial cells. *Eur J Pharmacol*. 2012 May 5;682(1-3):62-72.

Cabral, C. M. N. (2006). Recuperação funcional da síndrome fêmoro-patelar: um estudo comparativo entre fortalecimento e alongamento muscular. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo. Recuperado em 2013-04-07 de <http://www.tese.usp.br/teses/disponiveis/5/5160/tde-16102006-163040/>

Caliendo G, Cirino G, Santagada V, Wallace JL. Synthesis and biological effects of hydrogen sulfide (H₂S): development of H₂S-releasing drugs as pharmaceuticals. *J Med Chem*. 2010 Sep 9;53(17):6275-86.

Campolo M, Esposito E, Ahmad A, Di Paola R, Wallace JL, Cuzzocrea S. A hydrogen sulfide-releasing cyclooxygenase inhibitor markedly accelerates recovery from experimental spinal cord injury. *FASEB J*. 2013 Nov;27(11):489-99.

Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 1985;113:484-90.

Carozzi V, Chiorazzi A, Canta A, Oggioni N, Gilardini A, Rodriguez-Menendez V, Avezza F, Crippa L, Ceresa C, Nicolini G, Bossi M, Cavaletti G. Effect of the chronic combined administration of cisplatin and paclitaxel in a rat model of peripheral neurotoxicity. *Eur J Cancer.* 2009 Mar;45(4):656-65.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 1997 Oct 23;389(6653):816-24.

Cavaletti G, Cavalletti E, Montaguti P, Oggioni N, De Negri O, Tredici G. Effect on the peripheral nervous system of the short-term intravenous administration of paclitaxel in the rat. *Neurotoxicology.* 1997;18(1):137-45.

Chen H, Lamer TJ, Rho RH, et al. Contemporary management of neuropathic pain for the primary care physician. *Mayo Clin Proc* 2004;79:1533-45.

Choi Y, Yoon YW, Na HS, Kim SH, Chung JM. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain.* 1994 Dec;59(3):369-76.

Choi EM, Lee YS. Luteolin suppresses IL-1 β -induced cytokines and MMPs production via p38 MAPK, JNK, NF- κ B and AP-1 activation in human synovial sarcoma cell line, SW982. *Food Chem Toxicol.* 2010 Oct;48(10):2607-11.

Clegg TE, Roberts CS, Greene JW, Prather BA. Hip dislocations- epidemiology, treatment, and outcomes. *Injury.* 2010 Apr;41(4):329-34.

Coletta C, Papapetropoulos A, Erdelyi K, Olah G, Módis K, Panopoulos P, Asimakopoulou A, Gerö D, Sharina I, Martin E, Szabo C. Hydrogen sulfide and nitric oxide are mutually dependent in the regulation of angiogenesis and endothelium-dependent vasorelaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jun 5;109(23):9161-6.

Coruzzi G, Venturi N, Spaggiari S. Gastrointestinal safety of novel nonsteroidal antiinflammatory drugs: selective COX-2 inhibitors and beyond. *Acta Biomed.* 2007 Aug;78(2):96-110.

Costa SK, Kumagai Y, Brain SD, Teixeira SA, Varriano AA, Barreto MA, de Lima WT, Antunes E, Muscará MN, Costa SK. Involvement of sensory nerves and TRPV1 receptors in the rat airway inflammatory response to two environment pollutants: diesel exhaust particles (DEP) and 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ). *Arch Toxicol.* 2010 Feb;84(2):109-17.

Costell MH, Ancellin N, Bernard RE, Zhao S, Upson JJ, Morgan LA, Maniscalco K, Olzinski AR, Ballard VL, Herry K, Grondin P, Dodic N, Mirguet O, Bouillot A, Gellibert F, Coatney RW, Lepore JJ, Jucker BM, Jolivet LJ, Willette RN, Schnackenberg CG, Behm DJ. Comparison of

soluble guanylate cyclase stimulators and activators in models of cardiovascular disease associated with oxidative stress. *Front Pharmacol*. 2012;3:128.

Cunha TM, Dal-Secco D, Verri WA Jr, Guerrero AT, Souza GR, Vieira SM, Lotufo CM, Neto AF, Ferreira SH, Cunha FQ. Dual role of hydrogen sulfide in mechanical inflammatory hypernociception. *Eur J Pharmacol*. 2008;590(1-3):127-35.

Dada J, Pinder AG, Lang D, James PE. Oxygen mediates vascular smooth muscle relaxation in hypoxia. *PLoS One*. 2013;8(2):e57162.

Deng L, Guindon J, Vemuri VK, Thakur GA, White FA, Makriyannis A, Hohmann AG. The maintenance of cisplatin- and paclitaxel-induced mechanical and cold allodynia is suppressed by cannabinoid CB₂ receptor activation and independent of CXCR4 signaling in models of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Mol Pain*. 2012 Sep 22;8:71.

