



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas
Departamento de Química
Curso de Pós-Graduação em Química

***SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE N,N'-DIARILURÉIAS, FRENTE A
DIFERENTES MODELOS DE HIPERNOCICEPÇÃO E NA
COLITE EM CAMUNDONGOS.***

PAULO CÉSAR LEAL

Florianópolis – 2009

PAULO CÉSAR LEAL

***SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE N,N'-DIARILURÉIAS, FRENTE A
DIFERENTES MODELOS DE HIPERNOCICEPÇÃO E NA
COLITE EM CAMUNDONGOS.***

**Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Química da Universidade Federal de
Santa Catarina, como requisito parcial a obtenção
do grau de Doutor em Química.**

Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Nunes

Co-orientador: Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes

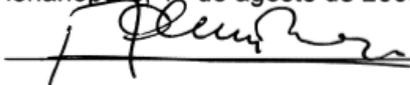
Florianópolis - 2009

PAULO CÉSAR LEAL

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE N,N'-DIARILURÉIAS, FRENTE A DIFERENTES MODELOS DE HIPERNOCICEPÇÃO E NA COLITE EM CAMUNDONGOS.

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de Doutor em Química no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

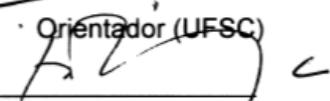
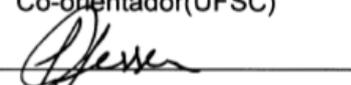
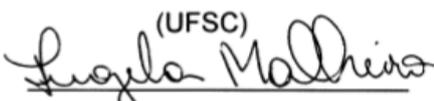
Florianópolis, 17 de agosto de 2009.



Prof. Dr. Ademir Neves

Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Ricardo José Nunes
Orientador (UFSC)
Prof. Dr. Antônio Luiz Braga
(UFSC)
Prof. Dr. Hernán Francisco Terenzi
(UFSC)
Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes
Co-orientador (UFSC)
Prof. Dr. José Carlos Gesser
(UFSC)
Prof.ª Dra. Angela Malheiros
(UNIVALI)
Prof. Dr. Brás Héleno de Oliveira
Relator (UFPR)

*“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas
usadas que já tem a forma do nosso corpo
e esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre
aos mesmos lugares.
É o tempo da travessia e,
se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre,
à margem de nós mesmos”.*

(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

- ✓ À Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC;
- ✓ Ao Departamento de Química e o curso de Pós-Graduação em Química por propiciarem o caminho para o desenvolvimento deste trabalho;
- ✓ Ao Prof. Dr. Ricardo José Nunes pela amizade e compreensão;
- ✓ Ao Prof. Dr Rosendo Augusto Yunes pela amizade e seus ensinamentos;
- ✓ Ao Prof. Dr. José Andres Yunes do Centro Boldrini (Campinas-SP) pela generosa parceria e o fornecimento de alguns reagentes utilizados neste trabalho;
- ✓ Ao Prof. Dr. João Batista Calixto por disponibilizar seu laboratório e alunos e técnicas (Aline e Adriane) para realização de parte deste trabalho;
- ✓ À Prof. Dra. Maria Martha Campos pela amizade e orientação nos estudos farmacológicos;
- ✓ À Nara Quintão, Mariane N. Majavachi, Isa. Deschamps e Alisson Bento pelos experimentos farmacológicos desenvolvidos em conjunto neste trabalho;
- ✓ Aos funcionários da Central de Análise do Departamento de Química da UFSC por todos estes anos juntos.
- ✓ Aos colegas de laboratório Alessandra, Louise e Marlon e Anderson e a todos que já contribuíram com nosso laboratório;
- ✓ Aos amigos Jacks, Fábio, Marlon, Juliano, Bruno, Fabrício, Cristiano Mora;
- ✓ Aos Professores do Departamento de Química, o meu muito obrigado em especial ao Pro. Dr. Faruk None e Prof. Dr.Hugo Gallardo por fornecerem alguns dos reagentes que foram utilizados neste trabalho;

- ✓ Ao Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira (UFPR) por aceitar o convite para participar como relator deste trabalho;
- ✓ A professora Dra. Angela Malheiros (UNIVALI) por aceitar o convite para participar como membro externo da banca examinadora;
- ✓ À Banca examinadora composta pelos professores: Dr. Hernan Terenzi (UFSC), Dr. Antônio Luiz Braga (UFSC), Dr. José Carlos Gesser (UFSC) por aceitarem o convite para participar da banca examinadora deste trabalho;
- ✓ Este trabalho foi apoiado por concessões do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), o aos Núcleos de Excelência de Programa de Apoio (PRONEX) e à Pesquisa de Fundação de Apoio do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e recursos da FAPESP;
- ✓ Ao CNPq pela bolsa de estudos e suporte financeiro;
- ✓ A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XIX
LISTA DE TABELAS	XXV
LISTA DE GRÁFICOS	XXVI
LISTA DE TERMOS E ABREVIATURAS	XXIX
RESUMO	XXXIII
ABSTRACT	XXXV
1.0 INTRODUÇÃO	37
1.1 A ORIGEM DOS FÁRMACOS.....	37
1.2. A QUÍMICA MEDICINAL	39
1.3 FÁRMACOS SINTÉTICOS	40
1.4 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MEDICAMENTOS	41
1.5 MODIFICAÇÃO ESTRUTURAL E CORRELAÇÃO ENTRE ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	45
1.6 OTIMIZAÇÃO DO COMPOSTO PROTÓTIPO.....	48
1.7 Método manual de Topliss.	48
1.8 REGRA DOS CINCO DE CHRISTOPHER A. LIPINSKI PARA COMPOSTOS SINTÉTICOS.	52
1.9 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS DA INFLAMAÇÃO E DA DOR.	52
1.10 DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS.	58
1.11 QUIMIOCINAS E SEUS RECEPTORES NA INFLAMAÇÃO.....	60
1.12 UTILIDADE TERAPÊUTICA.....	66
2.0 REVISÃO	67
2.1 PRIMEIRO INIBIDOR NÃO PEPTÍDICO SELETIVO E POTENTE DE UM RECEPTOR DE UMA QUIMIOCINA.....	67
2.2 QUÍMICA DA URÉIA.....	72
2.3 N,N',-DIARILURÉIAS BIOATIVAS	73

2.4 ALGUNS EXEMPLOS DO USO DE N,N'-DIARILUREIAS NA PESQUISA PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS.....	75
2.5 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE N,N'-DIARILURÉIAS.....	80
Síntese e decomposição de N,N'-diariluréia, reação de fosgenação de aminas aromáticas.....	80
2.6 SÍNTESE DE N,N'-DIARILURÉIAS VIA REAÇÃO DE ISOCIANATO DE FENILA COM AMINAS AROMÁTICAS.....	81
2.7 SÍNTESE DE N,N'-DIARILURÉIAS SIMÉTRICAS VIA REAÇÃO DE ANILINA COM URÉIA.	82
3.0 OBJETIVOS.....	84
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	84
3.2 OS OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO PRESENTE TRABALHO SÃO:.....	84
4.0 PARTE EXPERIMENTAL.....	86
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS: SÍNTESES DOS COMPOSTOS ANÁLOGOS.....	86
4.1.1 Reagentes e instrumentação.....	86
4.2 SÍNTESE DAS N,N'-DIARILURÉIAS SUBSTITUÍDAS.....	87
4.2.1 Síntese do SB225002 1-(2-Hidroxi-4-nitrofenila)-3-(2-bromofenila)-uréia.	87
Dados espectroscópicos.....	88
4.2.2 Síntese do composto 1-(2-hidroxi-4-nitrofenila)-3-(1-naftaleno-)-uréia (A00) ...	89
Dados espectroscópicos.....	90
4.2.3 Síntese do composto 1-(1-naftaleno)-3-(5-nitro-2-piridina)-uréia (A01).....	91
Dados espectroscópicos.....	91
4.2.4 Preparação do composto 1-(1-naftaleno)-3-(2-tiazol)-uréia (A02).....	92
Dados espectroscópicos.....	92
4.2.5 Preparação do composto 1-(1-naftaleno)-3-(4-nitrofenil)-uréia (A03).....	93
Dados espectroscópicos.....	93
4.2.6 Preparação do composto 1-(4-bromofenila)-3-(1-naftaleno)-uréia (A04).....	94
Dados espectroscópicos.....	94

4.2.7	Preparação do composto 1-(3,4-diclorofenila)-3-(1-naftaleno)-uréia (A05).	95
	Dados espectroscópicos.	95
4.2.8	Preparação do composto 1-(4-clorofenila)-3-(1-naftaleno)-uréia (A06).	96
	Dados espectroscópicos.	96
4.2.9	Preparação do composto -(1-naftaleno)-3-(2-pirazina)-uréia (A07).	97
	Dados espectroscópicos.	97
4.2.10	Preparação do composto -(1-naftaleno)-3-fenetiluréia (A08).	98
	Dados espectroscópicos.	98
4.2.11	Preparação do composto 1-(2-(1,3-benzodioxol-6-etil)-3-(1-naftaleno)-uréia (A09).	99
	Dados espectroscópicos.	99
4.2.12	Preparação do composto 1-(4-metoxifenetila)-3-(1-naftaleno)-uréia (A10).	100
	Dados espectroscópicos.	100
4.2.13	Preparação do composto 1-(3,4-diclorobenzila)-3-(1-naftaleno)-uréia (A11).	101
	Dados espectroscópicos.	101
4.2.14	Preparação do composto 1-(2-bromofenila)-3-(4-nitrofenila)-uréia (A12).	102
	Dados espectroscópicos.	102
4.2.15	Preparação do composto 1-(2-bromofenila)-3-(2-hidroxifenila)uréia (A13).	103
	Dados espectroscópicos.	103
4.2.16	Preparação do composto 1,3-bis-(1-naftaleno)-uréia (A14).	104
	Dados espectroscópicos.	104
4.2.17	Preparação do composto 1-(4-fluorfenila)-3-(1-naftaleno)-uréia (A15).	105
	Dados espectroscópicos.	105
4.2.18	Preparação do composto 1-(2-bromofenila)-3-(1-naftaleno)-uréia (A16).	106
	Dados espectroscópicos.	106
4.2.19	Síntese do composto 1-(2-fluorfenila)-3-(1-naftaleno)-uréia (A17).	107
	Dados espectroscópicos.	107
4.2.20	Síntese do composto 1-(1-naftaleno)-3-feniluréia (A18).	108

Dados espectroscópicos.....	108
4.2.21 Síntese do composto 1-(2-bromofenil)-3-(2-metoxi-4-nitrofenila)-uréia (A19).	109
Preparação do diazometano.....	109
Dados espectroscópicos.....	110
4.2.22 Síntese do composto 1-(2-bromofenila)-3-(8-quinolina)-uréia (A20).	112
Dados espectroscópicos.....	112
4.2.23 Síntese do composto 1-(2-bromofenila)-3-feniluréia (A21).....	113
Dados espectroscópicos.....	113
4.2.24 Síntese do composto 1-(1-naftaleno)-3-metóxfeniluréia (A22).	114
Dados espectroscópicos.....	114
4.2.25 Síntese do composto 1-(3,4-diclorofenila)-3-(2-naftaleno)-uréia (A23).	115
Dados espectroscópicos.....	115
4.2.26 Síntese do composto 1-(3-clorofenila)-3-(1-naftaleno)-uréia (A24).	116
Dados espectroscópicos.....	116
4.2.27 Síntese do composto 1-(2-bromofenil)-3-(3,4-diclorofenila)-uréia (A25).	117
Dados espectroscópicos.....	117
4.2.28 Síntese do composto 1-(5-cloro-2-hidroxifenila)-3-(3,4-diclorofeniluréia)-uréia (A26).	118
Dados espectroscópicos.....	118
4.2.29 Síntese do composto 1-(4-metoxifenila)-3-(1-naftaleno)-uréia (A27).	119
Dados espectroscópicos.....	119
4.2.30 Síntese do composto 1-(3,4-diclorofenila)-3-(2-hidroxifenila)-uréia (A28).	120
Dados espectroscópicos.....	120
4.2.31 Síntese do composto 1-(5-cloro-2-hidroxifenila)-3-(1-naftaleno)-uréia (A29).	121
Dados espectroscópicos.....	121

4.2.32 Síntese do composto 1-(2-bromofenila)-3-(4-cloro-2-hidroxifenila)-uréia (A30).	122
.....	122
Dados espectroscópicos.....	122
4.2.33 Síntese do composto 1-(4-cloro-2-hidroxifenila)-3-(1-naftaleno)-uréia (A31).	123
.....	123
Dados espectroscópicos.....	123
4.2.34 Síntese do composto 1-(2-bromofenila)-3-(2-naftaleno)-uréia (A32).....	124
Dados espectroscópicos.....	124
4.3 MATERIAIS E MÉTODOS: ENSAIOS BIOLÓGICOS.	125
4.3.1 Os Animais	125
4.4 Comportamento de nocicepção aguda.....	126
4.4.1 Hipernocicepção induzida pelo ácido acético.....	126
4.4.2 Nocicepção induzida pela Formalina.....	127
4.4.3 Modelos evidentes de nocicepção	128
4.4.4 Hipernocicepção mecânica induzida pelo KC (citocina pro-inflamatória), pelo PGE ₂ ou pela epinefrina	130
4.4.5 Hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina	131
4.5 COMPORTAMENTO DA DOR DURADOURA.....	133
4.5.1 Hipernocicepção mecânica induzida pelo complexo adjuvante de Freund (CFA)	133
.....	133
4.5.2 Procedimentos cirúrgicos da constrição parcial do nervo ciático (CPNC).....	133
4.5.3 Resposta da retirada da pata traseira pelos filamentos de Von Frey.	134
4.6 ENSAIOS BIOQUÍMICOS	136
4.6.1 Atividade da Mieloperoxidase.....	136
4.6.2 Determinação de IL-1 β , TNF α ou níveis do KC na pata do rato.....	137
4.7 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NÃO ESPECÍFICOS.	137

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.	139
4.9 MATERIAIS E MÉTODOS DOS ENSAIOS DE COLITE INDUZIDA POR TNBS.....	139
4.9.1 Animais.....	139
4.9.2 Indução da Colite.	140
4.9.3 Tratamento animal.	141
4.9.4 Fármacos e reagentes.....	141
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.	143
5.1 RESULTADOS DA SÍNTESE DO SB225002 E DAS 33 N,N'-DIARILURÉIAS SINTÉTICAS...	143
5.2 MECANISMO GERAL DA REAÇÃO DE UMA AMINA AROMÁTICA COM ISOCIANATO DE FENILA E MECANISMO DE FORMAÇÃO DO DIAZOMETANO.	146
5.3 SÍNTESE QUÍMICA E RELAÇÃO ESTRUTURA E ATIVIDADE	148
5.4 Simplificação da estrutura do SB225002.....	149
5.5 Fusão de anéis.....	152
5.6 Variação dos anéis heteroaromáticos.	156
5.7 Extensão da cadeia (CH ₂) _n	159
5.8 Método manual de Topliss.	162
5.9 ESTRUTURA DOS COMPOSTOS BASEADOS NO ANÁLOGO A05 COM GRUPOS SUBSTITUINTES (3,4-DICLORO).....	166
5.10 ESTRUTURA DOS COMPOSTOS SINTÉTICOS COM PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO ≥ (52 ±3 %), RESULTADOS OBTIDOS PARA O SB225002 NO MODELO DE DOR INDUZIDO PELA CARRAGENINA.	168
5.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS DE HIPERNOCICEPÇÃO INDUZIDA PELA CARRAGENINA (COMPARAÇÃO ENTRE SB225002 SEUS 33 COMPOSTOS ANÁLOGOS SINTÉTICOS).....	171
5.2.1 RESULTADO DO SB225002 E DOS 33 COMPOSTOS ANÁLOGOS, FRENTE O MODELO DE HIPERNOCICEPÇÃO INDUZIDO PELA CARRAGENINA.....	171

5.2.2 Resultado do análogo A00 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	172
5.2.3 Resultado do análogo A01 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida carragenina na dose de (300 µg/pata).	173
5.2.4 Resultado do análogo A02 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	174
5.2.5 Resultado do análogo A03 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	175
5.2.6 Resultado do análogo A04 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	176
5.2.7 Resultado do análogo A05 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	177
5.2.8 Resultado do análogo A06 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	178
5.2.9 Resultado do análogo A07 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à carragenina na dose de (300 µg/pata). .	179

5.2.10 Resultado do análogo A08 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	180
5.2.11 Resultado do análogo A09 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	181
5.2.12 Resultado do análogo A10 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	182
5.2.13 Resultado do análogo A11 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	183
5.2.14 Resultado do análogo A12 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	184
5.2.15 Resultado do análogo A13 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	185
5.2.16 Resultado do análogo A14 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	186
5.2.17 Resultado do análogo A15 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	187

5.2.18 Resultado do análogo A16 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	188
5.2.19 Resultado do análogo A17 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	189
5.2.20 Resultado do análogo A18 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepçãp induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	190
5.2.21 Resultado do análogo A19 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	191
5.2.22 Resultado do análogo A20 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à carragenina na dose de (300 µg/pata). .	192
5.2.23 Resultado do análogo A21 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à carragenina na dose de (300 µg/pata). .	193
5.2.24 Resultado do análogo A22 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	194
5.2.25 Resultado do análogo A23 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	195
5.2.26 Resultado do análogo A24 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	196

5.2.27 Resultado do análogo A25 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	197
5.2.28 Resultado do análogo A26 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	198
5.2.29 Resultado do análogo A27 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	199
5.2.30 Resultado do análogo A28 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	200
5.2.31 Resultado do análogo A29 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	201
5.2.32 Resultado do análogo A30 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	202
5.2.33 Resultado do análogo A31 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	203
5.2.34 Resultado do análogo A32 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).	204

5.3 CURVA DOSE RESPOSTA PARA OS 09 COMPOSTOS ANÁLOGOS SINTÉTICOS (A00, A03, A04, A05, A07, A08, A09, A16 E A28) COM ATIVIDADE \geq AO SB225002 FRENTE AO MODELO DE HIPERNOCICEPÇÃO INDUZIDO PELA CARRAGENINA.....	205
5.3.1 Curva dose resposta do análogo A00 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), frente à carragenina na dose de (300 μ g/Kg).....	205
5.3.2 Curva dose resposta do análogo A03 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), frente à carragenina na dose de (300 μ g/Kg).....	206
5.3.3 Curva dose resposta do análogo A04 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), frente à carragenina na dose de (300 μ g/Kg).....	207
5.3.4 Curva dose resposta do análogo A05 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), frente à carragenina na dose de (300 μ g/Kg).....	208
5.3.5 Curva dose resposta do análogo A07 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), frente à carragenina na dose de (300 μ g/Kg).....	209
5.3.6 Curva dose resposta do análogo A08 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), frente à carragenina na dose de (300 μ g/Kg).....	210
5.3.7 Curva dose resposta do análogo A09 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), frente à carragenina na dose de (300 μ g/Kg).....	211
5.3.8 Curva dose resposta do análogo A16 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), frente à carragenina na dose de (300 μ g/Kg).....	212
5.3.9 Curva dose resposta do análogo A28 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), frente à carragenina na dose de (300 μ g/Kg).....	213
5.4 RESULTADOS DA INIBIÇÃO MÁXIMA NO INTERVALO DE 3 HORAS APÓS O TRATAMENTO COM CARRAGENINA NA DOSE DE (300 μ G/PATA) FRENTE AO SB 225002 E SEUS 33 ANÁLOGOS SINTÉTICOS.	213
5.5 ATIVIDADE DOS ANÁLOGOS SINTÉTICOS.....	223

5.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS REALIZADOS COM O SB225002 EM DIVERSOS MODELOS DE HIPERNOCICEPÇÃO E NA COLITE INDUZIDA POR TNBS.....	224
5.6.1 Hipernocicepção induzida pelo ácido acético para o SB225002.....	224
5.6.2 Hipernocicepção induzida pela formalina para o SB225002.	225
5.6.3 Hipernocicepção induzida pela carragenina, determinação da curva dose resposta para o SB 225002 em doses de (1 – 3 mg/Kg).....	226
5.6.4 Hipernocicepção induzida pelo complexo adjuvante de Freund frente ao SB225002.....	228
5.6.5 Hipernocicepção induzida pela constrição parcial do nervo ciático frente ao SB225002.....	229
5.7 RESULTADOS OBTIDOS COM O SB225002 EM DIFERENTES MODELOS DE NOCICEPÇÃO.	230
5.8 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS COM O SB225002 EM DIFERENTES MODELOS DE NOCICEPÇÃO.	235
5.9 RESULTADOS OBTIDOS DA INVESTIGAÇÃO DA AÇÃO DO ANTAGONISTA SELETIVO DO RECEPTOR CXCR2, SB225002, SOBRE PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS NA COLITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR TNBS EM CAMUNDONGOS.	241
5.9.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM SB225002 SOBRE O DANO MACROSCÓPICO.....	241
5.9.2 Efeito do SB225002 sobre o peso corporal e a mortalidade induzida pelo TNBS	243
5.9.3 Efeito do SB225002 sobre o peso e comprimento do cólon, e peso do baço, no modelo de colite experimental induzida pelo TNBS em camundongos.....	245
5.9.4 Efeito do tratamento com SB225002 sobre o dano microscópico	248
6.0 CONCLUSÃO	251
7.0 REFERÊNCIAS	253
8.0 PERSPECTIVAS FUTURAS:.....	262

9.0 PUBLICAÇÕES	263
ANEXOS	264

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estruturas químicas de alguns princípios ativos isolados de plantas.....	38
Figura 2 Diferentes fontes de agentes terapêuticos.	40
Figura 3 Quimioterápicos de origem vegetal de interesse da indústria farmacêutica.	43
Figura 4 Os estágios do desenvolvimento de um novo fármaco “típico”, isto é, uma substância sintética sendo desenvolvida para uso sistêmico (RANG et. al. 2004).	45
Figura 5 Árvore de decisão de Topliss para substituintes aromáticos, M = mais ativo, E = igual atividade e L = menos ativo, comparados com o composto (H) inicial (TOPLISS, 1972).	49
Figura 6 Mecanismos transmissão da dor.	55
Figura 7 Cascata de Citocinas.	57
Figura 8 Principais doenças inflamatórias intestinais: Doença de Crohn e Colite ulcerativa (BENTO, 2008).	58
Figura 9 Imagem de uma colonoscopia de um paciente com doença de Crohn, a membrana do cólon está inflamada (M130/776 - Science Photo Library, 2009).	59
Figura 10 Doença de Crohn no reto (C001/2342 - Science Photo Library, 2009).	59
Figura 11 Modelo putativo da estrutura terciária proposta do receptor CXCR1 e de CXCR2. Os domínios helicoidais transmembrana são indicados pelas estruturas tubulares, numeradas 1-7. Três “loops” extracelular são designados EL1-3. Duas pontes de dissulfeto potenciais ligam o domínio extracelular do N-terminal com o terceiro laço extracelular, e os primeiros e segundos laços extracelular, são mostrados em vermelho (ROTH e HEBERT, 2000).	62
Figura 12 Alinhamento das seqüências do receptor hCXCR1 e hCXCR2 humanos. Os resíduos idênticos são marcados por um asterisco. As substituições conservadoras são marcadas por um ponto (ROTH e HEBERT, 2000).	63
Figura 13 Modelo das estruturas secundárias do receptor CXCR1 e do CXCR2 humanos. Como deduzido pela exploração da alanina por mutagenesis, os resíduos em CXCR1 que são importantes para a expressão do receptor ou para o bloqueio do ligante são indicados em verde. Os resíduos envolvidos na sinalização da proteína de G são mostrados em azul. As causas determinantes estruturais importantes conservadas em CXCR1 e em CXCR2 são indicadas em vermelho (ROTH e HEBERT, 2000).	64
Figura 14 Representação gráfica da homologia da seqüência entre as proteínas CXCR1 e CXCR2 em diferentes espécies animais (ROTH e HEBERT, 2000).	65
Figura 15 Estrutura química do SB225002 (WHITE et al., 1998).	67
Figura 16 Estrutura tridimensional dimérica da Interleucina-8 em solução (CLORE et al., 1990).	68
Figura 17 Ilustração adaptada, uma resposta inflamatória (HENSON, 2006).	69
Figura 18 Representação dos receptores CXCR1 e CXCR2 em neutrófilos (BARNES, 2002).	70
Figura 19 Localização dos aminoácidos envolvidos na inibição por um ligante marcado com 125I que se liga ao receptor do mutante. As regiões envolvidas na ligação de CXCL8, CXCL1 e SB225002 foram indicados por setas: cinza escuro, cinza e preta respectivamente (CATUSSE et al., 2003).	71

Figura 20 Competição de ligação da IL-8 na presença de SB225002. Membranas BA/F3 das células que expressam o hCXCR1 humano (painel A), hCXCR2 (painel B) ou “cynomolgus” cynoCXCR1 (painel C) ou cynoCXCR2 (receptores do painel D) foram incubados na presença de IL-8 resfriada e radiomarcada e em concentrações crescentes do SB225002. O bloqueio das membranas com radiomarcado foi medido por cintilação. (HIPKIN, 2004);	72
Figura 21 Formação da uréia a partir do aquecimento do isocianato de amônio.....	73
Figura 22 Estrutura de um novo antagonista seletivo do receptor CXCR2.	74
Figura 23 Estrutura de outro novo antagonista seletivo do receptor CXCR2.....	74
Figura 24 Estrutura do Germanin.....	75
Figura 25 Estrutura química dos compostos patenteados.....	76
Figura 26 Estrutura química de um antagonista do receptor vanilóide SB452533.....	77
Figura 27 Estrutura química de inibidores da proteína quinase.	77
Figura 28 Exemplos dos compostos patenteados.	78
Figura 29 Estrutura química do composto patenteadado	78
Figura 30 Estrutura química do composto patenteadado.	79
Figura 31 Estrutura química do Tosilato de Sorafenib utilizado para o tratamento de carcinoma de células renais pela Bayer com o nome comercial Nexavar.	80
Figura 32 Esquema da síntese de A. Hofmann	81
Figura 33 Esquema da decomposição da N,N'-difeniluréia sob pentóxido de fósforo.	81
Figura 34 Esquema da síntese da N,N'-difeniluréia via anilina e isocianato de fenila.	82
Figura 35 Síntese de N,N'-difeniluréias simétricas.	82
Figura 36 Esquema da síntese do SB225002.	88
Figura 37 Esquema da síntese do análogo A00.....	90
Figura 38 Esquema da síntese do análogo A01.....	91
Figura 39 Esquema da síntese do análogo A02.....	92
Figura 40 Esquema da síntese do análogo A03.....	93
Figura 41 Esquema da síntese do análogo A04.....	94
Figura 42 Esquema da síntese do análogo A05.....	95
Figura 43 Esquema da síntese do análogo A06.....	96
Figura 44 Esquema da síntese do análogo A07.....	97
Figura 45 Esquema da síntese do análogo A08.....	98
Figura 46 Esquema da síntese do análogo A09.....	99
Figura 47 Esquema da síntese do análogo A10.....	100
Figura 48 Esquema da síntese do análogo A11.....	101
Figura 49 Esquema da síntese do análogo A12.....	102
Figura 50 Esquema da síntese do análogo A13.....	103
Figura 51 Esquema da síntese do análogo A14.....	104
Figura 52 Esquema da síntese do análogo A15.....	105
Figura 53 Esquema da síntese do análogo A16.....	106
Figura 54 Esquema da síntese do análogo A17.....	107

Figura 55 Esquema da síntese do análogo A18.....	108
Figura 56 Esquema da síntese do análogo A19.....	109
Figura 57 Obtenção do diazometano (CH ₂ N ₂).....	110
Figura 58 Esquema da síntese do análogo A20.....	112
Figura 59 Esquema da síntese do análogo A21.....	113
Figura 60 Esquema da síntese do análogo A22.....	114
Figura 61 Esquema da síntese do análogo A23.....	115
Figura 62 Esquema da síntese do análogo A24.....	116
Figura 63 Esquema da síntese do análogo A25.....	117
Figura 64 Esquema da síntese do análogo A26.....	118
Figura 65 Esquema da síntese do análogo A27.....	119
Figura 66 Esquema da síntese do análogo A28.....	120
Figura 67 Esquema da síntese do análogo A29.....	121
Figura 68 Esquema da síntese do análogo A30.....	122
Figura 69 Esquema da síntese do análogo A31.....	123
Figura 70 Esquema da síntese do análogo A32.....	124
Figura 71 Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.....	126
Figura 72 Demonstração do teste da formalina.....	128
Figura 73 Estrutura química da capsaicina.....	129
Figura 74 Estrutura química do glutamato.....	129
Figura 75 Estrutura do acetato miristato de forbol.....	129
Figura 76 Estrutura química 8-Br-cAMP.....	130
Figura 77 Estrutura da prostaglandina E ₂	130
Figura 78 Estrutura da epinefrina.....	131
Figura 79 Teste do filamento de Von Frey (FVF).....	132
Figura 80 Constricção parcial do nervo ciático.....	134
Figura 81 Teste de pressão na pata dos ratos (Von Frey).....	135
Figura 82 Teste do (rota-rod).....	138
Figura 83 Teste da placa quente (Hot plate).....	138
Figura 84 Teste do campo aberto (Open Field).....	138
Figura 85 Espectro de ¹ H-RMN do SB225002 em DMSO-d ₆	143
Figura 86 Espectro de ¹ H-NMR do SB225002 expandido 6,5-11,5 ppm (ACD/SpecManager Ver. 4.09/21 Set. 1999, Advanced Chemistry Development Inc.).....	144
Figura 87 ESI-IT-MS ⁿ do SB225002 via infusão direta no modo full scan negativo.....	145
Figura 88 Mecanismo geral da reação de formação da N,N'-difeniluréia (KUTEPOV, 1962), para comparação (SATCHELL, 1975).....	147
Figura 89 Mecanismo de formação do diazometano a partir do Diazald [®] (MOORE, 1961).....	148
Figura 90 Esquema da síntese dos compostos A12, A13, A19 e A21.....	150
Figura 91 Esquema da síntese dos compostos A00, A14, A16, A18, A29, A30 e A32.....	154

Figura 92 Estrutura dos compostos sintetizados baseados nos dados obtidos para o composto A00.	156
Figura 93 Estrutura dos compostos obtidos pela introdução de anéis heteroaromáticos.	157
Figura 94 Estrutura dos compostos sintetizados usando a estratégia de extensão da cadeia.	160
Figura 95 Árvore de decisão de Topliss para substituintes aromáticos, M = mais ativo, E = igual atividade e L = menos ativo, comparados com o composto (H) inicial.	163
Figura 96 Estrutura dos compostos sintetizados (A18, A06, A27, A22, A05, A24, A03 e A15) utilizando o método manual de Topliss.	164
Figura 97 Estrutura dos compostos sintetizados baseados nos resultados do análogo A05.	167
Figura 98 Estrutura dos 09 compostos com porcentagem de inibição \geq ao SB225002 (na dose de 1mg/Kg) frente ao modelo de hipernocicepção induzido pela carragenina e seus respectivos valores de DI_{50} e CLog P.	169
Figura 99 Efeito do SB225002 administrado via: (A) i.p. (0.1–3 mg/kg, 30 min. antes), (C) i.pl. (35–106 μ g/pata, co-administrado), (D) i.t. (1–35 μ g/local, 10 min. antes) ou (E) i.c.v. (3.5–35 μ g/local, 10 min. antes) rotas de indução da hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.pl. de carragenina (300 μ g/pata) em ratos. O gráfico B representa a area sobre a curva do gráfico A.	227
Figura 100 A frequência da resposta de retirada da pata direita foi avaliada no grupo de controle e nos ratos tratados sistematicamente com o SB225002 (1 mg/kg, 30 minutos antes) em intervalos diferentes depois da injeção i.pl (A) PGE2 (0,1 nmol/pata), (B) de epinefrina (100 ng/pata), ou (C) KC (10 ng/pata). Ponto básico inicial (B), (em ANOVA dois sentidos, seguido pelo teste Bonfferroni's).	232
Figura 101 Efeito do SB225002 (0.1–3 mg/kg, i.p.) no aumento de: (A) MPO, (B) IL-1b, (C) TNFa, or (D) KC produzido pela indução por uma injeção i.pl. de carragenina (300 ng/pata)sobre a retirada da pata.	234
Figura 102 Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002 e dexametasona, sobre o dano macroscópico induzido pelo TNBS em camundongos.	242
Figura 103 Efeito do tratamento com o antagonista do receptor CXCR2, sobre o peso corporal, na colite induzida por TNBS. Os resultados representam a média do peso corporal de 6-8 animais por grupo e as barras verticais os erros padrões das médias.	244
Figura 104 Efeito do antagonista do receptor CXCR2, o SB225002, ou da dexametasona, sobre a mortalidade induzida pelo TNBS em camundongos. As colunas representam a porcentagem de sobrevivência em relação ao número de animais utilizados em cada grupo experimental. Os números acima de cada bara representam a quantidade de animais mortos em relação ao número total de animais utilizados no experimento.	245
Figura 105 Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002, ou da dexametasona, sobre o aumento de peso do cólon de camundongos após a administração do TNBS. As colunas representam a média do peso dos cólons de 4-6 animais por grupo e as barras verticais o desvio padrão das média.	246
Figura 106 Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002, ou da dexametasona, sobre o encurtamento do cólon de camundongos após a administração do TNBS. (A) As colunas representam a média do comprimento dos cólons de 4 – 6 animais por grupo e as barras verticais o desvio padrão	

da média. (B) Foto representativa de cólons dos grupos experimentais, (1) controle, (2) TNBS, (3) TNBS + SB225002 e (4) TNBS + dexametasona).....	247
Figura 107 Efeito do antagonista do receptor CXCR2, ou da dexametasona, sobre o aumento do peso do baço após a administração do TNBS. As colunas representam a média do peso do baço de 6-8 animais por grupo e as barras verticais o desvio padrão da média.....	248
Figura 108 Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002, ou da dexametasona, sobre o dano tecidual microscópico induzido pelo TNBS. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do tecido de cólons fixados em H & E (aumento 200 X) dos grupos: (A) controle, (B) TNBS, (C) TNBS + SB225002 e (D) TNBS + dexametasona. (E) As colunas representam a média de 4-6 animais e as barras verticais o desvio padrão da média.	249

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Ordem de potência para vários parâmetros físico-químicos.	50
Tabela 2 Seleção de novos substituintes.....	51
Tabela 3 Inibição máxima (%) no intervalo de 3 h após a injeção i.pl. de carragenina na dose de (300 µg/pata).	214
Tabela 4 Efeitos do SB225002 em vários modelos de nocicepção em ratos.....	231
Tabela 5 Análise dos possíveis efeitos adversos do SB225002 em ratos.	235

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Efeito do tratamento com SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	171
Gráfico 02 Efeito do tratamento com o análogo A00 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	172
Gráfico 03 Efeito do tratamento com o análogo A01(1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	173
Gráfico 04 Efeito do tratamento com o análogo A02 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	174
Gráfico 5 Efeito do tratamento com o análogo A03 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	175
Gráfico 6 Efeito do tratamento com o análogo A04 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	176
Gráfico 7 Efeito do tratamento com o análogo A05 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	177
Gráfico 8 Efeito do tratamento com o análogo A06 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	178
Gráfico 9 Efeito do tratamento com o análogo A07 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	179
Gráfico 10 Efeito do tratamento com o análogo A08 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	180
Gráfico 11 Efeito do tratamento com o análogo A09 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	181
Gráfico 12 Efeito do tratamento com o análogo A10 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	182
Gráfico 13 Efeito do tratamento com o análogo A11 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	183
Gráfico 14 Efeito do tratamento com o análogo A12 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	184
Gráfico 15 Efeito do tratamento com o análogo A13 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	185
Gráfico 16 Efeito do tratamento com o análogo A14 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	186
Gráfico 17 Efeito do tratamento com o análogo A15 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	187
Gráfico 18 Efeito do tratamento com o análogo A16 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose (300 µg/pata).	188

Gráfico 19 Efeito do tratamento com o análogo A17 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose (300 µg/pata).	189
Gráfico 20 Efeito do tratamento com o análogo A18 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	190
Gráfico 21 Efeito do tratamento com o análogo A19 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	191
Gráfico 22 Efeito do tratamento com o análogo A20 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	192
Gráfico 23 Efeito do tratamento com o análogo A21 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	193
Gráfico 24 Efeito do tratamento com o análogo A22 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	194
Gráfico 25 Efeito do tratamento com o análogo A23 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	195
Gráfico 26 Efeito do tratamento com o análogo A24 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	196
Gráfico 27 Efeito do tratamento com o análogo A25 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	197
Gráfico 28 Efeito do tratamento com o análogo A26 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	198
Gráfico 29 Efeito do tratamento com o análogo A27 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	199
Gráfico 30 Efeito do tratamento com o análogo A28 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	200
Gráfico 31 Efeito do tratamento com o análogo A29 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	201
Gráfico 32 Efeito do tratamento com o análogo A30 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	202
Gráfico 33 Efeito do tratamento com o análogo A31 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	203
Gráfico 34 Efeito do tratamento com o análogo A32 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).	204
Gráfico 35 Curva dose resposta do análogo A00 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), 3 horas após a injeção de carragenina na dose de (300 µg/Kg).....	205
Gráfico 36 Curva dose resposta do análogo A03 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), 3 horas após a injeção de carragenina na dose de (300 µg/Kg).....	206
Gráfico 37 Curva Curva dose resposta do análogo A04 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), 3 horas após a injeção de carragenina (300 µg/Kg).	207
Gráfico 38 Curva Curva dose resposta do análogo A05 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), 3 horas após a injeção de carragenina na dose de (300 µg/Kg).	208

Gráfico 39 Curva dose resposta do análogo A07 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), 3 horas após a injeção de carragenina na dose de (300 µg/Kg).....	209
Gráfico 40 Curva dose resposta do análogo A08 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), 3 horas após a injeção de carragenina na dose de (300 µg/Kg).....	210
Gráfico 41 Curva dose resposta do análogo A09 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), 3 horas após a injeção de carragenina na dose de (300 µg/Kg).....	211
Gráfico 42 Curva dose resposta do análogo A16 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), 3 horas após a injeção de carragenina na dose de (300 µg/Kg).....	212
Gráfico 43 Curva dose resposta do análogo A28 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), 3 horas após a injeção de carragenina na dose de (300 µg/Kg).....	213
Gráfico 44 Avaliação da nocicepção induzida pelo ácido acético frente ao SB225002 em diferentes doses, comparado com a dipirona.	224
Gráfico 45 Efeito do tratamento com SB225002 na primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela formalina.	225
Gráfico 46 Frequência da resposta das retiradas da pata direita que foram injetadas com o complex adjuvante de Freund (CFA – 20 µl/pata) no grupo controle e nos ratos tratados com SB225002 (1 mg/kg, i.p., administrado duas vezes por dia) em diferentes intervalos de tempo após o tratamento com estas drogas.	229
Gráfico 47 Frequência da resposta da retirada da pata direita nos falso operados e operados pela constrição parcial do nervo ciático, os ratos foram tratados com salina (10 ml/kg) ou SB225002 (1mg/Kg, i.p. administrado duas vezes por dia) em diferentes intervalos de tempo após o tratamento.	230

LISTA DE TERMOS E ABREVIATURAS

Ad libitum - à vontade;

Alvos para ação de fármacos – Um fármaco é uma substância química que afeta a função fisiológica de modo específico. Com poucas exceções, os fármacos atuam sobre proteínas-alvo, que consistem em: enzimas, transportadores, canais de íons e receptores. A especificidade é recíproca: classes individuais de substâncias se ligam apenas a determinados alvos, e alvos individuais só reconhecem determinadas classes de fármacos. Nenhum fármaco é totalmente específico nas suas ações. Em muitos casos, o aumento na sua dose afeta outros alvos diferentes do alvo principal, podendo resultar em efeitos colaterais;

Análise de Hansch – A análise é uma investigação da relação quantitativa entre a atividade biológica de uma série de compostos e seus parâmetros físico-químicos relativos aos substituintes ou à molécula toda que representam os efeitos hidrofóbicos, eletrônicos, estéricos e outros, usando a metodologia de correlação de regressão múltipla;

Árvore de decisão de Topliss – Árvore de decisão de Topliss é um esquema operacional para o planejamento de análogos;

BIONCEs – “Bioactives new chemical entities”;

Carragenina – Um extrato solúvel em água derivado da carragena, musgo irlandês, uma alga marinha encontrada nas costas do Atlântico da Europa e América do Norte.

CCD - cromatografia em camada delgada;

cm⁻¹ - unidade de número de onda em centímetro recíproco;

CNPC – Constrição parcial do nervo ciático.

COMFA – “Comparative Molecular Field Analysis”;

Complexo adjuvante de Freund – Adjuvante altamente irritante e potente preparado como uma emulsão de água-em-óleo, com micobactérias (adjuvante de Freund completo)

Constante σ de Hammett – A constante de Hammett é um descritor eletrônico de substituinte que reflete as propriedades doadoras ou receptoras de elétrons de um substituinte;

Constante π de Hansch-Fujita – A constante π de Hansch-Fujita descreve a contribuição de um substituinte para a lipofilia de um composto;

3D QSAR – “Four-dimensional Quantitative structure-activity relationship”

4D QSAR – “Three-dimensional Quantitative structure-activity relationship”

DI₅₀ - Dose Inibitória de 50% expressa em $\mu\text{mol/Kg}$;

DMSO (d₆) - dimetil sulfóxido deuterado;

Es - Efeito estérico;

FDA - Food and Drug Administration;

Geração de farmacóforo – Geração de farmacóforo é um procedimento para extrair as mais importantes características estruturais comuns que sejam relevantes para uma dada atividade biológica de uma série de moléculas com mecanismo de ação semelhante;

Hidrofilia – Hidrofilia é a tendência de uma molécula em ser solvatada por água;

Hidrofobia – Hidrofobia é uma associação de agrupamentos ou moléculas apolares em um ambiente aquoso que se origina da tendência da água excluir moléculas apolares;

HTS - High-throughput screening;

i.c.v – Intracerebroventricular;

i.p. - intra-peritoneal;

i.pl. – Intraplantar;

IBD – “Inflammatory Bowel Disease”;

I.t.I (ntratecal) – A barreira hematoencefálica e a barreira hematoliquórica muitas vezes impedem ou reduzem a penetração de fármacos no sistema nervoso central. Portanto, quando se deseja um efeito local rápido do fármaco nas meninges ou no eixo cerebrospinal, como em raquianestesia ou nas infecções agudas do sistema nervoso central, às vezes se injetam os fármacos no espaço subaracnóide;

Interações fármaco receptor – A ocupação de um receptor por uma molécula de um fármaco pode ou não resultar em ativação do receptor. A ativação se refere à capacidade da molécula ligada de afetar o receptor de modo a desencadear uma resposta tecidual. Quando uma substância se liga ao receptor sem causar ativação, impedindo conseqüentemente a ligação do agonista, é denominada antagonista do receptor. A tendência de um fármaco se ligar ao receptor é determinada pela sua afinidade, enquanto a tendência, uma vez ligada, de ativar o receptor é indicada pela sua eficácia. Em geral, os fármacos de alta potência exibem alta afinidade pelos receptores, portanto ocupam uma proporção significativa destes, até mesmo na presença de baixas concentrações. Os agonistas também possuem alta eficácia, enquanto os antagonistas apresentam, no caso mais simples, eficácia zero;

IV - Infra-Vermelho;

Leucócitos polimorfonucleares – Os neutrófilos polimorfonucleares constituem os primeiros leucócitos sanguíneos a alcançar a área da reação inflamatória. Aderem às células endoteliaisvasculares através de uma interação entre as moléculas de adesão presentes na célula endotelial. A seguir os neutrófilos migram para fora do vaso até o local em que se encontra o patógeno invasor, atraídos por substâncias químicas denominadas quimiotaxinas: algumas liberadas pelo microorganismo, outras produzidas localmente, como quimiocinas produzidas por macrófagos, em particular IL-8 (CXCL8). Se o neutrófilo for inapropriadamente ativado, os produtos tóxicos de oxigênio e as enzimas proteolíticas podem danificar os próprios tecidos do hospedeiro. Os eosinófilos possuem capacidades semelhantes aos neutrófilos e, além disso, são dotados de diversos constituintes granulares potentes que, quando liberados no meio extracelular, podem lesar parasitas multicelulares.

Lipofilia – Lipofilia representa a afinidade de uma molécula ou de um fragmento por um ambiente lipofílico. É comumente medida por seu comportamento de distribuição em um sistema bifásico, seja líquido-líquido (por exemplo, coeficiente de partição em 1-octanol/água) ou sólido-líquido (retenção em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa (RP-HPLC, do inglês reversed-phase high-performance liquid chromatography) ou de cromatografia de camada delgada (TLC, do inglês thin-layer chromatography);

Log P - coeficiente de partição;

m/z - relação massa/carga;

Mapeamento de receptor – Mapeamento de receptor é uma técnica usada para descrever as características geométricas ou eletrônicas de um sítio de ligação quando não estão disponíveis dados estruturais suficientes para este receptor ou enzima. Geralmente, a cavidade do sítio ativo é definida comparando-se a sobreposição de moléculas ativas com a de moléculas inativas;

Open-field (Campo aberto): Avalia emocionalidade, atividade locomotora e aprendizado por habituação. Além disso, é realizado o teste de reconhecimento de objetos no open-field, que avalia várias modalidades de memória.

PDB – O banco de dados de proteínas (PDB, do inglês Protein Data Bank) mantido no Laboratório Nacional Brookhaven, Upton, New York, que contém estruturas de raio-X de várias centenas de proteínas;

pf - ponto de fusão;

PKC - proteína quinase C;

Planejamento de fármacos – O planejamento de fármacos inclui não apenas o planejamento do ligante, mas também a farmacocinética e a toxicidade, que estão na maior parte das vezes além das possibilidades do planejamento auxiliado pela estrutura ou por computador. Todavia, ferramentas quimiométricas apropriadas, que incluem planejamento experimental e estatística multivariada, podem ser valiosas no planejamento e avaliação de experimentos e resultados farmacocinéticos e toxicológicos. O termo planejamento de fármacos é mais frequentemente usado do que o termo correto “Planejamento de ligantes”;

PM - peso molecular;

Potência e eficácia – A potência refere-se à quantidade de fármaco (geralmente expressa em mg/Kg ou $\mu\text{mol/Kg}$) de que se necessita para produzir um efeito, como aliviar a dor ou diminuir a pressão arterial. Por exemplo, se 5 miligramas do fármaco B aliviam a dor com a mesma eficácia que 10 miligramas do fármaco A, então o fármaco B é duas vezes mais potente que o fármaco A. De fato, um fármaco com maior potência não é necessariamente melhor que outro. Quando os médicos julgam as qualidades relativas dos fármacos, consideram muitos fatores, como o perfil dos efeitos secundários, a toxicidade potencial, a duração potencial máxima que um fármaco pode induzir.

PPC – Principais propriedades de substituintes;

ppm - parte por milhão da frequência aplicada;

QSAR - Quantitative Structure-Activity Relationship;

Quimiocinas – As quimiocinas são definidas como citocinas quimioatraentes que controlam a migração de leucócitos, funcionando como coordenadores de trânsito nas reações imunológicas e inflamatórias. As quimiocinas CXC (cujo principal exemplo é a IL-8), atuam sobre os neutrófilos e estão predominantemente envolvidas nas respostas inflamatórias agudas. As quimiocinas e seus receptores constituem alvos particularmente interessantes para novas substâncias devido à sua seletividade, uma vez que as quimiocinas atuam sobre receptores específicos em subgrupos específicos de células (RANG. H. P., 2004).

Receptor – Um receptor é uma proteína ou um complexo de proteínas localizado no interior ou na superfície de uma célula, que reconhece especificamente e interage com um composto que atua como um mensageiro molecular (neurotransmissor, hormônio, fármaco etc). Em um sentido mais amplo, o termo receptor é frequentemente usado como sinônimo para qualquer sítio ativo específico de ligação de fármacos (em oposição a não específico, como a ligação às proteínas do plasma), também incluindo ácidos nucléicos, tais como DNA;

Receptores acoplados a proteína G – Os receptores acoplados à proteína G (GPCR, G-protein coupled receptors) são também conhecidos como receptores metabotrópicos ou receptores que atravessam sete vezes a membrana (heptahelicoidais). Trata-se de receptores de membrana que estão acoplados a sistemas efetores intracelulares através de uma proteína G. Constituem a maior família e incluem receptores para muitos hormônios e transmissores lentos.

Rend. – rendimento;

RMN ¹H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio;

s – simpleto;

d – duplete;

dd - duplo dublete;

t – tripleto;

m – multiplete;

SAR - Structure-Activity Relationship;

SB225002 (N-(2-Bromophenyl)-N'-(2-hydroxy-4-nitrophenyl)urea) – Antagonista potente e seletivo do receptor de quimiocinas transmembrana CXCR2 (IC₅₀ = 22 nM), 150 x mais seletivo para CXCR2 do que para o receptor CXCR1.

TMS – tetrametilsilano;

UV - Ultra-Violeta;

Valores de CLog P – Valores de CLog P são coeficientes de partição 1-octanol/água calculados, frequentemente usados em estudos de correlação estrutura-propriedade ou de relação quantitativa estrutura-atividade (SPC/QSAR, do inglês Structure-Property Correlation e Quantitative Structure-Activity Relationship) (SANT'ANA, 2002);

RESUMO

No presente estudo foram sintetizados 33 (N,N'-diariluréias), análogos do 1-(2-hidroxi-4-nitrofenila)-3-(2-bromofenila)-uréia (SB225002) preparados utilizando ferramentas racionais utilizadas em química medicinal. Os efeitos antinociceptivos de um antagonista seletivo e não peptídico do receptor transmembrana de quimiocinas CXCR2, o SB225002 foram avaliados frente a diversos modelos experimentais de dor em camundongos. A nocicepção espontânea via a administração i.p. de SB225002 causou uma redução consistente e dose dependente das constrições abdominais induzidas por ácido acético, visto que não afetou significativamente a nocicepção induzida pela formalina, pela capsaicina, pelo glutamato ou pelo éster de phorbol. O tratamento sistemático com SB225002 reduziu impressionantemente a nocicepção espontânea induzida por 8-Br-cAMP, ou a hipernocicepção mecânica induzida pela prostaglandina E₂ (PGE₂), pela epinefrina, ou pela quimiocina KC. No modelo da carragenina o SB225002 foi eficaz em impedir a hipernocicepção mecânica, quando administrado por vias i.p., i.t ou i.c.v., ou mesmo quando co-administrado com o carragenina na pata do rato, indicando locais periféricos e centrais da ação para o SB225002. O tratamento via i.p. com SB225002, reduziu significativamente o aumento na atividade da mieloperoxidase (MPO) ou a elevação de IL-1 β , de TNF α ou de níveis do KC depois da injeção da carragenina. Quando examinada nos modelos crônicos da dor induzidos pelo complexo adjuvante de Freund (CFA) ou pela constrição parcial do nervo ciático

(CPNC), a administração repetida de SB225002 indicou efeitos antinociceptivos proeminentes e duradouros. O SB225002 não induziu efeitos centrais inespecíficos, como avaliados nos testes do campo aberto ou de “rota-rod” ou mesmo nas respostas da latência para estímulos térmicos. As 33 N, N'-diariluréias sintetizadas, foram avaliadas frente ao modelo de hipernocicepção mecânica induzido pela carragenina; onde nove compostos (A00, A03, A04, A05, A07, A08, A09, A16 e A28) apresentaram melhor eficácia, mas potência inferior ao valor encontrado para o SB225002, utilizado como modelo no presente estudo.