DATASUS. Sistema de Informa-ções Hospitalares do SUS (SIH/SUS). Morbidade Hospitalar do SUS - por local de internação - Brasil. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>> Acessado em: 13/08/2013.

di Villa Bianca Rd, Coletta C, Mitidieri E, De Dominicis G, Rossi A, Sautebin L, Cirino G, Bucci M, Sorrentino R. Hydrogen sulphide induces mouse paw oedema through activation of phospholipase A2. *Br J Pharmacol*. 2010 Dec;161(8):1835-42

Distrutti E, Sediari L, Mencarelli A, Renga B, Orlandi S, Russo G, Caliendo G, Santagada V, Cirino G, Wallace JL, Fiorucci S. 5-Amino-2-hydroxybenzoic acid 4-(5-thioxo-5H-[1,2]dithiol-3yl)-phenyl ester (ATB-429), a hydrogen sulfide-releasing derivative of mesalamine, exerts antinociceptive effects in a model of postinflammatory hypersensitivity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Oct;319(1):447-58.

Dray A, Read SJ. Arthritis and pain. Future targets to control osteoarthritis pain. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(3):212.

Drews G, Düfer M. Role of K(ATP) channels in β -cell resistance to oxidative stress. *Diabetes Obes Metab*. 2012 Oct;14 Suppl 3:120-8.

Ekmekcioglu C, Strauss-Blasche G, Holzer F, Marktl W. Effect of sulfur baths on antioxidative defense systems, peroxide concentrations and lipid levels in patients with degenerative osteoarthritis. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd*. 2002 Aug;9(4):216-20.

El Zorkany B, Alwahshi HA, Hammoudeh M, Al Emadi S, Benitha R, Al Awadhi A, Bouajina E, Laatar A, El Badawy S, Al Badi M, Al-Maini M, Al Saleh J, Alswailem R, Ally MM, Batha W, Djoudi H, El Garf A, El Hadidi K, El Marzouqi M, Hadidi M, Maharaj AB, Masri AF, Mofti A, Nahar I, Pettipher CA, Spargo CE, Emery P. Suboptimal management of rheumatoid arthritis in the Middle East and Africa: could the EULAR recommendations be the start of a solution? *Clin Rheumatol*. 2013 Feb;32(2):151-9.

Eleotério RB, Borges APB, Pontes KCS, Fernandes NA, Soares PF, Silva MB, Martins NJS, & Machado JP. Glucosamine and chondroitin sulfate in the repair of osteochondral defects in dogs - clinical-radiographic analysis. *Revista Ceres*, 2012 59(5), 587-596.

Ekmekcioglu C, Strauss-Blasche G, Holzer F, Marktl W. Effect of sulfur baths on antioxidative defense systems, peroxide concentrations and lipid levels in patients with degenerative osteoarthritis. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd*. 2002 Aug;9(4):216-20.

Ekundi-Valentim E, Santos KT, Camargo EA, Denadai-Souza A, Teixeira SA, Zanoni CI, Grant AD, Wallace J, Muscará MN, Costa SK. Differing effects of exogenous and endogenous hydrogen sulphide in carrageenan-induced knee joint synovitis in the rat. *Br J Pharmacol*. 2010 Apr;159(7):1463-74.

Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, Doeller JE, Kraus DW, Tao L, Jiao X, Scalia R, Kiss L, Szabo C, Kimura H, Chow CW, Lefer DJ. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Sep 25;104(39):15560-5.

Eto K, Asada T, Arima K, Makifuchi T, Kimura H. Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 May 24;293(5):1485-8.

Fanea R, Voroneanu M. [Patient-marker of failure of post-operative progress in dento-alveolar surgery]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2008 Oct-Dec;112(4):1084-7.

Fernandes D, Assreuy J. Involvement of guanylate cyclase and potassium channels on the delayed phase of mouse carrageenan-induced paw oedema. *Eur J Pharmacol*. 2004 Oct 6;501(1-3):209-14.

Ferraz-Amaro I, Machín S, Carmona L, González-Alvaro I, Díaz- González F; EMECAR study group. Pattern of use and safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs in rheumatoid arthritis patients. A prospective analysis from clinical practice. *Reumatol Clin* 2009; 5(6):252-8.

Filipovic MR, Miljkovic J, Allgäuer A, Chaurio R, Shubina T, Herrmann M, Ivanovic-Burmazovic I. Biochemical insight into physiological effects of H₂S: reaction with peroxynitrite and formation of a new nitric oxide donor, sulfinyl nitrite. *Biochem J*. 2012 Jan 15;441(2):609-21.

Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Rizzo G, Mencarelli A, Orlandi S, Zanardo R, Renga B, Di Sante M, Morelli A, Cirino G, Wallace JL. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. *Gastroenterology*. 2005 Oct;129(4):1210-24.

Fiorucci S, Orlandi S, Mencarelli A, Caliendo G, Santagada V, Distrutti E, Santucci L, Cirino G, Wallace JL. Enhanced activity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of mesalamine (ATB-429) in a mouse model of colitis. *Br J Pharmacol*. 2007 Apr;150(8):996-1002.

Flatters SJ, Bennett GJ. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain*. 2004 May;109(1-2):150-61.

Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1984;105:114-21.

Fornasari D. Pain mechanisms in patients with chronic pain. *Clin Drug Investig*. 2012 Feb;32 Suppl 1:45-52.

Freilich RJ, Balmaceda C, Seidman AD, Rubin M, DeAngelis LM. Motor neuropathy due to docetaxel and paclitaxel. *Neurology*. 1996 Jul;47(1):115-8.

Freitas A, Alves-Filho JC, Secco DD, Neto AF, Ferreira SH, Barja-Fidalgo C, Cunha FQ. Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. *Br J Pharmacol*. 2006 Oct;149(4):345-54. Epub 2006 Sep 4.

Furneri G, Mantovani LG, Belisari A, Mosca M, Cristiani M, Bellelli S, Cortesi PA, Turchetti G. Systematic literature review on economic implications and pharmacoeconomic issues of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2012 Jul-Aug;30(4 Suppl 73):72-84.

Galluzzi KE. Managing neuropathic pain. *J Am Osteopath Assoc*. 2007 Nov;107(10 Suppl 6):ES39-48.

Gan EY, Tian EA, Tey HL. Management of Herpes Zoster and Post-Herpetic Neuralgia. *Am J Clin Dermatol*. 2013 Mar 2.

Gao C, Xu DQ, Gao CJ, Ding Q, Yao LN, Li ZC, Chai W. An exogenous hydrogen sulphide donor, NaHS, inhibits the nuclear factor κ B inhibitor kinase/nuclear factor κ B inhibitor/nuclear factor- κ B signaling pathway and exerts cardioprotective effects in a rat hemorrhagic shock model. *Biol Pharm Bull*. 2012;35(7):1029-34.

Gauchan P, Andoh T, Kato A, Sasaki A, Kuraishi Y. Effects of the prostaglandin E1 analog limaprost on mechanical allodynia caused by chemotherapeutic agents in mice. *J Pharmacol Sci*. 2009 Mar;109(3):469-72.

Gong QH, Wang Q, Pan LL, Liu XH, Xin H, Zhu YZ. S-propargyl-cysteine, a novel hydrogen sulfide-modulated agent, attenuates lipopolysaccharide-induced spatial learning and memory impairment: involvement of TNF signaling and NF- κ B pathway in rats. *Brain Behav Immun*. 2011 Jan;25(1):110-9.

Habig WH, Pabst MJ, Fleischner G, Gatmaitan Z, Arias IM, Jakoby WB. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974 Oct;71(10):3879-82.

Hame SL, Alexander RA. Knee osteoarthritis in women. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2013 Mar 8.

Haseeb A, Haqqi TM. Immunopathogenesis of osteoarthritis. *Clin Immunol*. 2013 Jan 6;146(3):185-196.

Hara K, Saito Y, Kirihaara Y, Sakura S, Kosaka Y. Antinociceptive effects of intrathecal L-type calcium channel blockers on visceral and somatic stimuli in the rat. *Anesth Analg*. 1998 Aug;87(2):382-7.

Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1995;30(6):445-600.

Hess LM, Barakat R, Tian C, Ozols RF, Alberts DS. Weight change during chemotherapy as a potential prognostic factor for stage III epithelial ovarian carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 2007 Nov;107(2):260-5.

Hsu CC, Lin RL, Lee LY, Lin YS. Hydrogen sulfide induces hypersensitivity of rat capsaicin-sensitive lung vagal neurons: role of TRPA1 receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013 Oct;305(7):R769-79.

Hu LF, Wong PT, Moore PK, Bian JS. Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in microglia. *J Neurochem*. 2007 Feb;100(4):1121-8.

Hu LF, Lu M, Tiong CX, Dawe GS, Hu G, Bian JS. Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on Parkinson's disease rat models. *Aging Cell*. 2010 Apr;9(2):135-46.

Hutter MM, Wick EC, Day AL, Maa J, Zerega EC, Richmond AC, Jordan TH, Grady EF, Mulvihill SJ, Bunnett NW, Kirkwood KS. Transient receptor potential vanilloid (TRPV-1) promotes neurogenic inflammation in the pancreas via activation of the neurokinin-1 receptor (NK-1R). *Pancreas*. 2005 Apr;30(3):260-5.

Ibrahim M, Derbyshire ER, Marletta MA, Spiro TG. Probing soluble guanylate cyclase activation by CO and YC-1 using resonance Raman spectroscopy. *Biochemistry*. 2010 May 11;49(18):3815-23.