Embora os neutrófilos sejam implicados fortemente em eliminar os micróbios patogênicos, o recrutamento excessivo pode causar dano tecidual. Conseqüentemente, reduzir o influxo celular durante um processo inflamatório pode ser um alvo potencial para tratar as doenças inflamatórias intestinais, porque o receptor CXCR2 está diretamente envolvido na migração dos neutrófilos, este estudo também avaliou se o tratamento terapêutico sistemático com o antagonista seletivo de quimiocinas, o receptor CXCR2, o SB225002 melhora a colite experimental, que foi induzida nos ratos pelo ácido 2.4.6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). Os nove compostos análogos sintéticos mais efetivos serão avaliados neste modelo futuramente.

Nossos dados confirmam o importante papel exercido pelas quimiocinas nos processos que envolvem a dor, indicando que o antagonista seletivo para o receptor CXCR2, o SB225002 e seus 09 compostos análogos sintetizados que apresentaram eficácia superior ao SB225002, podem representar alternativas interessantes e inovadoras para a gerência de estados dolorosos agudos e crônicos.

ABSTRACT

This present study evaluated the antinociceptive effects of the selective and non-peptide transmembrane chemokine receptor CXCR2 antagonist SB225002 and 33 N, N'-diarylurées synthetic chemical analogous effect preparations using ferramentals rationals used in medicinal chemistry. The diverse experimental in models of pain in mice had been evaluated front. As assessed in different tests of spontaneous nociception, intraperitoneal (i.p.) administration of SB225002 caused consistent and dose-related reduction of acetic acid induced abdominal constrictions, whereas it did not significantly affect the nociception evoked by formalin, capsaicin, glutamate or phorbol ester acetate (PMA). Systemic treatment with SB225002 strikingly reduced the spontaneous nociception induced by 8-bromo-cAMP (8-Br-cAMP), or mechanical hypernociception induced by prostaglandin E₂ (PGE₂), epinephrine, or the keratinocyte-derived chemokine (KC). In the carrageenan model, SB225002 markedly reduced mechanical hypernociception when administered by i.p., intrathecal (i.t.) or intracerebroventricular (i.c.v.) routes, or even when co-administered with carrageenan into the mouse paw, indicating peripheral and central sites of action for SB225002. In addition, i.p. treatment with SB225002 significantly attenuated the increase in MPO activity or the elevation of IL-1 β , TNF α or KC levels following carrageenan injection. In the persistent models of pain evoked by complete Freund's adjuvant (CFA) or by the partial ligation of the sciatic nerve (PLSN), the repeated administration of SB225002 displayed prominent and long-lasting antinociceptive effects. Notably, SB225002 did not evoke unspecific central effects, as evaluated in the open-field and rota-rod tests, or even in the latency responses for

thermal stimuli. Our data confirm the previous notion on the critical role exerted by chemokines in pain, indicating that selective CXCR2 antagonists, such as SB225002, might well represent interesting and innovative alternatives for the management of both acute and chronic pain. The 33 synthetic N N'-diarylureas had been evaluated front to the model of induced hipernociception mechanics for the carragen; where nine composites (A00, A03, A04, A05, A07, A08, A09, A16 and A28) had presented effectiveness better, but inferior power to the value found for the SB225002, used as model in the present study.

Although neutrophils are strongly implicated in eliminating pathogens, excessive recruitment may cause tissue damage. Therefore, reducing cell influx during an inflammatory process may be a potential target for treating inflammatory bowel diseases (IBD). As CXCR2 is involved in neutrophil migration, this study aimed to evaluate whether the systemic therapeutic treatment with selective CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates experimental colitis, which was induced in mice by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS). The nine more effective synthetic analogous composites will be evaluated in this model in future.

Our data confirm the important paper exerted for the chemokine in the processes that involve pain, indicating that the selective antagonist for receiver CXCR2, the SB225002 and its nine synthetic analogous composites that had presented superior effectiveness to the SB225002, can represent interesting and innovative alternatives for the management of acute and chronic painful states.

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 A Origem dos fármacos

A importância dos produtos naturais na terapêutica é reconhecida desde tempos imemoriais. O conhecimento das plantas alucinógenas pelos ameríndios que as empregavam em ritos pagãos, bem como propriedades afrodisíacas de diversas poções preparadas a partir de distintas espécies vegetais, acompanha o homem há muitos milênios (BARREIRO e FRAGA, 2001). Os metabólitos secundários produzidos por plantas tiveram um papel fundamental no desenvolvimento da química orgânica sintética moderna. Historicamente, o desenvolvimento da química orgânica ocorreu paralelamente ao estudo de plantas, principalmente a partir do século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos sobre plantas, com base científica. Isso resultou no isolamento de alguns princípios ativos de plantas, já então conhecidas como medicinais. Desses estudos foram obtidas algumas substâncias que se consagraram como princípios ativos eficazes, e que até hoje, ainda são muito empregados no tratamento de certas doenças, a exemplo de morfina, quinina, cânfora e cocaína, apresentadas na Figura 1 (BARREIRO e FRAGA, 2001; MONTANARI, 2001).

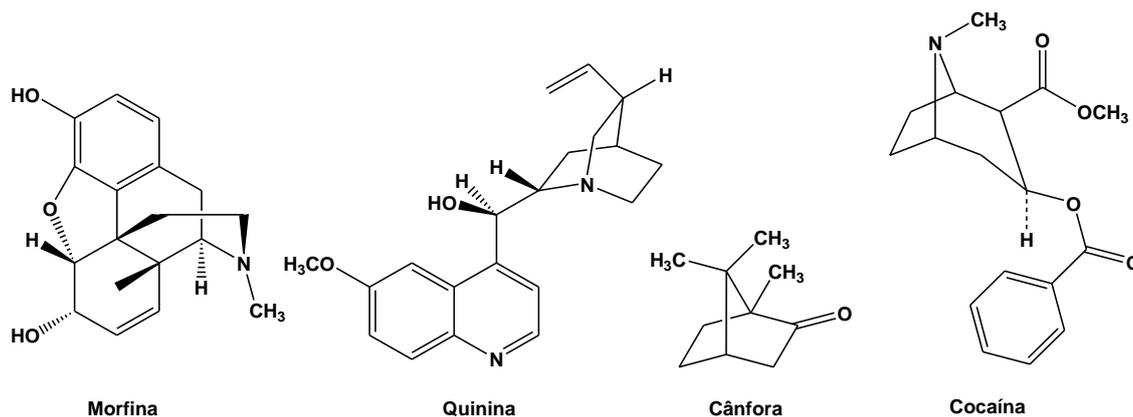


Figura 1 Estruturas químicas de alguns princípios ativos isolados de plantas.

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Entretanto, é o Reino Vegetal que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de substâncias úteis ao tratamento de doenças que acometem os seres humanos. A fantástica variedade e complexidade de metabólitos especiais biossintetizados pelas plantas ter-se-iam formado e evoluído, como mecanismo de defesa desses vegetais às condições ambientais ricas em microorganismos, insetos, animais e também às condições de adaptação e regulação. Desta forma, as plantas constituem-se num enorme laboratório de síntese orgânica, fruto de milhões de anos de evolução e adaptação sobre a terra (BARREIRO e FRAGA, 2001). Devido a tais constatações, os produtos naturais e derivados foram, e continuam sendo, notoriamente, de importância crucial em determinados setores de uma sociedade moderna, mesmo considerando-se o grande número de produtos produzidos por síntese. No século XX, o surgimento dos antibióticos produzidos por fermentação microbiana aliado ao desenvolvimento marcante de fármacos sintéticos produzidos pela indústria farmacêutica, logo depois da Grande Guerra, foram causas marcantes no declínio do uso de plantas

medicinais e conseqüentemente o investimento em fármacos de origem vegetal. (MONTANARI, 2001).

1.2. A Química Medicinal

A Química Medicinal pode ser definida por esta sentença de Alfred Burger **“...tried to be based on the ever-increasing hope that biochemicals rationally for drug discovery may be found...”** Com base nesta definição conclui-se que a Química Medicinal se dedica a estudar as razões moleculares da ação dos fármacos, a relação entre a estrutura química e a atividade farmacológica, incluindo o planejamento e o desenho estrutural de novas substâncias que possuam propriedades fármaco terapêuticas úteis e capazes de representar novos fármacos. Esta tarefa complexa envolve uma multiplicidade de fatores responsáveis pela resposta terapêutica de uma substância exógena (ex., fármaco) que precisa apresentar elevada eficácia, reflexo das propriedades farmacodinâmicas – aquelas que regem as interações responsáveis pelo reconhecimento molecular do fármaco pelo biorreceptor e resultam na resposta terapêutica desejada – e farmacocinéticas – aquelas que governam os fatores de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação do fármaco na biofase, resultando no perfil de biodisponibilidade – além de possuir reduzida toxidez (BARREIRO e FRAGA, 2001).

Face ao amplo espectro de fatores envolvidos, resultando da complexidade dos sistemas biológicos, para conduzir a termo esta tarefa, a Química Medicinal se caracteriza pela inter e multidisciplinaridade constituída, por exemplo, por biofísica, biologia molecular, bioquímica, clínica médica, farmacologia, físico-química,

fisiologia, neurobiologia, patologia, química biológica, toxicologia, química inorgânica, química orgânica e química quântica. Esse formalismo não leva, necessariamente, ao domínio da química medicinal sobre as outras disciplinas. Todas essas disciplinas funcionam conjuntamente dentro do aspecto trans-(sobre a inserção de um conceito em outro), multi-(sobre a co-existência de múltiplos) e interdisciplinar (sobre a necessidade de interfaces), onde todas as partes são fundamentais e a eventual falha de uma delas, prejudica todo o sistema. (BARREIRO e FRAGA, 2001; MONTANARI, 2000).

1.3 Fármacos sintéticos

Atualmente os fármacos obtidos por via sintética representam a maior parcela dos medicamentos disponíveis. O panorama dos agentes terapêuticos desenvolvidos atualmente está representado na (Figura 2) (CRAGG et. al. 1997).

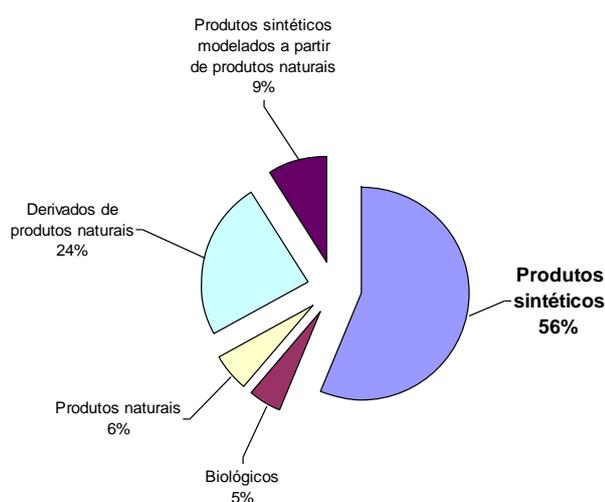


Figura 2 Diferentes fontes de agentes terapêuticos.

Em sua ampla maioria, os fármacos sintéticos são aquirais e possuem, não raramente, mais de um heteroátomo. Se os classificarmos pelo tipo de mecanismo de ação que apresentam, observar-se-á que em sua ampla maioria são substâncias sintéticas com propriedades inibidoras de enzimas e antagonistas de receptores seletivos, sendo menos numerosos aqueles que atuam como agonistas de receptores e, menos ainda, aqueles que atuam ao nível de canais iônicos. Estima-se que 79 enzimas e 24 tipos de diferentes receptores totalizem os alvos terapêuticos dos fármacos sintéticos empregados, embora sejam cerca de 200 enzimas estudadas atualmente como alvos terapêuticos úteis para ação de novos fármacos (BARREIRO e FRAGA, 2001).

1.4 Desenvolvimento de novos medicamentos

Detentores de um mercado extremamente lucrativo, os fitofármacos, como por exemplo: ginko, kava, ginseng, erva de São João, etc., reacenderam o interesse da indústria farmacêutica pelos produtos de origem vegetal. Por volta de 1990, estimou-se que cerca de 80% da população mundial procuravam nas plantas a fonte principal de medicamentos. Está comprovado hoje, que em grande parte a população mundial, principalmente aquelas de países em desenvolvimento usam como medicamentos extratos ou porções oriundas de plantas (MONTANARI, 2001). A indústria farmacêutica motivada, em parte pela descoberta de quimioterápicos eficazes como vimblastina (Velban[®]), vincristina (Oncovin[®]), podofilotoxina e os análogos etoposídeo (VP-16-213; Vespeside[®]) e teniposídeo (VM-26; Vumon[®]), camptotecina e taxol (placitaxel; Taxol[®]), (Figura 3), reativou o interesse pelos

medicamentos de origem vegetal, principalmente pela busca de substâncias com estruturas moleculares complexas, praticamente impossíveis de serem obtidas por um processo sintético de custo racional. A constatação desse fato é que a síntese comercial do taxol, na realidade é uma semi-síntese, cuja matéria prima é bacatina III ou cefalomanina, ambas com esqueleto taxano e o anel oxietano completamente formados. Fundamentado nesse princípio, a indústria farmacêutica vem aplicando grandes investimentos em pesquisas de bioprospecção, mesmo tendo em conta que a pesquisa de novos fármacos é um mercado de alto risco. De acordo com a Pharmaceutical Research and Manufactures of América (PhRMA) dentre 5.000-10.000 candidatos a fármacos, apenas um passa para a fase de testes pré-clínicos e clínicos e é submetido à aprovação do Food and Drug Administration (FDA-EUA) para comercialização. Levando em consideração o custo do investimento, e o retorno econômico de um produto farmacêutico, a indústria transnacional tem canalizado gigantescos investimentos em doenças como AIDS, mal de Alzheimer, câncer, depressão, diabetes, doenças cardíacas, inflamação, derrame e osteoporose, principalmente (MONTANARI, 2001).

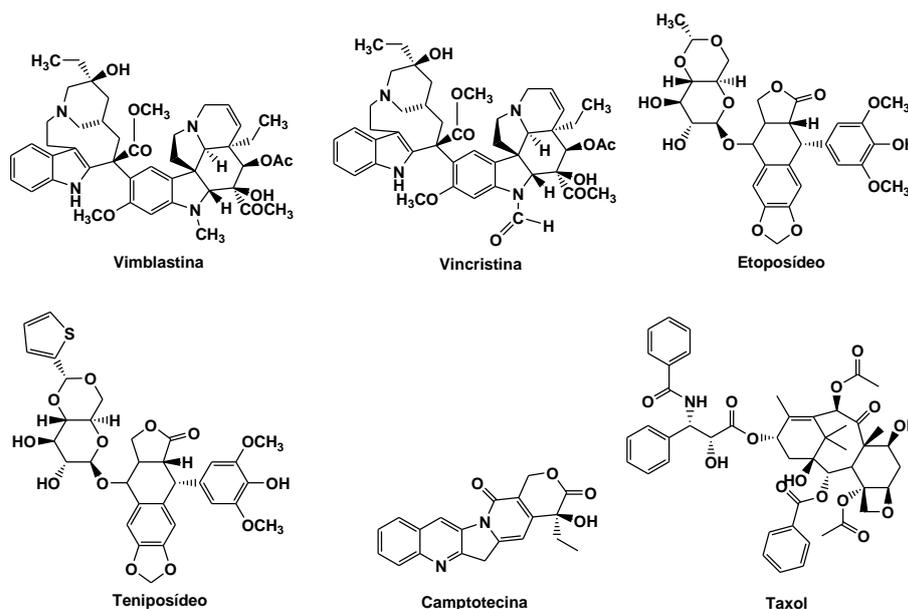


Figura 3 Quimioterápicos de origem vegetal de interesse da indústria farmacêutica.

Com objetivos muito bem definidos, a indústria farmacêutica não despreza o potencial que as plantas possuem em fornecer substâncias novas. Entretanto, para otimizar a busca por princípios ativos de maneira racional, por volta dos anos 80, a indústria farmacêutica redirecionou todo o processo de seleção de produtos bioativos, no que determinou de “busca racional de drogas” pelo uso de fracionamento guiado por bioensaios específicos para enzimas, receptores, DNA, etc, também motivado pelo conhecimento de mecanismos de ação de novas substâncias químicas biotivas [bioactives new chemical entities (BIONCEs)]. Dentro desse modelo, uma indústria farmacêutica de grande porte selecionava em média, cerca de 5.000 substâncias por ano. Nos anos 90, com advento da química combinatória, banco de germoplasma e bioensaios em larga escala [high-throughput screening (HTS)], os programas de descoberta de novos fármacos mudaram radicalmente. Hoje um programa de HTS pode testar o mesmo número de substâncias (ou mais) em apenas um dia. Usando a química combinatória como ferramenta, a química medicinal aumentou em centenas de vezes a produtividade de

BIONCEs. De acordo com Salvatore Forenza, Diretor executivo do Lead Discovery Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute, a química medicinal hoje, responsável pela produção de todas as classes de substâncias, em média de 50-100 substâncias por semana (MONTANARI, 2001).

No Brasil, já no início de um novo século, as pesquisas com plantas ainda estão muito centradas no âmbito da Universidade e Institutos de Pesquisas onde se desenvolve basicamente a fitoquímica tradicional. Muito embora já existam vários grupos nacionais envolvidos com a busca de princípios ativos de plantas, essa pesquisa é fundamentalmente acadêmica. Considerando-se que um programa de descoberta de novos fármacos é um processo muito longo, complexo e de alto custo (Figura 4); considerando-se ainda que o processo envolve duas etapas distintas a fase de descoberta e a de desenvolvimento e comercialização; não há sem dúvida que competência científica nacional está qualificada para atuar na primeira fase desse processo, com sucesso (MONTANARI, 2001).

Somente são apresentadas as principais atividades empreendidas em cada estágio (Figura 4), com os detalhes variando muito de acordo com o tipo de fármaco desenvolvido. O custo global de cada substância lançada no mercado é de 250-500 milhões de libras esterlinas, e a escala típica de tempo é de 8-12 anos. Somente 01 em cada 12 substâncias em desenvolvimento consegue alcançar o mercado (RANG et al, 2004).

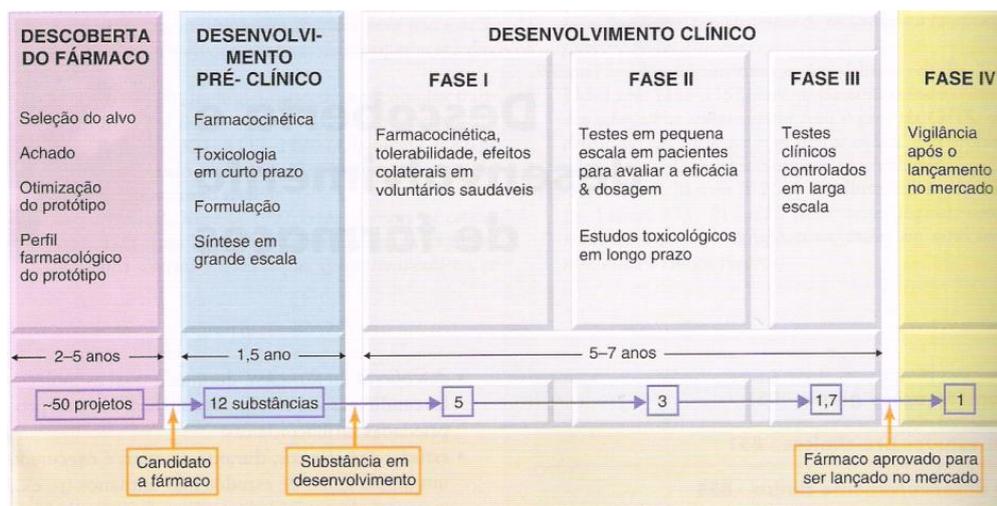


Figura 4 Os estágios do desenvolvimento de um novo fármaco “típico”, isto é, uma substância sintética sendo desenvolvida para uso sistêmico (RANG et. al. 2004).

1.5 Modificação estrutural e correlação entre estrutura química e atividade biológica.

Um estágio crucial neste processo é o desenho de novos fármacos em que o alvo principal é potencializar sua atividade e melhorar as suas propriedades minimizando os efeitos indesejáveis. Vamos discutir brevemente as estratégias do desenho de fármacos usados para melhorar as interações de uma droga e o seu alvo. Tais melhorias devem potencializar a atividade e podem igualmente reduzir efeitos se as interações forem melhoradas e aumentar a seletividade entre diferentes alvos (PATRICK, 2001).

Em geral, os fármacos disponíveis no mercado, são em sua ampla maioria, de origem sintética. A modificação estrutural constitui-se no método mais utilizado para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos, ou para potencializar a atividade de princípios ativos naturais ou sintéticos. Muitas mudanças podem ser

introduzidas em uma molécula, dependendo de seus centros reativos, vários caminhos poderão ser seguidos:

- ✓ Variação dos substituintes;
- ✓ Extensão da estrutura;
- ✓ Extensão ou contração da cadeia;
- ✓ Expansão ou contração do anel;
- ✓ Variação do anel;
- ✓ Fusão de anéis;
- ✓ Simplificação da estrutura;
- ✓ Tornar a estrutura rígida.

Sabe-se que a modificação de um átomo de hidrogênio por um determinado substituinte (grupo alquila, nitro, ciano, carboxilato, halogênio, etc.) pode modificar a potência, duração e ainda a natureza do efeito farmacológico de uma molécula. Os estudos de correlação estrutura e atividade, fundamentados no efeito do substituinte em um determinado anel aromático, são muito comuns na química medicinal, uma vez que mais de 50% dos fármacos ou compostos bioativos possuem este tipo de anel (YUNES e CALIXTO, 2001).

As modificações produzidas pela introdução de um substituinte podem modificar várias propriedades físico-químicas da molécula, tais como: hidrofobicidade, densidade eletrônica, conformação estrutural e propriedades farmacocinéticas, entre outras, cuja análise poderá orientar as sínteses a serem realizadas. Por exemplo, um grupo hidroxila pode ser transformado em metóxila, acetoxi, etc.; uma dupla ligação pode ser hidrogenada, transformada em epóxido, ou ainda sofrer reações de adição de diferentes grupos; um grupo carboxílico pode ser

reduzido a aldeído, álcool ou transformado em amida ou éster. Utilizando estas reações como ferramentas, pode-se obter dados importantes da nova molécula sobre efeitos estereo-eletrônicos, como: a mudança da lipossolubilidade, eliminação do grupo doador de ponte de hidrogênio, mudança da densidade eletrônica de determinados grupos, mudanças na conformação, entre outros, que influenciam diretamente na atividade biológica das moléculas (YUNES e CALIXTO, 2001).

Na química medicinal a otimização das estratégias de síntese são importantes para obter os melhores resultados e para diminuir os custos envolvidos no processo de descoberta do novo agente farmacologicamente ativo. Utilizando-se de uma boa estratégia de síntese, permitirá a obtenção de um grupo de compostos importantes para realizar um tratamento quantitativo de relação estrutura e atividade.

Os mais modernos métodos de correlação são o 4D-QSAR, 3D-QSAR, mais conhecidos com COMFA (CRAMER, et al., 1998). Muitas estratégias foram desenvolvidas para compreender os mais diversos parâmetros físico-químicos numa pequena série de compostos ou grupo de testes. Dentre estes, pode-se citar os métodos de Topliss, Hansch e Leo, Craig, PPC (Principais Propriedades de Substituintes), (YUNES e CALIXTO, 2001).

Pode-se ressaltar que trabalhando com métodos relativamente simples e clássicos (método de Topliss), pode-se obter grande êxito no entendimento e desenvolvimento de novas entidades bioativas (TOPLISS, 1972).

1.6 Otimização do composto protótipo.

As substâncias-referências encontradas por triagem ao acaso fornecem a base para o seguinte estágio, a otimização do protótipo, cujo objetivo (geralmente) é aumentar a potência da substância, sobre o seu alvo e otimizá-lo em relação às outras propriedades, como seletividade, estabilidade metabólica etc. Nessa fase, os testes aplicados incluem uma gama mais ampla de ensaios sobre diferentes sistemas de testes, incluindo estudos para determinar a atividade e o curso temporal das substâncias in vivo (onde possível, em modelos animais mimetizando os aspectos da condição clínica), verificação dos efeitos colaterais óbvios e, geralmente, para absorção oral. O objetivo da fase de otimização do protótipo é identificar um ou mais fármacos candidatos convenientes para desenvolvimento posterior. O problema mais comum é que a “otimização do protótipo” prova ser impossível: apesar de muito engenho e da química, o protótipo, como adolescente rebelde, recusa-se a parar com seus maus hábitos. Em outros casos, as substâncias, embora produzam o efeito desejado sobre a molécula-alvo, falham em produzir os efeitos esperados em modelos animais da doença, implicando que, provavelmente, o alvo não é bom. A minoria virtual consegue ir para onde a próxima fase: o desenvolvimento pré-clínico (RANG et al., 2004).

1.7 Método manual de Topliss.

A interação de um fármaco com um sistema biológico envolve a consideração de efeitos de substituintes que podem dar uma importante contribuição

independente e aditiva. Topliss tem indicado que o método de correlação entre estrutura química e atividade, desenvolvido por Hansch conseguiu uma aproximação mais racional para otimizar a síntese de fármacos. Quando esta otimização é procurada pela incorporação de diferentes substituintes no anel benzênico, Topliss sugere um método não estatístico, denominado manual, para aplicar o método de Hansch. O método manual consiste na análise dos resultados de cinco compostos, que devem ser sintetizados com os substituintes no anel aromático A: H, 4-Cl, 3,4-Cl₂, 4-CH₃ e 4-OCH₃ (Figura 5) (TOPLISS, 1972).

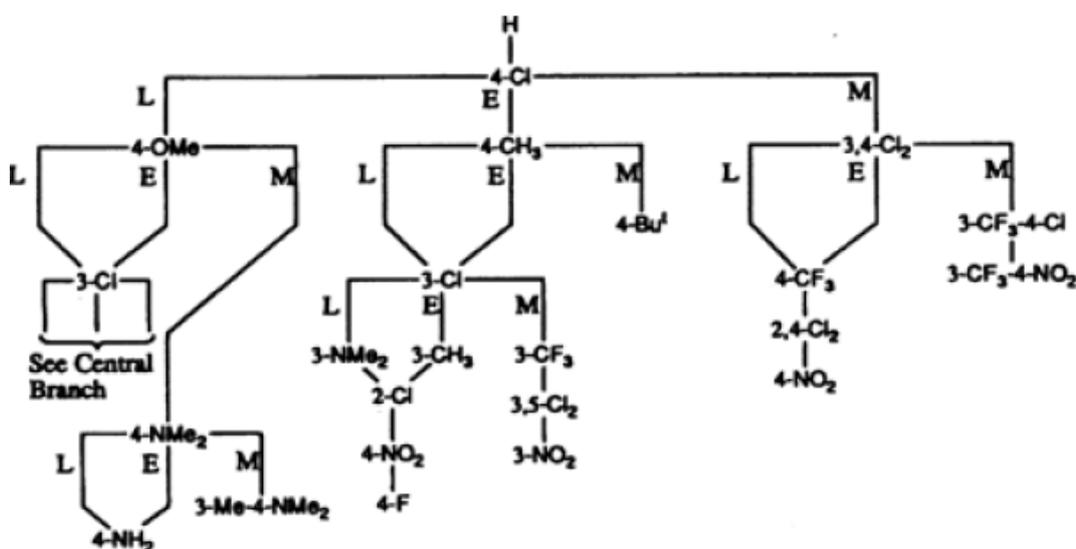


Figura 5 Árvore de decisão de Topliss para substituintes aromáticos, M = mais ativo, E = igual atividade e L = menos ativo, comparados com o composto (H) inicial (TOPLISS, 1972).

Apresentamos na Tabela 1 as dependências paramétricas físico-químicas encontradas nas relações de Hansh como: π (constante de hidrofobicidade), σ (constante de Hammett) e várias contribuições $\pi \pm \sigma$, apresentam as diferentes contribuições que cada efeito possa exercer bem como o parâmetro Es (efeito estérico na posição 4).

Tabela 1 Ordem de potência para vários parâmetros físico-químicos.

Substituintes	Parâmetros									
	π	$\pi - \pi^2$	σ	$-\sigma$	$\pi + \sigma$	$2\pi - \sigma$	$\pi - \sigma$	$\pi - 2\sigma$	$\pi - 3\sigma$	Es
3,4-Cl ₂	1	1-2	1	5	1	1	1-2	3-4	5	2-5
4-Cl	2	1-2	2	4	2	2-3	3	3-4	3-4	2-5
4-CH ₃	3	3	4	2	3	2-3	1-2	1	1	2-5
4-OCH ₃	4-5	4-5	5	1	5	4	4	2	2	2-5
H	4-5	4-5	3	3	4	5	5	5	3-4	1

Baseado em resultados de quatro ou cinco compostos, pode-se pré-dizer, a rota sintética provável para a obtenção de novos compostos farmacologicamente mais potentes (Tabela 2). A vantagem da aplicação do método de Topliss na correlação estrutura química-atividade biológica está na sua simplicidade,

possibilitando ótimos resultados em pouco tempo. Este método não aplica outros parâmetros fora de π , σ e efeito estéreo (Es) (TOPLISS, 1972; TOPLISS, 1977).

Tabela 2 Seleção de novos substituintes.

<i>Prováveis Parâmetros Ativos</i>	<i>Seleção de Novos Substituintes</i>
$\pi, \pi + \sigma, \sigma$	3-CF ₃ , 4-Cl; 3-CF ₃ , 4-NO ₂ ; 4-CF ₃ ; 2,4-Cl ₂ ; 4-C ₅ H ₉ , 4-C ₆ H ₁₁
$\pi, 2\pi - \sigma, \pi - \sigma$	4-CH(CH ₃) ₂ ; 4-C(CH ₃) ₃ ; 3,4-(CH ₃) ₂ ; 4-O(CH ₂) ₃ CH ₃ ; 4-OCH ₂ Ph; 4-N(C ₂ H ₅) ₂
$\pi - 2\sigma, \pi - 3\sigma, -\sigma$	4-N(C ₂ H ₅) ₂ ; 4-N(CH ₃) ₂ ; 4-NH ₂ , 4-NHC ₄ H ₉ ; 4-OH; 4-OCH(CH ₃) ₂ ; 3-CH ₃ ; 4-OCH ₃
$2\pi - \pi^2$	4-Br; 3-CF ₃ ; 3,4-(CH ₃) ₂ ; 4-C ₂ H ₄ ; 4-O (CH ₂) ₂ CH ₃ ; 3-CH ₃ ; 4-Cl
<i>Es (posição 4)</i>	3-Cl; 3-CH ₃ ; 3-OCH ₃ ; 3-N(CH ₃) ₂ ; 3-CF ₃ ; 3,5-Cl ₂ ;
<i>Efeito orto</i>	2-Cl; 2-CH ₃ ; 2-OCH ₃ ; 2-F
<i>Outros</i>	4-F; 4NHCOCH ₃ ; 4-NHSO ₂ CH ₃ ; 4-NO ₂ ; 4-COCH ₃ ; 4-SO ₂ CH ₃ ; 4-CONH ₂ ; 4-SO ₂ NH ₂

1.8 Regra dos cinco de Christopher A. Lipinski para compostos sintéticos.

A regra de Lipinski, denominada de regra dos cinco, tem como objetivo estimar a solubilidade e a permeabilidade de fármacos administrados por via oral, predizendo a influência da estrutura química na absorção de um dado composto.

Os critérios a serem avaliados são:

- ✓ A massa molar não deve exceder a 500 g/mol;
- ✓ O log P, cujo valor limite é cinco;
- ✓ Os grupos doadores (NH + OH) e aceptores (N + O) de ligação hidrogênio, cujas somatórias não devem ultrapassar a 5 e 10, respectivamente.
- ✓ Apenas classes de compostos que são substratos para transportadores biológicos e produtos naturais são consideradas exceções à regra (LIPINSKI, 1997).

1.9 Aspectos farmacológicos da inflamação e da dor.

Inflamar significa “colocar fogo” o que implica na cor vermelha, na possibilidade de aquecimento e na geração de dor (TROWBRIGDE e EMLING, 1996). A resposta inflamatória é um mecanismo benéfico e fisiológico pelo qual o organismo se defende contra infecções e tenta reparar danos teciduais ou perda de função (LAWRENCE et al., 2002). Assim, o processo inflamatório agudo pode ser definido como um conjunto de alterações bioquímicas e celulares que ocorrem em resposta a estímulos inespecíficos, tais como infecções ou danos teciduais

(HANSSON, 2005). As reações inflamatórias locais são caracterizadas por aumento do fluxo sangüíneo e da permeabilidade vascular, seguida de dilatação venular e acúmulo de células do processo inflamatório, caracterizado os quatro sinais típicos da presença de inflamação: rubor (hiperemia), tumor (edema), calor (aumento da temperatura local) e dor, (GILROY et al., 2004). O quinto sinal da inflamação, que é a perda da função do tecido ou órgão lesado (KASSUYA, 2006).

As causas que levam à inflamação são múltiplas e de natureza variável. São reconhecidos os seguintes tipos de agentes que causam inflamação: agentes biológicos como bactérias, vírus, protozoários; agentes químicos como ácidos, álcalis, formaldeído, carragenina; agentes físicos como calor excessivo, frio exagerado, radiação ultravioleta e ionizante, eletricidade, traumatismos, fraturas, incisões e agentes imunes, exposição a antígenos provocando ativação da resposta imunológica do hospedeiro (KASSUYA, 2006).

Os componentes básicos de um processo inflamatório envolvem eventos vasculares e celulares, mediadores derivados de células e da ativação plasmática, que produzem os sinais clássicos da inflamação. As alterações vasculares iniciam-se imediatamente e desenvolvem-se durante as primeiras horas após o estímulo inflamatório. Elas consistem em vasodilatação, aumento do fluxo sangüíneo, aumento da permeabilidade vascular e exsudação de plasma. Em condições normais à micro-circulação apresenta baixíssima permeabilidade a macromoléculas. As proteínas plasmáticas circulam muito lentamente entre sangue e tecidos e retornam ao sangue através dos vasos linfáticos. Esta situação muda dramaticamente durante o processo inflamatório. A micro-circulação torna-se permeável a macromoléculas e fluídos vindos do sangue, causando edema tecidual (GILROY et al., 2004 e KASSUYA, 2006).

Os eventos celulares são marcados pela saída das células circulantes da luz do vaso e a migração de leucócitos para o sítio inflamatório. Esse fenômeno segue algumas fases como captura, rolamento dos leucócitos pelo endotélio, adesão firme e transmigração. Todas estas etapas do processo de migração leucocitária são dependentes da expressão pelos leucócitos e pelas células endoteliais de moléculas denominadas moléculas de adesão e de mediadores quimiotáticos. A mobilização adequada dos leucócitos circulantes para o sítio inflamado é fundamental para a defesa do organismo, já que estas células podem desenvolver suas ações de fagocitose e destruição de agentes patogênicos levando à resolução do processo. Os leucócitos circulantes migram seletivamente e em número significativo para o tecido inflamado no decorrer do processo. Em uma resposta inflamatória aguda, e logo nos estágios iniciais, há acúmulo predominante de neutrófilos, enquanto que as células mononucleares são observadas mais tardiamente durante a fase aguda, bem como nos processos crônicos. A migração de eosinófilos também pode ocorrer em processos inflamatórios, estando principalmente associada a processos alérgicos e infecções parasitárias. Algumas das células já estão presentes no tecido afetado tais como: células endoteliais, células mesoteliais, mastócitos, eosinófilos, macrófagos e alguns linfócitos (KASSUYA, 2006).

Além da dor derivada do processo inflamatório, podemos citar outros tipos de dor como nociceptiva, neurogênica e a neuropática (MILAN, 1999). Além disso, outras manifestações dolorosas como a hiperalgia (sensibilidade exacerbada a um estímulo doloroso) são freqüentes em pacientes acometidos de dor. Em termos de duração, a dor pode ser aguda ou crônica. A dor aguda está associada com uma lesão tecidual recente, ativação de nociceptores e pode desaparecer até mesmo antes da cura do dano tecidual (CARR e GOUDAS, 1999; PARK e VASKO, 2005).

Por outro lado a dor crônica pode se perpetuar por meses ou anos, caracteriza-se em relação à persistência e alterações adaptativas, o que muitas vezes dificulta o tratamento (IADAROLA e CAUDLE, 1997; BESSON, 1999 e KASSUYA, 2006).

A percepção dolorosa a um determinado estímulo nocivo tem como propósito biológico alertar o organismo sobre algum perigo no ambiente, incluindo a resposta comportamental de proteger o organismo contra possível lesão. A transmissão da dor envolve uma interação complexa de estruturas centrais e periféricas desde a pele, vísceras ou outros tecidos até o córtex cerebral (Figura 6) (DOR ON LINE, 2009).

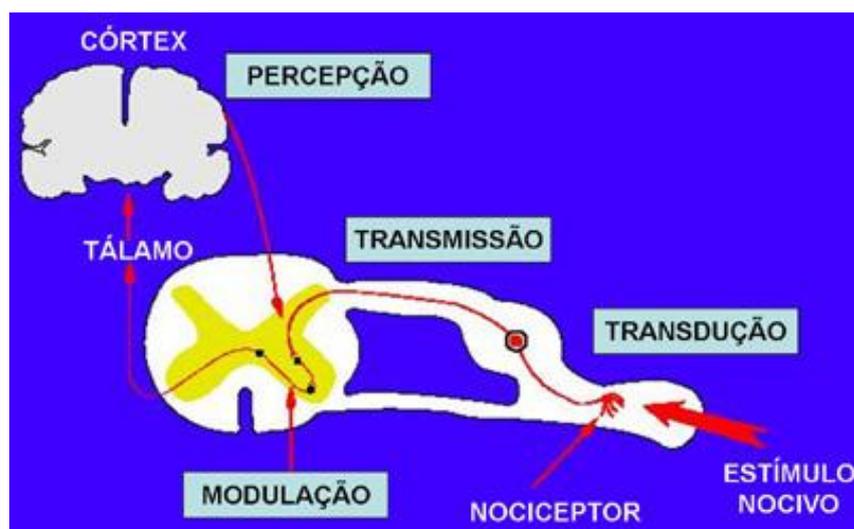


Figura 6 Mecanismos transmissão da dor.

Os estímulos tais como calor, frio, compressão intensa ou substâncias químicas endógenas ou exógenas potencialmente nocivas, ativam as terminações nervosas livres e periféricas de fibras sensoriais delgadas do tipo C e $A\delta$, chamadas de nociceptores. Estas fibras são formadas por neurônios cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios da raiz dorsal (DRG) e trigemial, e são responsáveis pela condução das informações nociceptivas até o corno dorsal da medula espinhal e o

núcleo trigemial pars caudalis na ponte, respectivamente (DRAY e PERKINS, 1997; RUSSO e BROSE, 1998; BESSON, 1999, PARK e VASKO, 2005). Imediatamente, um reflexo de retirada mediado pela medula espinhal é desencadeado no intuito de remover a região do corpo ameaçada. Nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal, as terminações dos nociceptores liberam vários neurotransmissores que estimulam neurônios de segunda ordem. Estes neurônios formam vias que irão distribuir informações para circuitos cerebrais responsáveis pela produção das sensações dolorosas (CRAIG, 2003; HUNT e MANTHY, 2001; PARK e VASKO, 2005)

Embora diversos mecanismos moleculares envolvidos na sensibilização central tenham sido estabelecidos recentemente, aqueles responsáveis pela sensibilização periférica ainda não foram completamente elucidados. Entretanto, o conhecimento da biologia molecular acerca dos diversos receptores e vias transduccionais envolvidos na gênese da nocicepção permitiram um extraordinário progresso no entendimento do mecanismo de ação de diversos neurotransmissores e, conseqüentemente, de drogas que atuam na modulação central e periférica da nocicepção. Os mecanismos envolvidos na transdução neuroquímica da dor geralmente envolvem a interação dos mediadores inflamatórios e/ou nociceptivos com canais iônicos de membrana dependente de voltagem, canais iônicos operados por receptor, receptores associados à tirosina quinase, ou com receptores de membrana que usualmente encontram-se acoplados a proteínas G (LEVINE e TAIWO, 1994; WOOD e DOCHERTY, 1997; MILLAN, 1999; PARK e VASKO, 2005).

A Figura 07 ilustra observações experimentais. Uma inflamação induzida por uma substância irritante chamada carragenina ou por uma toxina bacteriana (lipopolisacarídeo – LPS) estimula as células residentes do tecido a liberarem uma

citocina denominada $\text{TNF-}\alpha$ (Fator de Necrose Tumoral) que, por sua vez, induz a liberação de outras duas citocinas: interleucina 1-Beta (IL-1b) e Interleucina-8 (IL-8). A IL-1b promove a ativação de uma enzima denominada ciclooxigenase (COX) responsável pela produção de prostaglandinas. A IL-8 promove a produção local de aminas simpatomiméticas (p.ex. dopamina e noradrenalina). As prostaglandinas e as aminas simpatomiméticas atuam nos receptores dos neurônios sensitivos primários (NSP) induzindo a sua sensibilização (DOR ON LINE, 2009).

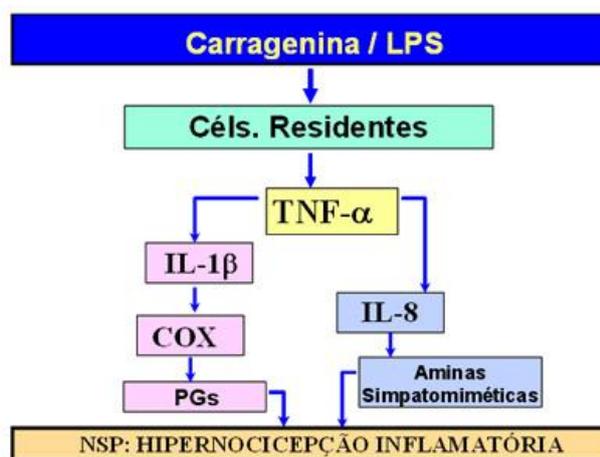


Figura 7 Cascata de Citocinas.

Os neutrófilos, os eosinófilos, os mastócitos, os macrófagos dentre outras células são capazes de produzir vários mediadores inflamatórios e/ou nociceptivos como histamina, serotonina, PGs, leucotrienos (LTs), PAF, citocinas, quimiocinas, fator de necrose tumoral ($\text{TNF-}\alpha$) e numerosas proteases entre outros. Estes mediadores podem estar relacionados tanto com a inflamação quanto com a dor (KASSUYA, 2006).

1.10 Doenças inflamatórias intestinais.

Doenças inflamatórias intestinais (IBD, do inglês Inflammatory Bowel Disease) é uma classificação genérica para um grupo de desordens inflamatórias do trato gastrointestinal que é caracterizada por dano e inflamação da mucosa intestinal. As duas IBDs são a colite ulcerativa e a doença de Crohn (Figura 8). A doença de Crohn é geralmente caracterizada por ser uma doença inflamatória transmural que afeta todo o trato digestivo, podendo afetar desde a boca até o ânus (Figura 9). Por outro lado, a colite ulcerativa é uma doença inflamatória não transmural que está restrita ao cólon (Figura10).

A ocorrência das (IBDs) envolve diversos fatores como idade, raça, etnia e região geográfica. Os casos de pessoas que sofrem destas doenças podem chegar a 1,4 milhões nos Estados Unidos e 2,2 milhões na Europa (BENTO, 2008).

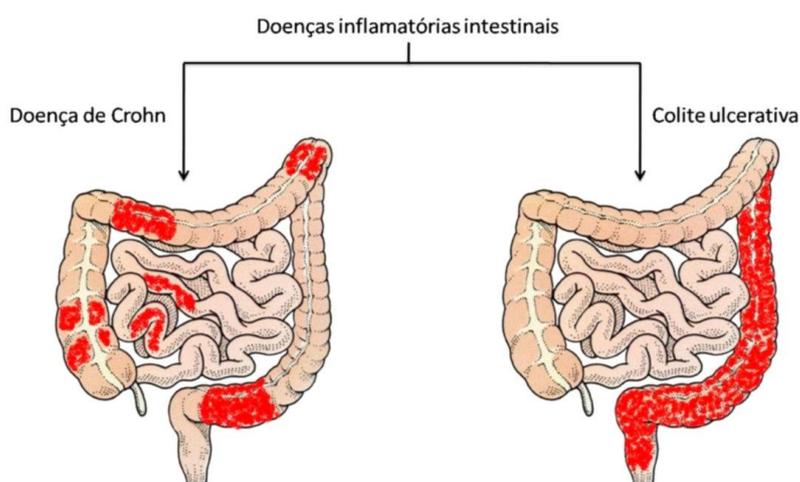


Figura 8 Principais doenças inflamatórias intestinais: Doença de Crohn e Colite ulcerativa (BENTO, 2008).

Casos de colite crônica aumentam as chances de desenvolver câncer do cólon. Um número cada vez maior de modelos de inflamação intestinal em animais tem contribuído de forma substancial para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese das IBDs (BENTO, 2008).



Figura 9 Imagem de uma colonoscopia de um paciente com doença de Crohn, a membrana do cólon está inflamada (M130/776 - Science Photo Library, 2009).



Figura 10 Doença de Crohn no reto (C001/2342 - Science Photo Library, 2009).

Doenças inflamatórias intestinais são uma classificação genérica de um grupo de desordens inflamatórias do trato gastrointestinal, caracterizado por danos na mucosa e infiltração de leucócitos.

As doenças inflamatórias intestinais são complexas e envolvem condições ambientais, genéticas e fatores imunológicos. A colite ulcerativa e a doença de Crohn representam os dois maiores tipos de doenças inflamatórias intestinais.

Os neutrófilos expressam dois receptores CXC, o CXCR1 e CXCR2, que são importantes na patogênese das respostas inflamatórias (BENTO, 2008).

1.11 Quimiocinas e seus receptores na inflamação.

As quimiocinas formam uma superfamília de pequenas citocinas que participam do recrutamento de leucócitos. As quimiocinas (citocinas quimioatraentes) são proteínas de baixo peso molecular, um grupo de moléculas secretadas por leucócitos inflamatórios e por células não leucocíticas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes que estimulam o movimento dos leucócitos e regulam sua migração direcionando-os a tecidos linfóides ou periféricos. Esse direcionamento depende do grau de maturação e da ativação celular, assim como do estado de inflamação do tecido, isso porque a produção das quimiocinas e a expressão de seus receptores são regulados por uma grande variedade de moléculas que contribuem para o estabelecimento da resposta inflamatória (BENTO, 2008).

Os receptores de Quimiocinas são receptores de citocinas encontrados na superfície de determinadas células, que interagem com um tipo de citocina chamada de quimiocina. Existem dezenove receptores distintos de quimiocinas descritos nos mamíferos. Cada um tem uma estrutura com sete domínios transmembrana

acoplados a proteína-G para a transdução do sinal para dentro da célula, fazendo parte de uma grande família de proteína de receptores as proteínas-G acopladas. Depois da interação com seus ligantes específicos de quimiocinas, os receptores de quimiocinas provocam um fluxo intracelular de íons de cálcio (Ca^{2+} - sinalização do cálcio). Isto causa as respostas na célula, incluindo o início de um processo conhecido como quimiotaxia que regula tráfego na célula. Os receptores de quimiocinas são divididos em quatro famílias diferentes: os receptores CXC de quimiocinas, os receptores CC de quimiocinas, os receptores CX3C e os receptores CXC que correspondem às quatro subfamílias distintas das quimiocinas. Os receptores de quimiocinas tipo CXC são proteínas integrantes da membrana que especificamente se ligam e respondem as citocinas da família dos quimiocinas CXC. Representam uma subfamília dos receptores de quimiocinas, uma grande família de receptores ligados a proteína G que contém sete domínios transmembrana. Existem atualmente sete receptores conhecidos do quimiocinas CXC nos mamíferos, nomeados CXCR1 a CXCR7. Estes receptores são proteínas com sete domínios trans-membrana, conectado por “loops” extracelulares. Eles são ativados pela ligação de moléculas na superfície da célula que induz respostas no interior da mesma (Figura 11) (ROTH e HEBERT, 2000).

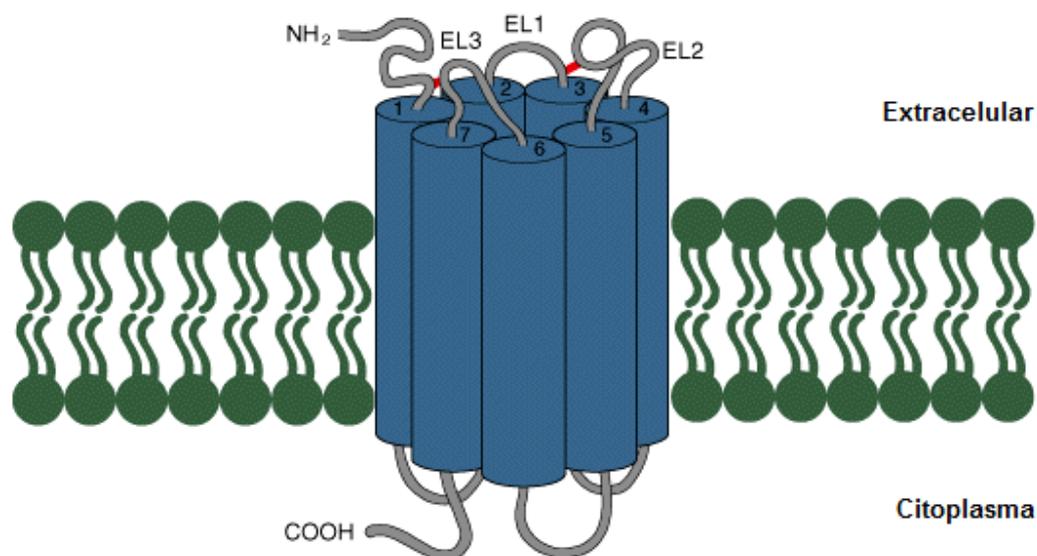


Figura 11 Modelo putativo da estrutura terciária proposta do receptor CXCR1 e de CXCR2. Os domínios helicoidais transmembrana são indicados pelas estruturas tubulares, numeradas 1-7. Três “loops” extracelular são designados EL1-3. Duas pontes de dissulfeto potenciais ligam o domínio extracelular do N-terminal com o terceiro laço extracelular, e os primeiros e segundos laços extracelular, são mostrados em vermelho (ROTH e HEBERT, 2000).