Irvine JC, Ganthavee V, Love JE, Alexander AE, Horowitz JD, Stasch JP, Kemp-Harper BK, Ritchie RH. The soluble guanylyl cyclase activator bay 58-2667 selectively limits cardiomyocyte hypertrophy. *PLoS One*. 2012;7(11):e44481.

Jhaveri MD, Elmes SJ, Kendall DA, Chapman V. Inhibition of peripheral vanilloid TRPV1 receptors reduces noxious heat-evoked responses of dorsal horn neurons in naïve, carrageenan-inflamed and neuropathic rats. *Eur J Neurosci*. 2005 Jul;22(2):361-70.

Jesse CR, Bortolatto CF, Savegnago L, Rocha JB, Nogueira CW. Involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of tramadol in the rat forced swimming test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008 Dec 12;32(8):1838-43.

Jia J, Xiao Y, Wang W, Qing L, Xu Y, Song H, Zhen X, Ao G, Alkayed NJ, Cheng J. Differential mechanisms underlying neuroprotection of hydrogen sulfide donors against oxidative stress. *Neurochem Int*. 2013 Jun;62(8):1072-8.

Jiang B, Tang G, Cao K, Wu L, Wang R. Molecular mechanism for H₂S-induced activation of KATP channels. *Antioxid. Redox Signal*. 2010 12:1167–78

Kashfi K, Olson KR. Biology and therapeutic potential of hydrogen sulfide and hydrogen sulfide-releasing chimeras. *Biochem Pharmacol*. 2013 Mar 1;85(5):689-703.

Katsuyama S, Sato K, Yagi T, Kishikawa Y, Nakamura H. Effects of repeated milnacipran and fluvoxamine treatment on mechanical allodynia in a mouse paclitaxel-induced neuropathic pain model. *Biomed Res*. 2013 Apr;34(2):105-11.

Kawabata A, Ishiki T, Nagasawa K, Yoshida S, Maeda Y, Takahashi T, Sekiguchi F, Wada T, Ichida S, Nishikawa H. Hydrogen sulfide as a novel nociceptive messenger. *Pain* 2007 132:74-81.

Kearney PM, Baigent C, Godwin J, Halls H, Emberson JR, Patrono C. Do selective cyclooxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials. *BMJ*. 2006 Jun 3;332(7553):1302-8.

Khakzad MR, Mirsadraee M, Mohammadpour A, Ghafarzadegan K, Hadi R, Saghari M, Meshkat M. Effect of verapamil on bronchial goblet cells of asthma: an experimental study on sensitized animals. *Pulm Pharmacol Ther*. 2012 Apr;25(2):163-8.

Kimura Y, Kimura H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J*. 2004 Jul;18(10):1165-7. Epub 2004 May 20.

Kimura H, Nagai Y, Umemura K, Kimura Y. Physiological roles of hydrogen sulfide: synaptic modulation, neuroprotection, and smooth muscle relaxation. *Antioxid Redox Signal*. 2005 May-Jun;7(5-6):795-803. Review.

Kimura H. Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system. *Neurochem Int*. 2013 Nov;63(5):492-7.

Kloesch B, Liszt M, Krehan D, Broell J, Kiener H, Steiner G. High concentrations of hydrogen sulphide elevate the expression of a series of pro-inflammatory genes in fibroblast-like synoviocytes derived from rheumatoid and osteoarthritis patients. *Immunol Lett*. 2012 Jan 30;141(2):197-203.

Klusakova I, Dubovy P. Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries - an anatomical perspective. *Ann Anat* 2009;191:248-59.

Kodala R, Chattopadhyay M, Kashfi K. NOSH-Aspirin: A Novel Nitric Oxide-Hydrogen Sulfide-Releasing Hybrid: A New Class of Anti inflammatory Pharmaceuticals. *ACS Med Chem Lett.* 2012 Mar 8;3(3):257262.

Koenders, M.I.; Joosten, L. A. B.; Vandenberg, W. B. Potential new targets in arthritis therapy: interleukin (IL)-17 and its relation to tumour necrosis factor and IL-1 in experimental arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2006 v. 65, n. 3, p. 29-33.

Kubo S, Doe I, Kurokawa Y, Kawabata A. Hydrogen sulfide causes relaxation in mouse bronchial smooth muscle. *J Pharmacol Sci.* 2007 Aug;104(4):392-6.

Lan T, Yang ZL, Yang X, Liu YJ, Wang XR, Zeng QY. Extensive functional diversification of the *Populus* glutathione S-transferase supergene family. *Plant Cell.* 2009 Dec;21(12):3749-66.