Abaixo na Figura 12 apresentamos a comparação das sequências de aminoácidos dos receptores hCXCR1 e hCXCR2 humanos.

Os 20 aminoácidos das sequências abaixo são representados (do inglês): alanine - ala – A, arginine - arg – R, asparagine - asn – N, aspartic acid - asp – D, cysteine - cys – C, glutamine - gln – Q, glutamic acid - glu – E, glycine - gly – G, histidine - his – H, isoleucine - ile – I, leucine - leu – L, lysine - lys – K, methionine - met – M, phenylalanine - phe – F, proline - pro – P, serine - ser – S, threonine - thr – T, tryptophan - trp – W, tyrosine - tyr – Y, valine - val – V.

Human CXCR1:

```

1 MSNITDPQMW DFDDLNFDTGM PPADEDYSPC MLETETLNKY VVIIAYALVF LLSLLGNSLV
61 MLVILYSRVG RSVTDVYLLN LALADLLFAL TLPWAASKV NGWIFGTFLC KVVSLKKEVN
121 FYSGILLLAC ISVDRYLAIV HATRTLQKR HLKVFVCLGC WGLSMNLSLP FFLFRQAYHP
181 NNSSPVCYEV LGNDTAKWRM VLRILPHTFG FIVPLFVMLF CYGFTLRTLF KAHMGQKHRA
241 MRVIFAVVLI FLLCWLPLYN LLLADTLMRT QVIQETCERR NNIGRALDAT EILGFLHSCL
301 NPFIYAFIQG NFRHGFLKIL AMHGLVSKEF LARHRVTSYT SSSVNVSSNL

```

Human CXCR2:

```

1 MEDFNMESDS FEDFWKGEDL SNYSYSSTLP PFLDAAAPCE PESLEINKYF VVIIYALVFL
61 LSLGNSLVM LVILYSRVGR SVTDVYLLNL ALADLLFALT LPIWAASKVN GWIFGTFLCK
121 VVSLKKEVNF YSGILLLACI SVDRYLAIVH ATRTLQKRY LVKFICLSIW GLSLLALPV
181 LLFRRTVYSS NVSPACYEDM GNNTANWRML LRILPQSFGF IVPLLIMLFC YGFTLRTLFK
241 AHMGQKHRA RVIYAVVLI FLLCWLPLYN LVLLADTLMRTQ VIQETCERRN HIDRALDATE
301 ILGILHSCLN PLIYAFIQGK FRHGLLKILA IHGLISKDSL PKDSRPSFVG SSSGHTSTTL

```

```

          10          20          30          40
hCXCR1      MSNITDPQMWDFDDL-NF---TGMPPADEDYSPCMLETETLNKYV
          * . . . * .** * . .** * .** * .***
hCXCR2      MEDFNMESDSFEDFWKGEDLSNYSYSSTLPPFLDAAAPCEPESLEINKYF
          10          20          30          40          50

          50          60          70          80          90
hCXCR1      VIIAYALVFLSLLGNSLVMLVILYSRVGRSVTDVYLLNLALADLLFALT
          * * *****
hCXCR2      VVIIYALVFLSLLGNSLVMLVILYSRVGRSVTDVYLLNLALADLLFALT
          60          70          80          90          100

          100         110         120         130         140
hCXCR1      LPIWAASKVNGWIFGTFLCKVVSLKKEVNFYSGILLLACISVDRYLAIVH
          *****
hCXCR2      LPIWAASKVNGWIFGTFLCKVVSLKKEVNFYSGILLLACISVDRYLAIVH
          110         120         130         140         150

          150         160         170         180         190
hCXCR1      ATRTLQKRHLVKFVCLGCWGLSMNLSLPPFLFRQAYHPNNSPVCYEV
          ***** **.*. ****. ***.***. . * ** *
hCXCR2      ATRTLQKRYLVKFICLSIWGLSLLALPVLFRRTVYSSNVSPACYEDM
          160         170         180         190         200

          200         210         220         230         240
hCXCR1      GNDTAKWRMVLRLPHTFGFIVPLFVMLFCYGFTLRTLFKAHMGQKHRA
          **.*.***.*****.*****.*****
hCXCR2      GNNTANWRMLLRILPQSFGFIVPPLIMLFCYGFTLRTLFKAHMGQKHRA
          210         220         230         240         250

          250         260         270         280         290
hCXCR1      RVIFAVVLIFFLLCWLPLYNLLADTLMRTQVIQETCERRNNIGRALDATE
          ***** * .*****
hCXCR2      RVIFAVVLIFFLLCWLPLYNLLADTLMRTQVIQETCERRNHIDRALDATE
          260         270         280         290         300

          300         310         320         330         340
hCXCR1      ILGFLHSCLNPIIYAFIQGNFRHGFLKILAMHGLVSKEFARHRVTSYTS
          **.*.*****.*****.*****.***.*. * . . * . .
hCXCR2      ILGILHSCLNPLIYAFIQGKFRHGLLKILAIHGLISKDSLPKDSRPSFVG
          310         320         330         340         350

          350
hCXCR1      SSVNVSSNL
          ** . *
hCXCR2      SSSGHTSTTL
          360

```

Figura 12 Alinhamento das seqüências do receptor hCXCR1 e hCXCR2 humanos. Os resíduos idênticos são marcados por um asterisco. As substituições conservadoras são marcadas por um ponto (ROTH e HEBERT, 2000).

Podemos observar na (Figura 12) que existem diferenças nas sequências que representam os dois receptores CXCR1 e CXCR2 e estas diferenças nas sequências governam as interações com as quimiocinas de maneira diferente para cada receptor (ROTH e HEBERT, 2000). Modelo das estruturas secundárias dos receptores humanos transmembrana hCXCR1 e hCXCR2 são apresentados na Figura 13.

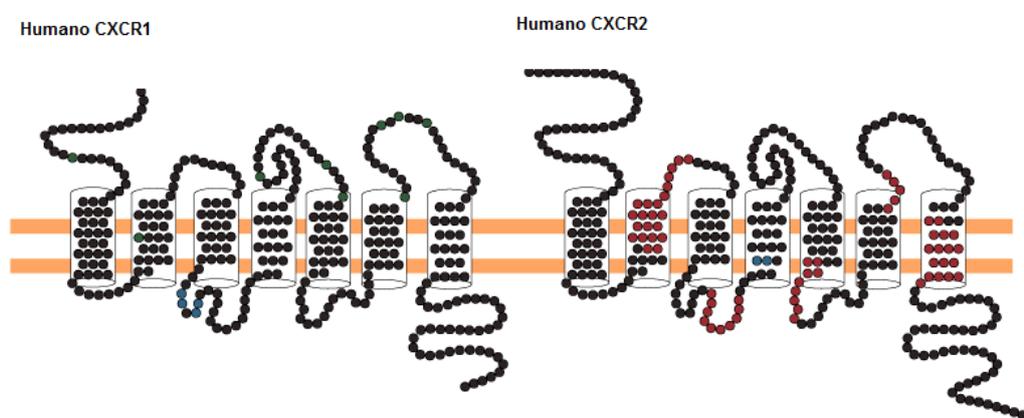


Figura 13 Modelo das estruturas secundárias do receptor CXCR1 e do CXCR2 humanos. Como deduzido pela exploração da alanina por mutagenesis, os resíduos em CXCR1 que são importantes para a expressão do receptor ou para o bloqueio do ligante são indicados em verde. Os resíduos envolvidos na sinalização da proteína de G são mostrados em azul. As causas determinantes estruturais importantes conservadas em CXCR1 e em CXCR2 são indicadas em vermelho (ROTH e HEBERT, 2000).

Na Figura14, podemos observar a homologia da sequência dos aminoácidos em diferentes espécies. Podemos observar uma grande diferença na homologia do receptor hCXCR2 para humanos (360 aminoácidos: 40,759 Da), camundongos (359 aminoácidos: 40,425 Da) e ratos (359 aminoácidos: 40,532 Da).

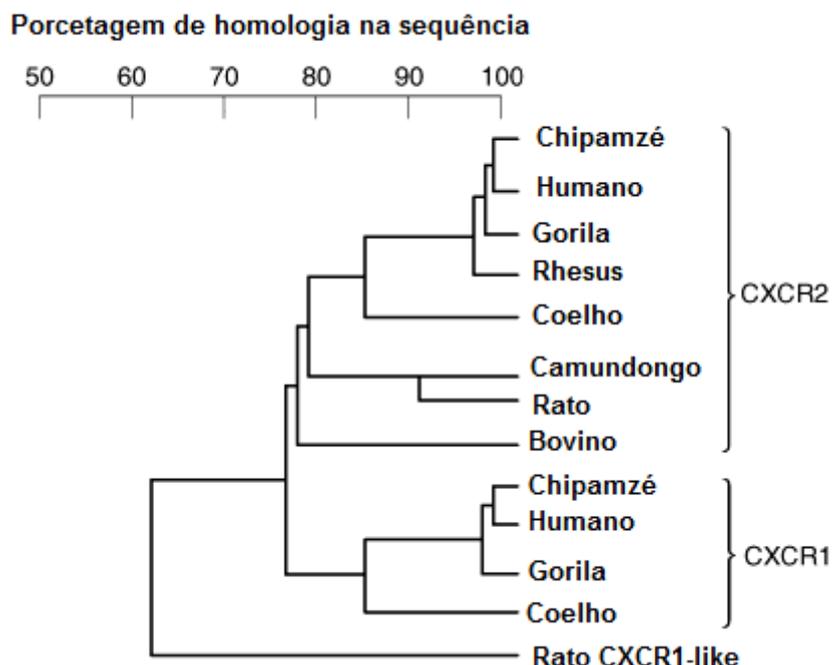


Figura 14 Respresentação gráfica da homologia da seqüência entre as proteínas CXCR1 e CXCR2 em diferentes espécies animais (ROTH e HEBERT, 2000).

Observa-se na (Figura 14) que existe uma grande diferença entre a homologia da sequência de aminoácidos do receptor CXCR2 humano comparado com o do camundongo e do rato bem como outras espécies. Este fato pode explicar diferenças encontradas nas doses para cada espécie ou mesmo a falta de interação dos ligantes. As principais atividades e o papel fisiopatológico dos receptores CXCR1 e CXCR2 mediam uma diversidade de funções das quimiocinas em uma variedade de tipos de células.

Os leucócitos são importantes em mediar às defesas contra micróbios. Ambos os receptores atuam induzindo a quimiotaxia e o fluxo de cálcio em diferentes subconjuntos de leucócitos. Nos neutrófilos, a ativação do receptor estimula igualmente a liberação de enzimas de grânulos assim como a geração de superóxido. Além dos seus efeitos em células imunes, CXCR1 e/ou CXCR2 podem

ser importantes na regulação da vasculogênese e no crescimento conseqüente de tumores. Quimiocinas contendo ELR (glutamina- leucina-arginina) que precede a porção N-terminal destas proteínas CXC e sinalizam através destes receptores para induzir in vitro a quimiotaxia de células endoteliais assim como a angiogênese em vários modelos animais (ROTH e HEBERT, 2000).

1.12 Utilidade terapêutica.

Os estudos envolvendo neutralização de anticorpos demonstraram que IL-8 é um mediador chave da inflamação aguda mediada por neutrófilo em coelhos. Entretanto, a seletividade dos dois receptores IL-8 conhecidos do coelho para quimiocinas não foi definido, assim sua importância relativa em modelos inflamatórios não foi compreendida igualmente ainda. Os alvos potenciais de doenças incluem muitos mediados por neutrófilos e os processos inflamatórios tais como ferimento por isquemia/reperfusão, a síndrome da aflição respiratória em adultos e determinadas formas de glomerulonefrites e dermatites. A evidência recente sugere que IL-8 possa estar igualmente envolvida na doença de Alzheimer, assim como no crescimento de tumores através de seus efeitos angiogênicos. Por causa da redundância dos ligantes, os receptores de quimiocinas podem ser melhores alvos para o desenvolvimento de agentes de bloqueio para o uso terapêutico. Entretanto, ainda não se sabe o que será exigido para bloquear ambos os subtipos de receptores, ou se a inibição de apenas um bastará. (ROTH E HEBERT, 2000).

2.0 REVISÃO

2.1 Primeiro inibidor não peptídico seletivo e potente de um receptor de uma Quimiocina.

Foi publicado, em abril de 1998, no Journal of Biological Chemistry (WHITE et al., 1998), um trabalho onde foi identificado um antagonista não peptídico, potente e seletivo do receptor transmembrana CXCR2, uma N,N'-diariluréia chamada de SB225002 (N-(2-Hidroxi-4-nitrofenila)-N'-(2-bromofenila)uréia (Fig. 15), que inibe a IL-8 (ou CXCL8 proteína de ativação de neutrófilos, nova nomenclatura (ZLOTNIK, 2000), responsável pela migração de neutrófilos (Figura 16). A IL-8 é uma proteína não glicosilada de 8 kDa (72 aminoácidos), observe a forma dimérica na (Figura 16).

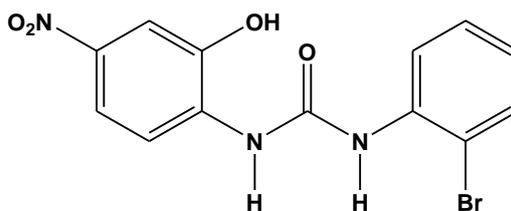


Figura 15 Estrutura química do SB225002 (WHITE et al., 1998).

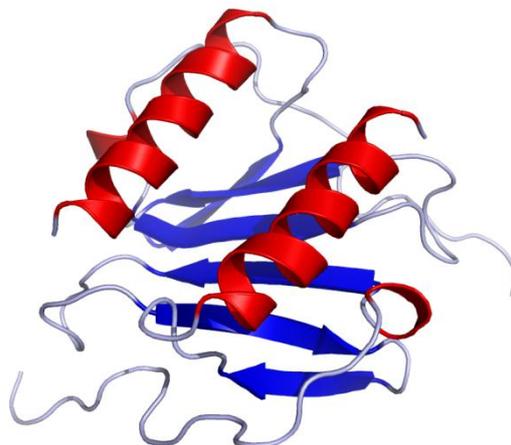


Figura 16 Estrutura tridimensional dimérica da Interleucina-8 em solução (CLORE et al., 1990).

Uma interação química, que inibia seletivamente CXCR2 foi descoberta através de HTS (high-throughput screening), e foi otimizada quimicamente. O recrutamento de células inflamatórias em locais de danos teciduais é uma resposta fisiológica normal, projetada para combater às infecções, remover as células danificadas, e estimular cicatrização. Entretanto, o recrutamento excessivo de tais células exacerba frequentemente, os danos no tecido, retarda a cicatrização, e em alguns casos conduz à morte. Conseqüentemente a inibição do recrutamento de células inflamatórias pode ser uma estratégia terapêutica apropriada em várias doenças inflamatórias, tais como ferimento por isquemia, artrite, asma, e a doença inflamatórias intestinais (WHITE, 1998 – ANEXO A).

Em particular, o SB225002 é uma importante ferramenta para avaliar o papel da IL-8 e do receptor CXCR2 no recrutamento de neutrófilos, um processo importante em diversas doenças inflamatórias, incluindo a síndrome de aflição respiratória do adulto, na bronquite crônica e na asma. Os neutrófilos estão implicados em várias doenças inflamatórias incluindo doença pulmonar obstrutiva

crônica (DPOC). A quimiocina IL-8 (CXCL8) é um potente fator ativador envolvido no recrutamento de neutrófilos, esta foi detectada em amostras clínicas de vários pacientes e pensa-se que o antagonismo da IL-8 pode ser uma estratégia terapêutica útil. Na última década foram concentrados esforços para entender o mecanismo molecular da produção de IL-8 nos processos inflamatórios. A expressão gênica da IL-8 parece controlar vários dos componentes inflamatórios. A IL-8 apresenta efeito sobre os neutrófilos pela alta afinidade por dois receptores transmembrana na superfície da célula, chamados CXCR1 e CXCR2. Os neutrófilos reagem via receptor CXC com as quimiocinas, tal como a população de IL-8 (Figura 17) (HENSON, 2006).

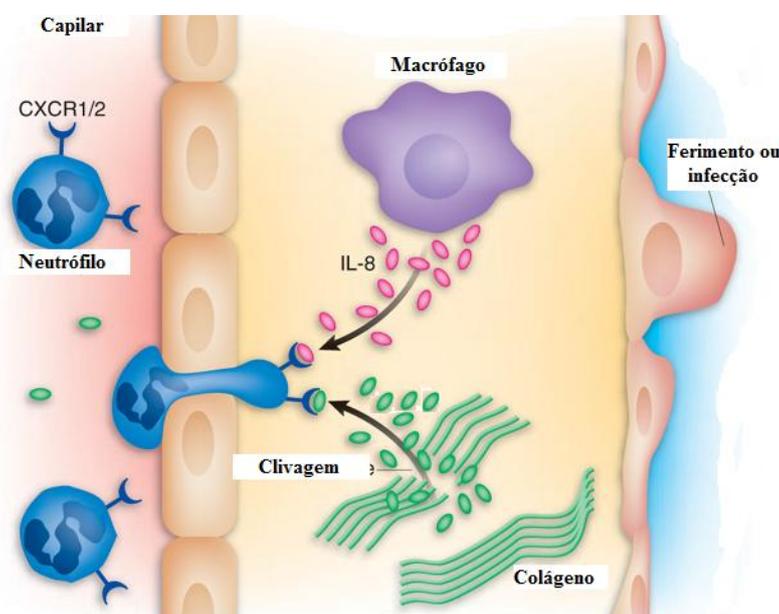


Figura 17 Ilustração adaptada, uma resposta inflamatória (HENSON, 2006).

A interleucina-8 (IL-8 ou CXCL8) ativa o receptor CXCR1 com baixa afinidade, mediando a ativação dos neutrófilos e a alta afinidade da (IL-8) pelo receptor CXCR2 media a quimiotaxia ou trânsito dos neutrófilos.

O receptor CXCR2 pode ser ativado por outras CXC (quimiocinas – Figura 18): CTAP3, peptídeo conectivo ativante de tecido III; ENA, proteína epitelial de ativação de neutrófilos; GCP2, proteína quimiotática de granulócito 2; GRO, oncoproteína de crescimento; NAP2, peptídeo 2 de ativação de neutrófilos; PF4, fator plaquetário 4; β -TG, β -tromboglobina (BARNES, 2002).

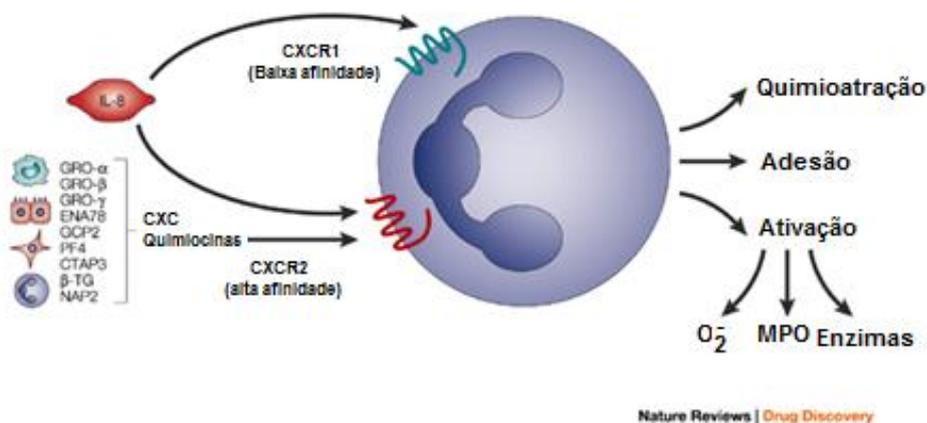


Figura 18 Representação dos receptores CXCR1 e CXCR2 em neutrófilos (BARNES, 2002).

Possíveis regiões envolvidas na interação do SB225002 com o receptor CXCR2 (Figura 19).

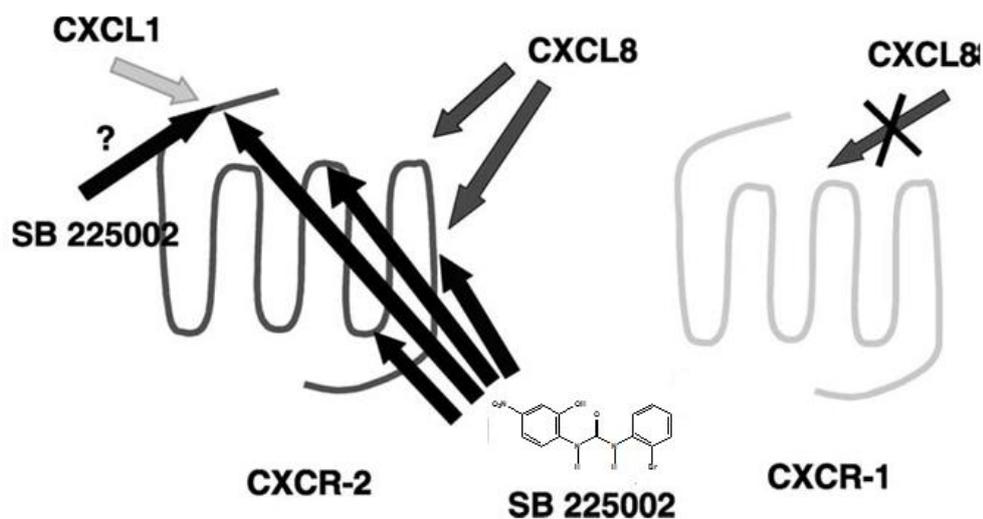


Figura 19 Localização dos aminoácidos envolvidos na inibição por um ligante marcado com ^{125}I que se liga ao receptor do mutante. As regiões envolvidas na ligação de CXCL8, CXCL1 e SB225002 foram indicados por setas: cinza escuro, cinza e preta respectivamente (CATUSSE et al., 2003).

Entretanto, afinidade do SB225002 foi de aproximadamente 10 vezes mais potente em inibir a interleucina-8 (IL-8) que se liga ao hCXCR2 (humano) ($\text{IC}_{50} = 4.8 \pm 1.6 \text{ nM}$) do que a cCXCR2 (“Cynomologus”) ($\text{IC}_{50} = 34 \pm 11 \text{ nM}$; Figura 20), (CATUSSE et al., 2003).

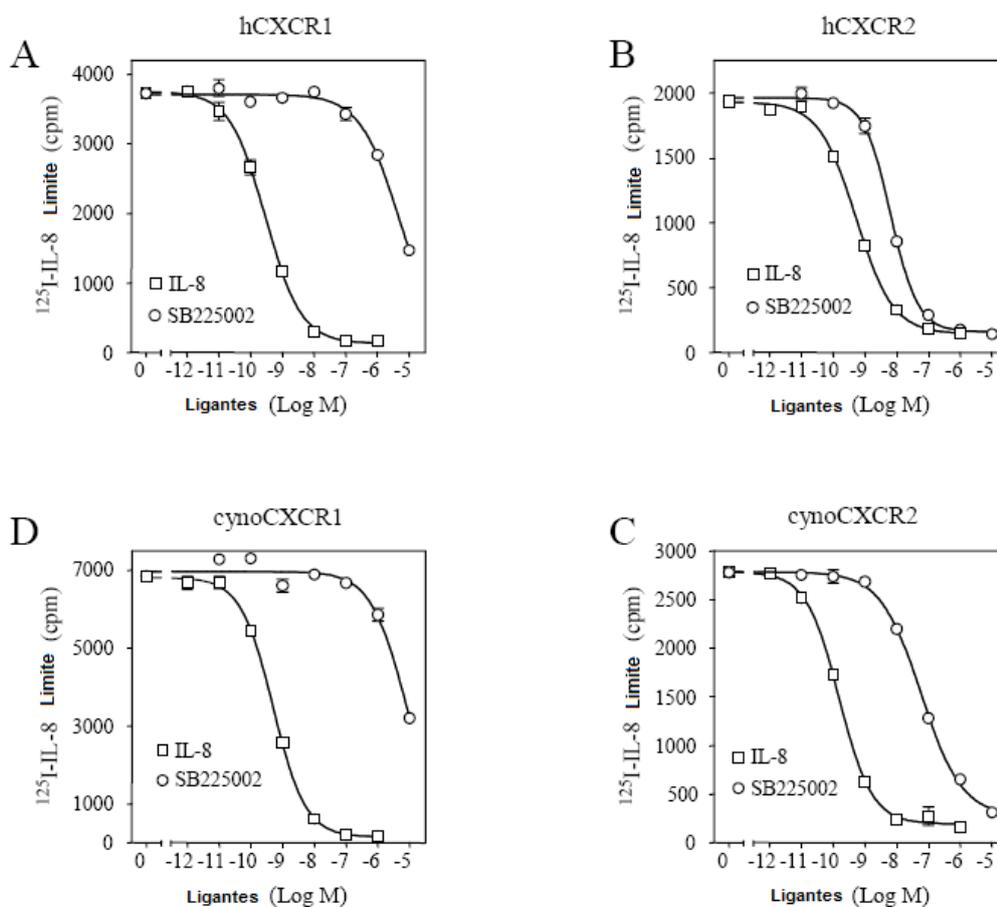


Figura 20 Competição de ligação da IL-8 na presença de SB225002. Membranas BA/F3 das células que expressam o hCXCR1 humano (painel A), hCXCR2 (painel B) ou “cynomolgus” cynoCXCR1 (painel C) ou cynoCXCR2 (receptores do painel D) foram incubados na presença de IL-8 resfriada e radiomarcada e em concentrações crescentes do SB225002. O bloqueio das membranas com radiomarcado foi medido por cintilação. (HIPKIN, 2004);

2.2 Química da uréia

A uréia ou carbamida foi isolada da urina por um químico Francês, Hilaire Marin Rouelle em 1773. Foi o primeiro composto orgânico sintetizado artificialmente em 1828 por Friedrich Woehler, obtido a partir do aquecimento do cianato de amônio (um sal inorgânico) (Figura 21); ocorrendo pela dissociação em amônia e ácido

isocianico por recombinação e rearranjo formando uréia (BATCHELOR et al., 1998). Esta síntese derrubou a teoria que os compostos orgânicos só poderiam ser sintetizados pelos organismos vivos, chamada de teoria da força vital.

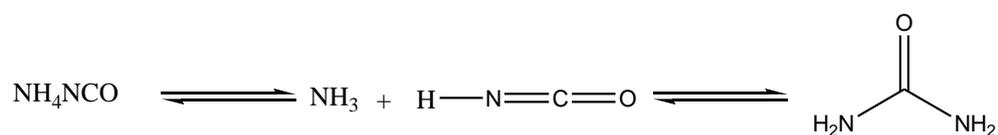


Figura 21 Formação da uréia a partir do aquecimento do isocianato de amônio.

A uréia é o principal produto final da excreção do nitrogênio nos mamíferos, sendo sintetizada pelo ciclo da uréia e produzida industrialmente a partir da combinação de amônia com dióxido de carbono. Usada na fabricação de resinas uréia-formaldeído, na indústria de tintas de anilinas e na produção de compostos macromoleculares como: plásticos, resinas sintéticas e borrachas. São de enorme importância na produção de fertilizantes, materiais para alimentação e também na preparação de agro-químicos inseticidas, fungicidas, estabilizante em explosivos de nitrocelulose, cosméticos e produtos para o tratamento de diversas doenças.

2.3 N,N',-diariluréias bioativas

Vários pesquisadores trabalharam na síntese de N,N'-diariluréias como WIDDOWSON e colaboradores, (2004). Novos compostos contendo grupos H, 4-NO₂, 3-NO₂, 5-NO₂, 4-CN, 4-Br, (3-Br,4-CN), (3-Cl,4-CN), (3-CN,4-Cl) foram

preparados e sua relação estrutura-atividade para o receptor CXCR2 foi avaliada. Assim foi identificado outro potente e altamente seletivo antagonista do receptor CXCR2, que apresentou ação *in vitro* contra neutrófilos humanos e *in vivo* nos modelos envolvendo orelhas de coelhos (Figura 22) (WIDDOWSON et al., 2004).

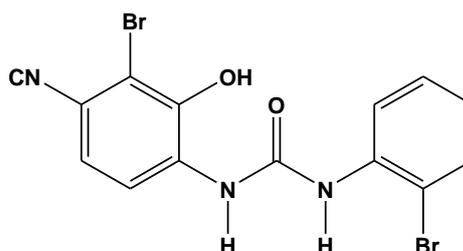


Figura 22 Estrutura de um novo antagonista seletivo do receptor CXCR2.

Um grupo de pesquisadores da indústria farmacêutica GlaxoSmithKline (JIN ET AL., 2004) sintetizaram outra série de N,N'-diariluréias (Figura 23) contendo um grupo sulfonamida na posição 3, para aumentar a sua biodisponibilidade oral e estes compostos foram avaliados frente sua afinidade pelo receptor de CXCR2.

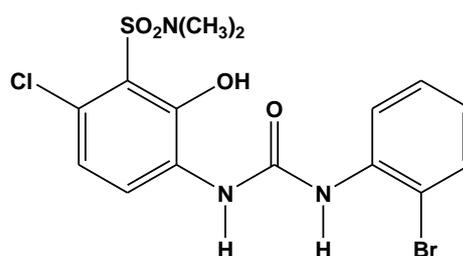


Figura 23 Estrutura de outro novo antagonista seletivo do receptor CXCR2.

Em um trabalho recente (KHLEBNIKOV et al., 2006), avaliou quatro categorias de compostos: N,N'-difeniluréias, nicotinamida N-óxidos, quinoxalinas e

tiotriazóis, usando QSAR-3D procurando relacioná-los como possíveis antagonistas do receptor CXCR2.

Outras estruturas como as N,N'-diarilsquaramidas foram sintetizadas e avaliadas como antagonistas do receptor CXCR2, também foram preparadas várias N,N'-diariluréias contendo substituintes sulfonamidas (MCCLELAND et al., 2007).

Estes trabalhos exemplificam a grande importância da crescente busca por novos antagonistas seletivos para o receptor CXCR1 e CXCR2, pois isto pode ser uma boa estratégia de terapia para o tratamento de várias doenças inflamatórias.

2.4 Alguns exemplos do uso de N,N'- diarilureias na pesquisa para o tratamento de doenças.

A uréia e seus derivados substituídos foram estudados na síntese do Germanin em 1916, (Suramin/Bayer, Figura 24), fármaco usado para combater a doença de chagas (KUTEPOV, 1962).

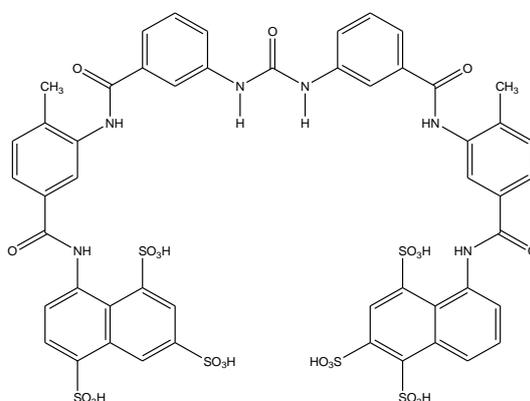
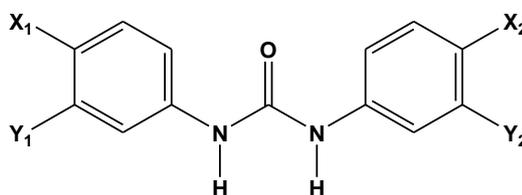


Figura 24 Estrutura do Germanin

Diversas empresas depositaram recentemente pedidos de patente envolvendo a síntese de N,N'-diariluréias para o tratamento de doenças como: artrite reumatóide, lúpus eritematoso, doenças inflamatórias intestinais, inflamações pulmonares, arterosclerose e câncer. Abaixo apresentamos alguns exemplos:

Em 2001 a empresa SMITHKLINE BEECHAM depositou um pedido de patente com o título: Antagonistas do receptor de interleucina-8 (IL-8) (WIDDOWSON, 2001 - US Pat. 6,262,113).

Em 2003 a empresa TELIK, INC solicitou um pedido de patente (Figura 25) com o título: Diariluréias substituídas como estimulante ou mediador de apoptose, para o tratamento de doenças auto-imunes, doenças infecciosas ou malignas (ROBINSON et al., 2003, WO02/076930).



X_1 e X_2 podem ser independentemente -F, -Cl, -Br ou $-SO_2R$.
 Y_1 e Y_2 podem ser independentemente -CN, $-NO_2$, -COR, $-CONR_1R_2$, $-SOR_1$ ou $-SOR_1R_2$.

Figura 25 Estrutura química dos compostos patenteados

Alguns derivados de N,N'-diariluréias foram patenteados em 2004 pela GLAXOSMITHKLINE com o título: Derivados de uréia apresentam atividade antagonista para receptores vanilóides (TRPV1), dentre eles o SB453533 (Figura 26) (RAMI et al., 2004).

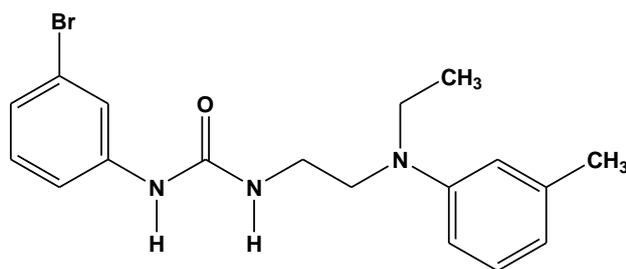


Figura 26 Estrutura química de um antagonista do receptor vanilóide SB452533.

O Em junho de 2006 foi solicitado um depósito de patente dos laboratórios ABBOTT (Figura 27), requerendo o uso de diariluréias como inibidor de proteínas quinases (GAOQUAN, 2006, US Pat. 7,056,925). Cujos derivados baseiam-se na estrutura abaixo:

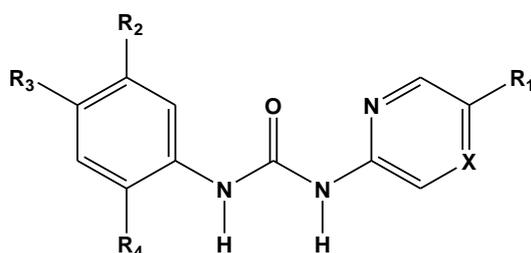


Figura 27 Estrutura química de inibidores da proteína quinase.

Pesquisadores alemães depositaram uma patente em 2006 com o título: Derivados de uréia e seu uso como inibidor de tirosina quinase, especialmente quinases envolvidas no tratamento de tumores (Figura 28).

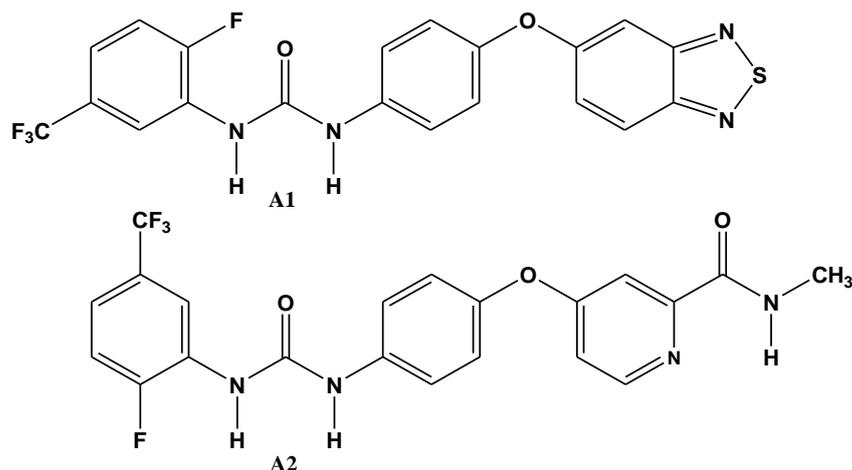


Figura 28 Exemplos dos compostos patenteados.

Em um trabalho de 2007 a empresa BAYER HEALTHCARE registrou uma patente mundial com a seguinte denominação: Diaril uréias para o tratamento de hipertensão pulmonar (SANDNER, 2007, WO2007/054216). Esta mesma substância (Figura 29) foi patenteada em 2007 pela BAYER HEALTHCARE para o tratamento de diabetes neuropática (WEBER, 2007, WO2007/054303).

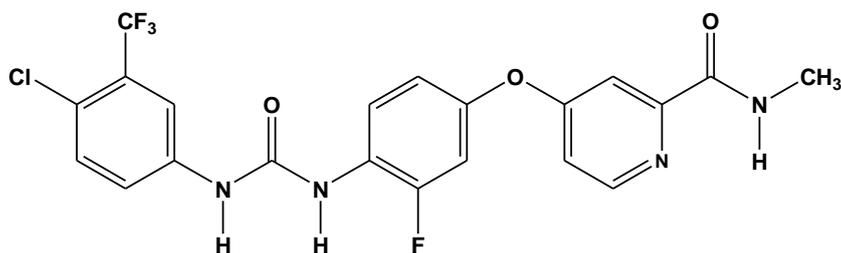


Figura 29 Estrutura química do composto patenteados

A empresa KALYPSYS INC depositou um pedido de patente (Figura 30), com o título: Tiazoluréias substituídas e seu uso como inibidor de proteínas quinases para tratamento de doenças como o câncer (HERBERT, 2007, WO2007/076460).

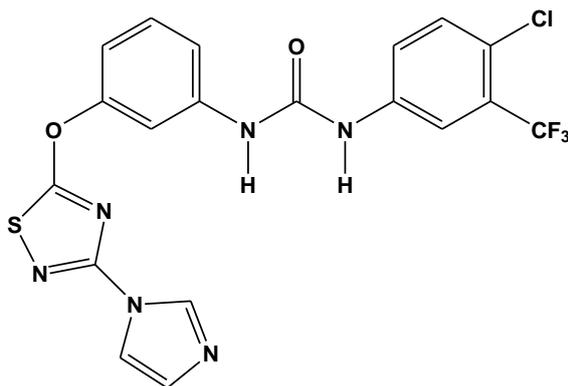


Figura 30 Estrutura química do composto patenteado.

Um importante exemplo de um medicamento produzido contra o câncer de fígado surgiu em 2007, o Nexavar/Sorafenib tosilato (Figura 31) (Bayer HealthCare, AG), utilizado no tratamento carcinoma hepatocelular, carcinoma de células renais avançado (um tipo de câncer dos rins que afeta as células dos túbulos renais), (WILHEM, 2007, WO 2007053573).

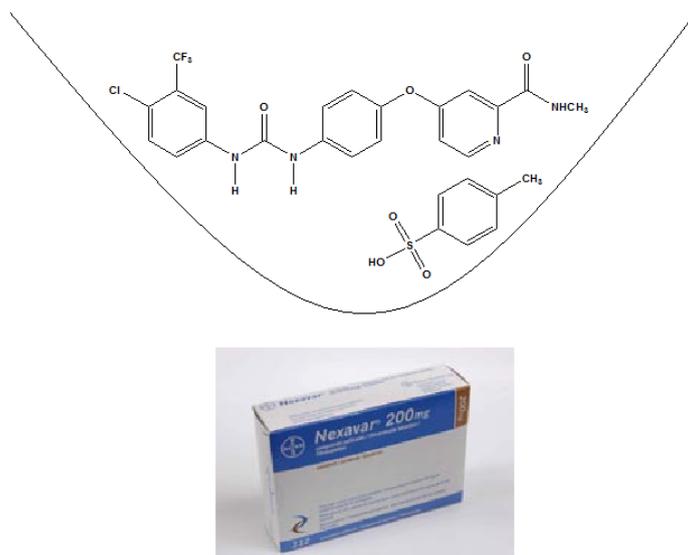


Figura 31 Estrutura química do Tosilato de Sorafenib utilizado para o tratamento de carcinoma de células renais pela Bayer com o nome comercial Nexavar.

Estes são alguns exemplos e demonstram a grande importância e relevância do estudo de compostos baseados em N,N'-diariluréias para o tratamento de diversos tipos de doenças.

2.5 Métodos de obtenção de N,N'-diariluréias

Síntese e decomposição de N,N'-diariluréia, reação de fosgenação de aminas aromáticas

As primeiras sínteses de N,N'-difeniluréias (Figura 32) foram realizadas por A. Hofmann (KUTEPOV, 1962), passando cloreto de carbonila (fosgênio) em uma

solução aquosa saturada de anilina, liberando ácido clorídrico (HCl). Este método é empregado para obtenção de N,N'-diariluréias simétricas.

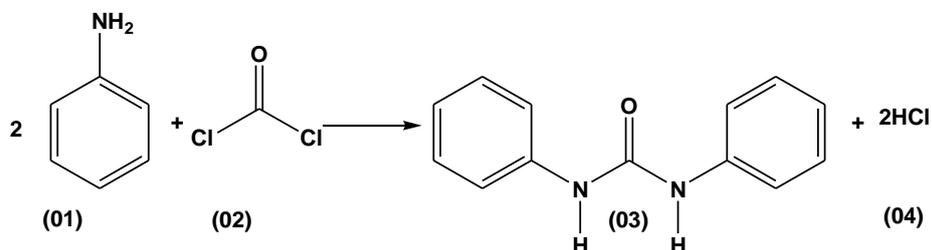


Figura 32 Esquema da síntese de A. Hofmann

Por destilação sobre pentóxido de fósforo (P₂O₅), ocorre a decomposição da N,N'-difeniluréia em anilina e isocianato de fenila (Figura 33) (KUTEPOV, 1962).

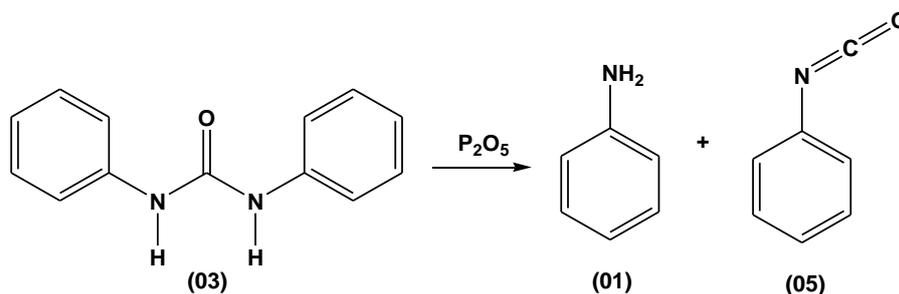


Figura 33 Esquema da decomposição da N,N'-difeniluréia sob pentóxido de fósforo.

2.6 Síntese de N,N'-diariluréias via reação de isocianato de fenila com aminas aromáticas

O isocianato de fenila reage com anilina formando a N,N'-difeniluréia simétrica (Figura 34) (KUTEPOV, 1962).

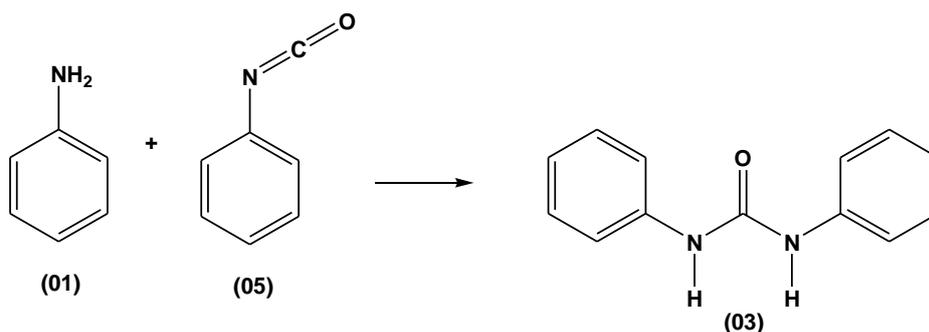


Figura 34 Esquema da síntese da N,N'-difeniluréia via anilina e isocianato de fenila.

Os isocianatos aromáticos são extremamente reativos e podem ser formados pela reação de fosgênio com aminas aromáticas (KUTEPOV, 1962).

As N,N'-difeniluréias são hidrolisadas sob condições relativamente severas, por exemplo, em soluções ácidas à quente. O grau de hidrólise aumenta com o aumento da concentração do ácido e da temperatura. Em condições básicas ocorre de forma semelhante (KUTEPOV, 1962).

2.7 Síntese de N,N'-diariluréias simétricas via reação de anilina com uréia.

Metodologia apresentada por (DAVIS e BLANCHARD, 1923), Figura 35.

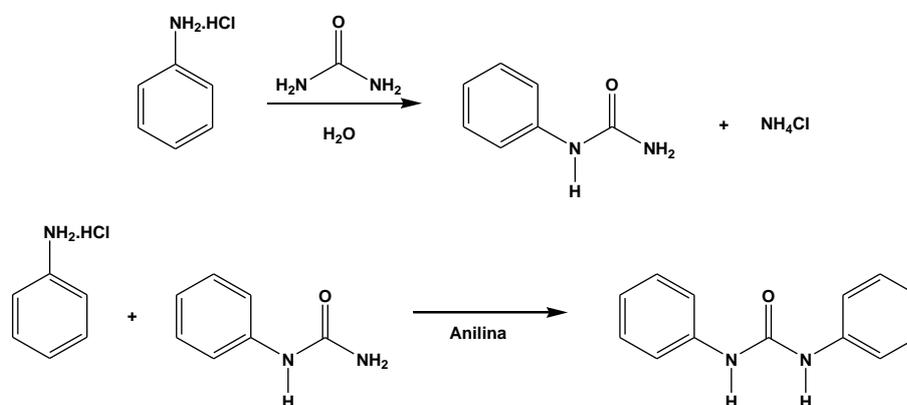


Figura 35 Síntese de N,N'-difeniluréias simétricas.

A reação pode ser explicada pela formação de uma mistura em equilíbrio de cianato de amônio e uréia na solução em ebulição; o cianato do amônio reage com o cloridrato de anilina, fornecendo a feniluréia. A feniluréia reage na segunda etapa, envolvendo a formação intermediária de isocianato de fenila, que reage com o cloridrato da anilina, fornecendo à carbanilida ou N,N'-difeniluréia.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Frente às atuais necessidades para obtenção de novos fármacos mais potentes e seletivos contra a dor e inflamação, optou-se em sintetizar o SB225002 (antagonista seletivo do receptor transmembrana CXCR2 em neutrófilos), para verificar sua habilidade frente a diferentes modelos de hipernocicepção (inflamatória, neuropática e química) e na colite induzida pelo ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em camundongos. Usar os parâmetros obtidos para o SB225002 para comparar sua ação frente aos 33 compostos análogos sintéticos propostos neste trabalho, visando conhecer os mecanismos pelos quais os processos inflamatórios se desenvolvem e relacionar as estruturas químicas sintetizadas com atividade biológica.

3.2 Os objetivos específicos do presente trabalho são:

- ✓ Sintetizar, purificar e caracterizar o SB225002 (N-(2-Hidroxi-4-nitrofenila)-N'-(2-bromofenila)-uréia);
- ✓ Avaliar o SB225002 frente aos diferentes modelos de hipernocicepção tais como: inflamatória, neuropática e química;
- ✓ Determinar a curva dose-resposta do SB225002 para obter o valor da DI_{50} ;

- ✓ Preparar sinteticamente, purificar e caracterizar 33 N,N'-diariluréias análogas ao SB225002 utilizando o método manual de TOPLISS dentre outras ferramentas utilizadas em química medicinal.
- ✓ Avaliar e comparar os 33 novos análogos sintéticos com os dados obtidos nos experimentos anteriores realizados para o SB225002 e determinar a ordem de potência dos análogos mais ativos frente ao modelo de hipernocicepção induzido pela carragenina.
- ✓ Determinar a curva dose-resposta para os compostos que apresentarem melhor atividade, obtendo o valor da DI_{50} dos mesmos;
- ✓ Investigar as ações do antagonista seletivo do receptor CXCR2, SB225002, sobre alguns parâmetros inflamatórios no modelo experimental de colite induzida por TNBS em camundongos.

4.0 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais e métodos: Síntes dos compostos análogos.

4.1.1 Reagentes e instrumentação

Para a realização deste trabalho utilizou-se reagentes e solventes grau P.A. ou purificados quando necessário segundo métodos da literatura (ARMAREGO e PERRIN, 1996). As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD), onde foram utilizadas cromatoplasacas Merck de alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄, com espessura 0,2 mm, utilizando o sistema de solventes hexano/acetato de etila (50:50).

Os compostos que apresentaram impurezas foram recristalizados em etanol ou cromatografados em coluna, utilizando-se sílica gel Merck 230-400 mesh e como solvente um gradiente hexano-acetato (0-100%)

Para a determinação do ponto de fusão (P.f.°C) utilizou-se um aparelho Microquímica modelo MQRPF-301 e os valores não foram corrigidos.

Para secagem dos compostos sintéticos, utilizou-se um forno de secagem sob vácuo marca Buchi, modelo TO-51.

As análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H-RMN) foram realizadas em um espectrômetro Bruker 400MHz, usando solventes deuterados como DMSO-d₆, adquiridos da empresa Tedia Brazil e tetrametilsilano (TMS) como

padrão interno. Os deslocamentos químicos foram expressos em valores adimensionais δ (ppm) em relação a um padrão interno de tetrametilsilano (TMS).

Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro da Perkin Elmer FT16 PC e as substâncias foram incorporadas em pastilhas de brometo de potássio, sendo que as absorções foram registradas em escala de cm^{-1} .

O espectro de massas do SB225002 foi obtido em um espectrômetro de massas "Ion Trap" 500-MS – Varian, por infusão direta via seringa (fluxo 10 $\mu\text{L}/\text{min}$), via "probe eletrospray" (ESI) no modo full scan negativo.

4.2 Síntese das N,N'-diariluréias substituídas

As N,N'-diariluréias foram sintetizadas em uma única etapa pela reação de uma anilina mono, di-substituída com isocianato de naftila, isocianato 2-bromofenila ou isocianato de 3,4-diclorofenila em dioxano a temperatura ambiente por 24 horas.

4.2.1 Síntese do SB225002 1-(2-Hidroxi-4-nitrofenila)-3-(2-bromofenila)-uréia.

A metodologia proposta por (WHITE, 1998), onde procedimento experimental envolvia aquecimento da mistura de 2-bromofenilisocianato e 2-hidroxi-4-nitroanilina em dimetilformamida a 80°C por 16 horas, não foi eficiente pois o rendimento foi menor que o citado (47%) e o processo de purificação mais complexo, não obtendo

um composto com pureza elevada. Após realizar alguns testes optamos em modificar a metodologia proposta por uma alternativa descrita na Figura 36.

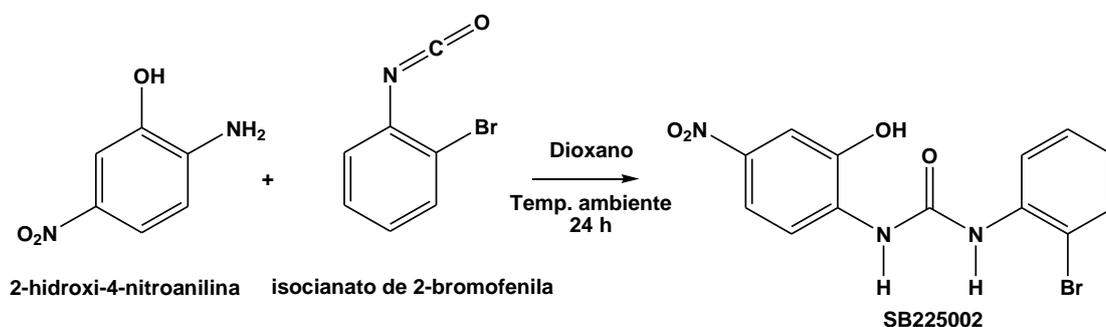


Figura 36 Esquema da síntese do SB225002.

Uma solução de 2-hidroxi-4-nitroanilina (500mg - 3,24 mmol) em dioxano (10 mL) foi tratada com isocianato de 2-bromofenila (641mg - 3,24 mmol) sob agitação por 24 horas, a temperatura ambiente com tubo secante contendo cloreto de cálcio. O produto da reação foi vertido em água, o precipitado formado foi filtrado e lavado com solução de ácido clorídrico diluída (0,1 N) e posteriormente lavado com água destilada. O sólido obtido foi seco a 60°C em forno sob vácuo. O produto bruto foi recristalizado em etanol, obtendo-se 0.798g. O produto, foi analisado por cromatografia em camada delgada (CCD), eluente 50:50 (hexano:acetato de etila) em câmara com lâmpada UV_{256,360}. (Adaptado de WHITE, 1998).

Dados espectroscópicos

$C_{13}H_{10}BrN_3O_4$: 352,14 g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6 , 400 MHz, TMS) δ ppm: 11,05 (br. s, 1H, OH), 9,48 (s, 1H, NH), 9,12 (s, 1H, NH), 8,36 (d, 1H, Ar-H, J= 9Hz), 7,93 (d, 1H, Ar-H, J=8,2 Hz), 7,75 (dd,

¹H, Ar-H, J=9,3 Hz), 7,69 (s, 1H, Ar-H), 7,63 (d, 1H, Ar-H, J=8,2 Hz), 7,36 (t, 1H, Ar-H), 7,03 (t, 1H, Ar-H).

IR (λ ; cm^{-1}): 3364, 3212 (NH), 1692 (C=O), 1588, 1536, 1507, 1430, 1306, 1267, 1212, 1086, 746, 649.

P.f.: 193-194°C, lit.193-195 °C, (WHITE, 1998).

Rf.: 0,74 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 70%.

CLogP: 2,99. (CHEMDRAW[®] ULTRA – Cambridgesoft 1985-2003).

Solubilidade: DMSO 200 mg/mL.

ESI-IT-MS full scan modo negativo (m/z): $[\text{M-H}]^- = 350$.

4.2.2 Síntese do composto 1-(2-hidroxi-4-nitrofenila)-3-(1-naftaleno-)-uréia (A00)

Uma solução de 4-nitroanilina 0,5g (3,24 mmol) em dioxano (10 mL) foi tratada com 2-bromofenila isocianato (0,641g – 3,24 mmol) por 24 horas sob agitação a temperatura ambiente sob tubo secante de CaCl_2 (Figura 37). O produto da reação foi vertido em água, onde o precipitado formado foi filtrado e lavado com solução de ácido clorídrico diluído (0,1 N), e posteriormente lavado com água destilada. O sólido obtido foi seco a 60°C em forno sob vácuo. O produto bruto foi recristalizado e/ou lavado com etanol. O produto foi analisado por cromatografia em camada delgada (CCD), eluente 50:50 (hexano:acetato de etila) em câmara com lâmpada UV_{256,360}.

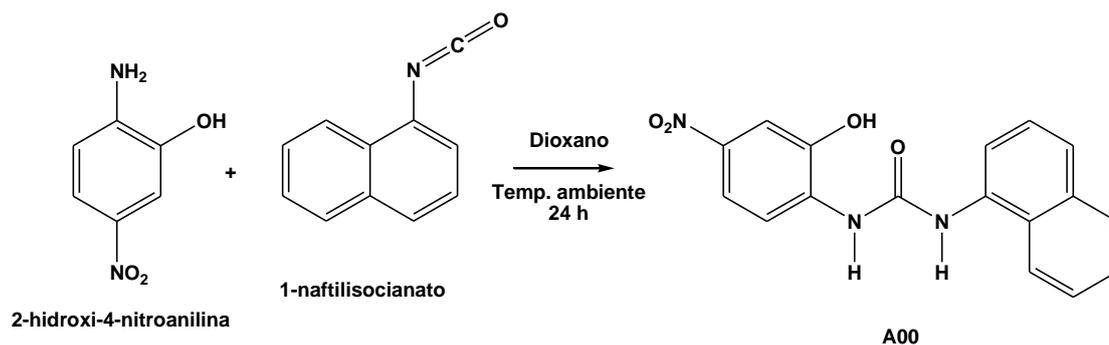


Figura 37 Esquema da síntese do análogo A00.

Dados espectroscópicos

$C_{17}H_{13}N_3O_4$: 323,3g/Mol.

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 11,15 (br. s, 1H, OH), 9,57 (s, 1H, NH), 9,31 (s, 1H, NH), 8,43 (d, 1H, Ar-H), 8,4 (d, 1H, Ar-H), 8,2 (d, 1H, Ar-H), 8,03 (s, 1H, Ar-H), 7,92 (d, 1H, Ar-H), 7,76 (t, 1H, Ar-H), 7,69 (t, 1H, Ar-H), 7,65 (m, 2H, Ar-H) e 7,48(t, 1H, Ar-H).

IR (λ ; cm^{-1}): 3368, 3278 (NH), 1642, 1551 (C=O), 1497, 1343, 1214, 752.

P.f.: 221,4-222,7°C.

Rf.: 0,62 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 70%.

CLogP: 3,22.

4.2.3 Síntese do composto 1-(1-naftaleno)-3-(5-nitro-2-piridina)-uréia (A01).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 2-aminopiridina com 1-naftilisocianato (Figura 38).

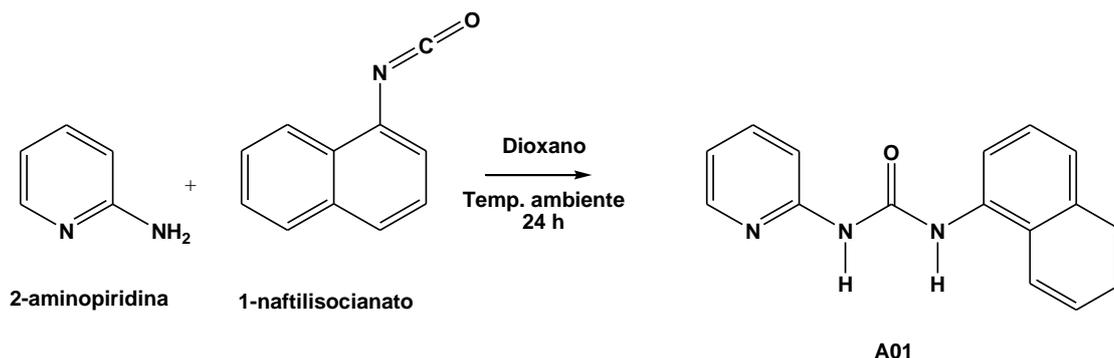


Figura 38 Esquema da síntese do análogo A01.

Dados espectroscópicos

$C_{16}H_{13}N_3O$: 263,29g/Mol.

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 11,41 (br. s, 1H, NH), 9,88 (s, 1H, NH), 8,40 (s, 1H, Ar-H), 8,17 (d, 2H, Ar-H), 7,94 (d, 1H, Ar-H), 7,78 (dd, 1H, Ar-H), 7,64 (m, 4H, Ar-H), 7,04 (t, 1H, Ar-H).

IR (λ ; cm^{-1}): 3209 (NH), 3006, 1702 (C=O), 1576, 1475, 1409, 1300, 1237, 761.

P.f.: 195,4-195,8°C.

Rf.: 0,62 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 67%.

CLogP: 2,89.

4.2.4 Preparação do composto 1-(1-naftaleno)-3-(2-tiazol)-uréia (A02).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 2-aminotiazol com 1-naftilisocianato (Figura 39).

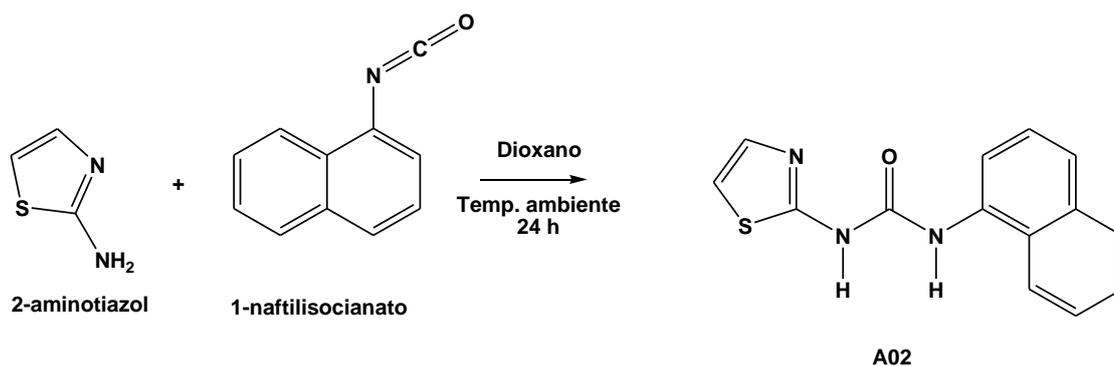


Figura 39 Esquema da síntese do análogo A02.

Dados espectroscópicos.

$C_{14}H_{11}N_3OS$: 269,32 g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 10,84 (s, 1H, NH), 9,15 (s, 1H, NH), 8,06 (s, 1H, Ar-H), 8,04 (d, 1H Ar-H), 8,01 (d, 1H, Ar-H), 7,80 (dd, 2H, Ar-H), 7,59 (s, 1H, Ar-H), 7,51 (d, 1H, Ar-H), 7,41 (d, 1H, CH=CH), 7,13 (d, 1H, CH=CH).

IR (λ ; cm^{-1}): 3329 (NH), 1718 (C=O), 1550, 1399, 1250, 1190, 783.

P.f.: 252,9-254,7°C.

Rf.: 0,54 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 71%.

CLogP: 3,23.

4.2.5 Preparação do composto 1-(1-naftaleno)-3-(4-nitrofenil)-uréia (A03).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 4-nitroanilina com 1-naftilisocianato (Figura 40).

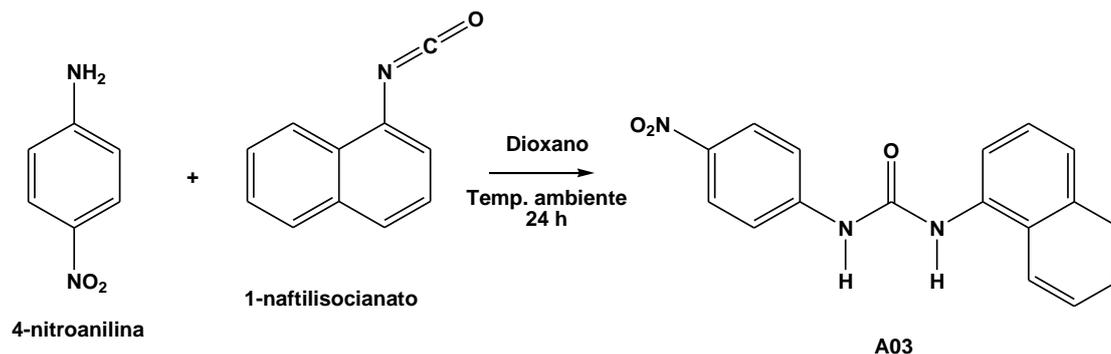


Figura 40 Esquema da síntese do análogo A03.

Dados espectroscópicos.

$C_{17}H_{13}N_3O_3$: 307,3g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 9,70 (s, 1H, NH), 8,95 (s, 1H, NH), 8,21 (d, 2H, Ar-H), 8,07 (d, 2H, Ar-H), 7,93 (d, 2H, Ar-H), 7,63 (m, 3H, Ar-H), 7,54 (m, 2H, Ar-H).

IR (λ ; cm^{-1}): 3277 (NH), 3052, 1631 (C=O), 1555, 1338, 1248, 778.

P.f.: 288,6-289,7°C.

Rf.: 0,72 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 75%.

CLogP: 3,61.

4.2.6 Preparação do composto 1-(4-bromofenila)-3-(1-naftaleno)-uréia (A04).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 4-bromoanilina com 1-naftilisocianato (Figura 41).

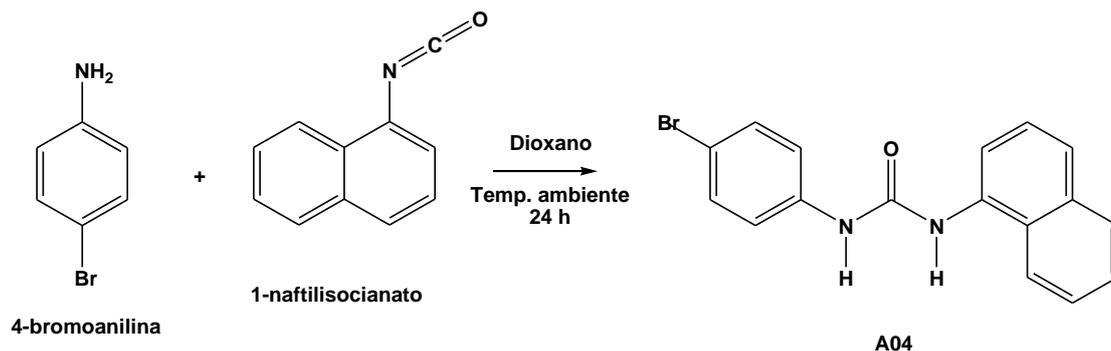


Figura 41 Esquema da síntese do análogo A04.

Dados espectroscópicos.

$C_{17}H_{13}BrN_2O$: 341,2g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 9,17 (s, 1H, NH), 8,78 (s, 1H, NH), 8,08 (d, 1H, Ar-H), 7,93 (d, 1H, Ar-H), 7,91 (d, 1H, Ar-H), 7,63 (dd, 2H, Ar-H), 7,56 (m, 4H, Ar-H), 7,52 (d, 2H, Ar-H).

IR (λ ; cm^{-1}): 3281 (NH), 1638 (C=O), 1592, 1557, 1490, 1394, 1246, 787, 682.

P.f.: 269-269,5°C.

Rf.: 0,88 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 62%.

CLogP: 4,34.

4.2.7 Preparação do composto 1-(3,4-diclorofenila)-3-(1-naftaleno)-uréia (A05).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 3,4-dicloroanilina com 1-naftilisocianato (Figura 42).

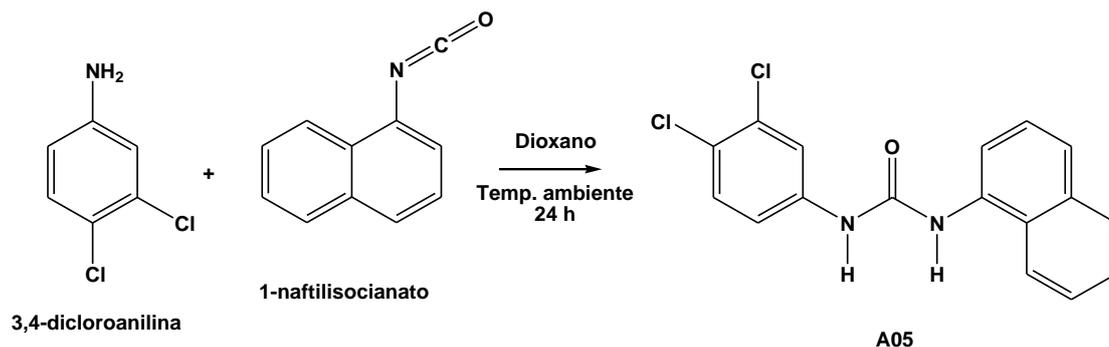


Figura 42 Esquema da síntese do análogo A05.

Dados espectroscópicos.

$C_{17}H_{12}Cl_2N_2O$: 331,2g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 9,31 (s, 1H, NH), 8,85 (s, 1H, NH), 8,12 (s, 1H, Ar-H), 7,93 (d, 1H, Ar-H), 7,91 (d, 1H, Ar-H), 7,65 (s, 1H, Ar-H), 7,52 (m, 4H, Ar-H), 7,46 (t, 1H, Ar-H), 7,34 (t, 1H, Ar-H).

IR (λ ; cm^{-1}): 3273 (NH), 3056, 1631 (C=O), 1581, 1469, 1388, 1264, 774, 680.

P.f.: 243,8-244,2°C.

Rf.: 0,86 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 83%.

CLogP: 4,63.

4.2.8 Preparação do composto 1-(4-clorofenila)-3-(1-naftaleno)-uréia (A06).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 4-dicloroanilina com 1-naftilisocianato (Figura 43).

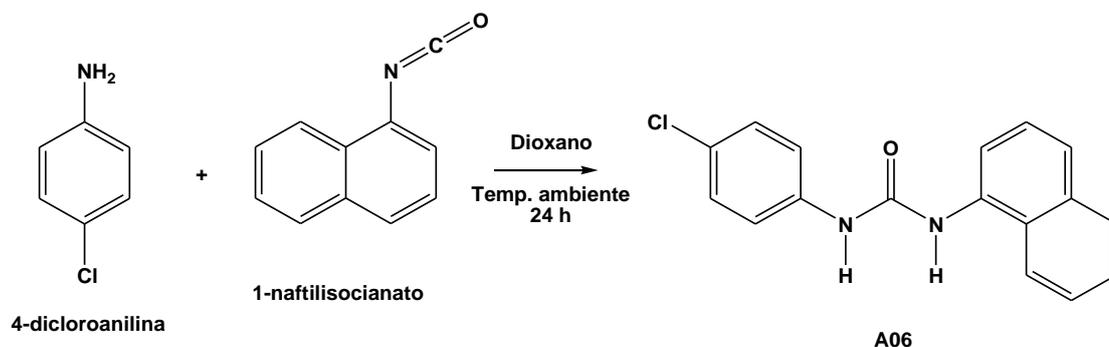


Figura 43 Esquema da síntese do análogo A06.

Dados espectroscópicos.

$C_{17}H_{13}ClN_2O$: 296,75 g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 9,16 (s, 1H, NH), 8,78 (s, 1H, NH), 8,09 (s, 1H, Ar-H), 7,93 (d, 2H, Ar-H), 7,63 (d, 2H, Ar-H), 7,54 (dd, 2H, Ar-H), 7,51 (dd, 2H, Ar-H), 7,35 (dd, 2H, Ar-H).

IR (λ ; cm^{-1}): 3279 (NH), 3051, 1638 (C=O), 1593, 1555, 1486, 1393, 1243, 1089, 786, 763, 675.

P.f.: 258,1-261,7°C.

Rf.: 0,86 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 81%.

CLogP: 4,07.

4.2.9 Preparação do composto -(1-naftaleno)-3-(2-pirazina)-uréia (A07).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 2-aminopirazina com 1-naftilisocianato (Figura 44).

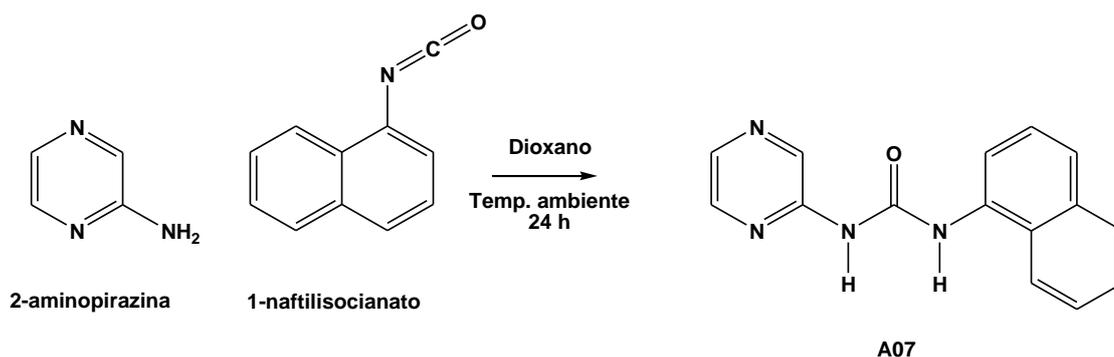


Figura 44 Esquema da síntese do análogo A07.

Dados espectroscópicos.

$C_{15}H_{12}N_4O$: 264,28 g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 9,17 (s, 1H, NH), 9,0 (s, 1H, Ar-H), 8,37 (d, 1H, Ar-H), 8,27 (d, 1H, Ar-H), 8,22 (d, 1H, Ar-H), 8,07 (s, 1H, Ar-H), 7,93 (dd, 2H, Ar-H), 7,60 (m, 4H, Ar-H).

IR (λ ; cm^{-1}): 3275 (NH), 3042, 1704 (C=O), 1630, 1558, 1504, 1398, 1292, 1239, 780, 681.

P.f.: 288-289,3°C.

Rf.: 0,46 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 58%.

CLogP: 1,55.

4.2.10 Preparação do composto -(1-naftaleno)-3-fenetiluréia (A08).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 2-fenetilamina com 1-naftilisocianato (Figura 45).

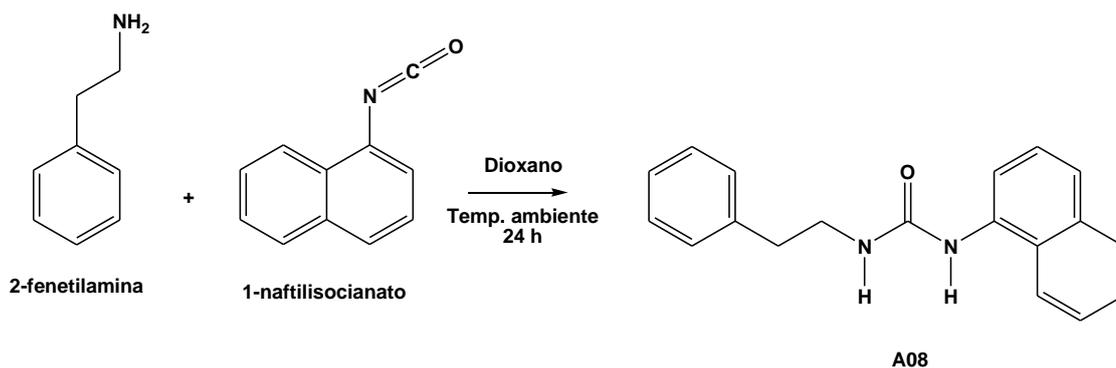


Figura 45 Esquema da síntese do análogo A08.

Dados espectroscópicos.

C₁₉H₁₈N₂O: 290,36 g/Mol

RMN ¹H (DMSO-d₆), 400 MHz, TMS) δ ppm: 8,52 (s, 1H, NH), 8,03 (d, 1H, Ar-H), 7,97 (s, 1H, Ar-H), 7,87 (d, 1H, Ar-H), 7,55 (d, 1H, Ar-H), 7,51 (dd, 1H, Ar-H), 7,49 (d, 1H, Ar-H), 7,40 (t, 1H, Ar-H), 7,30 (d, 2H, Ar-H), 7,26 (d, 2H, Ar-H), 7,21 (t, 1H, Ar-H), 6,55 (s, 1H, NH), 3,4 (t, 2H, CH₂), 2,78 (t, 2H, CH₂).

IR (λ; cm⁻¹): 3323, 3282 (NH), 1626 (C=O), 1559, 1241, 1082, 788, 761, 694, 668.

P.f.: 211,3-212,2°C.

Rf.: 0,68 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 64%.

CLogP: 3,86.

4.2.11 Preparação do composto 1-(2-(1,3-benzodioxol-6-etil)-3-(1-naftaleno)-uréia (A09).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 3,4-metilenodioxil-1-fenilamina com 1-naftilisocianato (Figura 46).

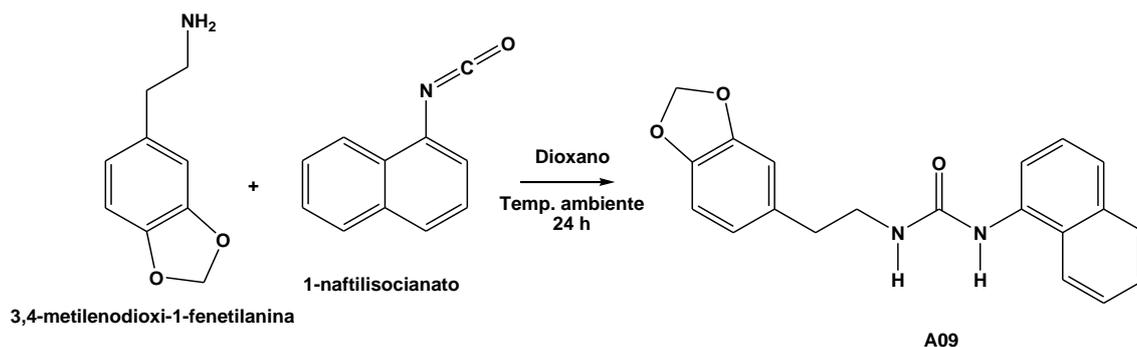


Figura 46 Esquema da síntese do análogo A09.

Dados espectroscópicos.

$C_{20}H_{18}N_2O_3$: 334,37 g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 8,56 (s, 1H, NH), 8,06 (d, 1H, Ar-H), 7,93 (d, 1H, Ar-H), 7,85 (d, 1H, Ar-H), 7,51 (m, 4H, Ar-H), 7,3 (t, 1H, Ar-H), 6,9 (s, 1H, Ar-H), 6,88 (s, 1H, Ar-H), 6,82 (s, 1H, NH), 5,94 (s, 2H, ROCH₂OR), 4,23 (t, 2H, CH₂), 3,52 (t, 2H, CH₂).

IR (λ ; cm^{-1}): 3286 (NH), 1627 (C=O), 1566, 1496, 1248, 1038, 782, 675.

P.f.: 236,1-236,6°C.

Rf.: 0,62 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 71%.

CLogP: 3,64.

4.2.12 Preparação do composto 1-(4-metoxifenetila)-3-(1-naftaleno)-uréia (A10).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 4-metoxifenetilamina com 1-naftilisocianato (Figura 47).

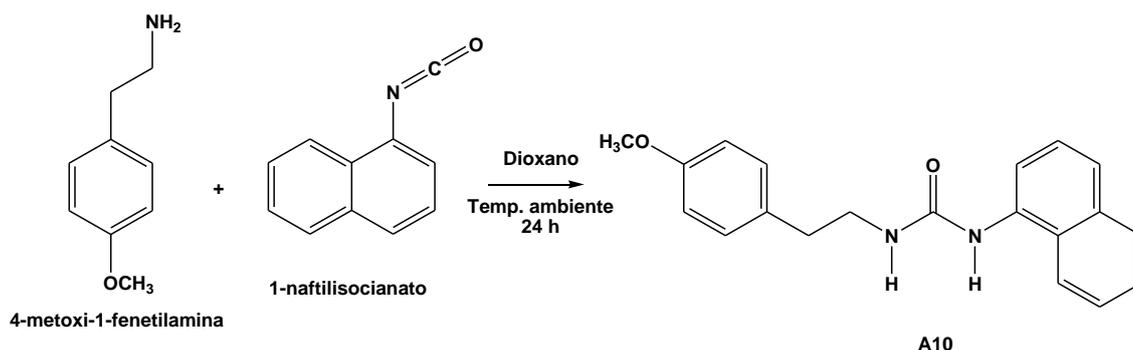


Figura 47 Esquema da síntese do análogo A10.

Dados espectroscópicos.

$C_{20}H_{20}N_2O_2$: 320,38 g/Mol

RMN ¹H (DMSO-d₆), 400 MHz, TMS) δ ppm: 8,45 (s, 1H, NH), 8,02 (d, 1H, Ar-H), 7,9 (d, 1H, Ar-H), 7,85 (d, 1H, Ar-H), 7,51 (m, 3H, Ar-H), 7,4 (t, 1H, Ar-H), 7,16 (d, 2H, Ar-H), 6,87 (d, 2H, Ar-H), 6,45 (s, 1H, NH), 3,7 (s, 3H, OCH₃), 3,26 (t, 2H, CH₂), 2,7 (t, 2H, CH₂).

IR (λ; cm⁻¹): 3300 (NH), 2864, 1630 (C=O), 1575, 1515, 1242, 1029, 783, 660.

P.f.: 209,7-210,2°C.

Rf.: 0,54 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 66%.

CLogP: 3,73.

4.2.13 Preparação do composto 1-(3,4-diclorobenzila)-3-(1-naftaleno)-uréia (A11).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 3,4-diclorofenilmetanamina com 1-naftilisocianato (Figura 48).

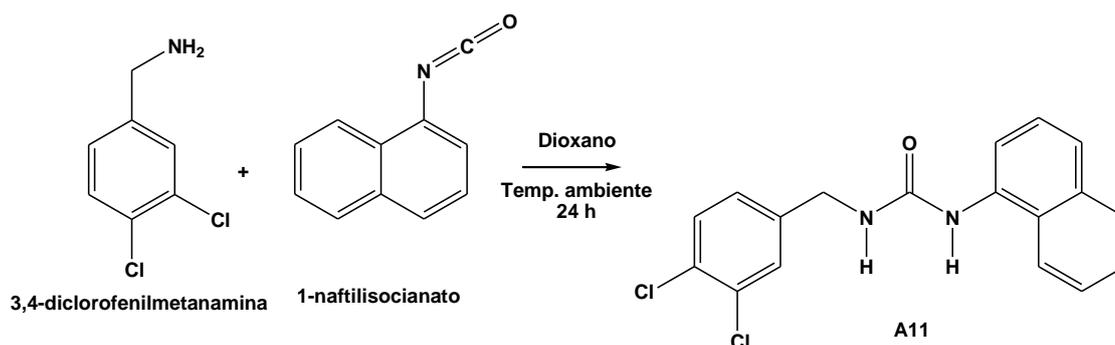


Figura 48 Esquema da síntese do análogo A11.

Dados espectroscópicos.

$C_{18}H_{14}Cl_2N_2O$: 345,22 g/Mol

RMN ¹H (DMSO-d₆), 400 MHz, TMS) δ ppm: 8,65 (s, 1H, NH), 8,04 (d, 1H, Ar-H), 7,9 (dd, 1H, Ar-H), 7,87 (dd, 1H, Ar-H), 7,58 (dd, 1H, Ar-H), 7,56 (dd, 1H, Ar-H), 7,52 (dd, 1H, Ar-H), 7,50 (dd, 1H, Ar-H), 7,41 (dd, 1H, Ar-H), 7,38 (dd, 1H, Ar-H), 7,31 (d, 1H, Ar-H), 7,07 (t, 1H, NH), 4,32 (d, 2H, CH₂).

IR (λ; cm⁻¹): 3306 (NH), 1625 (C=O), 1579, 1386, 1250, 1029, 786, 677.

P.f.: 231,2-232,4°C.

Rf.: 0,64 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 75%.

CLogP: 4,70.

4.2.14 Preparação do composto 1-(2-bromofenila)-3-(4-nitrofenila)-uréia (A12).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 4-nitroanilina com 2-bromofenil isocianato (Figura 49).

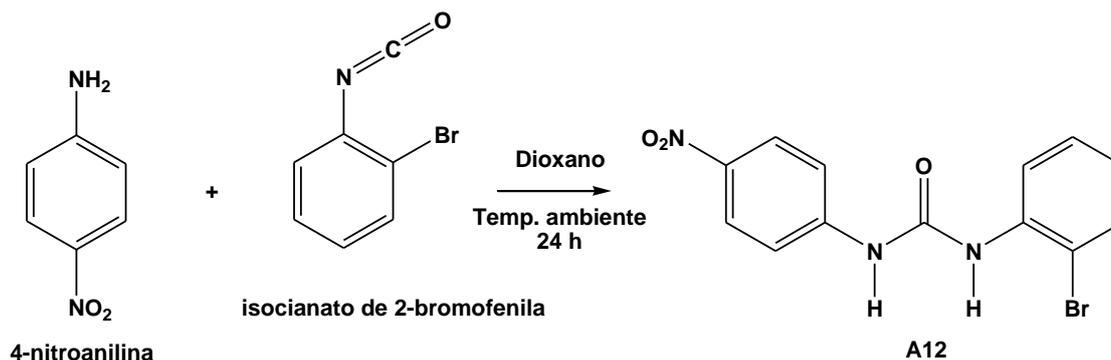


Figura 49 Esquema da síntese do análogo A12.

Dados espectroscópicos.

$C_{13}H_{10}BrN_3O_3$: 336,14 g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 9,48 (s, 1H, NH), 9,12 (s, 1H, NH), 8,36 (d, 1H, Ar-H), 7,93 (d, 1H, Ar-H), 7,75 (dd, 1H, Ar-H), 7,69 (d, 1H, Ar-H), 7,63 (d, 1H, Ar-H), 7,47 (d, 1H, ArH), 7,36 (t, 1H, Ar-H), 7,03 (t, 1H, Ar-H).

IR (λ ; cm^{-1}): 3291 (NH), 1647 (C=O), 1585, 1544, 1435, 1288, 1225, 1031, 752.

P.f.: 204,4-205,3°C.

Rf.: 0,94 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 72%.

CLogP: 3,38.

4.2.15 Preparação do composto 1-(2-bromofenila)-3-(2-hidroxifenil)uréia (A13).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 2-hidroxianilina com 2-bromofenil isocianato (Figura 50).

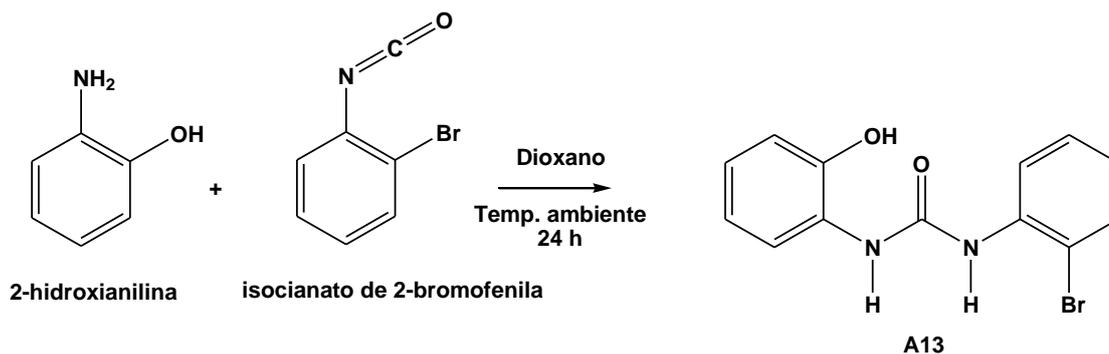


Figura 50 Esquema da síntese do análogo A13.

Dados espectroscópicos.

$C_{13}H_{11}BrN_2O_2$: 307,14 g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 9,87 (s, 1H, OH), 8,94 (s, 1H, NH), 8,79 (s, 1H, NH), 7,97 (dd, 1H, Ar-H), 7,95 (dd, 1H, Ar-H), 7,59 (d, 1H, Ar-H), 7,32 (t, 1H, Ar-H), 6,97 (t, 1H, Ar-H), 6,84 (dd, 1H, Ar-H), 6,8 (dd, 1H, Ar-H), 6,73 (t, 1H, Ar-H).

IR (λ ; cm^{-1}): 3431, 3290 (NH), 1650 (C=O), 1589, 1552, 1459, 1289, 1212, 1035, 750.

P.f.: 163,1-164,3°C.

Rf.: 0,76 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 69%.

CLogP:2,95.

4.2.16 Preparação do composto 1,3-bis-(1-naftaleno)-uréia (A14).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 1-naftilamina com 1-naftilisocianato (Figura 51).

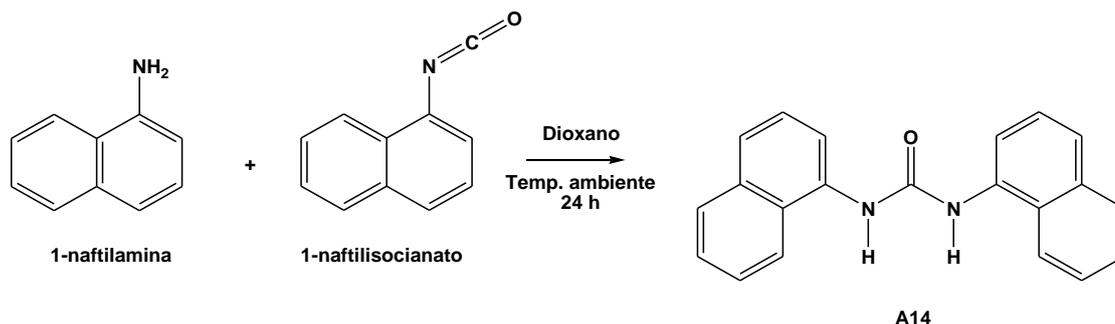


Figura 51 Esquema da síntese do análogo A14.

Dados espectroscópicos.

$C_{21}H_{16}N_2O$: 312,36 g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 9,18 (s, 2H, NH), 8,24 (d, 2H, Ar-H), 8,08 (d, 2H, Ar-H), 7,96 (d, 2H, Ar-H), 7,65 (t, 4H, Ar-H), 7,57 (t, 2H, Ar-H), 7,50 (t, 2H, Ar-H).

IR (λ ; cm^{-1}): 3278 (NH), 1628 (C=O), 1553, 1396, 1349, 1243, 1209, 779.

P.f.: 296-297°C. lit (296-296 °C), (BEAVER, 1957).

Rf.: 0,80 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 85%.

CLogP: 4,51.

4.2.17 Preparação do composto 1-(4-fluorfenila)-3-(1-naftaleno)-uréia (A15).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 4-fluoranilina com 1-naftilisocianato (Figura 52).

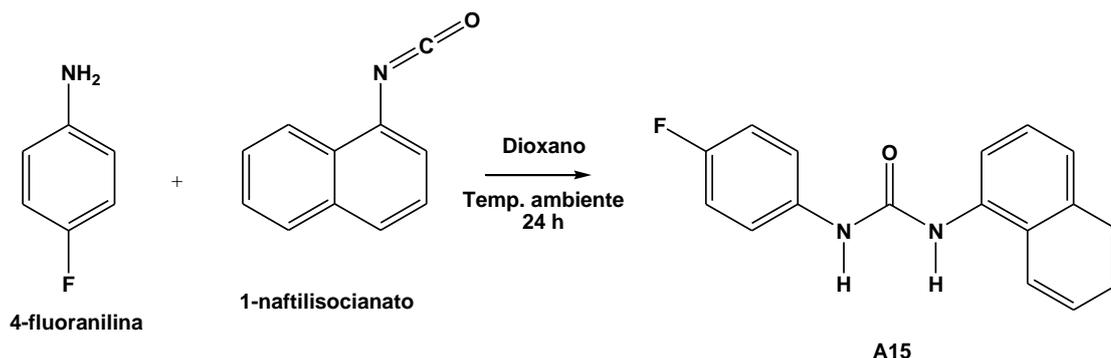


Figura 52 Esquema da síntese do análogo A15.

Dados espectroscópicos.

$C_{17}H_{13}FN_2O$: 280,3 g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 9,08 (s, 1H, NH), 8,76 (s, 1H, NH), 8,12 (s, 1H, Ar-H), 8,0 (d, 1H, Ar-H), 7,93 (d, 1H, Ar-H), 7,54 (m, 6H, Ar-H), 7,15 (s, 2H, Ar-H).

IR (λ ; cm^{-1}): 3266 (NH), 3053, 1638 (C=O), 1561, 1505, 1403, 1224, 789, 762, 675.

P.f.: 249,1-249,7°C.

Rf.: 0,80 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 61%.

CLogP: 3,67.

4.2.18 Preparação do composto 1-(2-bromofenila)-3-(1-naftaleno)-uréia (A16).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 1-naftilamina com 2-bromofenil isocianato (Figura 53).

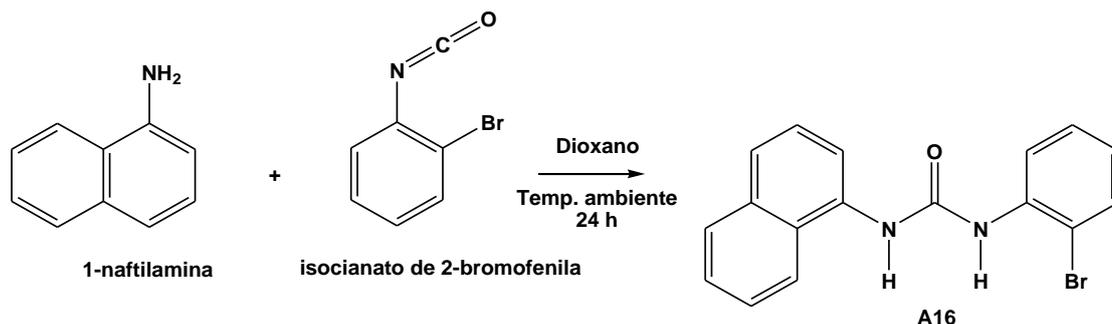


Figura 53 Esquema da síntese do análogo A16.

Dados espectroscópicos.

$C_{17}H_{13}BrN_2O$: 341,2 g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 9,46 (s, 1H, NH), 8,62 (s, 1H, NH), 8,19 (d, 1H, Ar-H), 8,08 (d, 1H, Ar-H), 7,97 (dd, 2H, Ar-H), 7,58 (m, 5H, Ar-H), 7,35 (t, 1H, Ar-H), 6,99 (t, 1H, Ar-H).

IR (λ ; cm^{-1}): 3447, 3286 (NH), 1637 (C=O), 1557, 1435, 1396, 1244, 1020, 787, 666, 560.

P.f.: 271,8-272,3°C.

Rf.: 0,88 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 72%.

CLogP: 4,34.

4.2.19 Síntese do composto 1-(2-fluorfenila)-3-(1-naftaleno)-uréia (A17).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 2-fluoranilina com 1-naftilsocianato (Figura 54).

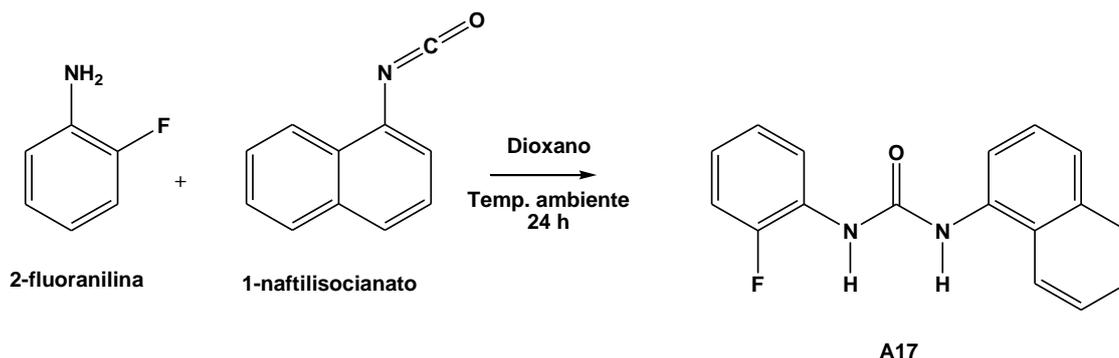


Figura 54 Esquema da síntese do análogo A17.

Dados espectroscópicos.

$C_{17}H_{13}FN_2O$: 280,3g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 9,17 (s, 1H, NH), 9,48 (s, 1H, NH), 8,24 (t, 1H, Ar-H), 8,17 (d, 1H, Ar-H), 8,06 (d, 1H, Ar-H), 7,94 (d, 1H, Ar-H), 7,59 (m, 3H, Ar-H), 7,49 (t, 1H, Ar-H), 7,28 (t, 1H, Ar-H), 7,16 (t, 1H, Ar-H), 7,02 (t, 1H, Ar-H).

IR (λ ; cm^{-1}): 3273 (NH), 3051, 1643 (C=O), 1557, 1493, 1307, 1254, 1200, 1100, 1015, 788, 752, 678.

P.f.: 241,8-242,1°C.

Rf.: 0,92 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 65%.

CLogP: 3,67.

4.2.20 Síntese do composto 1-(1-naftaleno)-3-feniluréia (A18).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se anilina com 1-naftilsocianato (Figura 55).

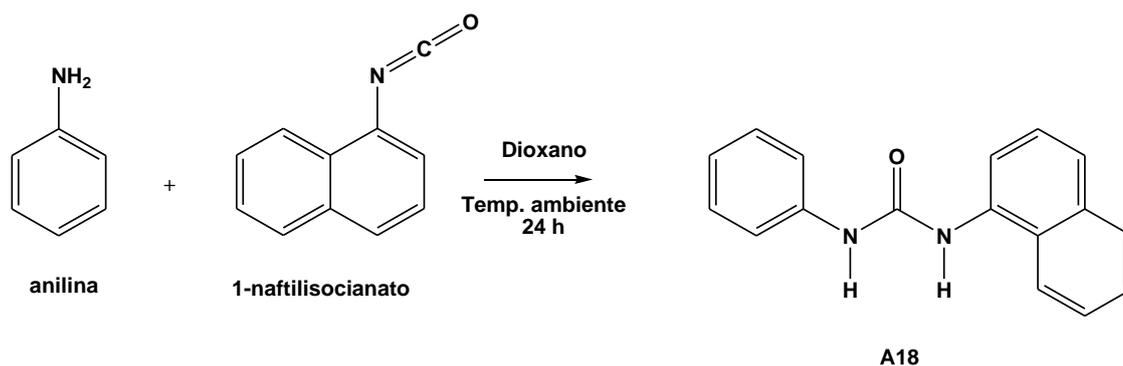


Figura 55 Esquema da síntese do análogo A18.

Dados espectroscópicos.

$C_{17}H_{14}N_2O$: 262,31 g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 9,06 (s, 1H, NH), 8,77 (s, 1H, NH), 8,13 (d, 1H, Ar-H), 8,02 (d, 1H, Ar-H), 7,93 (d, 1H, Ar-H), 7,55 (m, 4H, Ar-H), 7,51 (dd, 2H, Ar-H), 7,31 (t, 2H, Ar-H), 6,99 (t, 1H, Ar-H).

IR (λ ; cm^{-1}): 3276 (NH), 3051, 1637 (C=O), 1599, 1556, 1439, 1305, 1246, 1021, 784, 754, 684.

P.f.: 229,8-230,3°C.

Rf.: 0,80 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 79 %.

CLogP: 3,51.

4.2.21 Síntese do composto 1-(2-bromofenil)-3-(2-metoxi-4-nitrofenila)-uréia (A19).

O SB225002 foi obtido segundo o método descrito no item 4.2.1.

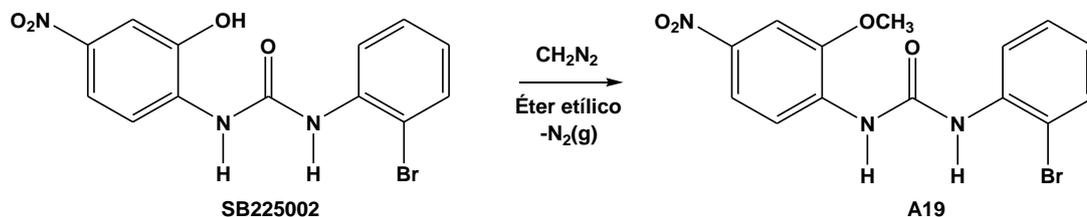


Figura 56 Esquema da síntese do análogo A19.

Preparação do diazometano.

O diazometano um gás **TÓXICO** e **EXPLOSIVO** deve ser preparado em capela de exaustão e sobre gelo e com o máximo cuidado!

Dissolver 2,14 g de Diazald[®] (p-toluilsulfonilmetilnitrosamida) em 30 mL de éter em um béquer mantido sobre o gelo. Dissolver 0,4 g de KOH com algumas gotas de água e 10 mL de etanol 96% em outro béquer mantido sobre o gelo. Os conteúdos dos dois béqueres foram misturados e destilados a 65 °C em aparato semelhante ao esquematizado abaixo (Figura 57).



Figura 57 Obtenção do diazometano (CH_2N_2).

Após a preparação do gás diazometano (CH_2N_2) em éter etílico o mesmo foi utilizado imediatamente.

Em um balão de 50 mL, adicionou-se excesso de diazometano/éter sobre (500mg) de SB225002 obtido anteriormente. Após término da reação o éter foi removido em rota evaporador. O análogo A19 foi obtido quantitativamente (Figura 56).

Dados espectroscópicos.

$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{BrN}_3\text{O}_4$: 366,17 g/Mol

RMN ^1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 9,52 (s, 1H, NH), 9,12 (s, 1H, NH), 8,42 (d, 1H, Ar-H), 7,91 (d, 2H, Ar-H), 7,81 (s, 1H, Ar-H), 7,64 (d, 1H, Ar-H), 7,37 (t, 1H, Ar-H), 7,05 (t, 1H, Ar-H), 4,05 (s, 3H, OCH_3).

IR (λ ; cm^{-1}): 3353 (NH), 3100, 1666 (C=O), 1502, 1430, 1340, 1278, 1213, 1094, 1022, 863, 796, 749, 643.

P.f.: 201,3-203,9°C.

Rf.: 0,76 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: quantitativo.

CLogP: 3,51

4.2.2 Síntese do composto 1-(2-bromofenila)-3-(8-quinolina)-uréia (A20).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 8-aminoquinolina com 2-bromofenilisocianato (Figura 58).

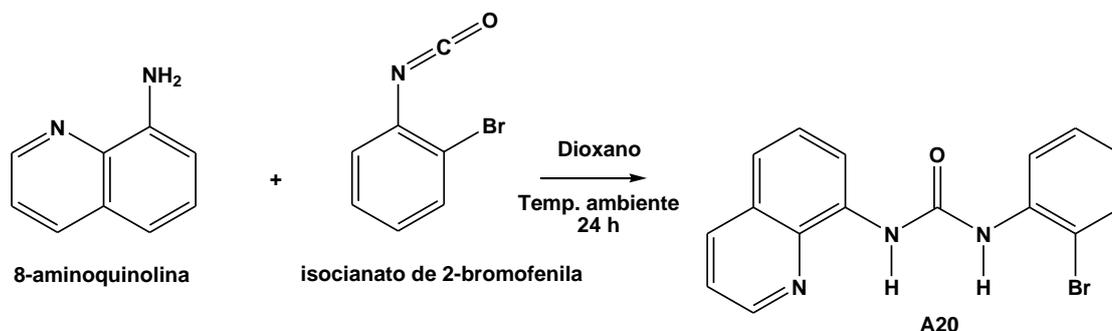


Figura 58 Esquema da síntese do análogo A20.