Lasker GF, Pankey EA, Kadowitz PJ. Modulation of soluble guanylate cyclase for the treatment of erectile dysfunction. *Physiology (Bethesda).* 2013 Jul;28(4):262-9.

Lee M, Sparatore A, Del Soldato P, McGeer E, McGeer PL. Hydrogen sulfide-releasing NSAIDs attenuate neuroinflammation induced by microglial and astrocytic activation. *Glia.* 2010 Jan 1;58(1):103-13

Lee AS, Ellman MB, Yan D, Kroin JS, Cole BJ, van Wijnen AJ, Im HJ. A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain. *Gene.* 2013 Sep 25;527(2):440-7.

Lee M, McGeer E, Kodala R, Kashfi K, McGeer PL. NOSH-aspirin (NBS-1120), a novel nitric oxide and hydrogen sulfide releasing hybrid, attenuates neuroinflammation induced by microglial and astrocytic activation: a new candidate for treatment of neurodegenerative disorders. *Glia.* 2013 Oct;61(10):1724-34.

Leibetseder V, Strauss-Blasche G, Holzer F, Marktl W, Ekmekcioglu C. Improving homocysteine levels through balneotherapy: effects of sulphur baths. *Clin Chim Acta.* 2004 May;343(1-2):105-11

Levy D, Zhang XC, Jakubowski M, Burstein R. Sensitization of meningeal nociceptors: inhibition by naproxen. *Eur J Neurosci.* 2008 Feb;27(4):917-22.

Li L, Fox B, Keeble J, Salto-Tellez M, Winyard PG, Wood ME, Moore PK, Whiteman M. The complex effects of the slow-releasing hydrogen sulfide donor GYY4137 in a model of acute joint inflammation and in human cartilage cells. *J Cell Mol Med.* 2013 Mar;17(3):365-76.

Li, L. et al. Anti-inflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative. *Free Radic. Biol. Med.* 2007, 42, 706–719

Li L, Salto-Tellez M, Tan CH, Whiteman M, Moore PK. GYY4137, a novel hydrogen sulfide-releasing molecule, protects against endotoxic shock in the rat. *Free Radic Biol Med.* 2009 Jul 1;47(1):103-13.

Liu YY, Sparatore A, Del Soldato P, Bian JS. H₂S releasing aspirin protects amyloid beta induced cell toxicity in BV-2 microglial cells. *Neuroscience*. 2011 Oct 13;193:80-8.

Luongo L, Costa B, D'Agostino B, Guida F, Comelli F, Gatta L, Matteis M, Sullo N, De Petrocellis L, de Novellis V, Maione S, Di Marzo V. Palvanil, a non-pungent capsaicin analogue, inhibits inflammatory and neuropathic pain with little effects on bronchopulmonary function and body temperature. *Pharmacol Res*. 2012 Sep;66(3):243-50.

Malfait AM, Schnitzer TJ. Towards a mechanism-based approach to pain management in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2013 Nov;9(11):65464.

Malik B, Stillman M. Pain Syndromes. In: Savitz S, Ronthal M, editors. *Neurology Review for Psychiatrists*. 1st Edition ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009: 253-5

Melin E, Lindroos E, Lundberg IE, Borg K, Korotkova M. Elevated expression of Prostaglandin E₂ synthetic pathway in skeletal muscle of prior polio patients. *J Rehabil Med*. 2013 Oct 25.

Mendes-Silverio CB, Leiria LO, Morganti RP, Anhê GF, Marcondes S, Mónica FZ, De Nucci G, Antunes E. Activation of haem-oxidized soluble guanylyl cyclase with BAY 60-2770 in human platelets lead to overstimulation of the cyclic GMP signaling pathway. *PLoS One*. 2012;7(11):e47223.

Morales-Lázaro SL, Simon SA, Rosenbaum T. The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *J Physiol*. 2013 Jul 1;591(Pt 13):3109-21.

Morel A, Malinowska J, Olas B. Antioxidative properties of hydrogen sulfide may involve in its antiadhesive action on blood platelets. *Clin Biochem*. 2012 Dec;45(18):1678-82.

Nagai Y, Tsugane M, Oka J, Kimura H. Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes. *FASEB J*. 2004 Mar;18(3):557-9.

Nam JL, Winthrop KL, van Vollenhoven RF, Pavelka K, Valesini G, Hensor EM, Worthy G, Landewé R, Smolen JS, Emery P, Buch MH. Current evidence for the management of rheumatoid arthritis with biological disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of RA. *Ann Rheum Dis*. 2010 Jun;69(6):976-86.

Nieto FR, Entrena JM, Cendán CM, Pozo ED, Vela JM, Baeyens JM. Tetrodotoxin inhibits the development and expression of neuropathic pain induced by paclitaxel in mice. *Pain*. 2008 Jul 31;137(3):520-31.