Dados espectroscópicos.

$C_{16}H_{12}BrN_3O$: 342,19 g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 10,30 (s, 1H, NH), 9,37 (s, 1H, NH), 8,95 (d, 1H, Ar-H), 8,56 (d, 1H, Ar-H), 8,40 (d, 1H, Ar-H), 7,92 (d, 1H, Ar-H), 7,63 (dd, 2H, Ar-H), 7,57 (dd, 2H, Ar-H), 7,37 (dd, 1H, Ar-H), 7,04 (t, 1H, Ar-H).

IR (λ ; cm^{-1}): 3329 (NH), 3291, 3049, 1658 (C=O), 1545, 1427, 1284, 1210, 1018, 821, 743, 635.

P.f.: 192,1-192,7°C.

Rf.: 0,90 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 67%.

CLogP: 3,43.

4.2.23 Síntese do composto 1-(2-bromofenila)-3-feniluréia (A21).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se anilina com 2-bromofenilisocianato (Figura 59).

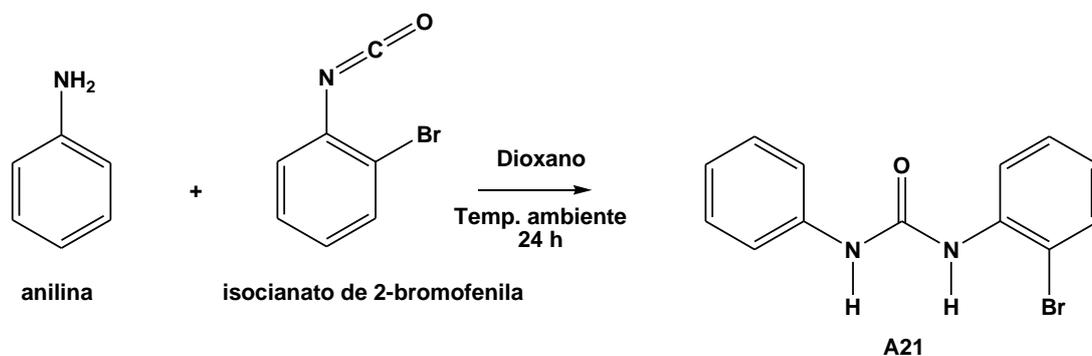


Figura 59 Esquema da síntese do análogo A21.

Dados espectroscópicos.

$C_{13}H_{11}BrN_2O$: 291,14 g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 9,43 (s, 1H, NH), 8,12 (s, 1H, NH), 8,01 (dd, 1H, Ar-H), 7,59 (dd, 1H, Ar-H), 7,43 (dd, 2H, Ar-H), 7,32 (d, 1H, Ar-H), 7,29 (dd, 1H, Ar-H), 7,27 (d, 1H, Ar-H), 6,97 (dd, 2H, Ar-H).

IR (λ ; cm^{-1}): 3447, 3290 (NH), 1647 (C=O), 1595, 1552, 1440, 1294, 1229, 1031, 752, 668.

P.f.: 188,2-188,5°C.

Rf.: 0,90 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 83 %.

CLogP: 3,34.

4.2.24 Síntese do composto 1-(1-naftaleno)-3-metóxfeniluréia (A22).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 4-metilaminilina com 1-naftilisocianato (Figura 60).

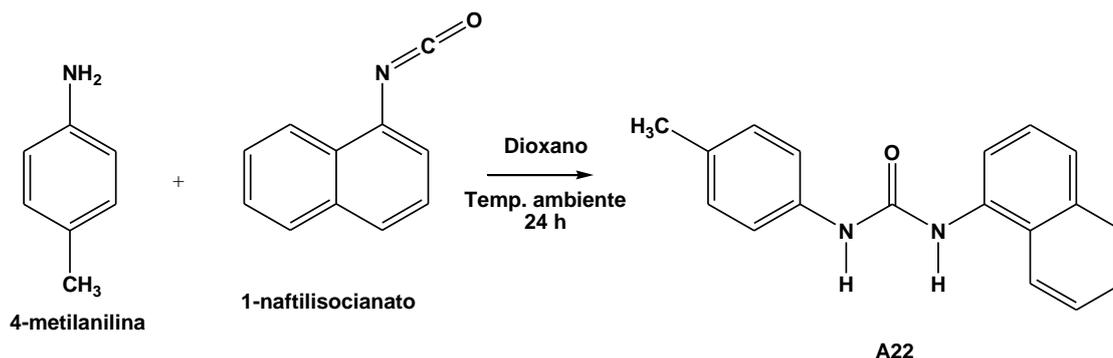


Figura 60 Esquema da síntese do análogo A22.

Dados espectroscópicos.

C₁₈H₁₆N₂O: 276,33 g/Mol

RMN ¹H (DMSO-d₆), 400 MHz, TMS) δ ppm: 8,94 (s, 1H, NH), 8,70 (s, 1H, NH), 8,08 (d, 1H, Ar-H), 7,95 (d, 1H, Ar-H), 7,91 (d, 1H, Ar-H), 7,61 (d, 1H, Ar-H), 7,55 (m, 2H, Ar-H), 7,45 (t, 1H, Ar-H), 7,35 (d, 2H, Ar-H), 7,09 (d, 2H, Ar-H), 2,22 (s, 3H, CH₃).

IR (λ; cm⁻¹): 3266 (NH), 3056, 1640 (C=O), 1598, 1558, 1507, 1249, 1209, 791, 761, 678.

P.f.: 249,8-250,1°C.

Rf.: 0,86 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 76%.

CLogP:4,00.

4.2.25 Síntese do composto 1-(3,4-diclorofenila)-3-(2-naftaleno)-uréia (A23).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 2-naftilamina com 3,4-diclorofenilisocianato (Figura 61).

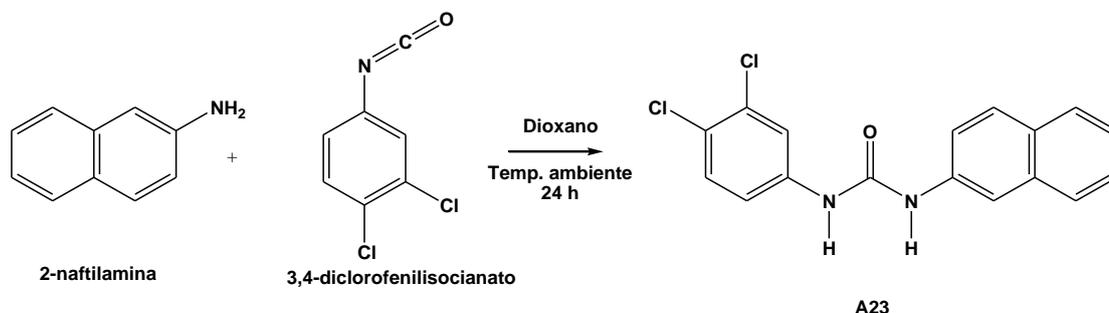


Figura 61 Esquema da síntese do análogo A23.

Dados espectroscópicos.

$C_{17}H_{12}Cl_2N_2O$: 331,2 g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 9,09 (s, 1H, NH), 9,03 (s, 1H, NH), 8,07 (d, 1H, Ar-H), 7,90 (d, 1H, Ar-H), 7,84 (s, 1H, Ar-H), 7,81 (d, 1H, Ar-H), 7,78 (d, 1H, Ar-H), 7,76 (s, 1H, Ar-H), 7,51 (d, 1H, Ar-H), 7,45 (m, 2H, Ar-H), 7,35 (dd, 1H, Ar-H).

IR (λ ; cm^{-1}): 3286 (NH), 1628 (C=O), 1578, 1374, 1266, 1233, 1125, 1031, 816, 748, 632.

P.f.: 266,4-267,6°C.

Rf.: 0,76 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 68%.

CLogP: 4,63.

4.2.26 Síntese do composto 1-(3-clorofenila)-3-(1-naftaleno)-uréia (A24).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 3-cloroanilina com 1-naftilsocianato (Figura 62).

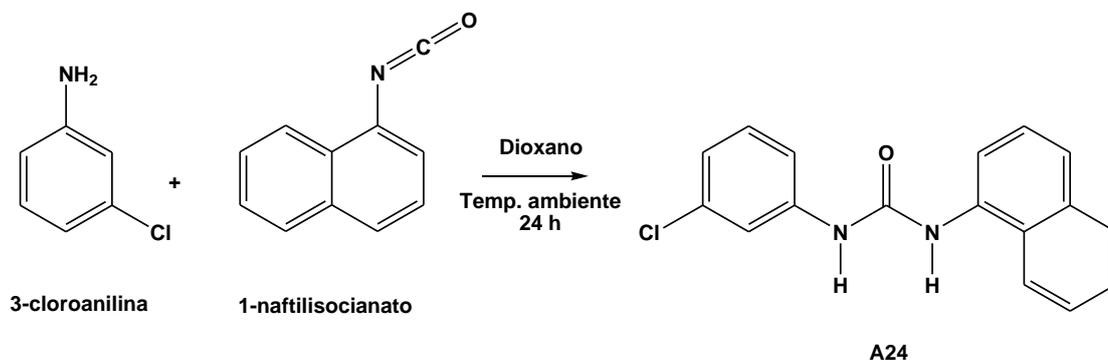


Figura 62 Esquema da síntese do análogo A24.

Dados espectroscópicos.

$C_{17}H_{13}ClN_2O$: 296,75 g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 9,24 (s, 1H, NH), 8,81 (s, 1H, NH), 8,07 (s, 1H, Ar-H), 7,92 (dd, 1H, Ar-H), 7,75 (t, 1H, Ar-H), 7,66 (d, 1H, Ar-H), 7,56 (dd, 2H, Ar-H), 7,55 (dd, 1H, Ar-H), 7,47 (t, 1H, Ar-H), 7,31 (d, 1H, Ar-H), 7,29 (t, 1H, Ar-H), 7,01 (dd, 1H, Ar-H).

IR (λ ; cm^{-1}): 3447, 3294 (NH), 1641 (C=O), 1592, 1552, 1424, 1258, 874, 790, 765, 674.

P.f.: 248,3-248,7°C.

Rf.: 0,86 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 65%.

CLogP: 4,07.

4.2.27 Síntese do composto 1-(2-bromofenil)-3-(3,4-diclorofenila)-uréia (A25).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 3,4-dicloroanilina com 2-bromofenilisocianato (Figura 63).

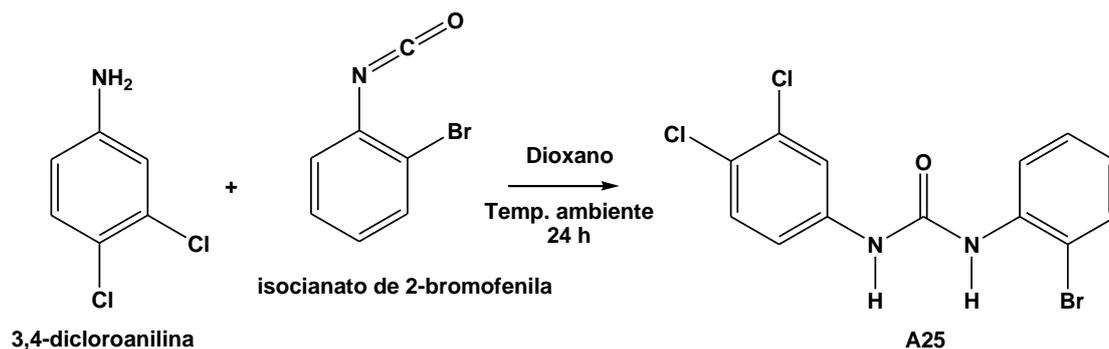


Figura 63 Esquema da síntese do análogo A25.

Dados espectroscópicos.

$C_{13}H_9BrCl_2N_2O$: 360,03 g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 9,72 (s, 1H, NH), 8,20 (s, 1H, NH), 7,99 (d, 1H, Ar-H), 7,88 (s, 1H, Ar-H), 7,61 (d, 1H, Ar-H), 7,51 (d, 1H, Ar-H), 7,33 (dd, 1H, Ar-H), 7,28 (d, 1H, Ar-H), 6,99 (dd, 1H, Ar-H).

IR (λ ; cm^{-1}): 3281 (NH), 3090, 1637 (C=O), 1589, 1556, 1470, 1288, 1234, 1031, 789, 743, 652.

P.f.: 221,5-222,9°C.

Rf.: 0,90 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 80%.

CLogP: 4,46.

4.2.28 Síntese do composto 1-(5-cloro-2-hidroxiifenila)-3-(3,4-diclorofenil)uréia (A26).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 2-hidroxi-5-cloroanilina com 3,4-diclorofenilisocianato (Figura 64).

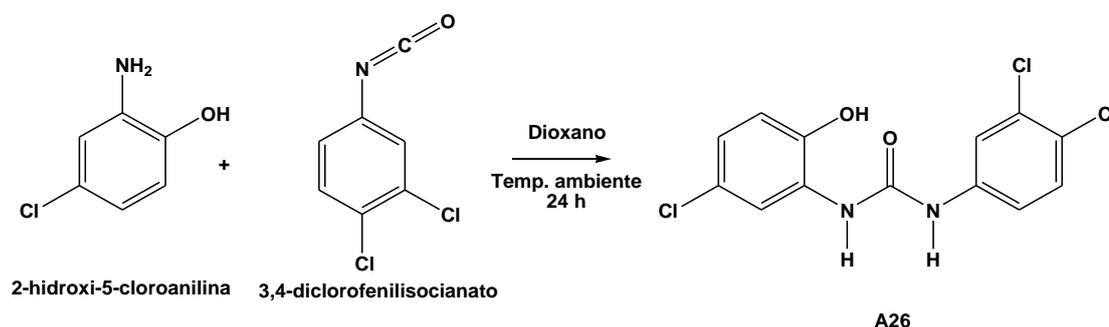


Figura 64 Esquema da síntese do análogo A26.

Dados espectroscópicos.

$C_{13}H_9Cl_3N_2O_2$: 331,58 g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 10,40 (br, s, 1H, OH), 9,66 (s, 1H, NH), 8,36 (s, 1H, NH), 8,11 (s, 1H, Ar-H), 7,87 (s, 1H, Ar-H), 7,5 (d, 1H, Ar-H), 7,23 (dd, 2H, Ar-H), 6,82 (s, 1H, Ar-H).

IR (λ ; cm^{-1}): 3402, 3227 (NH), 1695 (C=O), 1592, 1547, 1472, 1423, 1214, 1186, 1123, 865, 803, 644, 577, 544.

P.f.: 221,2-221,9°C.

Rf.: 0,60 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 73%.

CLogP: 4,46.

4.2.29 Síntese do composto 1-(4-metoxifenila)-3-(1-naftaleno)-uréia (A27).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 4-metoxianilina com 1-naftilisocianato (Figura 65).

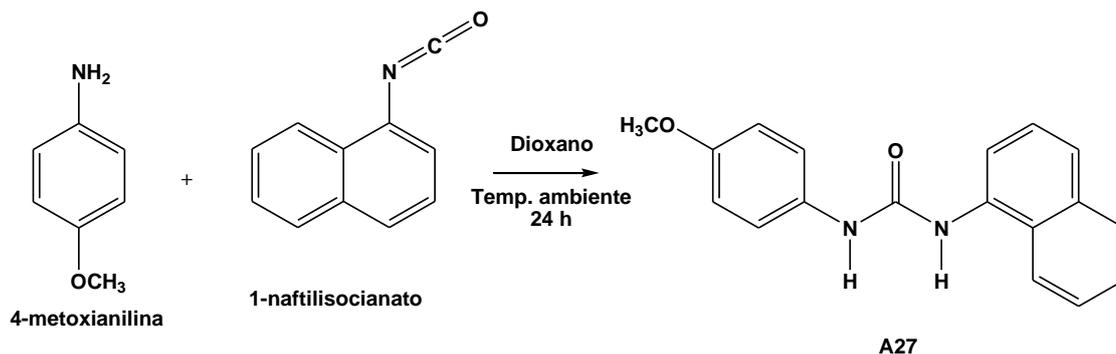


Figura 65 Esquema da síntese do análogo A27.

Dados espectroscópicos.

$C_{18}H_{16}N_2O_2$: 292,33 g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 8,86 (s, 1H, NH), 8,68 (s, 1H, NH), 8,11 (d, 1H, Ar-H), 8,0 (d, 1H, Ar-H), 7,91 (d, 1H, Ar-H), 7,57 (m, 4H, Ar-H), 7,41 (dd, 2H, Ar-H), 6,88 (d, 2H, Ar-H), 3,70 (s, 3H, OCH₃).

IR (λ ; cm^{-1}): 3267 (NH), 3052, 1643 (C=O), 1557, 1506, 1396, 1241, 1172, 1032, 833, 784, 682, 547.

P.f.: 219,5-220,7°C.

Rf.: 0,64 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 83 %.

CLogP: 3,38.

4.2.30 Síntese do composto 1-(3,4-diclorofenila)-3-(2-hidroxi-4-nitrofenila)-uréia (A28).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 2-hidroxi-4-nitroanilina com 3,4-diclorofenilisocianato (Figura 66).

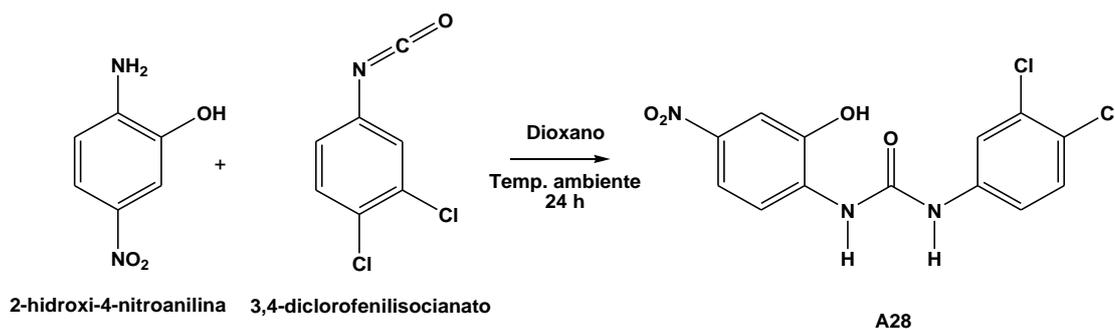


Figura 66 Esquema da síntese do análogo A28.

Dados espectroscópicos.

$C_{13}H_9Cl_2N_3O_4$: 342,13 g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 11,22 (br, s, 1H, OH), 9,84 (s, 1H, NH), 8,75 (s, 1H, NH), 8,31 (d, 1H, Ar-H), 7,87 (d, 1H, Ar-H), 7,73 (dd, 1H, Ar-H), 7,64 (d, 1H, Ar-H), 7,51 (d, 1H, Ar-H), 7,26 (dd, 1H, Ar-H).

IR (λ ; cm^{-1}): 3377 (NH), 3113, 1690 (C=O), 1594, 1540, 1483, 1383, 1303, 1197, 1082, 942, 866, 818, 737, 640.

P.f.: 236,5-237,1°C.

Rf.: 0,60 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 85%.

CLogP: 3,34.

4.2.31 Síntese do composto 1-(5-cloro-2-hidroxifenila)-3-(1-naftaleno)-uréia (A29).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 2-hidroxi-5-cloroanilina com 1-naftilisocianato (Figura 67).

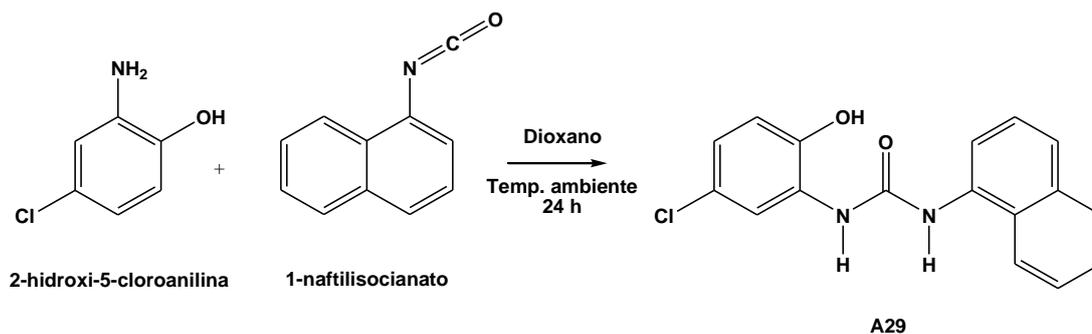


Figura 67 Esquema da síntese do análogo A29.

Dados espectroscópicos.

$C_{17}H_{13}ClN_2O_2$: 312,75 g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 10,39 (br, s, 1H, OH), 9,4 (s, 1H, NH), 8,92 (s, 1H, NH), 8,22 (s, 1H, Ar-H), 8,21 (d, 1H, Ar-H), 8,04 (d, 1H, Ar-H), 7,94 (d, 1H, Ar-H), 7,65 (d, 2H, Ar-H), 7,57 (dd, 2H, Ar-H), 7,48 (t, 1H, Ar-H), 6,86 (s, 1H, Ar-H).

IR (λ ; cm^{-1}): 3267 (NH), 1594 (C=O), 1568, 1491, 1264, 1118, 789, 662.

P.f.: 221,8-222,6°C.

Rf.: 0,70 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 61%.

CLogP: 3,68.

4.2.32 Síntese do composto 1-(2-bromofenila)-3-(4-cloro-2-hidroxifenila)-uréia (A30).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 2-hidroxi-4-cloroanilina com 2-bromofenilisocianato (Figura 68).

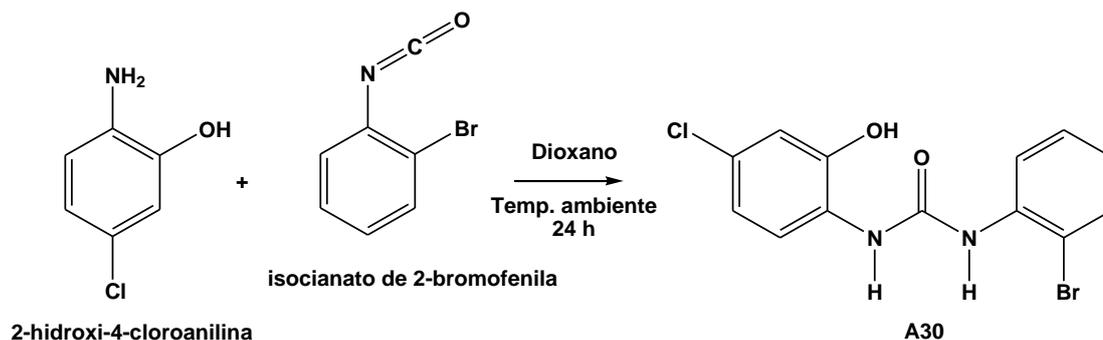


Figura 68 Esquema da síntese do análogo A30.

Dados espectroscópicos.

$C_{13}H_{10}BrClN_2O_2$: 341,59 g/Mol

RMN ¹H (DMSO-d₆), 400 MHz, TMS) δ ppm: 10,31 (br, s, 1H, OH), 8,91 (s, 1H, NH), 8,13 (s, 1H, NH), 7,93 (d, 1H, Ar-H), 7,61 (d, 1H, Ar-H), 7,34 (dd, 2H, Ar-H), 7,00 (dd, 2H, Ar-H), 6,85 (s, 1H, Ar-H).

IR (λ; cm⁻¹): 3359, 3207 (NH), 1654 (C=O), 1552, 1521, 1419, 1298, 1209, 1113, 1030, 869, 746, 687.

P.f.: 180,5-180,9°C.

Rf.: 0,70 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 75%.

CLogP: 3,51

4.2.33 Síntese do composto 1-(4-cloro-2-hidroxifenila)-3-(1-naftaleno)-uréia (A31).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 2-hidroxi-4-cloroanilina com 1-naftilisocianato (Figura 69).

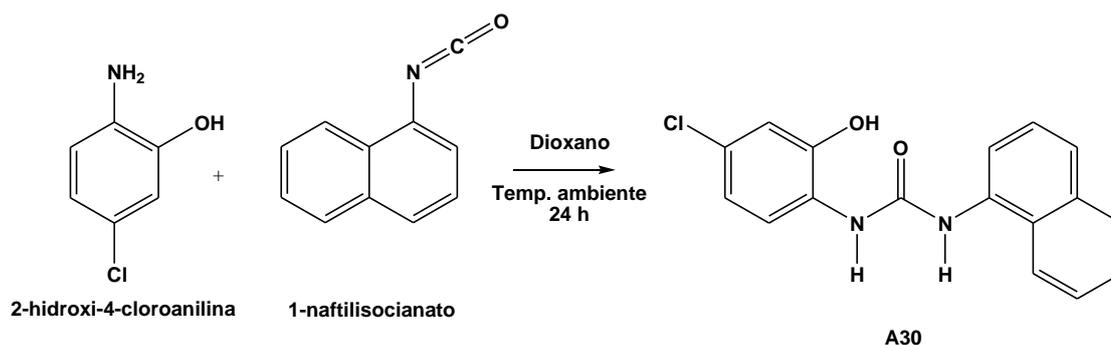


Figura 69 Esquema da síntese do análogo A31.

Dados espectroscópicos.

$C_{17}H_{13}ClN_2O_2$: 312,75 g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 10,60 (br, S, 1H, OH), 9,34 (s, 1H, NH), 8,82 (s, 1H, NH), 8,21 (d, 1H, Ar-H), 8,13 (d, 1H, Ar-H), 8,04 (d, 1H, Ar-H), 7,93 (s, 1H, Ar-H), 7,74 (t, 1H, Ar-H), 7,56 (m, 2H, Ar-H), 7,47 (dd, 1H, Ar-H), 6,88 (d, 1H, Ar-H), 6,83 (dd, 1H, Ar-H).

IR (λ ; cm^{-1}): 3528, 3270 (NH), 3053, 1644 (C=O), 1596, 1551, 1406, 1335, 1270, 1208, 1088, 796, 670.

P.f.: 195,4-197°C.

Rf.: 0,78 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento:68%.

CLogP:3,68

4.2.34 Síntese do composto 1-(2-bromofenila)-3-(2-naftaleno)-uréia (A32).

Procedimento experimental similar à preparação do composto análogo A00, reagindo-se 2-naftilamina com 2-bromofenilisocianato (Figura 70).

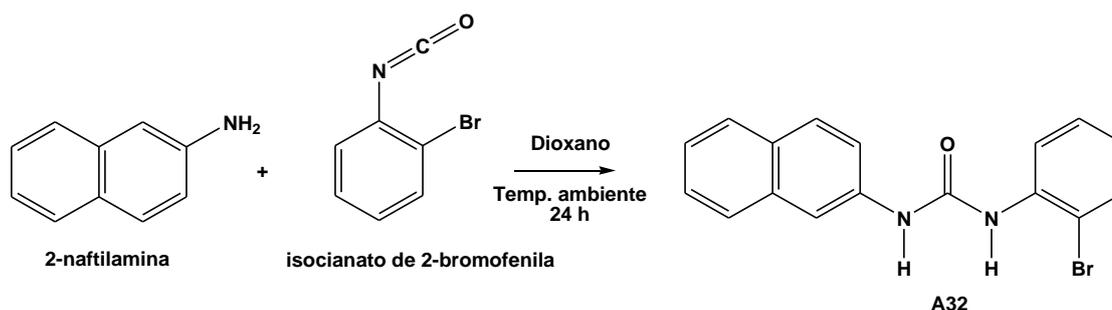


Figura 70 Esquema da síntese do análogo A32.

Dados espectroscópicos.

$C_{17}H_{13}BrN_2O$: 341,2 g/Mol

RMN 1H (DMSO- d_6), 400 MHz, TMS) δ ppm: 9,7 (s, 1H, NH), 8,25 (s, 1H, NH), 8,14 (dd, 1H, Ar-H), 8,11 (d, 1H, Ar-H), 7,87 (d, 1H, Ar-H), 7,85 (s, 1H, Ar-H), 7,81 (d, 1H, Ar-H), 7,64 (dd, 1H, Ar-H), 7,50 (d, 1H, Ar-H), 7,46 (d, 1H, Ar-H), 7,37 (dd, 2H, Ar-H), 7,0 (dd, 1H, Ar-H)..

IR (λ ; cm^{-1}): 3281 (NH), 3056, 1639 (C=O), 1583, 1549, 1434, 1268, 1229, 1024, 742, 659.

P.f.: 210,6-211,2°C.

Rf.: 0,90 (Hexano/Acetato de etila 50:50).

Rendimento: 83%.

CLogP: 4,34.

4.3 Materiais e métodos: Ensaio biológicos.

4.3.1 Os Animais

Os experimentos *in vivo* foram realizados utilizando camundongos suíços machos, pesando 25-35 g (n=5) mantidos sob ótimas condições de luminosidade, temperatura e umidade (ciclo 12:12 claro/escuro, $22 \pm 1^\circ\text{C}$, sob 60-80% de umidade), com comida e água fornecidos *ad libitum*. Os animais foram obtidos no Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, Brazil). Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas atuais para cuidados com animais de laboratório e normas éticas para investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). O Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina aprovou todos os procedimentos experimentais (protocolo número 262/CEUA e 23080.035334/2003-16/UFSC). O número de animais e a intensidade do estímulo nocivo utilizados foram o mínimo necessário para demonstrar os efeitos conscientes.

4.4 Comportamento de nociceção aguda

4.4.1 Hipernociceção induzida pelo ácido acético.

Preliminarmente foi verificado o efeito do SB225002 no teste de contorções abdominais em camundongos que embora seja um modelo de nociceção simples e pouco específico, permite avaliar a atividade analgésica de várias substâncias que atuam no sistema nervoso central. A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6 %) diluído em solução de salina (0,9 %).

Após a injeção intraperitoneal (i.p.) de um agente nociceptivo em ratos ou camundongos, observa-se respostas que consistem em uma seqüência de contorções e extensões do abdômen, algumas vezes acompanhada por torções do tronco e extensão dos membros posteriores do animal. Este comportamento foi denominado de contorção abdominal (Figura 71).



Figura 71 Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

A constrição abdominal induzida pela injeção intraperitoneal (i.p.) de uma solução de ácido acético (0,6%) foi realizada como descrito previamente (VAZ et al., 1996).

Os animais foram tratados com diferentes doses de SB225002 (0,1-1mg/Kg, i.p.) ou o veículo (10 mL/Kg, 1% Tween 80 em uma solução salina a 0,9%), 30 minutos antes da injeção de ácido acético. Os animais foram observados individualmente e o número de contorções abdominais cumulativas num período de 20 minutos após a injeção da solução de ácido acético, considerando um indicativo de nocicepção. Uma solução de Dipirona (60 mg/Kg, i.p.) foi usada como controle positivo.

4.4.2 Nocicepção induzida pela Formalina

O procedimento usado é similar ao descrito previamente por (MENDES et al., 2000). Os animais foram tratados com diferentes doses de SB225002 (1 - 3 mg/kg, i.p.) ou o veículo (10 mL/Kg, 1% Tween 80 em uma solução salina a 0,9%), 30 minutos antes da injeção de formalina (solução de formol a 37%). Os animais receberam uma injeção intraplantar (i.p.l) na pata direita traseira de uma solução contendo 20 µL de formalina a 2,5%. Os animais foram imediatamente colocados em um funil de vidro (Figura 72) de 20 cm de diâmetro, e o tempo que o animal passou lambendo a pata injetada durante 30 minutos foi considerado como indicativo de nocicepção.



Figura 72 Demonstração do teste da formalina.

4.4.3 Modelos evidentes de nociceção

Os efeitos de SB225002 foram avaliados em outros modelos de nociceção espontânea em camundongos. Para este propósito, os animais foram pré-tratados com SB225002 (1 – 3 mg/Kg, i.p.) ou o veículo (10 mL/Kg, 1% Tween 80 em uma solução salina a 0,9%), 30 minutos antes da injeção. Os ratos receberam uma injeção de 20- μ l (i.p.l.) de um dos seguintes agentes: capsaicina (Figura 73) (1.6 μ g/pata); (CORRÊA et al., 1996), glutamato (Figura 74) (30 μ mol/pata; (BEIRITH et al., 2002), acetato miristato de forbol (PMA) (30 ng/pata; (TANIGUCHI et al., 1997), ou 8-Br-cAMP (10 nmol/patas); (OTUKI et al., 2005), na pata traseira direita. Os animais foram observados individualmente nos cilindros de vidro transparentes (20 cm de diâmetro) durante 5 minutos após a capsaicina, 15 minutos após o glutamato, 45 após acetato miristato de forbol (Figura 75) (PMA) e 10 minutos após 8-bromoadenosina-3',5'-monofosfato cíclico (8-Br-cAMP) (Figura 76). A quantidade de

tempo gasto lambendo a pata injetada foi registada com um cronómetro e considerada como indicativo do nociceção.

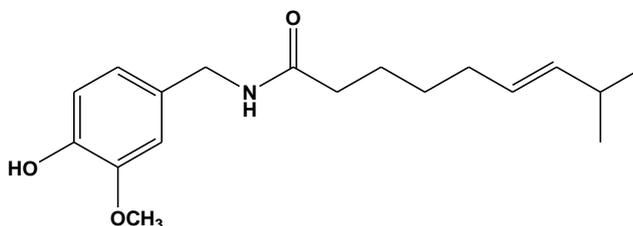


Figura 73 Estrutura química da capsaicina.

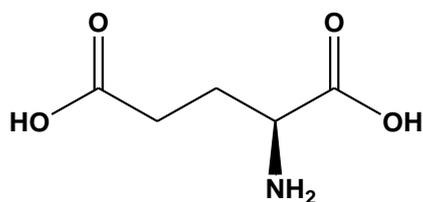


Figura 74 Estrutura química do glutamato.

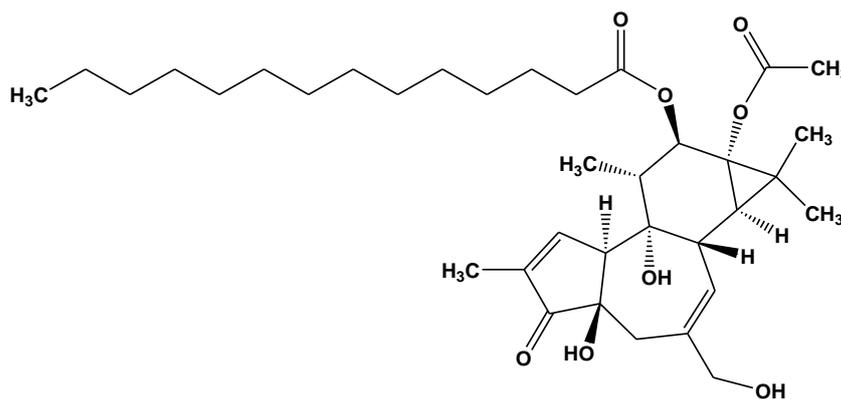


Figura 75 Estrutura do acetato miristato de forbol.

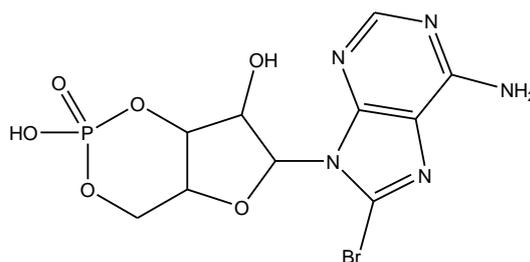


Figura 76 Estrutura química 8-Br-cAMP.

4.4.4 Hypernociceção mecânica induzida pelo KC (citocina pro-inflamatória), pelo PGE₂ ou pela epinefrina

Para a avaliação da hipernociceção mecânica, os camundongos foram tratados com SB225002 (1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, Tween 80 de 1% na solução do NaCl de 0.9%), 30 minutos antes da injeção i.p. de citocina pro-inflamatória (KC) (10 ng/pata), (CUNHA et al., 2005), de prostaglandina E₂ (PGE₂) (Figura 77) (0.1 nmol/pata), (KASSUYA et al., 2007) ou epinefrina (Figura 78) (100 ng/pata). A hipernociceção mecânica foi medida com os filamentos de Von Frey, em pontos e tempos diferentes após a injeção i.p. dos mediadores alôgenicos.

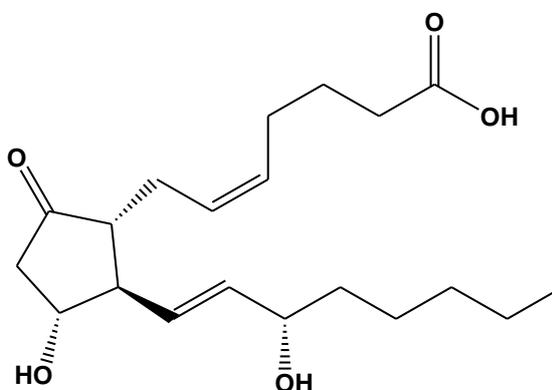


Figura 77 Estrutura da prostaglandina E₂.

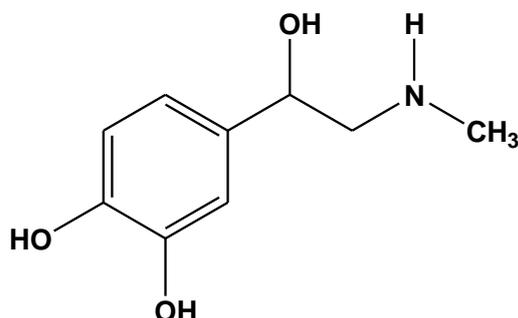


Figura 78 Estrutura da epinefrina.

4.4.5 Hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina

Para a indução da dor inflamatória, os ratos receberam uma injeção i.pl de 50 μ L de carragenina (extrato solúvel da caragena ou musgo irlandês) (300 μ g/pata) na superfície da pata traseira direita. Para avaliar o efeito sistêmico do tratamento da droga, os ratos receberam i.p. SB225002 (0.1 – 3 mg/kg,) ou o veículo (10 ml/kg, Tween 80 de 1% na solução salina a 0.9%), 30 minutos antes da injeção do carragenina. A fim avaliar o possível local da ação do SB225002 (central ou periférico), um grupo separado de animais recebeu uma injeção de i.pl de SB225002 (100 – 300 nmol/pata), co-administrada com carragenina (300 μ g/pata). Grupos de animais adicionais receberam uma injeção intratecal (i.t) ou intracerebroventricular (i.c.v) de 5 μ l do SB225002 (10 – 100 nmol/local), 10 minutos antes da aplicação da carragenina. As injeções i.t foram executadas de acordo com o método descrito por (HYLDEN e WILCOX, 1980) com algumas modificações. Para as injeções de i.t. os animais estavam conscientes evitando a possível interferência do anestésico. A agulha foi conectada a uma microseringa por uma tubulação do polietileno e foi

introduzida através da pele, um volume de 5 μ l da solução do veículo (controle) ou do SB225002 foi injetado entre o espaço vertebral L5 e L6. Para injeções de i.c.v., os animais foram anestesiados levemente com isoflurano e um volume 5 μ l de SB225002 foi injetado diretamente no ventrículo lateral (coordenadas 1 milímetro do bregma lateral de; 1 milímetro rostral e 3 milímetros vertical) como descrito previamente por (LAURSEN e BELKNAP, 1986).

A hipernocicepção mecânica de todos os grupos foi avaliada por meio do filamento de Von Frey (FVF), até 24 h após a administração do carragenina, como descrito na (Figura 79).



Figura 79 Teste do filamento de Von Frey (FVF).

O mesmo procedimento foi aplicado aos trinta e três compostos análogos e a dose aplicada foi de (1mg/kg,), i.p. baseados nos dados obtidos para o SB225002 no mesmo modelo.

4.5 Comportamento da dor duradoura

4.5.1 Hipernocicepção mecânica induzida pelo complexo adjuvante de Freund (CFA)

Para produzir uma resposta inflamatória persistente, os ratos receberam uma injeção de 20- μ l i.pl de CFA (1 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* morta pelo calor; cada ml do veículo contem 0.85 mL de óleo de parafina mais 0.15 ml de monooleato de manide) na pata traseira direita (QUINTÃO et al., 2005). Para observar os efeitos do tratamento crônico, SB225002 (1 mg/kg) foi administrado oralmente duas vezes por dia (12 X 12 h) por um período de 7 dias. A avaliação da hipernocicepção mecânica foi via o (FVF) diariamente avaliado, 6 h após a primeira administração diária. Os animais controle receberam o veículo (10 ml/kg, o Tween 80 de 1% de uma solução salina a 0.9%), na mesma programação adotada para o tratamento com o SB225002.

4.5.2 Procedimentos cirúrgicos da constrição parcial do nervo ciático (CPNC).

Para avaliar o comportamento da dor neuropática, o procedimento usado foi similar aquele descrito por (MALBERG e BASBAUM, 1998). Os ratos foram anestesiados com o hidrato de cloral de 7% (08 ml/kg; i.p.). O CNPC foi executado amarrando 1/3 a 1/2 da parcela dorsal do nervo ciático (Figura 80), com um fio de sutura 8.0 sedas (Ethicon, Edimburgo). Nos grupos de controle falso-operados, o nervo ciático foi exposto sem a ligadura.

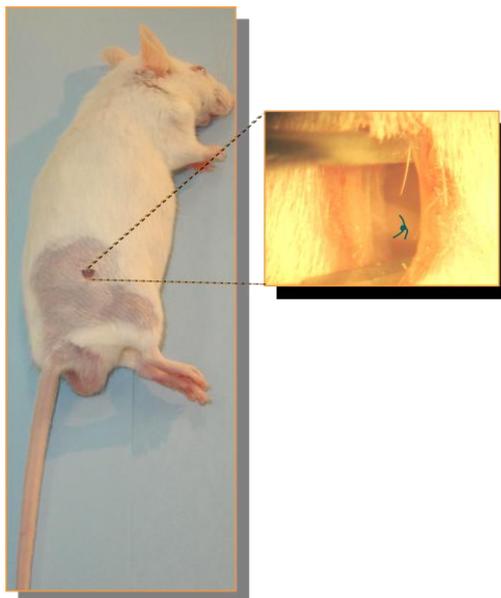


Figura 80 Constrição parcial do nervo ciático.

Depois de um período da recuperação (04 dias após os procedimentos cirúrgicos), os animais submetidos a (CPNC) foram tratados sistematicamente com o SB225002 (1 mg/kg, i.p.) ou o veículo (10 ml/kg, Tween 80 em solução salina a 0.9%), duas vezes por dia (12 X12 h) por um período de 5 dias após a cirurgia e avaliado com o (FVF) para até 6 h após o tratamento.

4.5.3 Resposta da retirada da pata traseira pelos filamentos de Von Frey.

O uso de filamentos de Von Frey é um método para avaliar a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico bastante utilizado clinicamente (Figura 81). Entretanto, tal método passou a ser utilizado também para experimentos

laboratoriais, no sentido de avaliar a influência de drogas sobre a sensibilidade nociceptiva em animais.



Figura 81 Teste de pressão na pata dos ratos (Von Frey).

Para avaliar o alodinia mecânica, os camundongos foram colocados individualmente em caixas desobstruídas de Plexiglas (9 x 7 x 11 cm) em plataformas elevadas do engranzamento de fio para permitir que o acesso à superfície ventral da pata traseira direito. A frequência da resposta da retirada foi medida depois de 10 aplicações (duração de 1 s cada um) dos filamentos de von Frey (FVF), Stoelting, Chicago, IL, EUA). Os estímulos foram realizados abaixo da superfície relativa da planta do pé direito. Os animais foram aclimatados 30 minutos antes para o teste comportamental e a hipernocicepção mecânica foi avaliada em diversos tempos-pontos. O (FVF) de 0.6 g produz uma frequência média da retirada de aproximadamente 15%, que foi considerada ser um valor adequado para a medida da hipernocicepção mecânica (Quintão et al, 2006). Conseqüentemente, os filamentos de 0.6 g foram usados durante todo este estudo. Para determinar os

pontos iniciais mecânicos básicos, todos os grupos foram avaliados antes do teste ou dos procedimentos cirúrgicos.

4.6 Ensaios bioquímicos

4.6.1 Atividade da Mieloperoxidase

O recrutamento do neutrófilo à pata do rato foi avaliado indiretamente por meio da atividade da mieloperoxidase no tecido (MPO), de acordo com o método descrito (DINAMARCA CUNHA et al., 2004). Com esta finalidade, os animais foram tratados com o SB225002 (0.1-3 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes e após, receberam 50µl i.pl de uma injeção de carragenina (300 µg/pata) na pata direita. Foram injetadas nas patas salina como controle. Os animais foram sacrificados 6 h após a aplicação da carragenina. O tecido subcutâneo das patas foi removido, homogeneizado em 5% (wv-1) de EDTA/NaCl (pH 4.7) e centrifugado em 10.000 RPM por 15 minutos à 4°C. O material foi ressuspendido em 0.5% de brometo hexadeciltrimetilamônio em tampão (pH 5.4), as amostras foram congeladas por três vezes no nitrogênio líquido. As amostras foram centrifugadas novamente a (10.000 RPM, 15 min. a 4°C) e 25µl do sobrenadante foi usado para o ensaio de MPO. A reação enzimática foi avaliada com tetrametilbenzidina 1.6 mM, 80 mM NaPO₄, e 0.3 mM de água oxigenada. A absorbância foi medida em 650 nanômetros, e os resultados foram expressos como OD por miligrama do tecido.

4.6.2 Determinação de IL-1 β , TNF α ou níveis do KC na pata do rato

Os níveis de citocinas pro-inflamatórias TNF α , IL-1 β ou KC, foram avaliados de acordo com o protocolo descrito por (DA CUNHA et al., 2004). Os animais foram tratados com o SB225002 (0.1-3 mg/kg, i.p.) e após 30 minutos receberam 50 μ l i.p. de uma injeção de carragenina (300 μ g/pata) na pata direita. Os ratos foram sacrificados 6 h após a injeção de carragenina e foi injetada nas patas salina como controle. Os tecidos foram colocados em PBS (PBS; pH = 7.4; NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM) contendo NaCl 0.4 M, PMSF 0.1 M, EDTA 10 mM, 0.05% de Tween 20, 0.5% de BSA e 2 mg/ml de aprotinina, foram homogeneizados e centrifugados a 3000 x g por 10 minutos e armazenado a -70 °C para posterior análise. Os níveis de citocinas foram avaliados usando um kit ELISA de acordo com as recomendações do fabricante (R&D Systems).

4.7 Avaliação dos efeitos não específicos.

Para excluir os possíveis efeitos não específicos do SB225002 na coordenação de motora, a atividade locomotora, ou as latências da resposta dos ratos foram testadas com “rota-rod”(Figura 82) (DUNHAM e MIYA, 1957), campo aberto (open field) (Figura 83) (BORTOLANZA et al., 2002) e placa quente(Figura 84) (Hot-plate), respectivamente. Os grupos diferentes de animais foram pre-tratados com SB225002 (1 e 3 mg/kg i.p.), veículo (10 ml/kg, i.p.), e foram submetidos a cada teste.

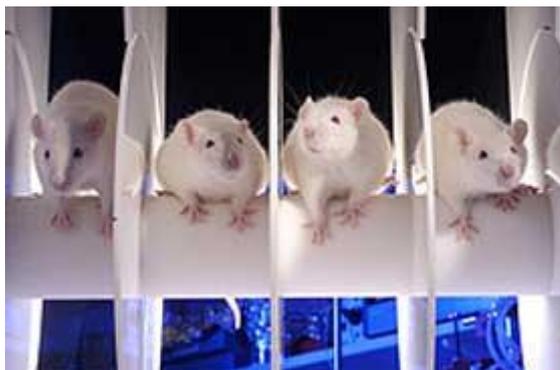


Figura 82 Teste do (rota-rod).

Teste da placa quente a nocicepção térmica manifesta por reflexo de retirada de pata.



Figura 83 Teste da placa quente (Hot plate).



Figura 84 Teste do campo aberto (Open Field).

4.8 Análise Estatística.

Os resultados foram apresentados como a média e o desvio padrão da média. de 5 a 7 animais, à exceção dos valores DI_{50} (isto é a dose de SB225002 que reduziu as respostas nociceptivas em 50% relativo aos valores do controle), que são apresentados como as médias acompanhados de seus limites de confiança respectivos de 95%. Os valores DI_{50} foram determinados pelo uso do método dos mínimos quadrados. As porcentagens da inibição são relatadas como a média e o desvio padrão da média das inibições obtidas para cada experiência individual. As comparações estatísticas dos dados foram executadas pela análise de variação em dois sentidos (ANOVA) seguida pelo post-test ou por ANOVA de sentido único de Bonferroni seguido pelo teste de Newman-Keuls'. Para valores menores de 0.05 ($P < 0.05$ ou menor) foi considerado significativo.

4.9 Materiais e métodos dos ensaios de Colite induzida por TNBS.

4.9.1 Animais

Foram utilizados camundongos Balb/c machos pesando entre 20-25 g, criados no Biotério de Farmacologia ou Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram mantidos em câmaras isoladas, com ventilação, sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e umidade (60-80%) em ciclo de 12 horas claro-escuro, além de livre acesso à água e ração. Os

experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo e os animais foram climatizados 1 hora antes do início dos testes. Todos os protocolos foram previamente pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (processo número 23080.035334/2003-16/UFSC). (BENTO, 2008).

4.9.2 Indução da Colite.

A Colite experimental foi induzida conforme descrito originalmente para ratos e modificado para camundongos, com poucas adaptações as nossas condições experimentais. Os animais foram aleatoriamente divididos em grupos e colocados em jejum sólido, utilizando uma grade de fundo da caixa para evitar a cropofagia e com livre acesso a uma solução de glicose 5%. Após 24 horas de jejum os animais receberam anestesia com uma solução de xilazina (10mg/Kg, i.p.) e quetamina (80 mg/Kg, i.p), e então um cateter de polietileno PE-50 (4 cm) acoplado a uma microseringa foi inserido no interior do cólon do animal para a administração de doses de ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). A Colite foi induzida em camundongos da linhagem Balb/c, utilizando-se 0,1 mL de TNBS 1,0; 1,5; 2,0 ou 2,5 mg em 35% de etanol. Os animais controle receberam 0,1 mL de uma solução estéril de salina 0,9%. Após a indução da Colite, os animais foram mantidos em posição inclinada a 45° por dois minutos. Decorridas 4 horas depois da indução, os animais passaram a ter livre acesso a ração e a água filtrada. Durante todo o experimento, os animais sobreviventes foram monitorados em relação a mudança de peso corporal e mortalidade. Os animais foram sacrificados 72 horas após a indução de colite. Os cólons foram removidos e as fezes presentes foram retiradas, e a seguir

foram ou não abertos com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e lavados com solução salina estéril. Os cólons foram pesados, seus comprimentos mensurados e acondicionados em freezer a -70° C para posteriores análises. Adicionalmente o baço também foi retirado e pesado. (BENTO, 2008).