Okubo K, Takahashi T, Sekiguchi F, Kanaoka D, Matsunami M, Ohkubo T, Yamazaki J, Fukushima N, Yoshida S, Kawabata A. Inhibition of T-type calcium channels and hydrogen sulfide-forming enzyme reverses paclitaxel-evoked neuropathic hyperalgesia in rats. *Neuroscience*. 2011 Aug 11;188:148-56.

Omote K, Iwasaki H, Kawamata M, Satoh O, Namiki A. Effects of verapamil on spinal anesthesia with local anesthetics. *Anesth Analg*. 1995 Mar;80(3):444-8.

Otsuki T, Nakahama H, Niizuma H, Suzuki J. Evaluation of the analgesic effects of capsaicin using a new rat model for tonic pain. *Brain Res*. 1986 Feb 19;365(2):235-40.

Ott IM, Alter ML, von Websky K, Kretschmer A, Tsuprykov O, Sharkovska Y, Krause-Relle K, Raila J, Henze A, Stasch JP, Hoher B. Effects of stimulation of soluble guanylate cyclase on diabetic nephropathy in diabetic eNOS knockout mice on top of angiotensin II receptor blockade. *PLoS One*. 2012;7(8):e42623.

Paice JA, Ferrell B. The management of cancer pain. *CA Cancer J Clin*. 2011 May-Jun;61(3):157-82.

Papapetropoulos A, Simoes DC, Xanthou G, Roussos C, Gratziou C. Soluble guanylyl cyclase expression is reduced in allergic asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 Jan;290(1):L179-84.

Paunovic V, Harnett MM. Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets for rheumatoid arthritis. *Drugs*. 2013 Feb;73(2):101-15.

Peers C, Bauer CC, Boyle JP, Scragg JL, Dallas ML. Modulation of ion channels by hydrogen sulfide. *Antioxid Redox Signal*. 2012 Jul 1;17(1):95-105.

Piano V, Verhagen S, Schalkwijk A, Hekster Y, Kress H, Lanteri-Minet M, Burgers J, Treede RD, Engels Y, Vissers K. Treatment for Neuropathic Pain in Patients with Cancer: Comparative Analysis of Recommendations in National Clinical Practice Guidelines from European Countries. *Pain Pract*. 2013 Jan 30.

Pinto S, Rao AV, Rao A. Lipid peroxidation, erythrocyte antioxidants and plasma antioxidants in osteoarthritis before and after homeopathic treatment. *Homeopathy*. 2008 Oct;97(4):185-9.

Pimenta CA, Koizumi MS, Teixeira MJ. [Cancer pain: characteristics and management]. *Revista Brasileira de Cancerologia* – 1997, Volume 43 n°1 Jan/Fev/Mar. Portuguese.

Pöhlmann W, Feneberg W. Current management of pain associated with multiple sclerosis. *CNS Drugs*. 2008;22(4):291-324. Review.

Polomano RC, Mannes AJ, Clark US, Bennett GJ. A painful peripheral neuropathy in the rat produced by the chemotherapeutic drug, paclitaxel. *Pain* 2001;94:293–304.

Pratsel HG, Eigner UM, Weinert D, Limbach B. [The analgesic efficacy of sulfur mud baths in treating rheumatic diseases of the soft tissues. A study using the double-blind control method]. *Vopr Kurortol Fizioter Lech Fiz Kult*. 1992 May-Jun;(3):37-41.

Qu K, Chen CP, Halliwell B, Moore PK, Wong PT. Hydrogen sulfide is a mediator of cerebral ischemic damage. *Stroke*. 2006 Mar;37(3):889-93.

Rahman W, Dickenson AH. Voltage gated sodium and calcium channel blockers for the treatment of chronic inflammatory pain. *Neurosci Lett*. 2013 Aug 11.

Ramakrishnan P, Hecht BA, Pedersen DR, Lavery MR, Maynard J, Buckwalter JA, Martin JA. Oxidant conditioning protects cartilage from mechanically induced damage. *J Orthop Res*. 2010 Jul;28(7):914-20.

Ramiro S, Radner H, van der Heijde DM, Buchbinder R, Aletaha D, Landewé RB. Combination therapy for pain management in inflammatory arthritis: a Cochrane systematic review. *J Rheumatol Suppl*. 2012 Sep;90:47-55.

Rashid S, Heer JK, Garle MJ, Alexander SP, Roberts RE. Hydrogen sulphide-induced relaxation of porcine peripheral bronchioles. *Br J Pharmacol*. 2013 Apr;168(8):1902-10.

Reiffenstein RJ, Hulbert WC, Roth SH. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1992, 32: 109–134.

Rodrigues, L. (2012). Efeito de doadores do H₂S no controle do prurido e inflamação cutânea em camundongos. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. Recuperado em 2013-04-07, de <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42136/tde-18092012-093925/>

Rodríguez MJ, Martínez-Moreno M, Ortega FJ, Mahy N. Targeting microglial K(ATP) channels to treat neurodegenerative diseases: a mitochondrial issue. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:194546.

Rowinsky EK, Chaudhry V, Cornblath DR, Donehower RC. Neurotoxicity of Taxol. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 1993;(15):107-15.

Saha L, Hota D, Chakrabarti A. Evaluation of lercanidipine in Paclitaxel-induced neuropathic pain model in rat: a preliminary study. *Pain Res Treat*; 2012:143579.

Sakurai M, Egashira N, Kawashiri T, Yano T, Ikesue H, Oishi R. Oxaliplatin-induced neuropathy in the rat: involvement of oxalate in cold hyperalgesia but not mechanical allodynia. *Pain*. 2009 Dec 15;147(1-3):165-74.

Salvemini D, Kim SF, Mollace V. Reciprocal regulation of the nitric oxide and cyclooxygenase pathway in pathophysiology: relevance and clinical implications. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013 Apr 1;304(7):R473-87.

Salvemini D, Masferrer JL. Interactions of nitric oxide with cyclooxygenase: in vitro, ex vivo, and in vivo studies. *Methods Enzymol*. 1996;269:12-25. Review.

Schaible HG, Richter F. Pathophysiology of pain. *Langen- becks Arch Surg* 2004; 389 (4): 237-43

Schmidtke A, Gao W, König P, Heine S, Motterlini R, Ruth P, Schlossmann J, Koesling D, Niederberger E, Tegeder I, Friebe A, Geisslinger G. cGMP produced by NO-sensitive guanylyl cyclase essentially contributes to inflammatory and neuropathic pain by using targets different from cGMP-dependent protein kinase I. *J Neurosci*. 2008 Aug 20;28(34):8568-76.

Searcy DG, Lee SH. Sulfur reduction by human erythrocytes. *J Exp Zool* 1998, 282: 310–322.

Sekiguchi F, Kawabata A. T-type calcium channels: functional regulation and implication in pain signaling. *J Pharmacol Sci*. 2013;122(4):244-50.

Senna ER, De Barros AL, Silva EO, Costa IF, Pereira LV, Ciconelli RM, Ferraz MB. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J Rheumatol*. 2004 Mar;31(3):594-7.

Sheihet L, Garbuzenko OB, Bushman J, Gounder MK, Minko T, Kohn J. Paclitaxel in tyrosine-derived nanospheres as a potential anti-cancer agent: in vivo evaluation of toxicity and efficacy in comparison with paclitaxel in Cremophor. *Eur J Pharm Sci*. 2012 Feb 14;45(3):320-9.

Shetty S, Fisher MC, Ahmed AR. Review on the influence of protocol design on clinical outcomes in rheumatoid arthritis treated with rituximab. *Ann Pharmacother*. 2013 Mar;47(3):311-23. doi: 10.1345/aph.1R574. Epub 2013 Feb 27.

Shi WW, Yang Y, Shi Y, Jiang C. K(ATP) channel action in vascular tone regulation: from genetics to diseases. *Sheng Li Xue Bao*. 2012 Feb 25;64(1):1-13. Review.

Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Nagahara N, Kimura H. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *J Biochem* 2009, 146: 623–626.

Sidhapuriwala J, Li L, Sparatore A, Bhatia M, Moore PK. Effect of S-diclofenac, a novel hydrogen sulfide releasing derivative, on carrageenan-induced hindpaw oedema formation in the rat. *Eur J Pharmacol*. 2007 Aug 13;569(1-2):149-54.

Sirmagul B, Kilic FS, Batu O, Erol K. The effects of verapamil on stress- and histamine-induced gastric lesions in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2004 Dec;26(10):763-7.

Smith PK, Nilius B. Transient receptor potentials (TRPs) and anaphylaxis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2013 Feb;13(1):93-100.

Stasch JP, Evgenov OV. Soluble guanylate cyclase stimulators in pulmonary hypertension. *Handb Exp Pharmacol*. 2013;218:279-313.

Steinbrecher KA, Harmel-Laws E, Garin-Laflam MP, Mann EA, Bezerra LD, Hogan SP, Cohen MB. Murine guanylate cyclase C regulates colonic injury and inflammation. *J Immunol*. 2011 Jun 15;186(12):7205-14.

Stipanuk MH, Beck PW. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J.* 1982 Aug 15;206(2):267-77.

Solomon DH, Rassen JA, Glynn RJ, Lee J, Levin R, Schneeweiss S. The comparative safety of analgesics in older adults with arthritis. *Arch Intern Med* 2010; 170(22):1968–76. [Erratum in: *Arch Intern Med* 2011; 171(5):403]

Song S, Yu B, Wei Y, Wientjes MG, Au JL. Low-dose suramin enhanced paclitaxel activity in chemotherapy-naïve and paclitaxel-pretreated human breast xenograft tumors. *Clin Cancer Res.* 2004 Sep 15;10(18 Pt 1):6058-65.