4.9.3 Tratamento animal.

Para avaliar o efeito terapêutico potencial do SB225002 na colite experimental, os animais receberam doses diferentes de SB225002 duas vezes por dia i.p. (0.1, 0.3, e 1 mg/kg), 24 h após a indução da colite. Em 24 h ou em 72 h depois da indução da colite, a contagem e a atividade macroscópicas da mieloperoxidase (MPO) foram avaliadas. A dose a mais eficaz (0.3 mg/Kg) foi usada para as outras experiências, tais como índices de citocina, COX-2, VEGF, e expressão da proteína iNOS. Os tratamentos similares do protocolo foram realizados usando o dexametasona como controle positivo (1 mg/kg, s.c.) e o anticorpo KC (30 μ g /kg, i.v.). O SB225002 foi dissolvido em uma solução 0.9% de NaCl que contém 0.33% Tween 80 imediatamente antes o uso, e os ratos controle foram tratados somente com este veículo.

4.9.4 Fármacos e reagentes.

Dexametasona, H_2O_2 , Tween 20, Tween 80, EDTA, aprotinina, PBS, H&E, TMB, H_2O_2 , OPD, e TNBS foram adquiridos da empresa Sigma Co. (St Louis, MO,

EUA). O formaldeído foi obtido da Merck (Frankfurt, Darmstadt, Alemanha). O reagente de Bradford foi comprado dos laboratórios Bio-Rad (Richmond, CA, EUA). Anticorpo KC, rato KC, IL-4, MIP-2, IL-10, e IL-1_/IL-1F2. Os kits DuoSet foram obtidos da R&D Systems. COX-2, β -actin, VEGF (C-1), e iNOS anticorpos primarios do foram adquiridos da Santa Cruz biotecnologia (Santa Cruz, CA, EUA). O anticorpo secundário Envision Plus, reagente de estreptavidina-HRP, e o cromogeno 3,3-diaminobenzidina foram adquiridos da Dako Cytomation (CA, EUA).

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.

5.1 Resultados da síntese do SB225002 e das 33 N,N'-diariluréias sintéticas.

Pode-se observar na Figura 85, um sinal em 0 ppm referente ao tetrametilsilano (TMS), 2,5 ppm dimetilsulfóxido e em aprox. 3,4 ppm o sinal de (HOD) (GOTTLIEB, 1997).

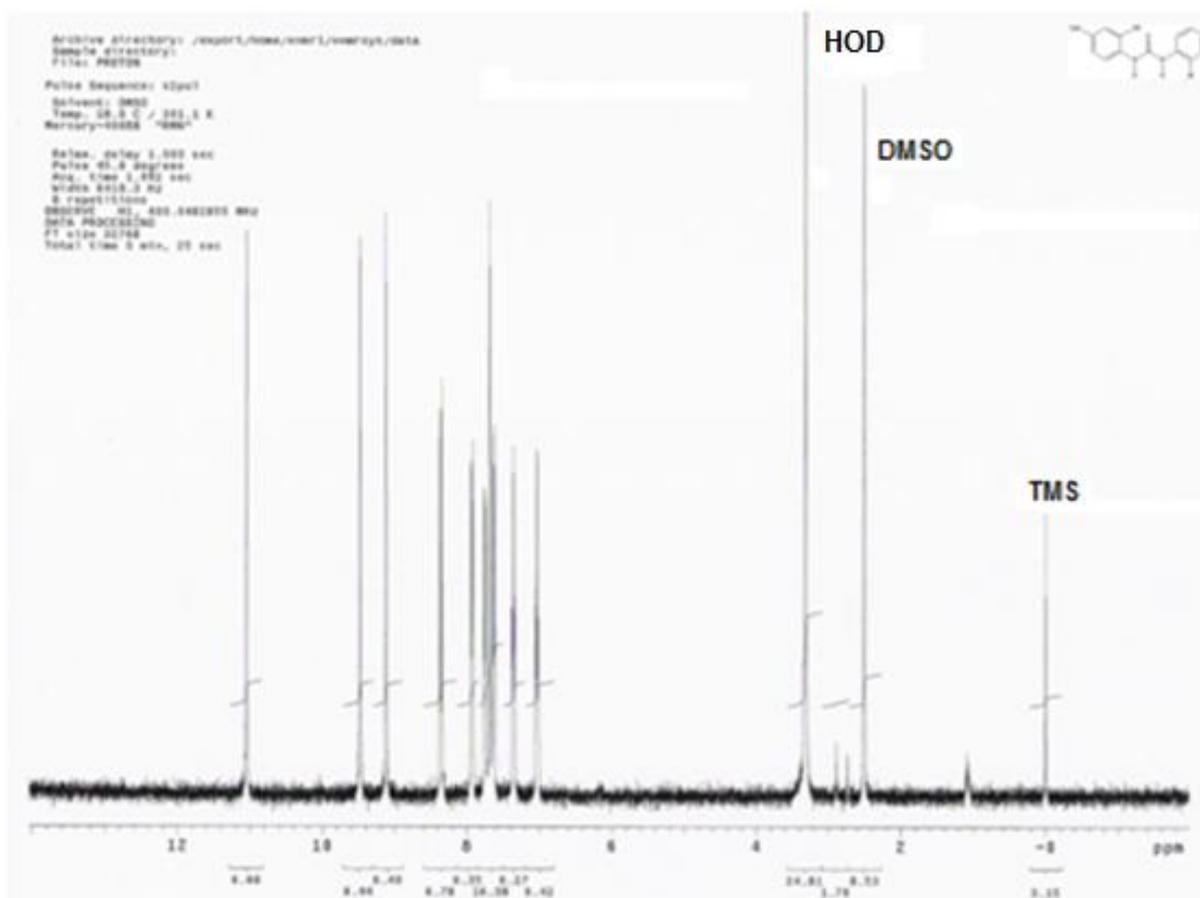
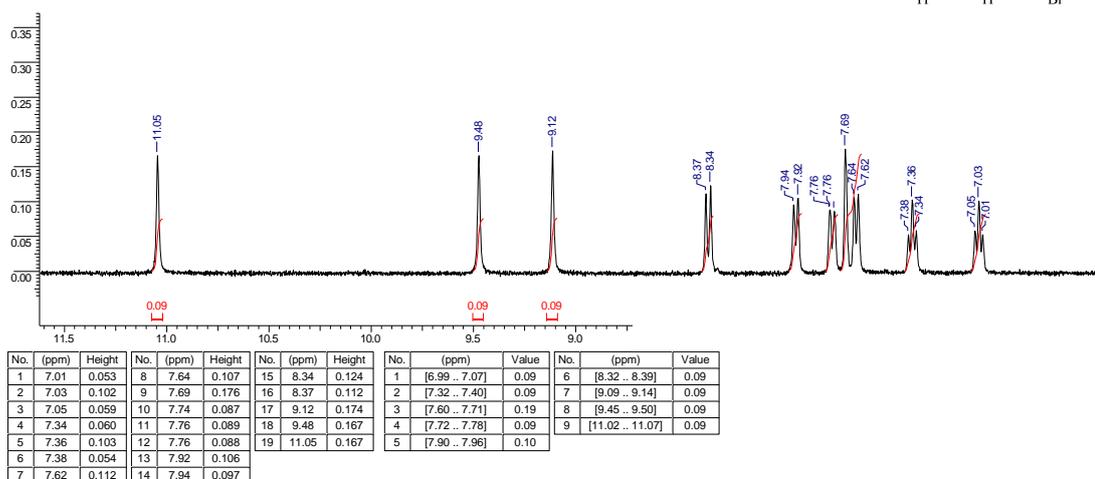
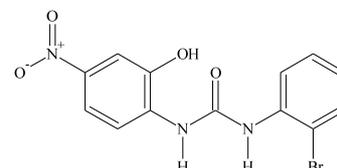


Figura 85 Espectro de ^1H -RMN do SB225002 em DMSO-d_6 .

Abaixo podemos observar a expansão da região entre 6,5 – 11,5 ppm referente ao hidrogênios do SB225002 (Figura 86).

Acquisition Time (sec)	1.9924	Comment	Imported from VNMR	Date	Jun 21 2004	Frequency (MHz)	400.05
Nucleus	¹ H	Number of Transients	8	Original Points Count	12772	Points Count	16384
Temperature (grad C)	28.000	Solvent	DMSO	Sweep Width (Hz)	6410.26		



C:\Documents and Settings\PClealMeus\documents\espectros\sb225002\fid.txt

Figura 86 Espectro de ¹H-NMR do SB225002 expandido 6,5-11,5 ppm (ACD/SpecManager Ver. 4.09/21 Set. 1999, Advanced Chemistry Development Inc.).

O espectro de ¹H-RMN do SB225002 (Figura 86) apresenta um simpleto com deslocamento de 11,05 (ppm) correspondente ao hidrogênio da hidroxila (OH). Os dois simpletos em 9,48 e 9,12 (ppm) correspondem aos hidrogênios dos grupos NH. Os dubletos 8,37-8,34 e 7,94-7,92 (ppm) correspondem aos hidrogênios do anel contendo o grupo nitro. O dubleto em 7,76 (ppm) corresponde ao hidrogênio do anel contendo bromo. O simpleto em 7,69 (ppm) corresponde ao hidrogênio do anel contendo o grupo nitro. O dubleto em 7,64-7,62 (ppm) corresponde ao hidrogênio do anel contendo bromo.

Os dois tripletos em 7,36 e 7,03 (ppm) correspondem ao hidrogênios do anel contendo bromo. Somando os valores de todas as integrais dos sinais

correspondentes aos hidrogênios do SB225002, temos o valor de 0,83 que foi dividido pelo número total (10 H) da molécula resultando um valor de $0,083 \cong 0,09$ para cada hidrogênio, como observamos no espectro (Figura 86).

O espectro de massas (Figura 87) foi obtido via infusão direta (via seringa) na probe “eletrospray” (ESI) no modo full scan negativo (ESI-IT-MSⁿ) equipamento Varian 500MS Ion Trap.

O átomo de bromo existe em duas formas isotópicas ^{79}Br e ^{81}Br (em aproximadamente 50%-50%). Uma molécula do bromo (Br_2) pode ser composta de 2 átomos de ^{79}Br , ou de dois átomos de ^{81}Br , ou de um átomo de ^{79}Br e de um átomo de ^{81}Br . Estatisticamente, 25% de moléculas do bromo apresentam-se $^{79}\text{Br}-^{79}\text{Br}$, 25% será $^{81}\text{Br}-^{81}\text{Br}$ e 50% será $^{79}\text{Br}-^{81}\text{Br}$. Os picos em um espectro massas refletem esta abundância relativa das moléculas diferentes contendo bromo de diferentes massas.

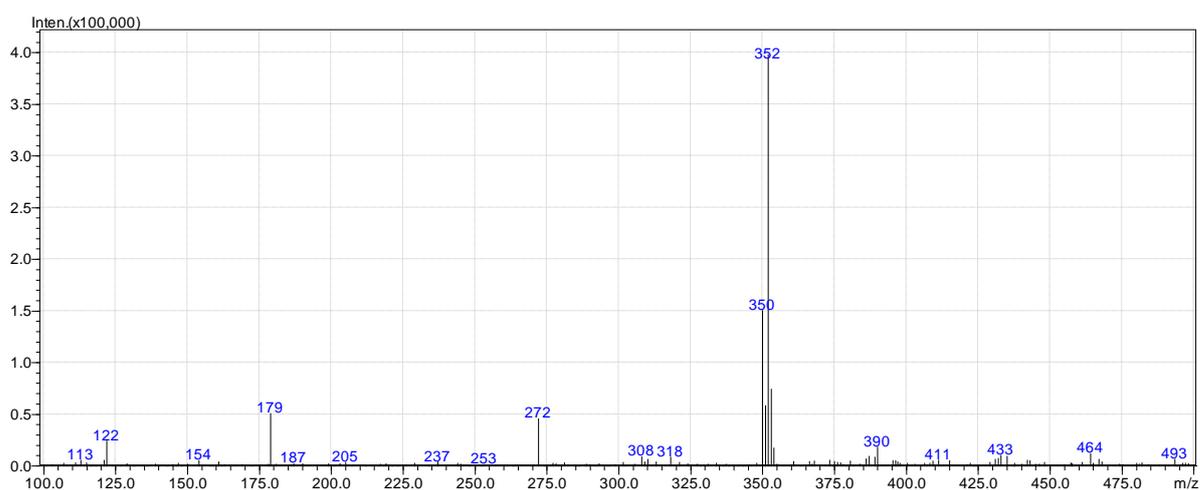


Figura 87 ESI-IT-MSⁿ do SB225002 via infusão direta no modo full scan negativo.

O SB225002 foi obtido com bom rendimento assim como seus 33 análogos sintéticos. Os dados de rendimento, ponto de fusão, r.f., infravermelho, espectro de massas e espectros de $^1\text{H-NMR}$ dos compostos sintetizados foram apresentados na parte experimental.

A confirmação estrutural das N,N'-diariluréias foi realizada através de análises espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio ($^1\text{H-RMN}$), Infravermelho (IV), ponto de fusão e espectrometria de massas para o SB225002, conforme descrito na parte experimental. Descrevemos a caracterização do SB225002, uma vez que para as outras N,N'-diariluréias os resultados foram semelhantes. Os valores de CLog P foram calculados usando o programa (CHEMDRAW[®] ULTRA – Cambridgesoft 1985-2003).

5.2 Mecanismo geral da reação de uma amina aromática com isocianato de fenila e mecanismo de formação do diazometano.

Neste caso a anilina adiciona ao grupo carbonil e ocorre a subsequente formação da N,N'-difeniluréia (Figura 88).

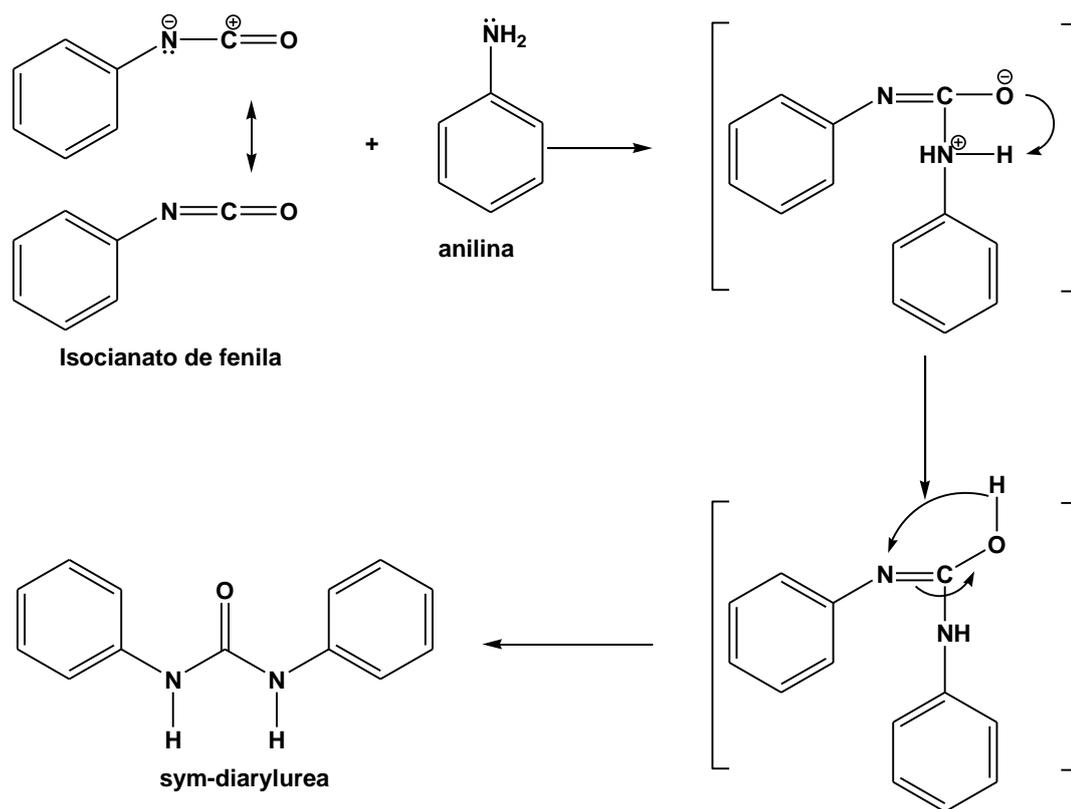


Figura 88 Mecanismo geral da reação de formação da N,N'-difeniluréia (KUTEPOV, 1962), para comparação (SACHELL, 1975).

Na Figura 89 apresentamos o mecanismo de formação do diazometano a partir do Diazald.

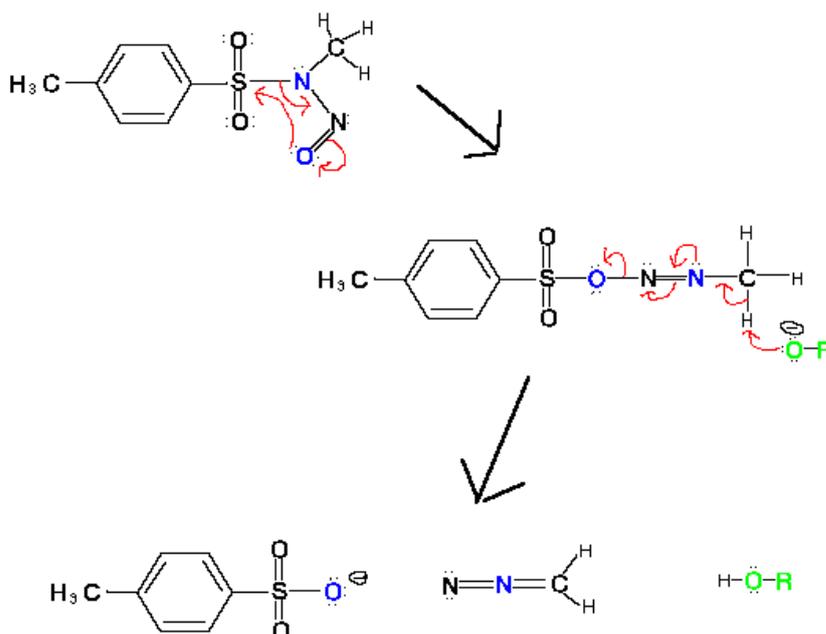


Figura 89 Mecanismo de formação do diazometano a partir do Diazald® (MOORE, 1961).

5.3 Síntese Química e relação estrutura e atividade

As alterações realizadas nos compostos sintetizados foram avaliadas e comparadas com os dados obtidos para o SB220002 anteriormente. Alterar as propriedades físico-químicas (como por ex. Log P), alteram diretamente os parâmetros de ADME (administração, metabolismo e excreção) *in vivo*.

Neste estudo não foram avaliadas as características de administração, metabolismo e excreção (ADME), mas somente o efeito do tratamento dos animais com os compostos análogos sintéticos antes da injeção intraplantar de carragenina e a redução do número de retiradas da pata como um indicativo no efeito anti-hipernociceptivo dos compostos sintetizados.

Para avaliar um possível candidato a fármaco, ensaios pré-clínicos toxicológicos e farmacocinéticos devem ser realizados. Pois de nada adianta encontrarmos um potente inibidor seletivo para um alvo terapêutico se ele não apresentar características físico-químicas adequadas, baixa toxidez para se tornar possivelmente um fármaco para uso em clínica médica.

Os compostos sintéticos que apresentaram porcentagem (%) de inibição maior do que o valor obtido para o SB225002 ($52 \pm 3\%$ de inibição); foram avaliados na dose de 1mg/Kg frente à hipernocicepção induzida pela carragenina e a curva dose resposta foi avaliada para obter o valor da DI_{50} somente para os compostos com maior porcentagem de inibição.

Este estudo foi conduzido para fins de investigação acadêmica e não contempla fins comerciais, pois os ensaios pré-clínicos somente são realizados para moléculas com elevado grau de interesse comercial.

5.4 Simplificação da estrutura do SB225002.

A simplificação molecular é uma estratégia de uso geral em química medicinal para os compostos de interesse, frequentemente complexos. Onde os grupos essenciais de tal fármaco foram identificados por estudos de relação estrutura e atividade (SARs), a seguir, geralmente podemos rejeitar as partes não essenciais da estrutura sem diminuir a sua atividade. A simplificação é melhor quando realizado em pequenos estágios, sintetizando estruturas mais simples e mantendo os grupos essenciais.

Os compostos A12, A13 e A21 foram sintetizados visando à simplificação da estrutura do SB225002 (Figura 90).

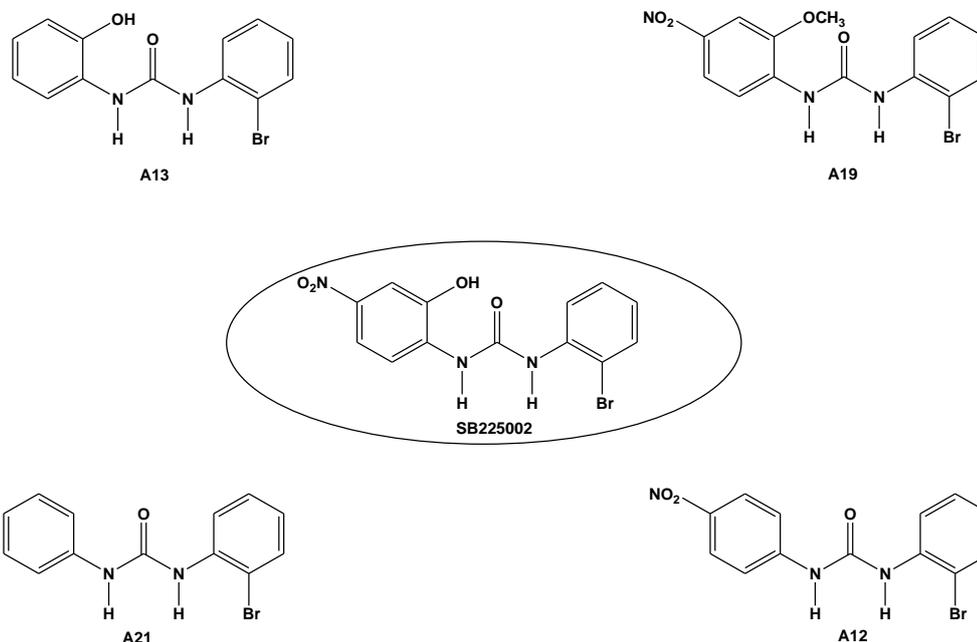


Figura 90 Esquema da síntese dos compostos A12, A13, A19 e A21.

No caso do composto A12, o grupo hidroxila (-OH) na posição 2 foi retirado e a sua atividade foi avaliada e comparada com o valor obtido para o SB225002 ($52 \pm 3\%$ de inibição). Esta simplificação resultou em uma eficácia farmacológica menor ($11 \pm 8\%$ de inibição), no modelo de hipernocicepção induzida pela carragenina. Sugere-se que a hidroxila na posição 2 seja importante para a manutenção da atividade farmacológica e que exerça grande importância na interação com os aminoácidos no receptor transmembrana CXCR2 ou por alteração nas características de ADME (administração, metabolismo e excreção) ou seja sua biodisponibilidade e este composto não consiga chegar ao local desejado para exibir sua ação.

No composto A13, o grupo nitro (-NO₂) foi retirado e comparando este com o SB225002 no modelo de hipernocicepção induzido pela carragenina observou-se

menor eficácia farmacológica ($5 \pm 4\%$ de inibição). Esta redução na atividade sugere que o grupo nitro na posição 4 exerce um importante papel na manutenção da atividade bem como na interação com os aminoácidos do receptor transmembrana CXCR2 ou por alteração nas características de (ADME) ou seja sua biodisponibilidade.

No composto A21, retirou da estrutura original do SB225002 o grupo hidroxila (-OH) na posição 2 e o grupo nitro (-NO₂) na posição 4 e o composto apresentou menor eficácia farmacológica ($28 \pm 5\%$ de inibição), frente ao modelo de hipernocicepção induzido pela carragenina, reforçando os dados obtidos para os compostos A12 e A13, onde o grupo hidroxila e o grupo nitro sugerem um importante papel na estrutura para a manutenção da atividade farmacológica.

O composto A19 foi avaliado realizando-se uma mudança do substituinte na hidroxila (-OH) original da molécula de SB225002 pela inserção de um grupo metoxila (-OCH₃). Isto pode bloquear interações do tipo hidrogênio. O resultado da metóxilação da hidroxila na posição 2 do composto A19 exibiu eficácia farmacológica menor ($36 \pm 12\%$ de inibição) no modelo de hipernocicepção induzido pela carragenina, reforçando os dados obtidos anteriormente e demonstrando a importância da hidroxila livre nas interações tipo hidrogênio que sugerem com que a atividade farmacológica seja maior.

Podemos concluir que o grupo hidroxila (OH) na posição 2 sugere um papel importante na manutenção da atividade farmacológica, bem como o grupo nitro (-NO₂) na posição 4. A metilação da hidroxila (OH) da posição 2 não resultou em aumento da atividade farmacológica, provavelmente por não fazer interações tipo hidrogênio com os aminoácidos do receptor transmembrana CXCR2 ou por

alteração nas características de (ADME) ou seja sua biodisponibilidade alterado por valores de Log P.

A simplificação estrutural via deleção de substituintes ou a metoxilação da hidroxila na posição 2 para uma molécula com poucos substituintes não foi uma boa estratégia para aumentar a eficácia nestes casos.

5.5 Fusão de anéis

Ao aumentar o número de anéis aromáticos pela fusão ou inserção, podemos às vezes potencializar as interações com os aminoácidos de proteínas ou de receptores, assim aumentando a seletividade frente os mesmos. Podemos aumentar a área de interação, aumentando assim as interações para o sistema aromático no caso do anel naftalênico. Outra idéia possível é que o sistema do anel do 1-naftaleno sugere melhor interação (ligações π) com porções hidrofóbicas do receptor transmembrana CXCR2, do que apenas um anel aromático contendo (2-bromofenila) no caso do SB225002.

Sendo assim optamos pela substituição de parte do SB225002, anel contendo 2-bromofenila por um anel aromático condensado, o 1-naftaleno (Figura 91).

Os resultados apresentados pelo SB225002 no modelo de hipernocicepção induzido pela carragenina foram de $52 \pm 3\%$ de inibição e para o composto A00 foi de $66 \pm 7\%$ de inibição, o que sugere um aumento da eficácia do composto A00. Estes dados sugerem que os compostos derivados do SB225002 contendo um anel aromático condensado tipo naftaleno podem aumentar sua atividade frente ao

modelo de hipernocicepção induzida pela carragenina, apresentando uma boa oportunidade para sintetizar novos compostos mantendo o anel naftalênico e substituindo as aminas aromáticas para avaliar os efeitos dos substituintes frente à hipernocicepção induzida pela carragenina.

Outra opção foi substituir a porção aromática, o anel contendo (2-hidroxi-4-nitrofenila) por um anel aromático condensado o 1-naftaleno obtendo o composto A16 e avaliar a sua atividade biológica frente à hipernocicepção induzida pela carragenina. O resultado para o composto A16 foi de $60 \pm 10\%$ de inibição, comparado com o SB225002 ($52 \pm 3\%$ de inibição), estes fatos sugere que mantendo um dos anéis o 1-naftaleno e o outro anel aromático com substituíntes como neste caso o 2-bromofenila podemos obter resultados importantes para avaliar o efeito dos substituintes nas interações com o receptor transmembrana CXCR2.

O resultado obtido para o composto A18 que foi preparado pela substituição da porção contendo o anel 2-hidroxi-4-nitrofenila por uma amina aromática isenta de substituíntes a anilina, apresentou um resultado de $24 \pm 3\%$ de inibição, comparado com os resultados obtidos para o SB225002. Apresentando assim um efeito menor, como já era esperado, pois a porção substituída com um anel contendo (2-hidroxi-4-nitrofenila) mostrou-se muito importante nos ensaios para a simplificação estrutural do SB225002 (Figura 91).

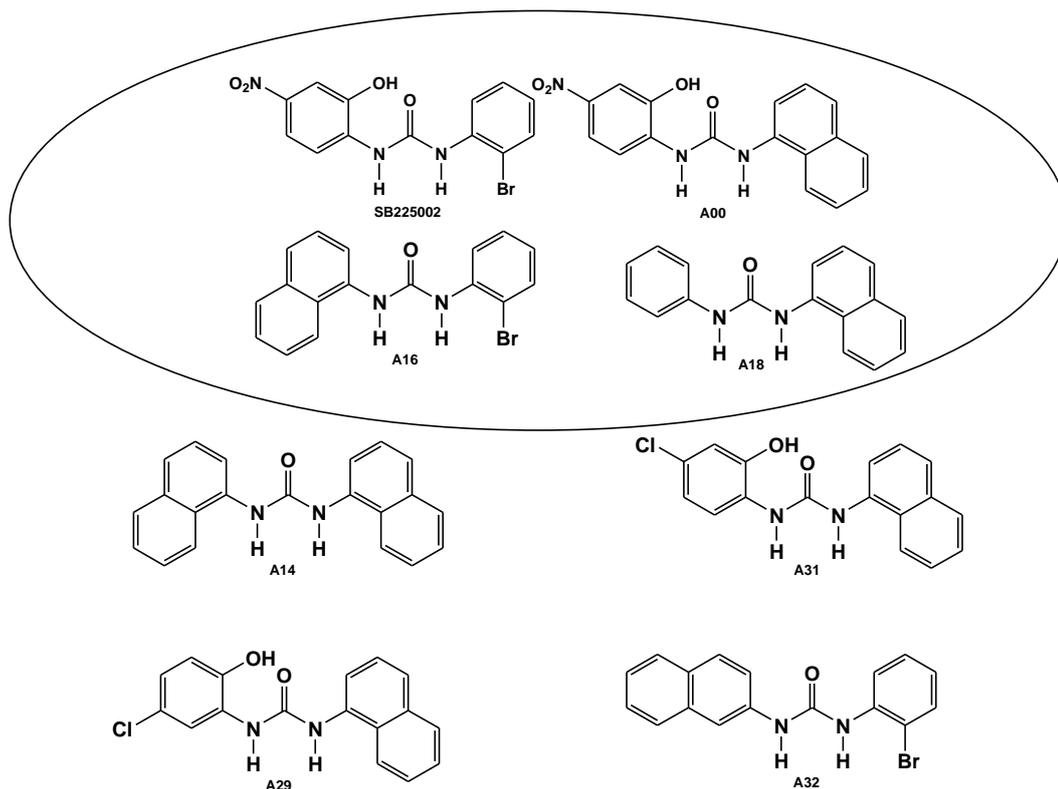


Figura 91 Esquema da síntese dos compostos A00, A14, A16, A18, A29, A30 e A32.

Os resultados obtidos na substituição da porção contendo o anel (2-bromofenila) por 1-naftaleno foi uma estratégia que potencializou a eficiência do composto A00, sendo assim, foi sintetizado o composto A14 onde foi substituído o anel contendo (2-hidroxi-4-nitrofenila) por (1-naftaleno), mas o resultado foi menor ($36 \pm 6\%$ de inibição); como também já era esperado, isto sugere que um dos anéis deve conter substituítes para exibir a ação desejada segundo dados apresentados no item anterior sobre a simplificação estrutural.

Preparamos o composto A29, onde foi mantida a porção 1-naftaleno e foi substituído a amina aromática contendo o anel 2-hidroxi-4-nitrofenila por um anel contendo os substituítes 2-hidroxi-5-clorofenila para avaliar o efeito da mudança do grupo nitro na posição 4 por um cloro na posição 5 e o resultado não apresentou

atividade 0% de inibição, sugerindo que o grupo nitro na posição 4 exerce função fundamental na estrutura para interação com o receptor.

O composto A31 foi preparado pela substituição da porção do anel contendo 2-hidroxi-4-nitrofenila por um anel contendo 2-hidroxi-4-clorofenila, substituindo assim o grupo nitro da posição 4 por um cloro na mesma posição e o resultado foi $10 \pm 4\%$ de inibição, de atividade frente a hipernocicepção induzida pela carragenina, sugerindo que a mudança do grupo nitro por um cloro não exerce aumento na eficácia farmacológica demonstrando que o grupo eletroretirador ($-\text{NO}_2$) favorecem as interações com o receptor transmembrana CXCR2 o grupo cloro ($-\text{Cl}$) não o faz.

Para efeito de comparação da posição 1 (alfa) ou 2 (beta) sintetizamos o análogo A32 onde foi mantido o anel contendo (2-bromofenila) e o outro contendo (2-hidroxi-4-nitrofenila) onde foi substituído pelo anel aromático condensado 2-naftaleno e o resultado foi de ($23 \pm 8\%$ de inibição), comparado com o composto A16 onde o anel aromático condensado foi o 1-naftaleno o qual o resultado foi de ($60 \pm$ sugerindo assim a importância do anel naftalênico na posição 1 apresentar maior eficiência do que na posição 2, reforçando os dados obtidos para o composto A00.

Os dados obtidos sugerem que para aumentar as interações com os aminoácidos do receptor transmembrana do CXCR2 foi manter o anel 1-naftaleno na estrutura e variar as aminas aromáticas substituídas.

Vários compostos análogos foram sintetizados como os apresentados na (Figura 92).

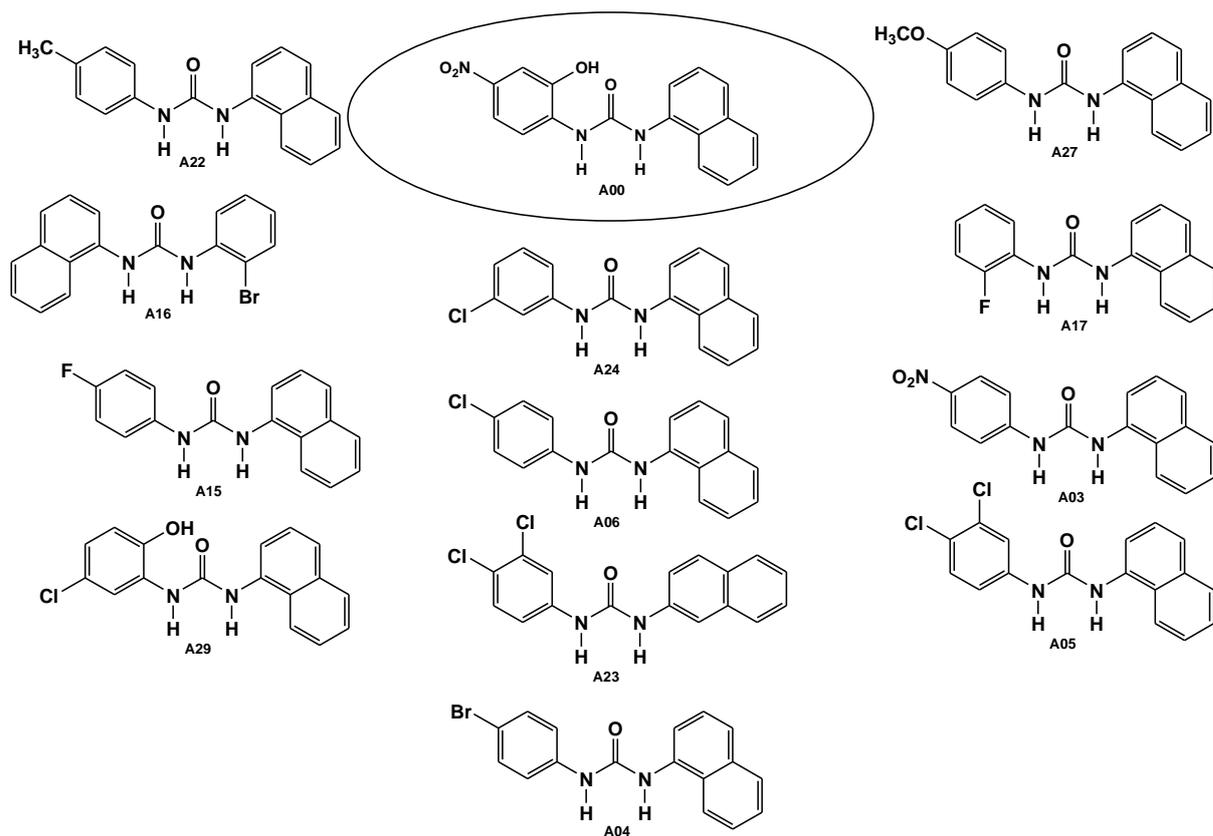


Figura 92 Estrutura dos compostos sintetizados baseados nos dados obtidos para o composto A00.

Os dados obtidos frente ao modelo de hipernocicepção induzido pela carragenina sugerem os compostos análogos A03, A04, A05, A16 como alguns dos mais eficazes (Tabela 5).

5.6 Variação dos anéis heteroaromáticos.

Uma estratégia muito usada para a síntese de compostos que contêm um anel aromático ou heteroaromático sugerem que a substituição do anel original por

uma variação dos anéis heteroaromáticos de diferentes tamanhos e posições diferentes do heteroátomo no anel pode aumentar a eficácia dos análogos sintéticos.

Diferentes companhias farmacêuticas variam o anel central para produzir uma enorme diversidade de novos compostos ativos.

Evidentemente, muitas destas mudanças são meramente maneiras de evitar imitações da patente (“me too” drugs), mas podem frequentemente haver algumas melhorias significativas na atividade, como o aumento da seletividade e os efeitos colaterais podem ser reduzidos.

Uma vantagem de alterar um anel aromático para um anel heteroaromático é que introdução possibilita uma interação extra da ligação de hidrogênio com um local ou uma região apropriada caso esteja disponível na nova estrutura sintetizada (Figura 93).

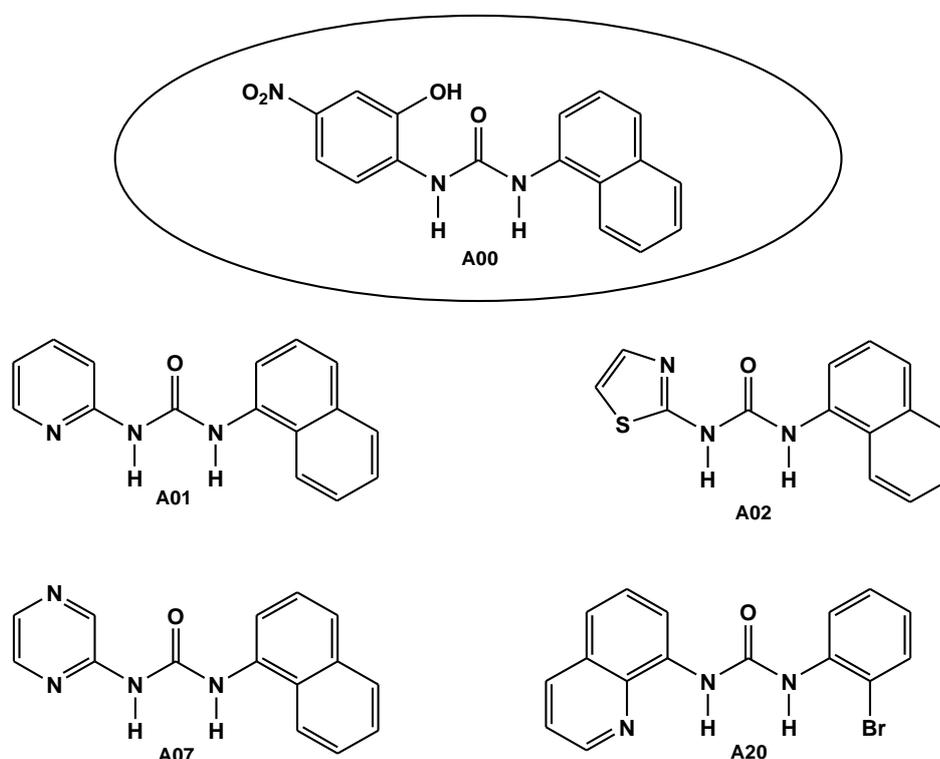


Figura 93 Estrutura dos compostos obtidos pela introdução de anéis heteroaromáticos.

Com os dados obtidos para o composto A00, sintetizamos 04 compostos utilizando a estratégia da introdução de anéis heteroaromáticos disponíveis em nosso laboratório.

No caso do composto A01, o anel contendo (2-hidroxi-4-nitrofenila) foi substituído por um anel tipo 2-aminopiridina e o resultado da atividade frente à hipernocicepção induzida pela carragenina foi de $3 \pm 3\%$ de inibição, um resultado de eficácia baixo comparado a molécula modelo A00 que foi de ($66 \pm 17\%$ de inibição). Neste caso esta a estratégia de introdução de um anel heteroaromático não foi bem sucedida.

O composto A02 foi sintetizado substituindo o anel contendo 2-hidroxi-4-nitrofenila por um anel heteroaromático tipo 2-aminotiazol e o resultado da atividade frente à hipernocicepção induzida pela carragenina foi de ($41 \pm 13\%$ de inibição, resultado inferior comparado ao composto A00 que foi de $66 \pm 17\%$ de inibição).

O composto A07 foi sintetizado substituindo o anel contendo 2-hidroxi-4-nitrofenila por um anel heteroaromático tipo 2-aminopirazina e o resultado da atividade frente à hipernocicepção induzida pela carragenina foi de $57 \pm 4\%$ de inibição, sugerindo um bom resultado quando comparado ao composto A00 que foi de $66 \pm 17\%$ de inibição.

Sintetizamos também o composto A20, substituímos o anel contendo 2-hidroxi-4-nitrofenila por um anel heteroaromático do tipo 8-aminoquinolina e foi mantido o anel contendo 2-bromofenila. O resultado da atividade frente à hipernocicepção induzida pela carragenina foi de $15 \pm 7\%$ de inibição, resultado inferior ao obtido para o análogo A00 que foi de $66 \pm 17\%$ de inibição.

Os resultados apresentados pela substituição de um anel por compostos heteroaromáticos não foi bem representando devido à pequena quantidade de compostos sintetizados. Devido à variedade de precursores heteroaromáticos disponíveis em nosso laboratório ser pequena e não sintetizamos uma grande variedade de estruturas.

Mas podemos observar que no caso do composto A07 quando foi introduzido um anel heteroaromático contendo 2-aminopirazina, sua atividade foi muito parecida com o análogo A00, sugerindo que anéis heteroaromáticos podem ser uma estratégia importante no desenvolvimento de novos compostos antagonistas do receptor transmembrana CXCR2 quando se faz uso de uma grande quantidade e variedade de anéis heteroaromáticos aumentando assim a diversidade estrutural para ser avaliada frente ao modelo em questão.

5.7 Extensão da cadeia (CH₂)_n.

Alguns fármacos contem dois grupos obrigatórios importantes ligados por uma cadeia, neste caso é possível que o comprimento da cadeia não seja ideal para a melhor interação com o sítio ativo do receptor ou enzima. Conseqüentemente, encurtar ou alongar o comprimento das cadeias pode ser uma estratégia útil a se tentar para potencializar a atividade dos compostos antagonistas do receptor transmembrana CXCR2.

Apresentamos a síntese de 04 exemplos (Figura 94) de compostos com extensão da cadeia, introduzindo espaçadores tipo metileno (CH_2)_n, com os reagentes disponíveis em nosso laboratório.

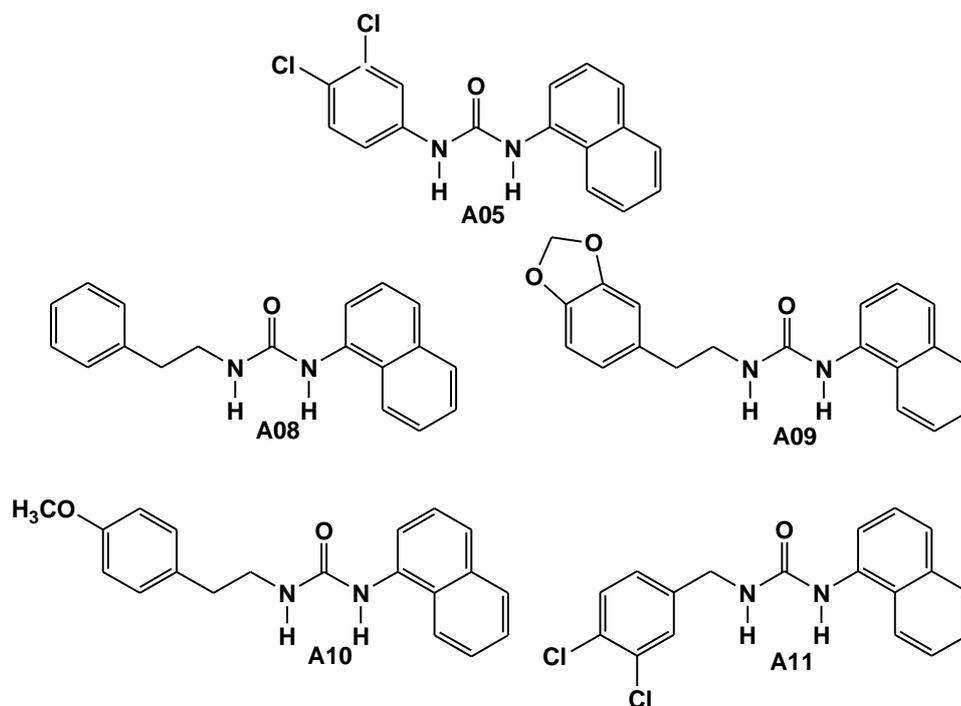


Figura 94 Estrutura dos compostos sintetizados usando a estratégia de extensão da cadeia.

Frente aos resultados obtidos para o análogo A05 ($85 \pm 7\%$ de inibição), foi sintetizado o análogo A08 e o resultado da atividade frente à hipernocicepção induzida pela carragenina foi de ($66 \pm 7\%$ de inibição). Este anel não possui nenhum substituinte e foi introduzido um aumento de duas unidades metilênicas ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) extendendo a cadeia. Podemos observar que os resultados obtidos sugerem para o análogo A08 que o aumento da cadeia pode favorecer interações antes limitadas pela extensão da molécula bem como aumentar graus de liberdade.

Apresentamos os dados obtidos para o análogo A09, onde foi utilizado a (3,4-metilenodioxifenetilamina), introduzimos duas unidades metilênicas ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$)

extendendo a cadeia e o anel ainda possui o grupo (3,4-metilenodioxo um farmacóforo natural), os resultados obtidos com atividade farmacológica frente ao modelo de hipernocicepção induzido pela carragenina foram de ($60 \pm 3\%$ de inibição), sugerindo que a extensão da cadeia e a introdução de grupos substituintes pode ser uma boa estratégia para a obtenção de compostos farmacologicamente mais eficientes e potentes.

No caso do análogo A10 os resultados foram ($3 \pm 3\%$ de inibição), neste caso também introduzimos um aumento de duas unidades metilênicas ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) extendendo a cadeia juntamente com um substituinte metoxila na posição 4 ($4-\text{OCH}_3$) e o resultado foi o oposto do obtido para o análogo A08. Isto indica que a extensão da cadeia pode favorecer interações fornecendo um acréscimo na atividade e também é dependente dos grupos substituintes no anel aromático para uma melhor interação com o sítio ativo ou porção onde os aminoácidos do receptor transmembrana CXCR2 interagem com a molécula do antagonista.

O resultado do composto análogo sintético A11 foi ($38 \pm 8\%$ de inibição) e os resultados foram comparados com o análogo A05 ($85 \pm 7\%$ de inibição). No caso do análogo A11 foi introduzida uma unidade metilênica ($-\text{CH}_2-$) e mantido os substituintes (3,4-dicloro) com a mesma substituição do análogo A05.

Os resultados obtidos sugerem que o aumento de uma unidade metilênica mantendo os substituintes (3,4-dicloro) pode não ter a distância mínima suficiente para realizar as interações para que o composto exiba sua atividade frente ao receptor.

Uma sugestão para a síntese de um novo composto análogo poderia ser a introdução de duas unidades metilênicas mantendo os substituintes (3,4-dicloro), ou

seja usar a (3,4-diclorofenetilamina) e comparar com os análogos A08 e A09 que forneceram um bom resultado.

Os resultados obtidos sugerem que a extensão da cadeia pode ser uma boa estratégia para a síntese de compostos farmacologicamente mais potentes, pois a introdução dos espaçadores metilênicos (-CH₂-) na molécula faz com que a mesma adquira maior mobilidade, favorecendo interações com sítios ativos no receptor transmembrana CXCR2. Uma vez que o número de compostos sintetizados também foi pequeno devido à disponibilidade de reagentes.

5.8 Método manual de Topliss.

Em determinadas situações fica muito difícil ou impraticável fazer uma grande quantidade de estruturas exigidas para determinar uma equação de Hansch. Por exemplo, a rota sintética envolvida pode ser difícil e somente algumas estruturas podem ser sintetizadas em uma escala limitada. Nestas circunstâncias, seria útil testar os compostos para a uma determinada atividade farmacológica e usar os resultados dos compostos sintetizados para prever a estrutura do análogo sintético seguinte.

O esquema manual de Topliss é um diagrama de fluxo que permite que tal procedimento seja seguido (Figura 95).

O esquema foi elaborado considerando a hidrofobicidade π e os fatores eletrônicos σ de vários substituintes e são projetados tais que o melhor substituinte pode ser encontrado mais facilmente.

O esquema manual de Topliss para substituintes aromáticos supõe que o composto padrão foi testado para uma dada atividade farmacológica e contém um anel aromático mono-substituído. O primeiro analogo do esquema é o derivado isento de substituintes no anel e o próximo é 4-cloro.

O análogo sem substituintes foi sintetizado bem como o análogo contendo 4-cloro (4-Cl) e a atividade farmacológica foi avaliada e comparada. Existem três possibilidades. O análogo 4-cloro pode exibir menor atividade (L), atividade igual (E), ou maior atividade (M) do que o composto inicial (isento) de substituintes. O resultado da atividade observado determinará em que via do esquema manual de Topliss os próximos compostos serão sintetizados.

Se a atividade biológica aumentar (M) a via a ser seguida é a síntese do análogo 3,4-dicloro. Se, de um lado, a atividade permanecer a mesma, a via a seguir (E) é a síntese sugerida é do análogo 4-metil . Finalmente, se a atividade for menor (L) a via sugerida é a do análogo 4-metóxi.

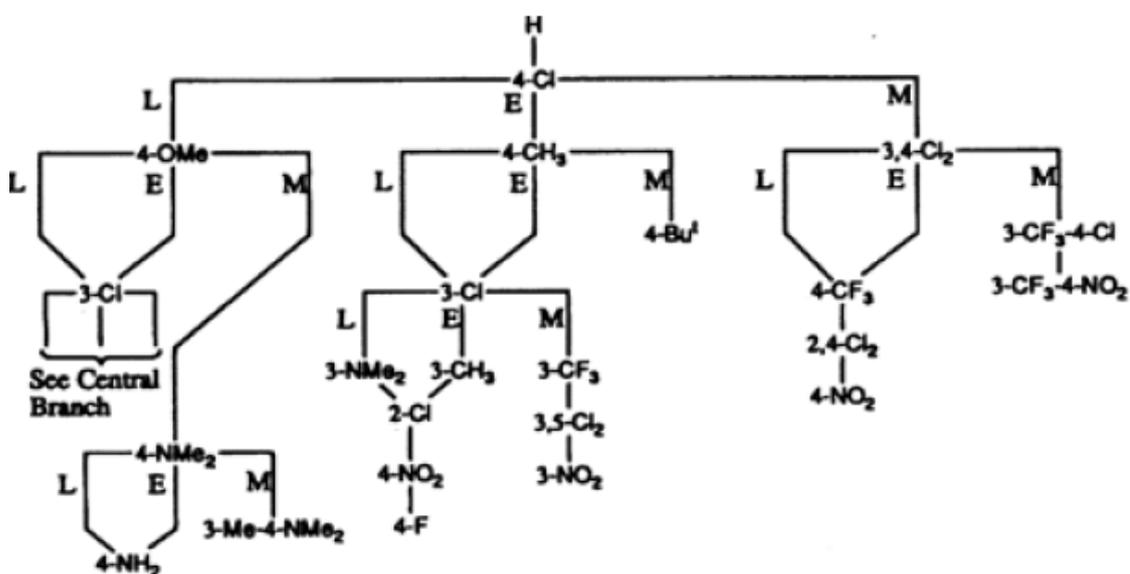


Figura 95 Árvore de decisão de Topliss para substituintes aromáticos, M = mais ativo, E = igual atividade e L = menos ativo, comparados com o composto (H) inicial.

Abaixo na Figura 96 apresentamos as estruturas sintetizadas segundo o método manual de Topliss para os compostos análogos frente ao modelo de hipernociceção induzido pela carragenina.

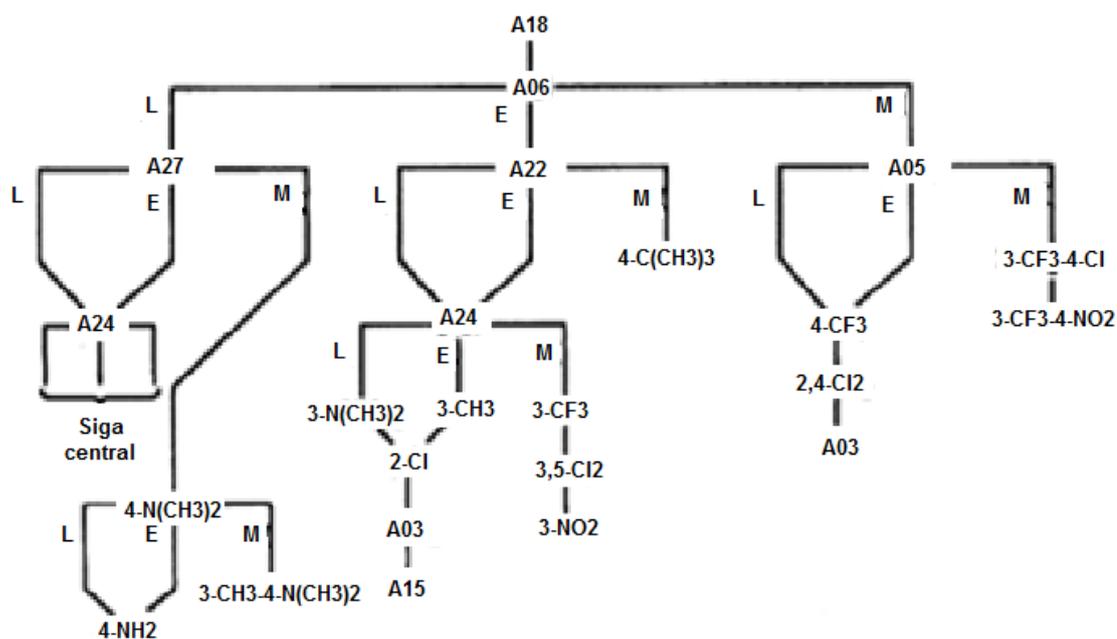


Figura 96 Estrutura dos compostos sintetizados (A18, A06, A27, A22, A05, A24, A03 e A15) utilizando o método manual de Topliss.

O análogo (isento) de grupo substituinte (A18) apresentou uma porcentagem de inibição frente ao modelo de hipernociceção induzido pela carragenina de $24 \pm 3\%$ de inibição.

A síntese do análogo A06 (4-Cloro) forneceu um resultado de atividade frente à hipernociceção induzida pela carragenina de $6 \pm 3\%$ de inibição.

Segundo o esquema manual de Topliss o análogo (A27) deve ser sintetizado e avaliado frente ao modelo de hipernociceção induzido pela carrageninae comparado com o análogo A06 (4-Cl). A síntese do análogo A27 contendo um substituinte 4-metóxi (4-OCH₃) forneceu um resultado de atividade frente à

hipernocicepção induzida pela carragenina de $0 \pm 0\%$ de inibição sugerindo segundo o esquema a síntese do análogo A22.

A síntese do análogo A22 contendo um substituinte 4-metil (4-CH_3) forneceu um resultado de atividade frente à hipernocicepção induzida pela carragenina de ($24 \pm 6\%$ de inibição), sugerindo a síntese do análogo contendo o grupo 4-tercbutil ($4\text{-C(CH}_3)_3$), o qual não foi sintetizado devido a não disponibilidade de reagentes.

A síntese do análogo A05 contendo um substituinte 3,4-dicloro ($3,4\text{-Cl}_2$) forneceu um resultado de atividade frente à hipernocicepção induzida pela carragenina de $85 \pm 7\%$ de inibição. O substituinte cloro tem valores positivos de π e de σ , isso implica que ambas as propriedades são importantes para a atividade biológica. Sugerindo que os próximos análogos a serem sintetizados são:

Segundo o esquema manual de Topllis o análogo A05 contendo os substituintes 3,4-dicloro ($3,4\text{-Cl}_2$) forneceu o melhor resultado ($85 \pm 7\%$ de inibição). sugerindo que os próximos análogos a serem sintetizados são: compostos que devem conter grupos no anel substituintes: 4-trifluorometil (4-CF_3), 2,4-dicloro ($2,4\text{-Cl}_2$) e 4-nitro (4-NO_2) respectivamente.

Somente o análogo A03 contendo um substituinte 4-nitro (4-NO_2) foi sintetizado devido à não disponibilidade de reagentes. O análogo A03 forneceu um resultado de atividade frente à hipernocicepção induzida pela carragenina de $61 \pm 4\%$ de inibição. Estes resultados sugerem que esta via não favorece o aumento da atividade farmacológica.

Assim a outra via do método manual de Topllis sugere a síntese dos análogos contendo os substituintes: 3-trifluorometil-4-cloro ($3\text{-CF}_3\text{-4Cl}$) e 3-trifluorometil-4-nitro

(3-CF₃-4-NO₂) respectivamente que não foram sintetizados devido a não disponibilidade das aminas aromáticas com estes substituintes.

O método manual de Topliss sugeriu a síntese do composto A05 (3,4-Cl₂), o qual apresentou o melhor resultado frente ao modelo de hipernocicepção induzido pela carragenina.

Após avaliação da atividade frente à hipernocicepção induzida pela carragenina os cinco derivados sintetizados segundo método manual de Topliss, foram agrupados em ordem decrescente de eficácia, obtendo-se: **3,4-Cl₂ > 4-H > 4-CH₃ > 4-Cl > 4-OCH₃.**

A validade do esquema de Topliss foi testada avaliando-se os resultados de estruturas e atividade de vários fármacos que já foram relatados na literatura e no presente trabalho sugere a síntese dos compostos contendo grupos substituintes: 3-trifluorometil-4-cloro (3-CF₃-4Cl) e 3-trifluorometil-4-nitro (3-CF₃-4-NO₂), como novos análogos para potencializar a ação frente ao modelo testado (compostos não foram sintetizados devido a não disponibilidade dos reagentes).

5.9 Estrutura dos compostos baseados no análogo A05 com grupos substituintes (3,4-dicloro).

Abaixo na Figura 97 apresentamos os compostos análogos sintetizados baseados no análogo A05.

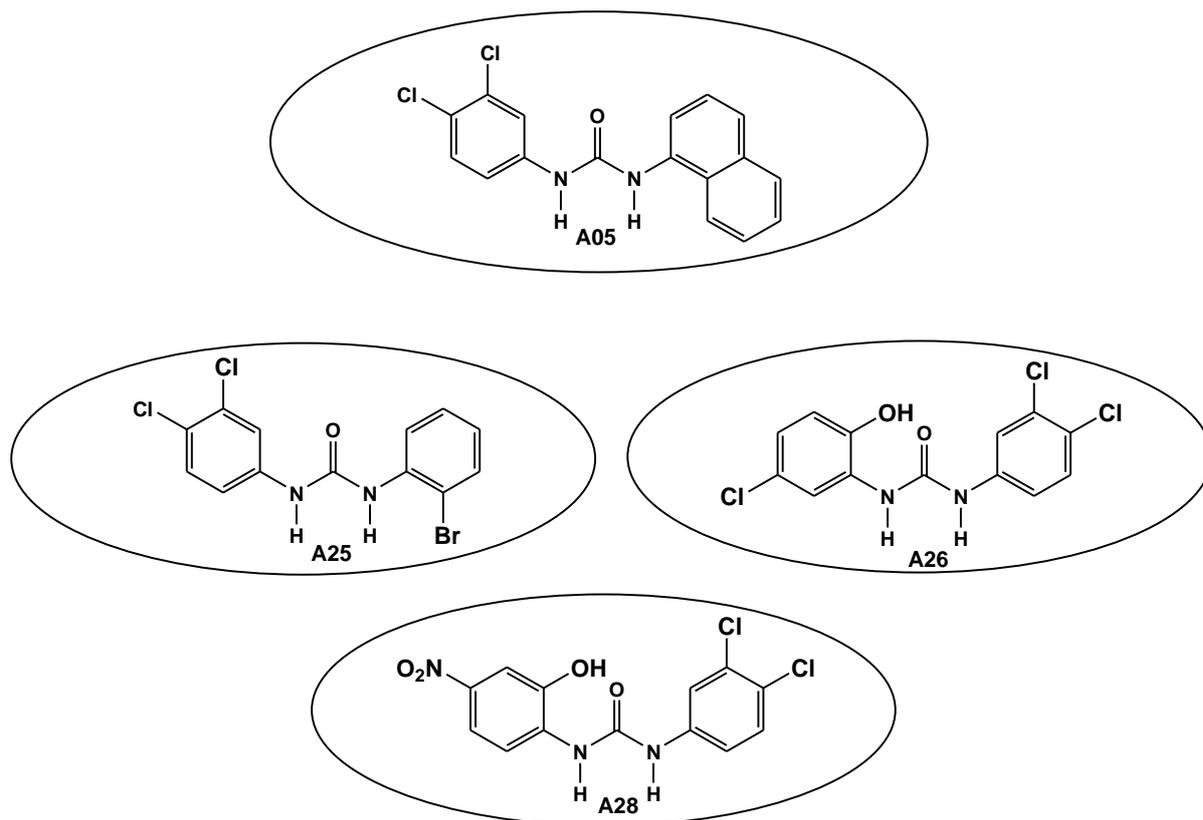


Figura 97 Estrutura dos compostos sintetizados baseados nos resultados do análogo A05.

A síntese do análogo A25 contendo um substituinte 3,4-dicloro (3,4-Cl₂), mantendo o anel contendo 2-bromo (2-Br) forneceu um resultado de atividade frente à hipernociceção induzida pela carragenina de $34 \pm 8\%$ de inibição. Estes resultados indicaram que esta estratégia não aumentou a eficácia da atividade farmacológica.

A síntese do análogo A26 contendo um substituinte 3,4-dicloro (3,4-Cl₂), mantendo o anel contendo 2-hidroxi-5-cloro (2-OH-5-Cl) forneceu um resultado de atividade frente à hipernociceção induzida pela carragenina de $48 \pm 8\%$ de inibição. Estes resultados sugerem que o cloro na posição 5 não deve interagir de maneira adequado com o receptor CXCR2.

A síntese do análogo A28 contendo um substituinte 3,4-dicloro (3,4-Cl₂), mantendo o anel original do SB225002, contendo 2-hidroxi-4-nitro (2-OH-4-NO₂) forneceu um resultado de atividade frente à hipernocicepção induzida pela carragenina de 59 ± 7% de inibição. Este resultado indica que o grupo 4-nitro e 2-hidroxi na molécula original do SB225002 exerce um grande papel na interação com o receptor reforçando os dados obtidos até o presente momento.

Foram considerados bons candidatos os compostos análogos com porcentagem (%) de inibição ≥ do que resultados obtidos para o SB225002 (52 ± 3% de inibição).

5.10 Estrutura dos compostos sintéticos com porcentagem de inibição ≥ (52 ± 3%), resultados obtidos para o SB225002 no modelo de dor induzido pela carragenina.

Para efeitos de comparação da potência frente ao modelo de hipernocicepção induzidos pela carragenina os dados foram expressos como DI₅₀ (µmol/Kg).

Os análogos A00, A03, A04, A05, A07, A08, A09, A16 e A28 apresentaram resultados de potência inferiores ao SB225002, mas sua eficácia foi superior em alguns casos.

Somente os análogos com atividade igual ou superior ao SB225002 foram avaliados frente à curva dose resposta para obtenção dos valores de DI₅₀ (µmol/Kg).

Na (Figura 98) apresentamos a diversidade de estruturas produzidas utilizando algumas ferramentas utilizadas em química medicinal. Podemos observar

que estes compostos apresentam diferentes substituintes, espaçadores metilênicos e valores de CLog P. Isto sugere que o receptor transmembrana CXCR2 que possui 7 “loops” transmembrana interage com moléculas relativamente parecidas produzindo a mesma ação farmacológica seja por melhor interação (afinidade) com o receptor ou maior biodisponibilidade (efeito não avaliado).

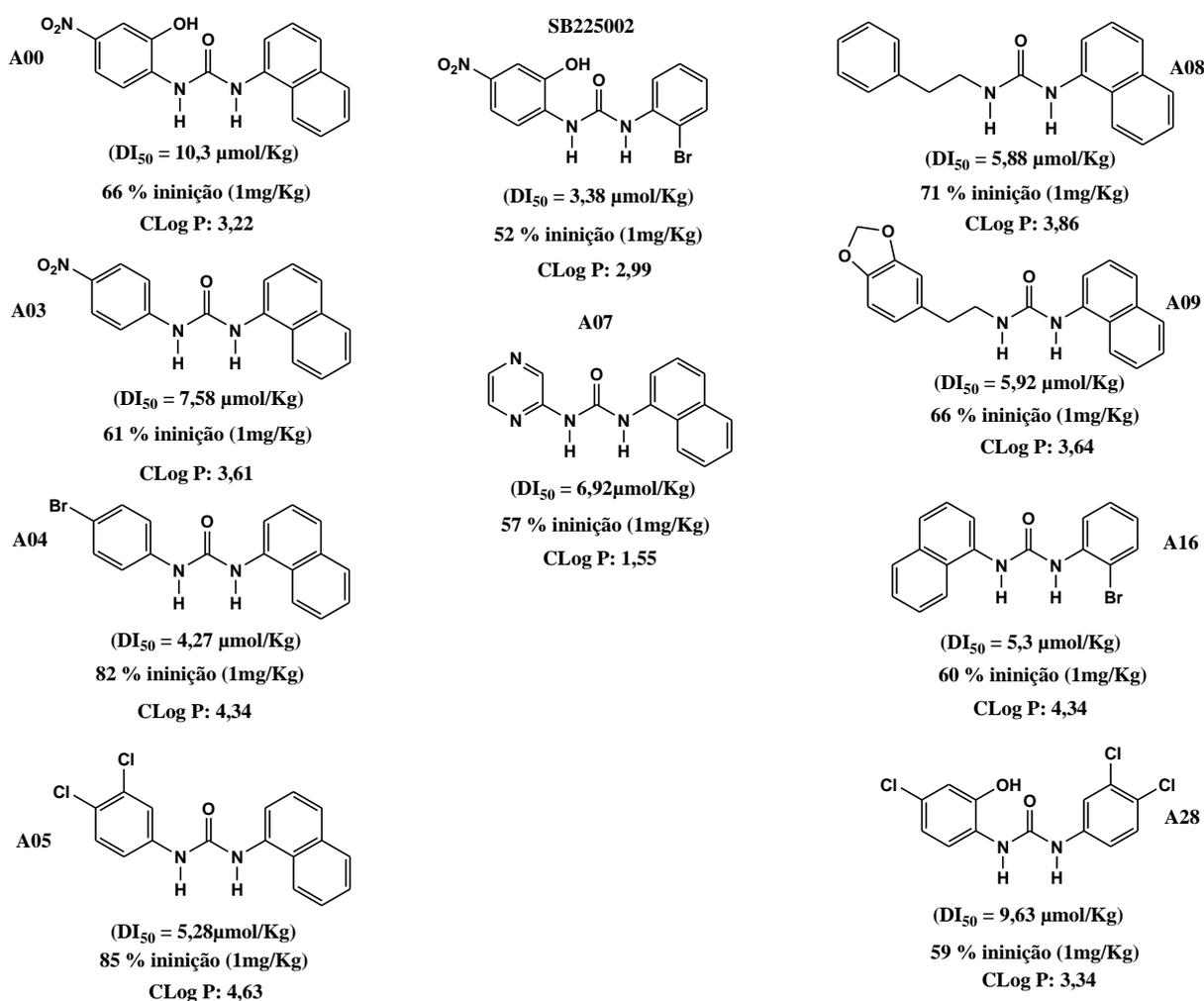


Figura 98 Estrutura dos 09 compostos com porcentagem de inibição \geq ao SB225002 (na dose de 1mg/Kg) frente ao modelo de hipernociceção induzido pela carragenina e seus respectivos valores de DI₅₀ e CLog P.

Os valores de CLog P variam de 1,55 para do análogo A07 à 4,64 para o análogo A05. O valor de CLog P do SB225002 foi de 2,99. Os valores calculados de Log P reforçam e sugerem que não é só o efeito do substituinte responsável pelo aumento ou manutenção da atividade.

O uso das ferramentas descritas no presente trabalho, onde foram sintetizados 33 compostos análogos e que apenas nove dos compostos apresentaram eficácia \geq aos resultados obtidos para o SB225002.

Levando em consideração que o número de estruturas sintetizadas foi pequeno e a diversidade de anéis heterocíclicos também, podemos sugerir que os compostos sintetizados (N,N'-diariluréias) exercem um importante papel nas interações com o receptor transmembrana CXCR2 caracterizado nos testes de hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina.

Os compostos sintetizados apresentam características físico-químicas diferentes e os estudos *in vivo* podem apresentar resultados dependentes da estrutura química, forma de administração, absorção, metabolismo, distribuição nos tecidos, excreção e toxicidade. Todos estes parâmetros devem ser avaliados após a escolha do melhor candidato a se tornar uma substância química com propriedades farmacológicas (um fármaco propriamente dito). O processo de desenvolvimento de um fármaco é um processo muito longo e envolve custos elevados como descrito na Figura 4 na pág. 45.

Os compostos sintetizados não apresentaram potência maior (DI_{50}) do que o SB225002, mas apresentaram maior eficácia em inibir a hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de 1mg/Kg.

5.2 Ensaio Biológico de hipernociceção induzida pela carragenina (comparação entre SB225002 seus 33 compostos análogos sintéticos).

5.2.1 Resultado do SB225002 e dos 33 compostos análogos, frente o modelo de hipernociceção induzido pela carragenina.

Observou-se no Gráfico 01 a melhor resposta do SB225002 (resultados extraídos da curva dose resposta), frente à carragenina no tempo total de 6 horas e avaliado em 3 horas no pico máximo da ação da carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $52 \pm 3\%$ de inibição. Para ilustrar o gráfico, os dados de inibição do SB225002 foram plotados na cor laranja. Na Tabela 05 apresentamos os valores da porcentagem inibição em 3 horas, comparando com os 33 análogos sintetizados.

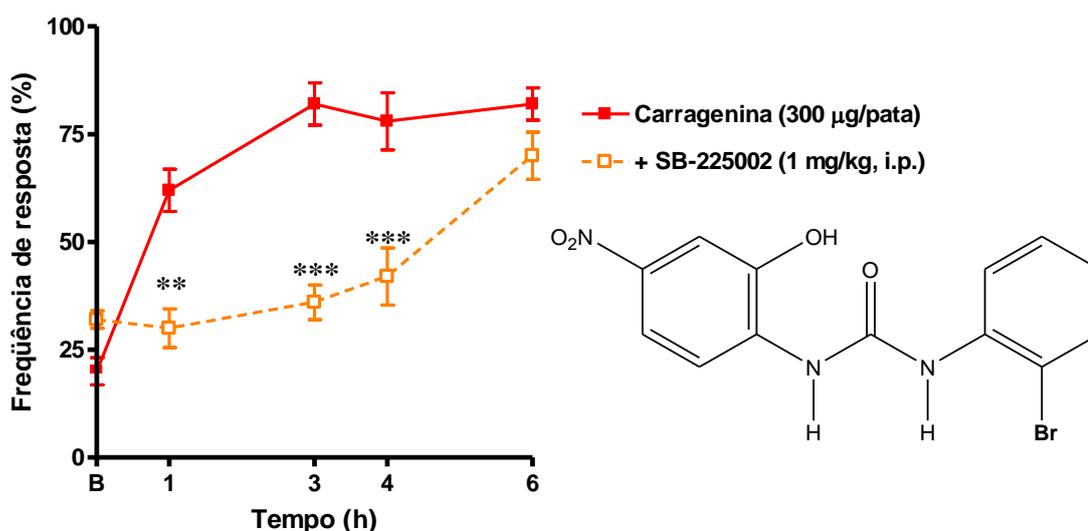


Gráfico 1 Efeito do tratamento com SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.2 Resultado do análogo A00 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 02, o resultado do análogo A00, comparado com o SB225002 frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $66 \pm 7\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo apresenta boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

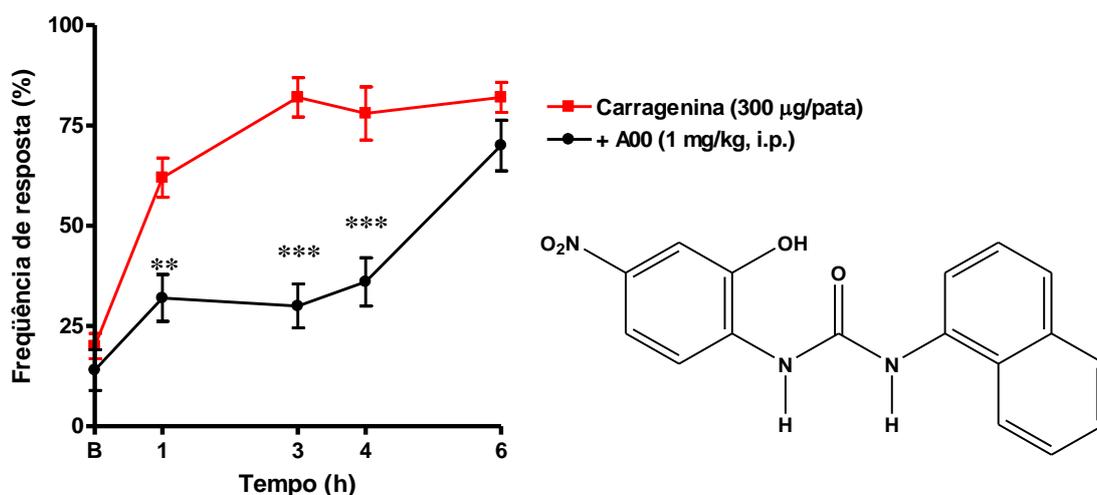


Gráfico 02 Efeito do tratamento com o análogo A00 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.3 Resultado do análogo A01 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 03, o resultado do análogo A01, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $3 \pm 3\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo não apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

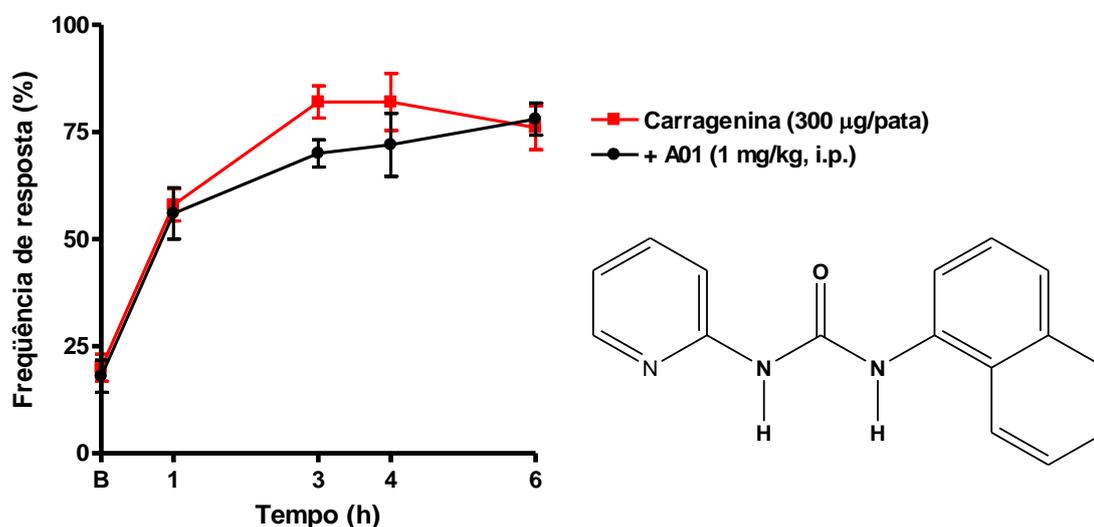


Gráfico 03 Efeito do tratamento com o análogo A01(1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.4 Resultado do análogo A02 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 04, o resultado do análogo A02, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $41 \pm 13\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo não apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

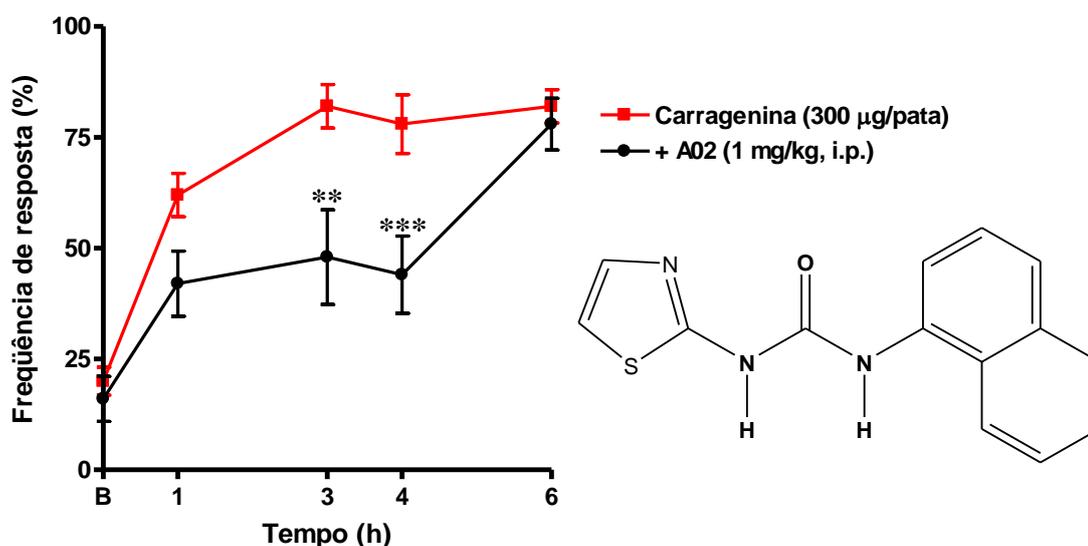


Gráfico 04 Efeito do tratamento com o análogo A02 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.5 Resultado do análogo A03 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 05, o resultado do análogo A03, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $61 \pm 4\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo apresenta boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

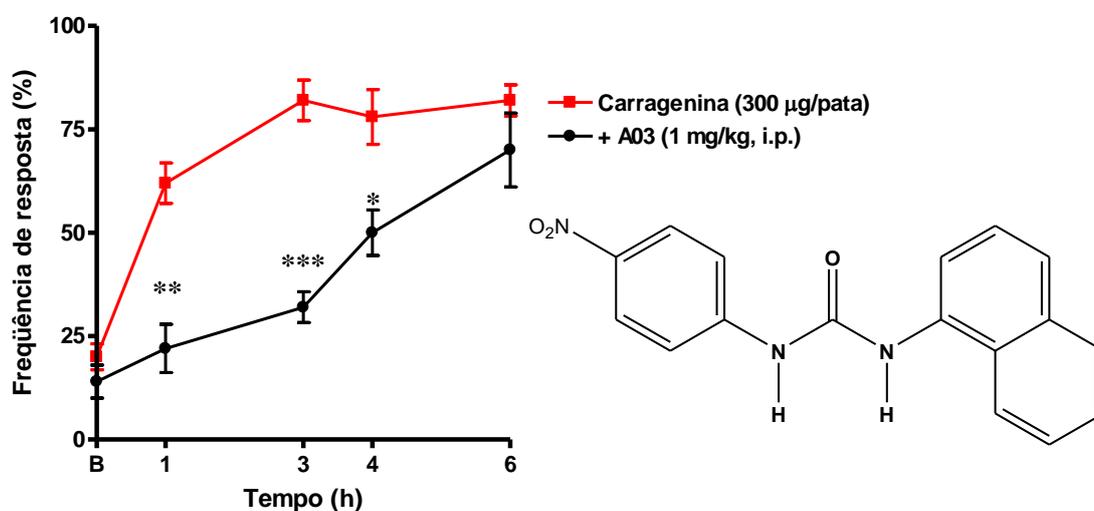


Gráfico 5 Efeito do tratamento com o análogo A03 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.6 Resultado do análogo A04 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 06, o resultado do análogo A04, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $82 \pm 6\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo apresenta maior inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

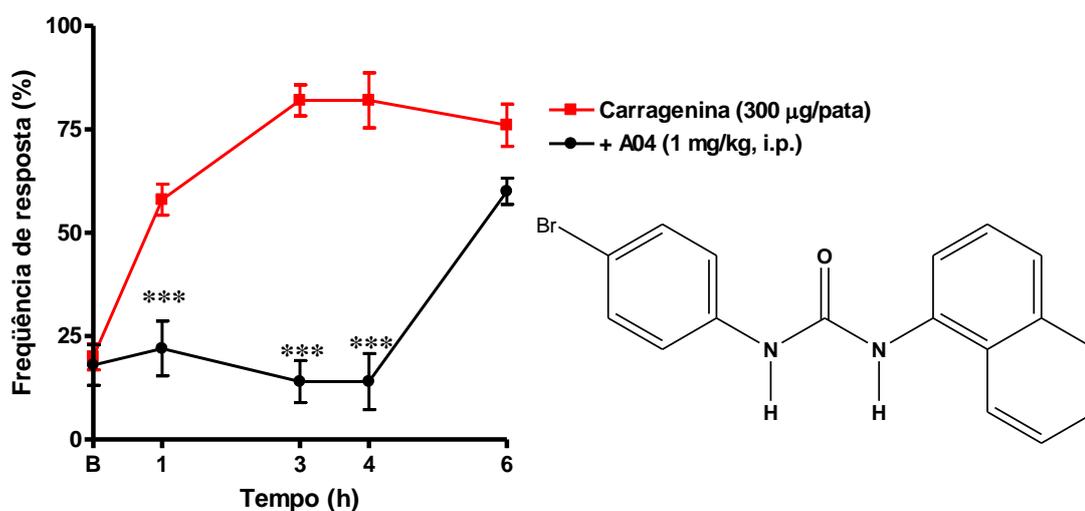


Gráfico 6 Efeito do tratamento com o análogo A04 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.7 Resultado do análogo A05 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 07, o resultado do análogo A05, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $85 \pm 7\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo apresenta melhor inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

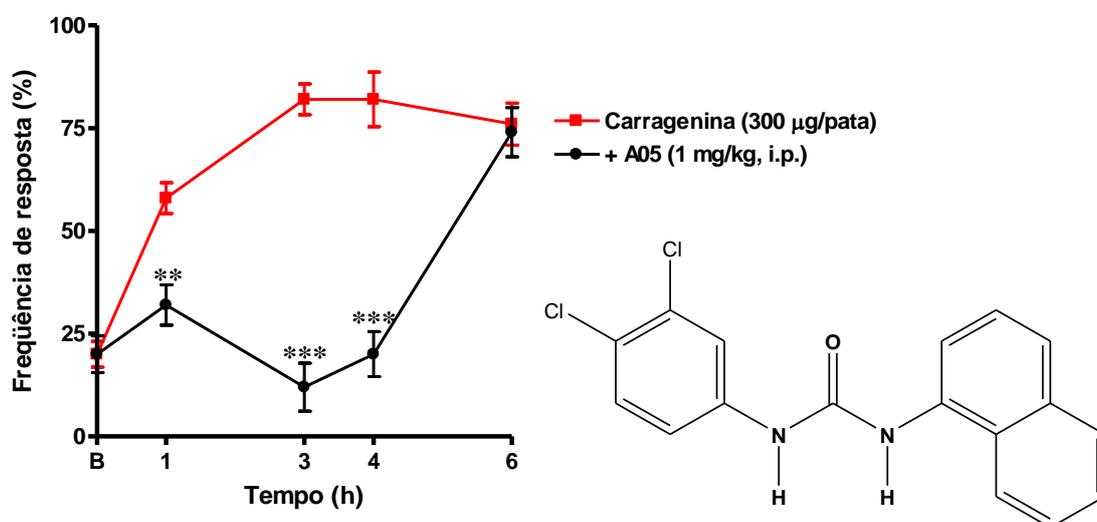


Gráfico 7 Efeito do tratamento com o análogo A05 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.8 Resultado do análogo A06 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 08, o resultado do análogo A06, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $6 \pm 3\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo não apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

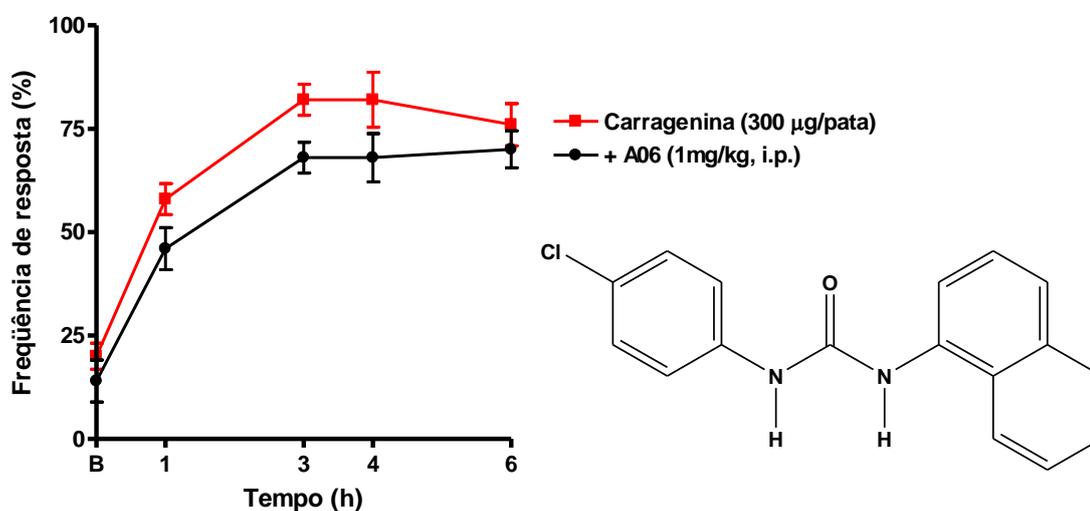


Gráfico 8 Efeito do tratamento com o análogo A06 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.9 Resultado do análogo A07 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 09, o resultado do análogo A07, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $54 \pm 7\%$ de inibição. Para ilustrar o gráfico, acrescentamos os dados de inibição do SB225002 na cor laranja. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

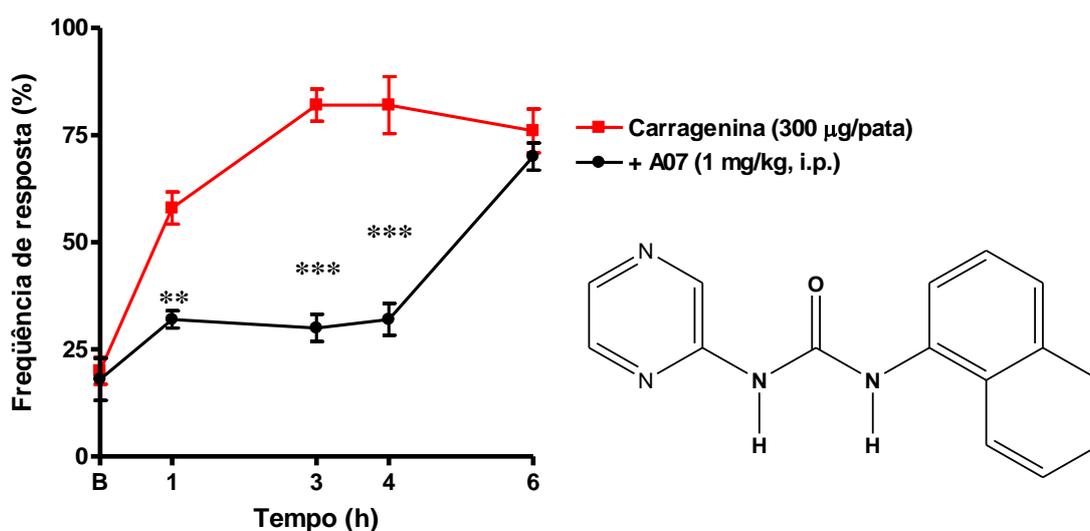


Gráfico 9 Efeito do tratamento com o análogo A07 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.10 Resultado do análogo A08 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 10, o resultado do análogo A08, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $71 \pm 5\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

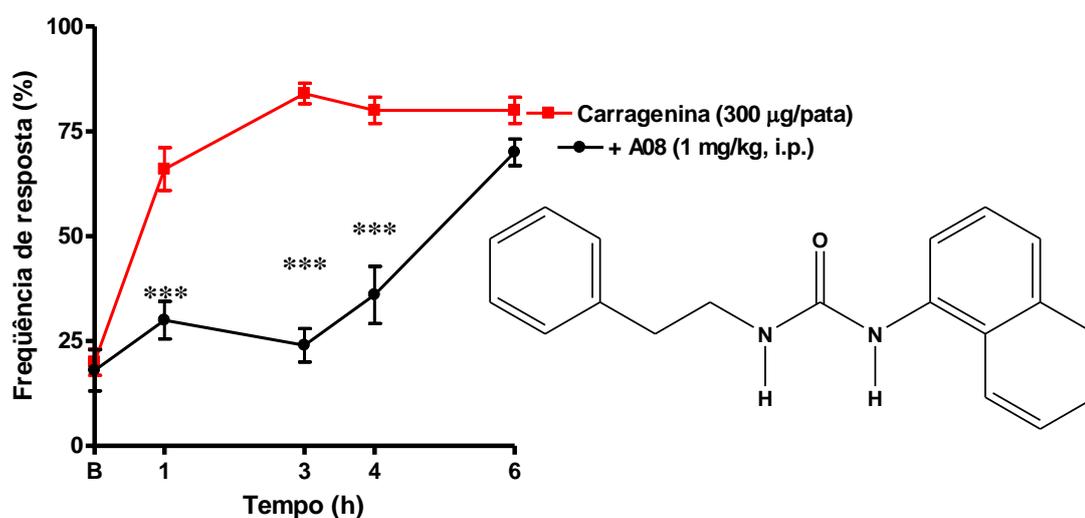


Gráfico 10 Efeito do tratamento com o análogo A08 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.11 Resultado do análogo A09 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 11, o resultado do análogo A09, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $66 \pm 7\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

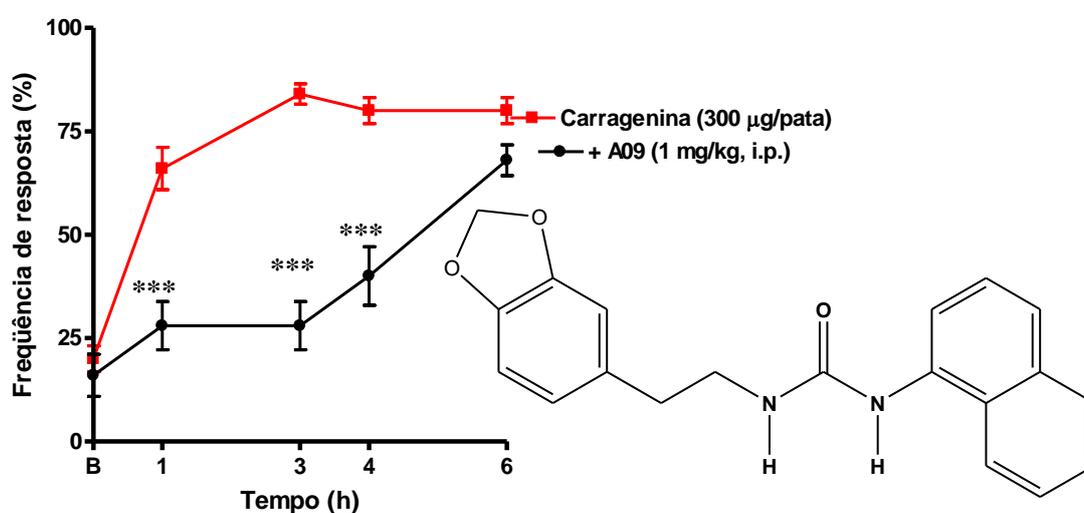


Gráfico 11 Efeito do tratamento com o análogo A09 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.12 Resultado do análogo A10 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 12, o resultado do análogo A10, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $0 \pm 0\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo não apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

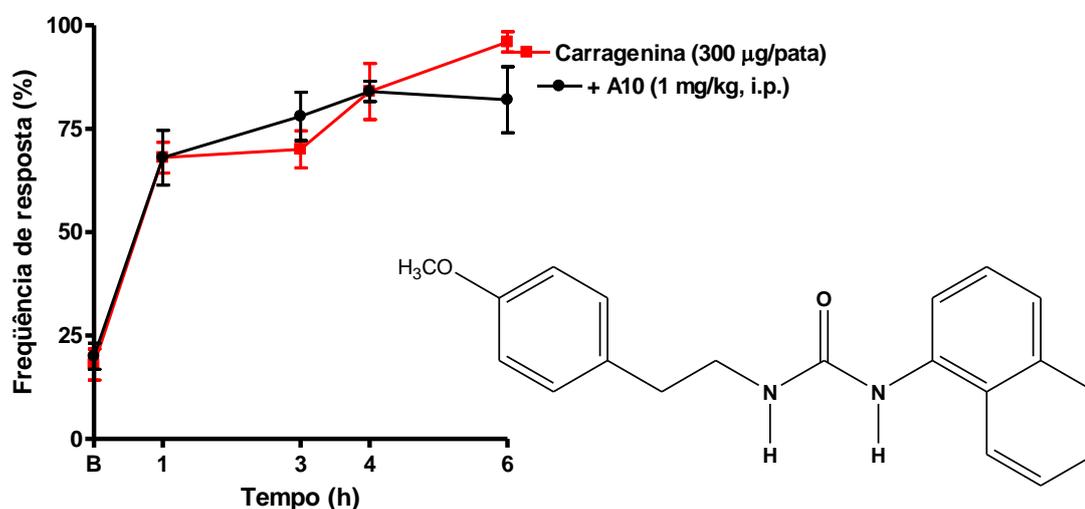


Gráfico 12 Efeito do tratamento com o análogo A10 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.13 Resultado do análogo A11 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 13, o resultado do análogo A11, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $03 \pm 3\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo não apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

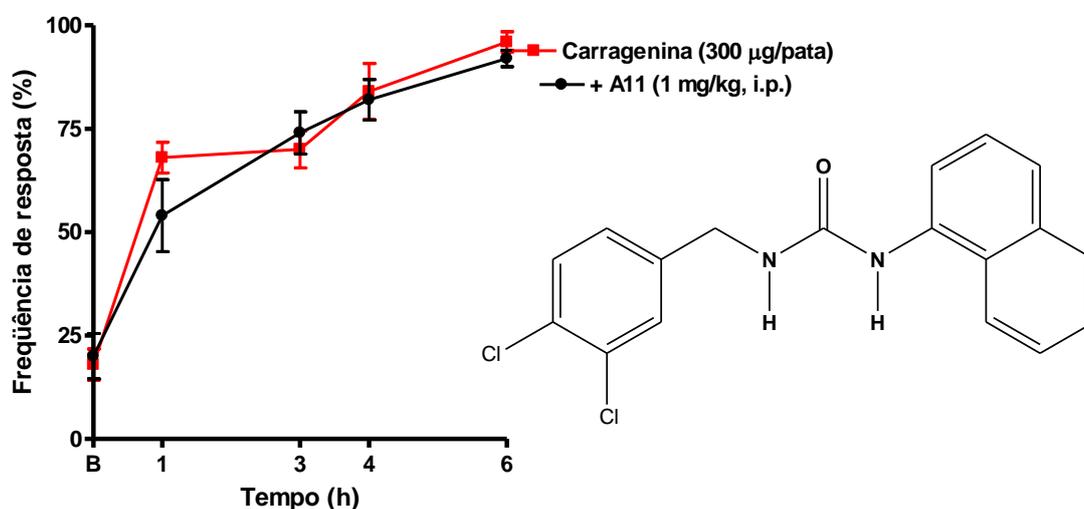


Gráfico 13 Efeito do tratamento com o análogo A11 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.14 Resultado do análogo A12 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 14, o resultado do análogo A12, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $11 \pm 8\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo não apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

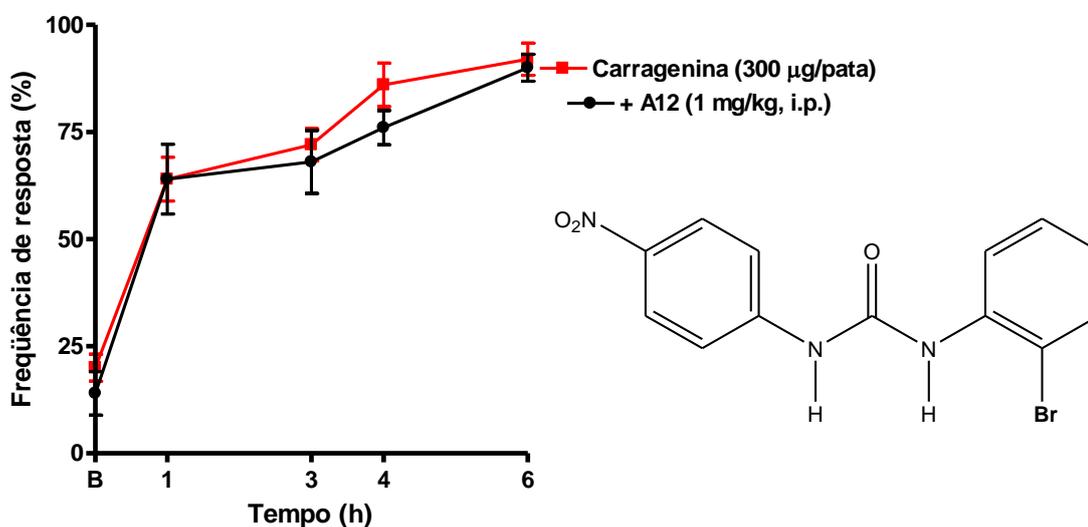


Gráfico 14 Efeito do tratamento com o análogo A12 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.15 Resultado do análogo A13 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 15, o resultado do análogo A13, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $5 \pm 4\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo não apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

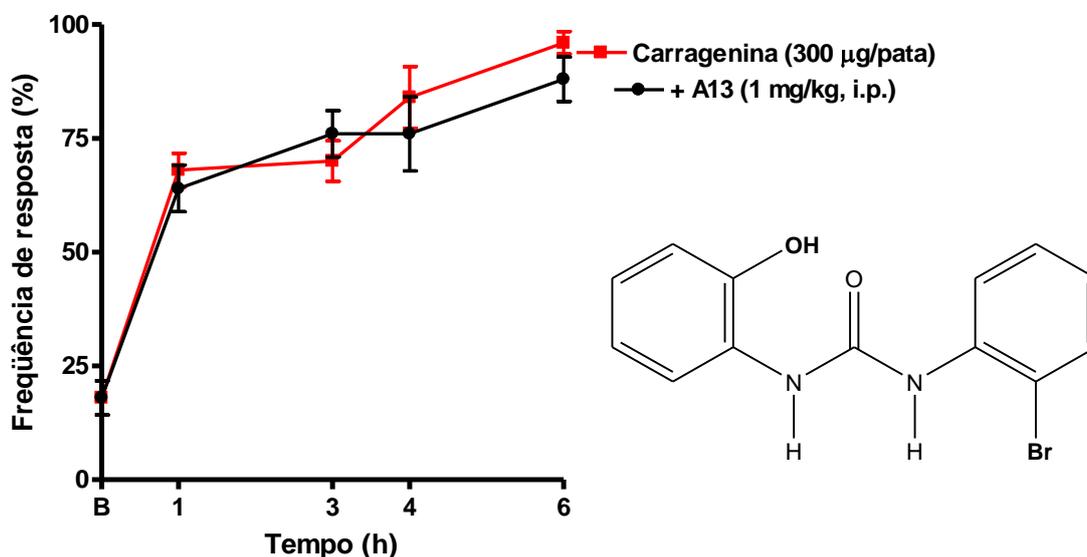


Gráfico 15 Efeito do tratamento com o análogo A13 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.16 Resultado do análogo A14 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 16, o resultado do análogo A14, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $33 \pm 6\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo não apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

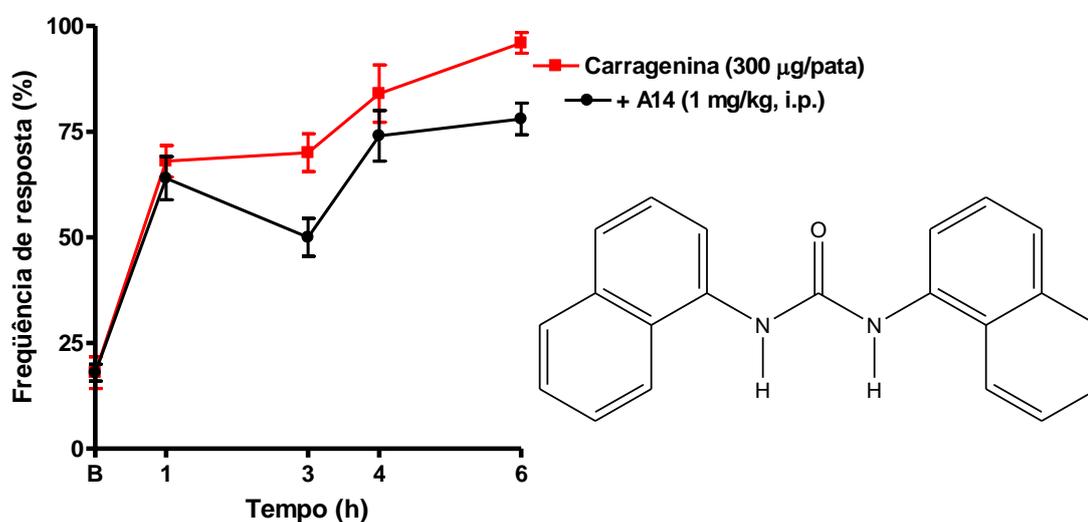


Gráfico 16 Efeito do tratamento com o análogo A14 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.17 Resultado do análogo A15 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 17, o resultado do análogo A15, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $6 \pm 3\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo não apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

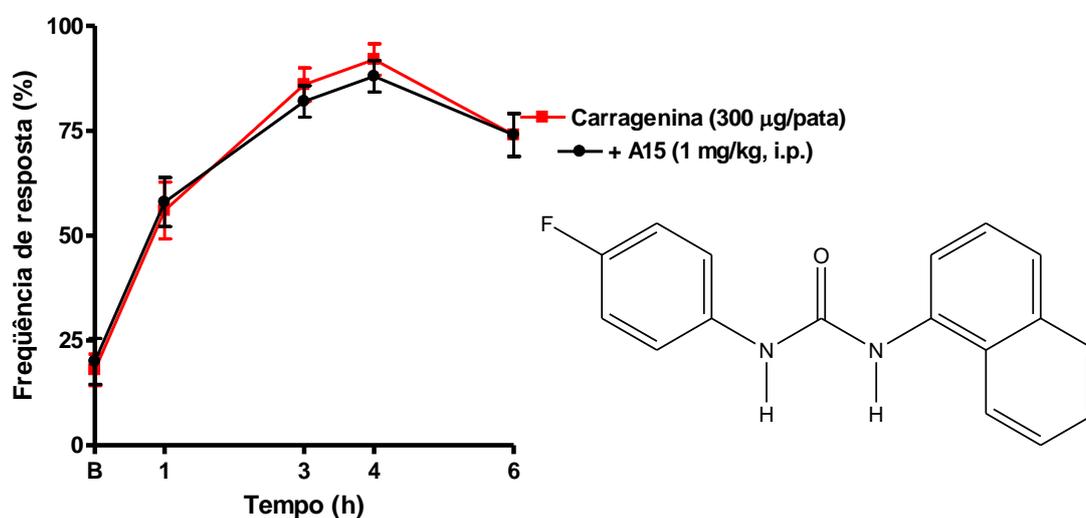


Gráfico 17 Efeito do tratamento com o análogo A15 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.18 Resultado do análogo A16 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernociepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 18, o resultado do análogo A16, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $60 \pm 10\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

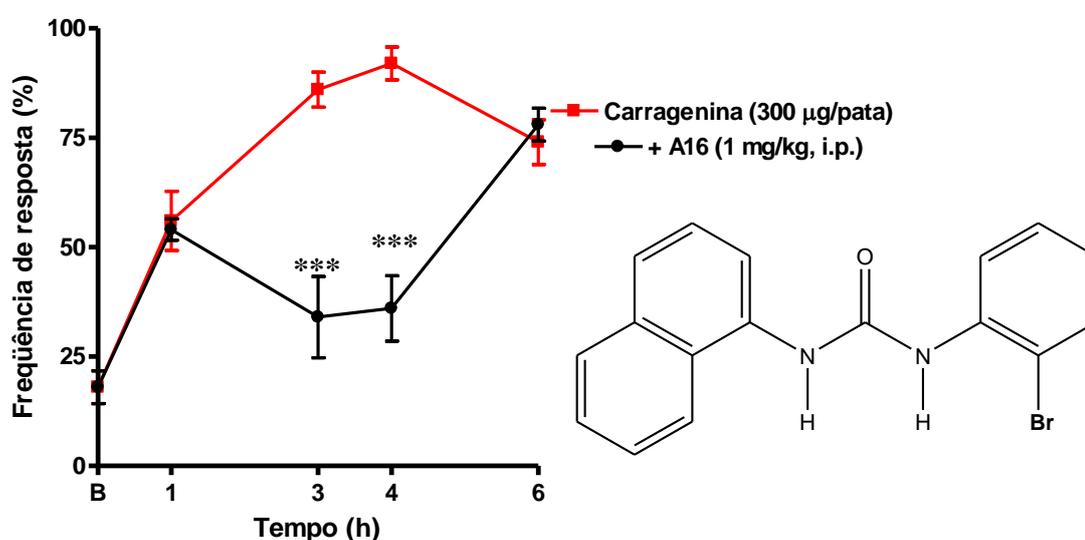


Gráfico 18 Efeito do tratamento com o análogo A16 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose (300 µg/pata).