Sukenik S, Buskila D, Neumann L, Kleiner-Baumgarten A, Zimlichman S, Horowitz J. Sulphur bath and mud pack treatment for rheumatoid arthritis at the Dead Sea area. *Ann Rheum Dis.* 1990 Feb;49(2):99-102.

Sun L, Wang H, Hu J, Han J, Matsunami H, Luo M. Guanylyl cyclase-D in the olfactory CO₂ neurons is activated by bicarbonate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Feb 20;106(6):2041-6.

Sun Y, Tang CS, DU JB, Jin HF. Hydrogen sulfide and vascular relaxation. *Chin Med J (Engl).* 2011 Nov;124(22):3816-9. Review.

Szallasi A, Blumberg PM. Complex Regulation of TRPV1 by Vanilloids. In: Liedtke WB, Heller S, editors. *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. Boca Raton (FL): CRC Press; 2007. Chapter 6.

Szallasi A. Targeting TRP channels for pain relief. *Eur J Pharmacol.* 2013 Mar 14.

Takahashi N, Kozai D, Mori Y. TRP channels: sensors and transducers of gasotransmitter signals. *Front Physiol.* 2012;3:324.

Teles, A. M. (2007). Contribuição farmacológica à gênese da inflamação neurogênica em vias aéreas de ratos frente a dois poluentes: Partículas eliminadas na exaustão do diesel (PED) e 1,2-naftoquinona (1,2-NQ). Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. Recuperado em 2013-04-29, de <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42136/tde-24092007-094137/>

Von Frey M. Untersuchungen über die Sinnesfunktion der menschlichen Haut; Erste Abhandlung: Druckempfindung und Schmerz. *Abh Mathemphys Clas Kgl Sachs Ges Wiss* 1897;23:208–217

Wallace JL. Hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drugs. *Trends Pharmacol Sci.* 2007 Oct;28(10):501-5. Epub 2007 Sep 19. Review.

Wallace JL, Dickey M, McKnight W, Martin GR. Hydrogen sulfide enhances ulcer healing in rats. *FASEB J.* 2007 Dec;21(14):4070-6. Epub 2007 Jul 18.

Wallace JL, Vong L, McKnight W, Dickey M, Martin GR. Endogenous and exogenous hydrogen sulfide promotes resolution of colitis in rats. *Gastroenterology*. 2009 Aug;137(2):569-78, 578.e1.

Wallace JL, Caliendo G, Santagada V, Cirino G. Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of naproxen (ATB-346). *Br J Pharmacol*. 2010 Mar;159(6):1236-46.

Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev*. 2012 Apr;92(2):791-896.

Wang TX, Shi XY, Liu YH. Endogenous cystathionine-gamma-lyase/hydrogen sulfide pathway regulates apoptosis of HepG2 cells. *Yao Xue Xue Bao*. 2013 Aug;48(8):1233-40.

Wick EC, Hoge SG, Grahn SW, Kim E, Divino LA, Grady EF, Bunnett NW, Kirkwood KS. Transient receptor potential vanilloid 1, calcitonin gene-related peptide, and substance P mediate nociception in acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 May;290(5):G959-69.

Woolf CJ. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann Intern Med* 2004; 140 (6): 441-51

Yamaguchi T, Narita M, Morita T, Kizawa Y, Matoba M. Recent developments in the management of cancer pain in Japan: education, clinical guidelines and basic research. *Jpn J Clin Oncol*. 2012 Dec;42(12):1120-7.

Yan SK, Chang H, Wang L, Wu R, Wang QH. Effects of hydrogen sulfide on homocysteine-induced oxidative stress in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;351:485-91.

Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa AK, Mu W, Zhang S, Snyder SH, Wang R. H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*. 2008 Oct 24;322(5901):587-90.

Yoon PJ, Parajuli SP, Zuo DC, Shahi PK, Oh HJ, Shin HR, Lee MJ, Yeum CH, Choi S, Jun JY. Interplay of hydrogen sulfide and nitric oxide on the pacemaker activity of interstitial cells of Cajal from mouse small intestine. *Chonnam Med J*. 2011 Aug;47(2):72-9.

Zanardo RC, Brancialeone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *FASEB J*. 2006 Oct;20(12):2118-20.

Zanchet EM, Cury Y. Peripheral tachykinin and excitatory amino acid receptors mediate hyperalgesia induced by Phoneutria nigriventer venom. *Eur J Pharmacol*. 2003 Apr 25;467(1-3):111-8.

Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J.* 2001 Nov 1;20(21):6008-16.

Zhao M, Isami K, Nakamura S, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice. *Mol Pain.* 2012 Jul 28;8:55.