5.2.19 Resultado do análogo A17 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 19, o resultado do análogo A17, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $39 \pm 8\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo não apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

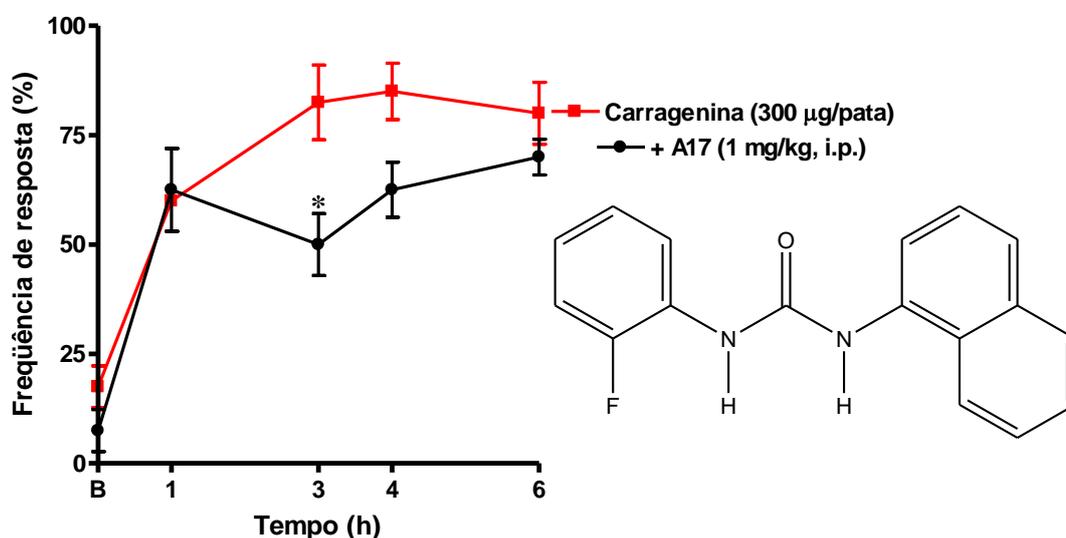


Gráfico 19 Efeito do tratamento com o análogo A17 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose (300 µg/pata).

5.2.20 Resultado do análogo A18 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 20, o resultado do análogo A18, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $24 \pm 3\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo não apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

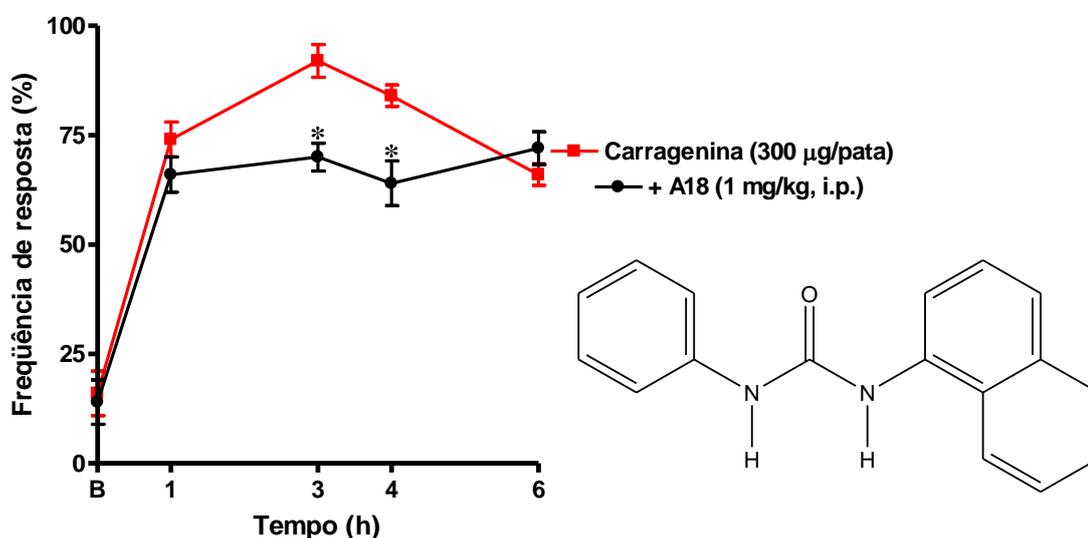


Gráfico 20 Efeito do tratamento com o análogo A18 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.21 Resultado do análogo A19 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 21, o resultado do análogo A19, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $28 \pm 5\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo não apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

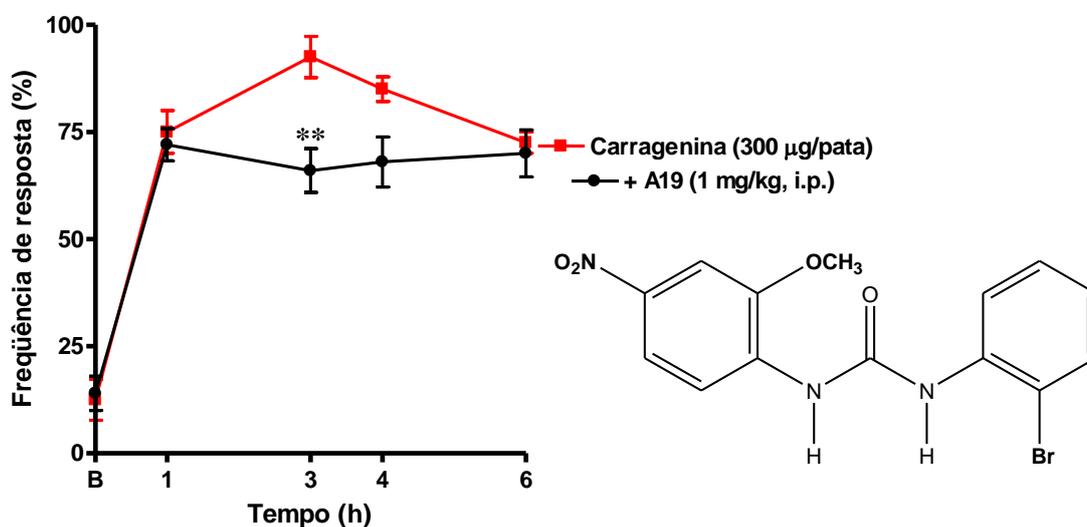


Gráfico 21 Efeito do tratamento com o análogo A19 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.22 Resultado do análogo A20 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 22, o resultado do análogo A20, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $24 \pm 6\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo não apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

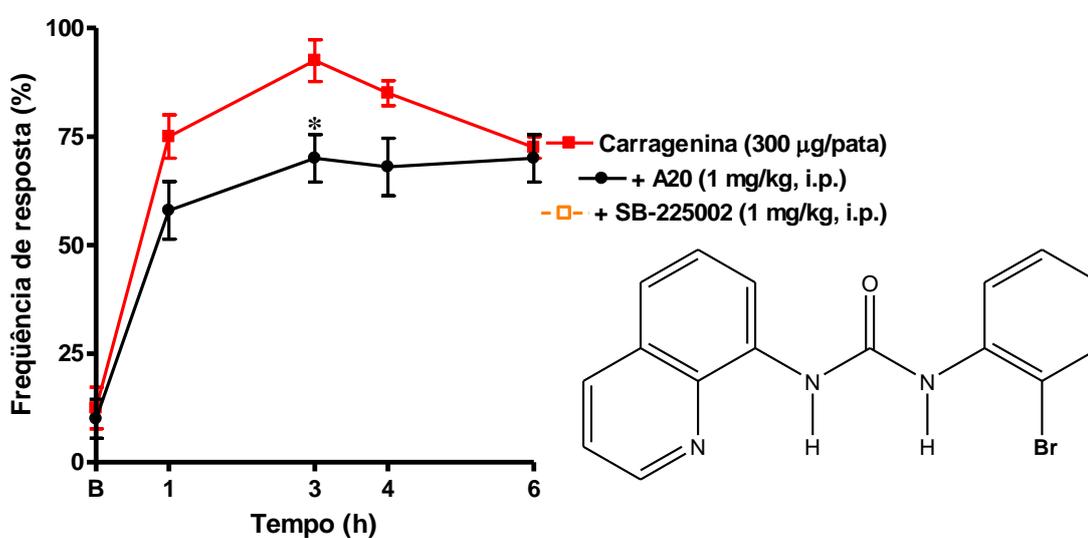


Gráfico 22 Efeito do tratamento com o análogo A20 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.23 Resultado do análogo A21 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 23, o resultado do análogo A21, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $28 \pm 5\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo não apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

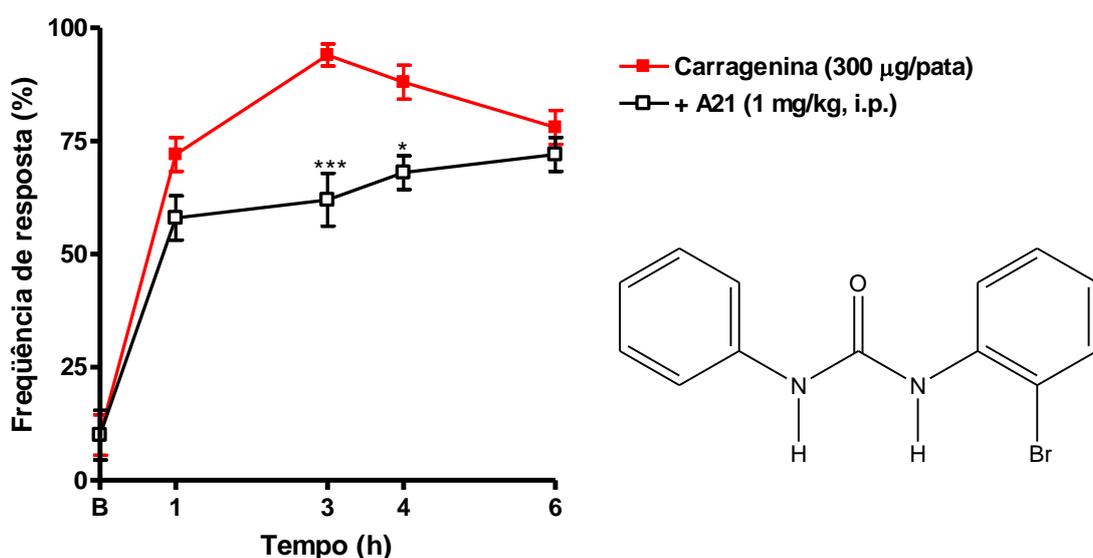


Gráfico 23 Efeito do tratamento com o análogo A21 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.24 Resultado do análogo A22 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 24, o resultado do análogo A22, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $24 \pm 6\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo não apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

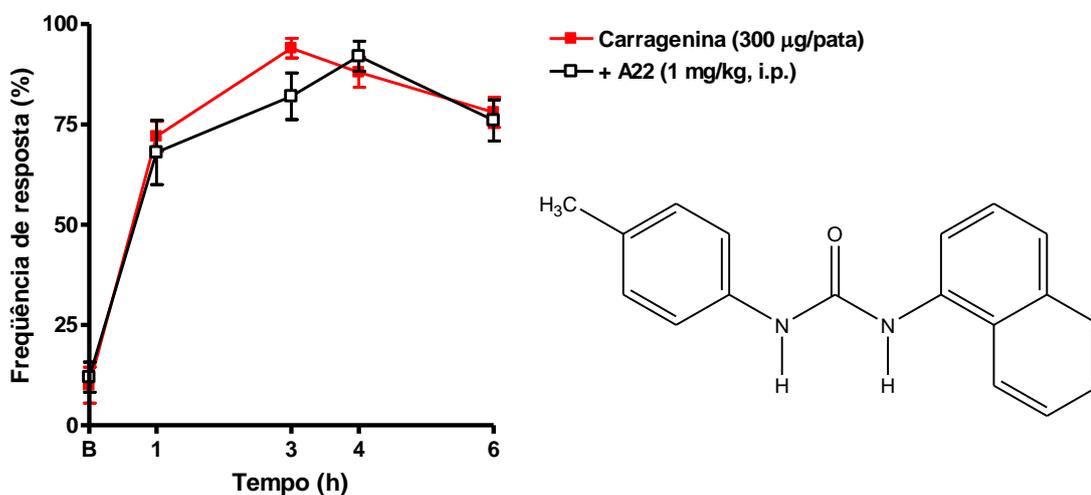


Gráfico 24 Efeito do tratamento com o análogo A22 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.25 Resultado do análogo A23 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 25, o resultado do análogo A23, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $34 \pm 6\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo não apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

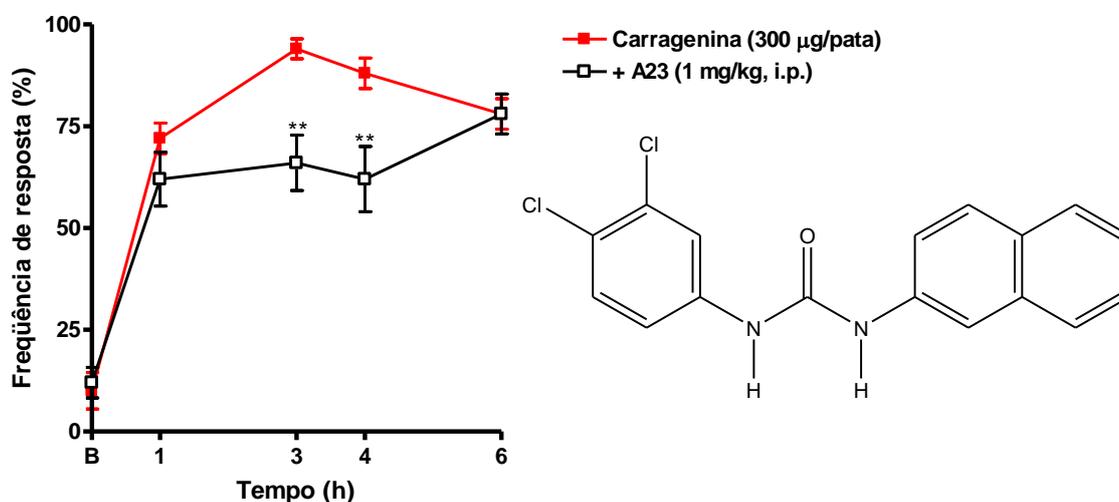


Gráfico 25 Efeito do tratamento com o análogo A23 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.26 Resultado do análogo A24 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 26, o resultado do análogo A24, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $14 \pm 5\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo não apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

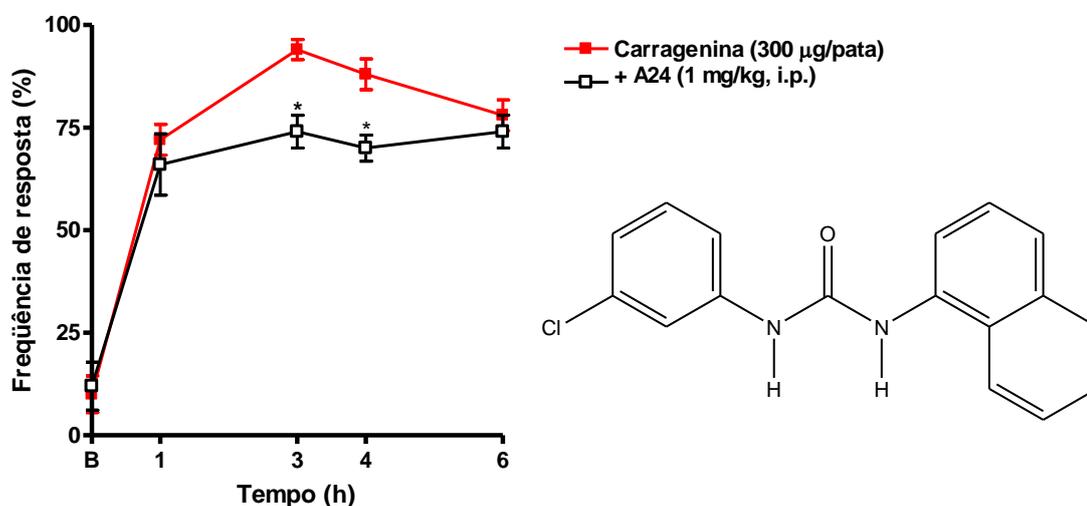


Gráfico 26 Efeito do tratamento com o análogo A24 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.27 Resultado do análogo A25 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 27, o resultado do análogo A25, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $34 \pm 8\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo não apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

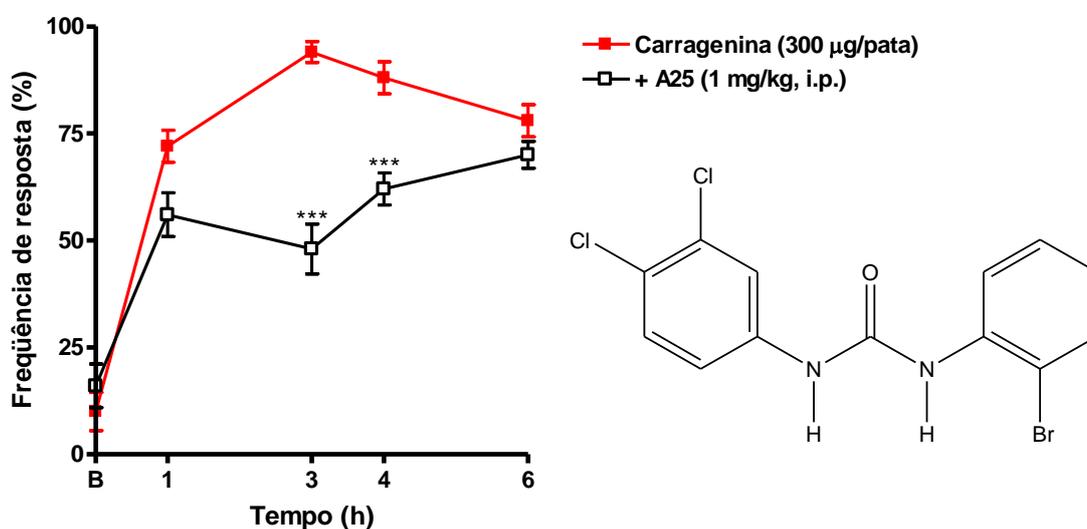


Gráfico 27 Efeito do tratamento com o análogo A25 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.28 Resultado do análogo A26 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 28, o resultado do análogo A26, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $48 \pm 5\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo não apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

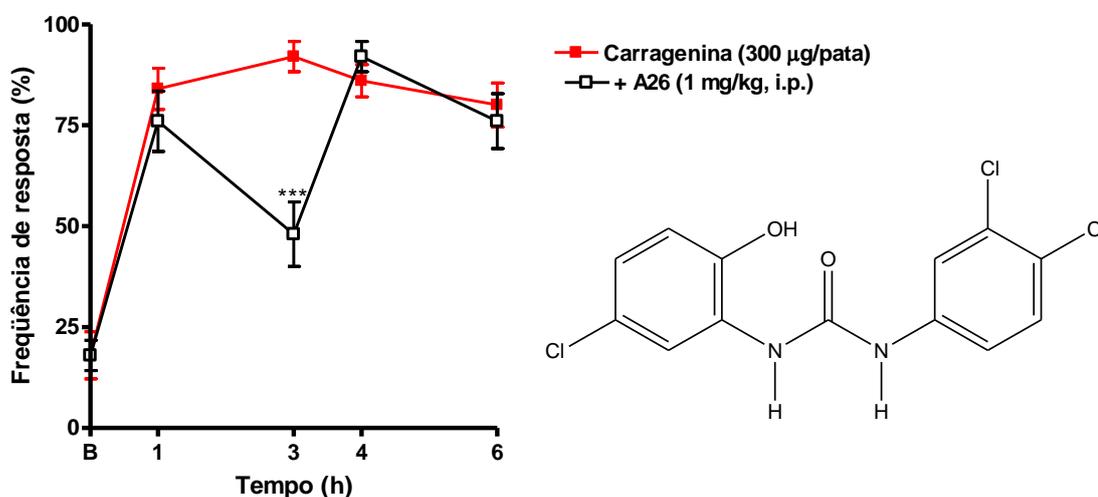


Gráfico 28 Efeito do tratamento com o análogo A26 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.29 Resultado do análogo A27 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 29, o resultado do análogo A27, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $0 \pm 0\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo não apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

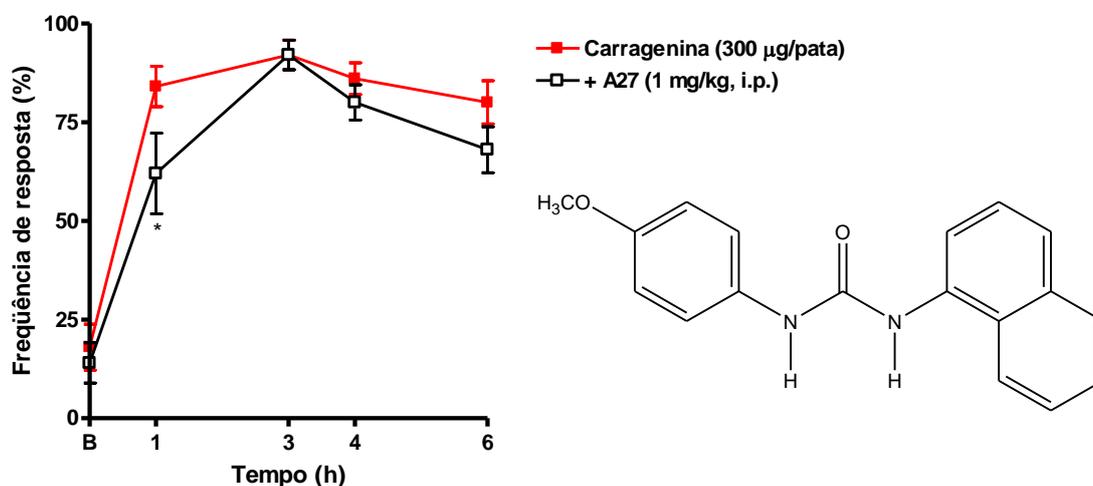


Gráfico 29 Efeito do tratamento com o análogo A27 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.30 Resultado do análogo A28 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 30, o resultado do análogo A28, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $59 \pm 7\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

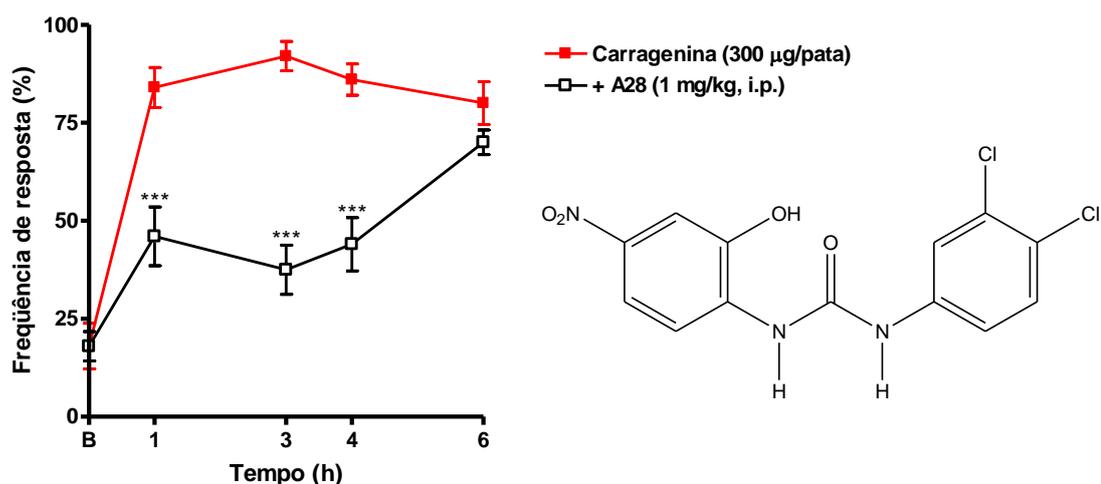


Gráfico 30 Efeito do tratamento com o análogo A28 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.31 Resultado do análogo A29 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 31, o resultado do análogo A29, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $10 \pm 4\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo não apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

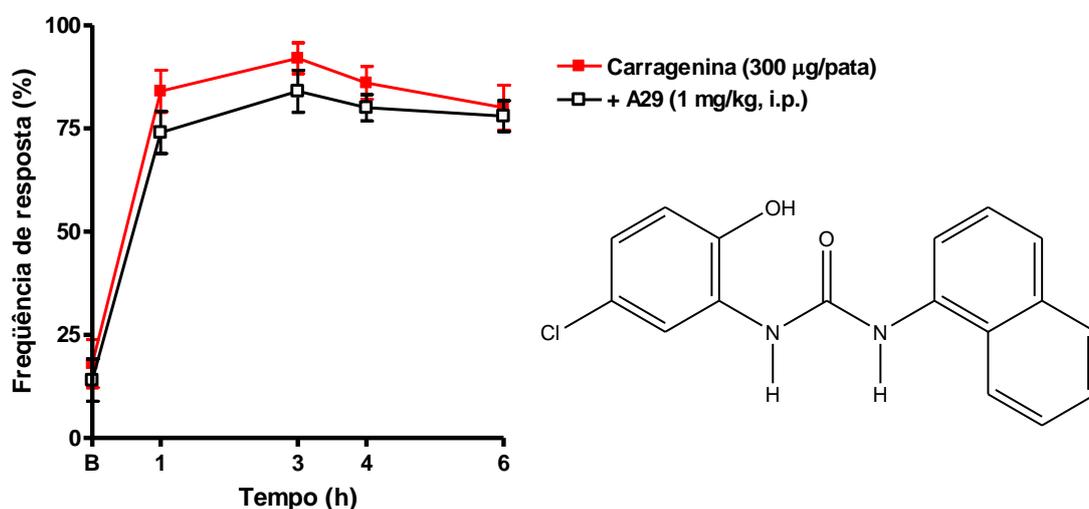


Gráfico 31 Efeito do tratamento com o análogo A29 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.32 Resultado do análogo A30 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 32, o resultado do análogo A30, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $25 \pm 6\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo não apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

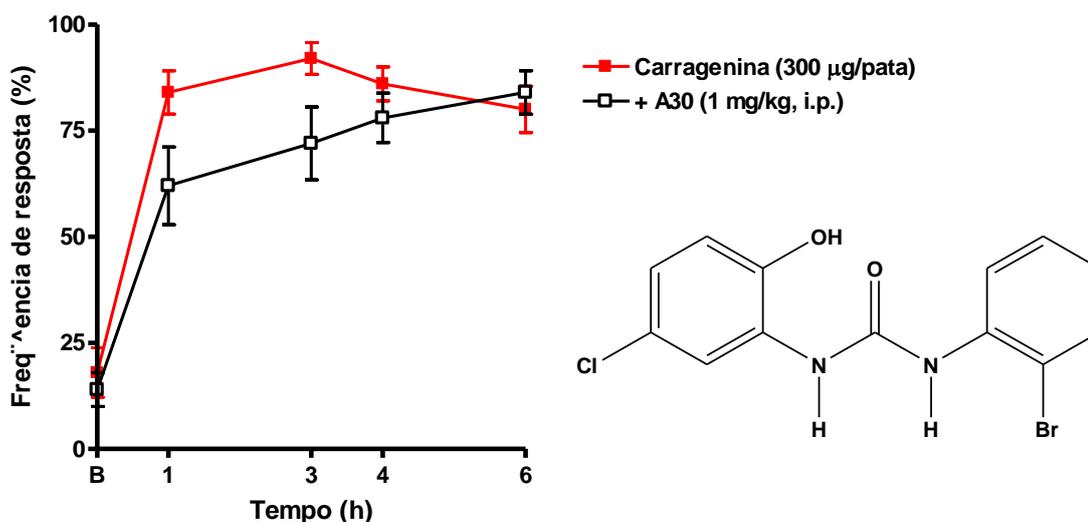


Gráfico 32 Efeito do tratamento com o análogo A30 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.33 Resultado do análogo A31 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 33, o resultado do análogo A31, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $8 \pm 4\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo não apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

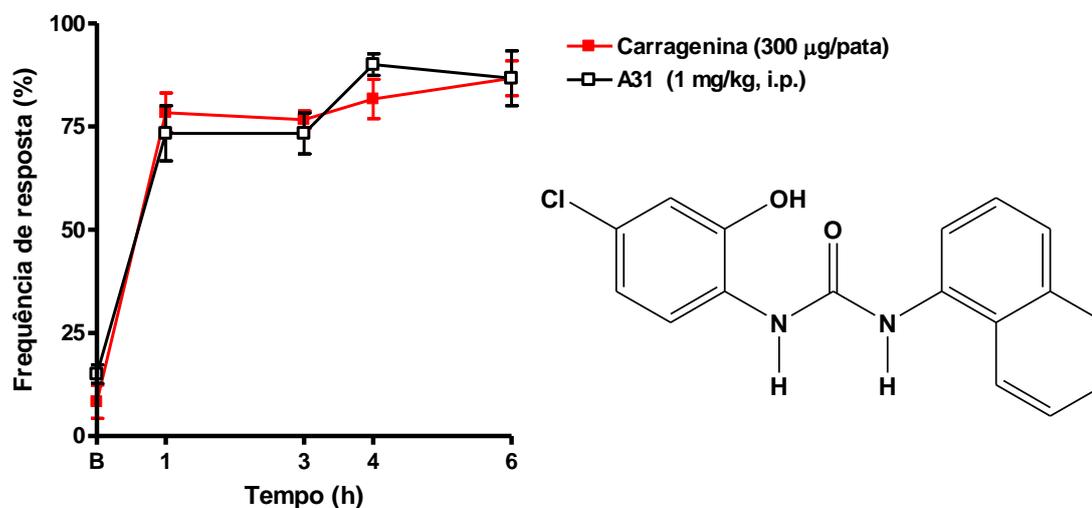


Gráfico 33 Efeito do tratamento com o análogo A31 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.2.34 Resultado do análogo A32 na dose de (1 mg/Kg, i.p.), comparado com SB225002 na dose de (1 mg/Kg).frente à hipernocicepção induzida pela carragenina na dose de (300 µg/pata).

Observou-se no Gráfico 34, o resultado do análogo A32, frente à carragenina. A porcentagem de inibição foi calculada no pico máximo de ação da carragenina (3h) e o resultado foi de $6 \pm 4\%$ de inibição. Podemos observar que este análogo não apresenta uma boa inibição comparada ao SB225002. Na Tabela 05 apresentamos os valores da inibição em 3 horas, comparado com os análogos sintetizados.

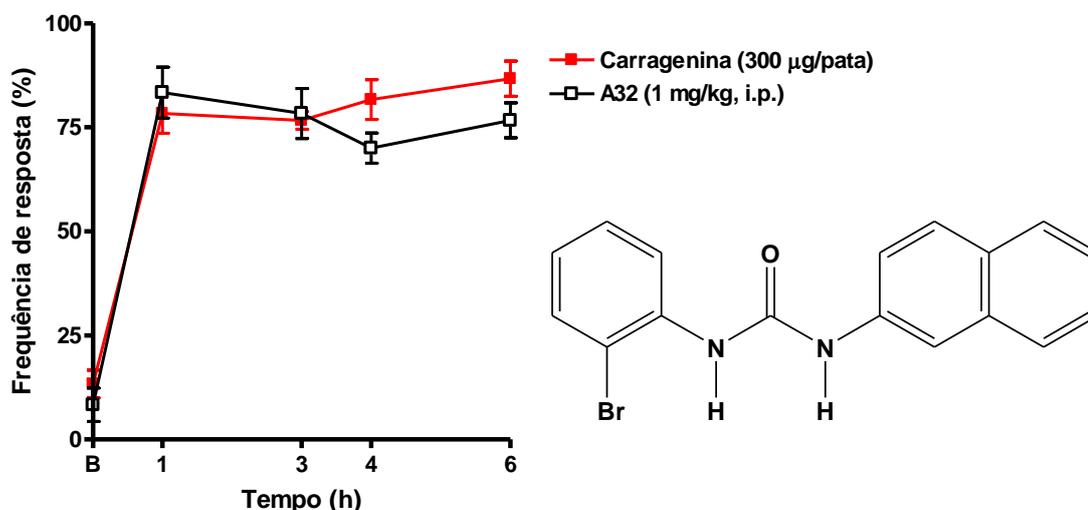


Gráfico 34 Efeito do tratamento com o análogo A32 (1 mg/Kg, i.p.) comparado com o SB225002 (1 mg/Kg, i.p.) frente ação da carragenina na dose de (300 µg/pata).

5.3 Curva dose resposta para os 09 compostos análogos sintéticos (A00, A03, A04, A05, A07, A08, A09, A16 e A28) com atividade \geq ao SB225002 frente ao modelo de hipernociceção induzido pela carragenina.

5.3.1 Curva dose resposta do análogo A00 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), frente à carragenina na dose de (300 μ g/Kg).

Podemos observar no gráfico 35 que o melhor resultado foi obtido na dose de 1mg/Kg no intervalo de 3 horas após a injeção de carragenina.

O valor da DI_{50} = 3,33 (2,01-5,52) mg/kg ou 10,3 μ mol/Kg.

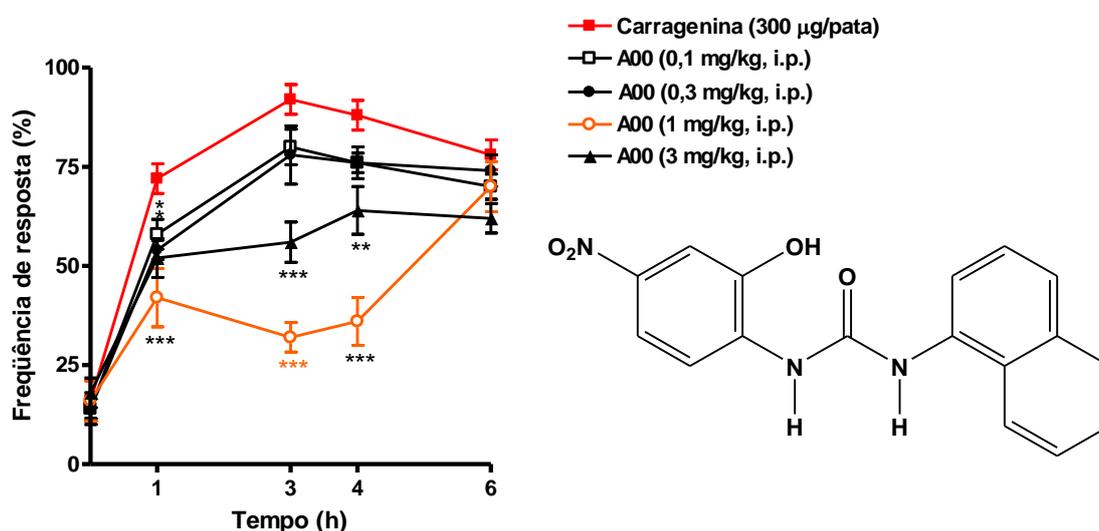


Gráfico 35 Curva dose resposta do análogo A00 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), 3 horas após a injeção de carragenina na dose de (300 μ g/Kg).

5.3.3 Curva dose resposta do análogo A04 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), frente à carragenina na dose de (300 µg/Kg).

Podemos observar no gráfico 37 que o melhor resultado foi obtido na dose de 1mg/Kg no intervalo de 3 horas após a injeção de carragenina.

O valor da DI_{50} = 1,46 (1,26-1,68) mg/kg ou 4,27µmol/Kg.

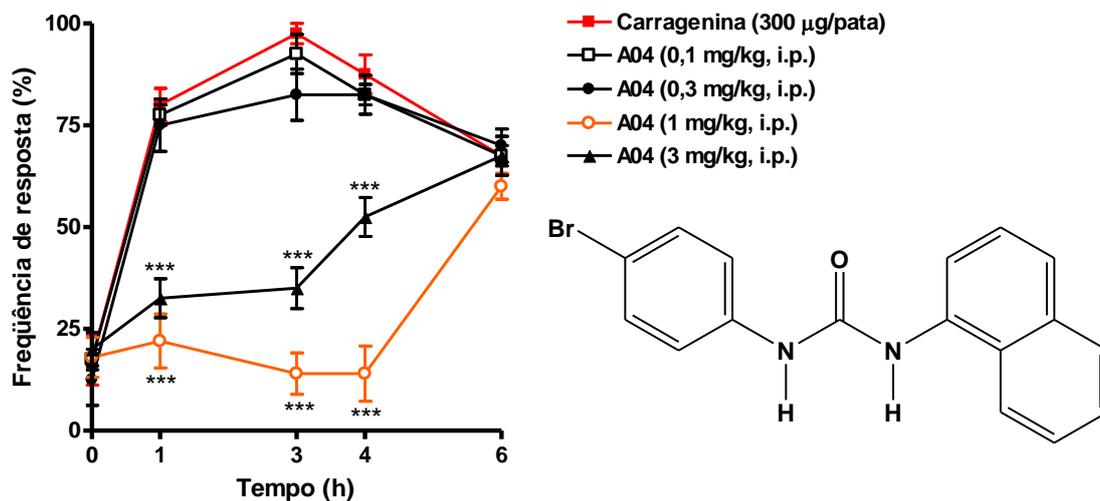


Gráfico 37 Curva Curva dose resposta do análogo A04 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), 3 horas após a injeção de carragenina (300 µg/Kg).

5.3.4 Curva dose resposta do análogo A05 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), frente à carragenina na dose de (300 µg/Kg).

Podemos observar no gráfico 38 que o melhor resultado foi obtido na dose de 1mg/Kg no intervalo de 3 horas após a injeção de carragenina.

O valor da DI_{50} = 1,75(1,41-2,17) mg/kg ou 5,28µmol/Kg.

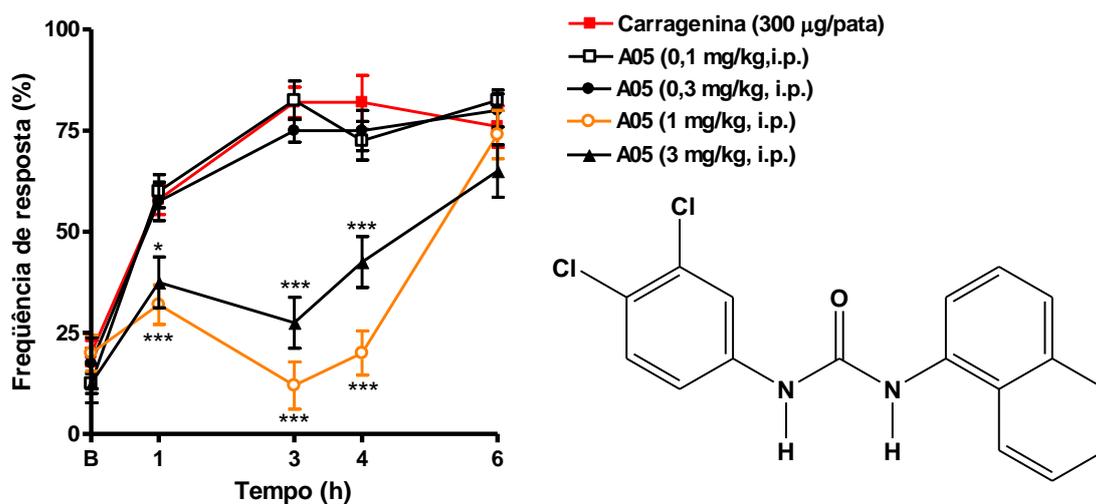


Gráfico 38 Curva Curva dose resposta do análogo A05 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), 3 horas após a injeção de carragenina na dose de (300 µg/Kg).

5.3.5 Curva dose resposta do análogo A07 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), frente à carragenina na dose de (300 µg/Kg).

Podemos observar no gráfico 39 que o melhor resultado foi obtido na dose de 3mg/Kg no intervalo de 3 horas após a injeção de carragenina.

O valor da DI_{50} = 1,83 (1,37-2,25) mg/kg ou 6,92 µmol/Kg.

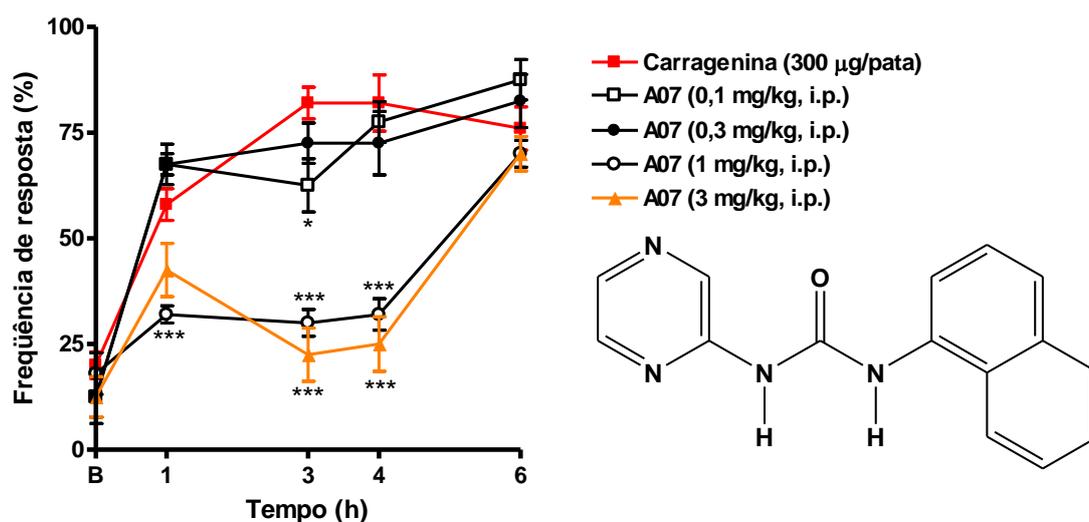


Gráfico 39 Curva dose resposta do análogo A07 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), 3 horas após a injeção de carragenina na dose de (300 µg/Kg).

5.3.6 Curva dose resposta do análogo A08 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), frente à carragenina na dose de (300 µg/Kg).

Podemos observar no gráfico 40 que o melhor resultado foi obtido na dose de 1mg/Kg no intervalo de 3 horas após a injeção de carragenina.

O valor da $DI_{50} = 1,71$ (1,42-2,06) mg/kg ou $5,88\mu\text{mol/Kg}$.

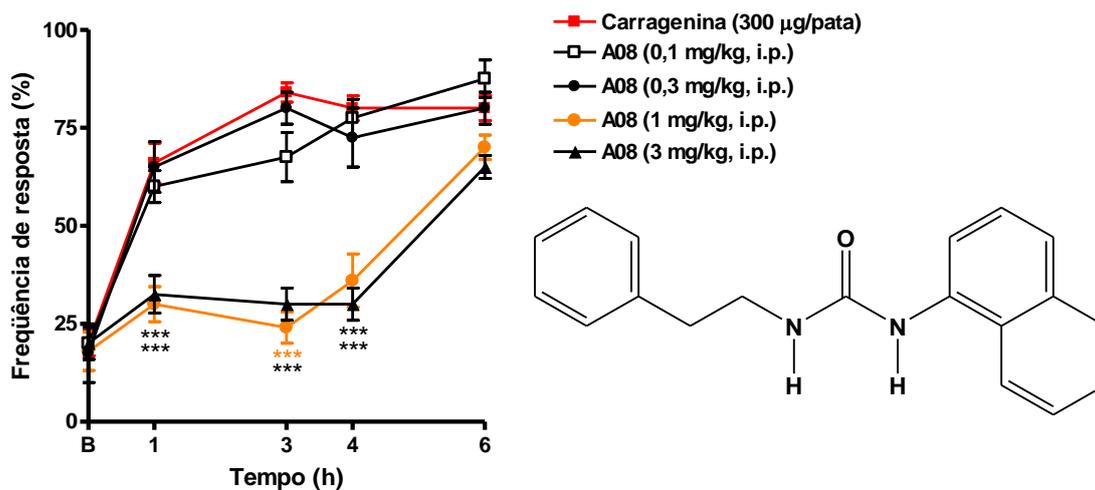


Gráfico 40 Curva dose resposta do análogo A08 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), 3 horas após a injeção de carragenina na dose de (300 µg/Kg).

5.3.7 Curva dose resposta do análogo A09 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), frente à carragenina na dose de (300 µg/Kg).

Podemos observar no gráfico 41 que o melhor resultado foi obtido na dose de 1mg/Kg no intervalo de 3 horas após a injeção de carragenina.

O valor da DI_{50} = 1,98 (1,39-2,84) mg/kg ou 5,92µmol/Kg.

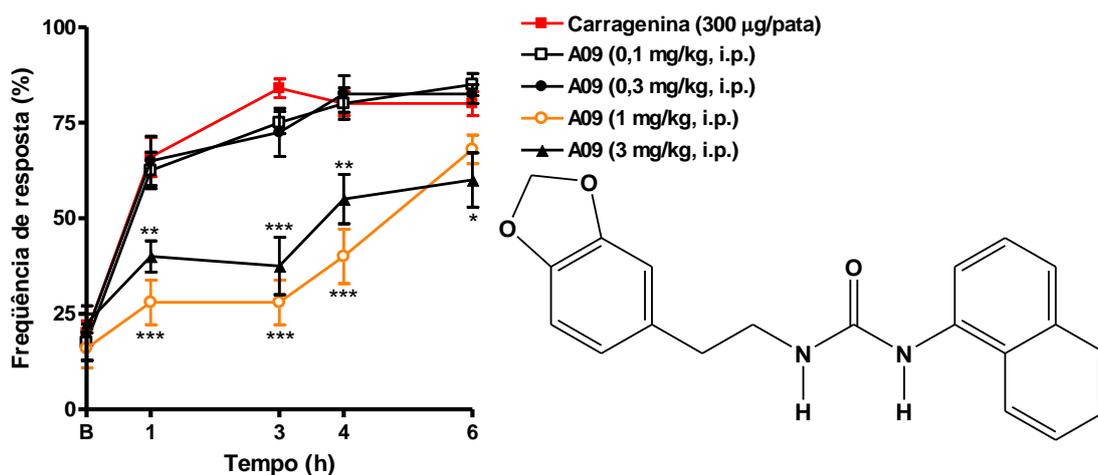


Gráfico 41 Curva dose resposta do análogo A09 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), 3 horas após a injeção de carragenina na dose de (300 µg/Kg).

5.3.8 Curva dose resposta do análogo A16 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), frente à carragenina na dose de (300 µg/Kg).

Podemos observar no gráfico 42 que o melhor resultado foi obtido na dose de 3mg/Kg no intervalo de 3 horas após a injeção de carragenina.

O valor da DI_{50} = 1,81 (1,33-2,45) mg/kg ou 5,3 µmol/Kg.

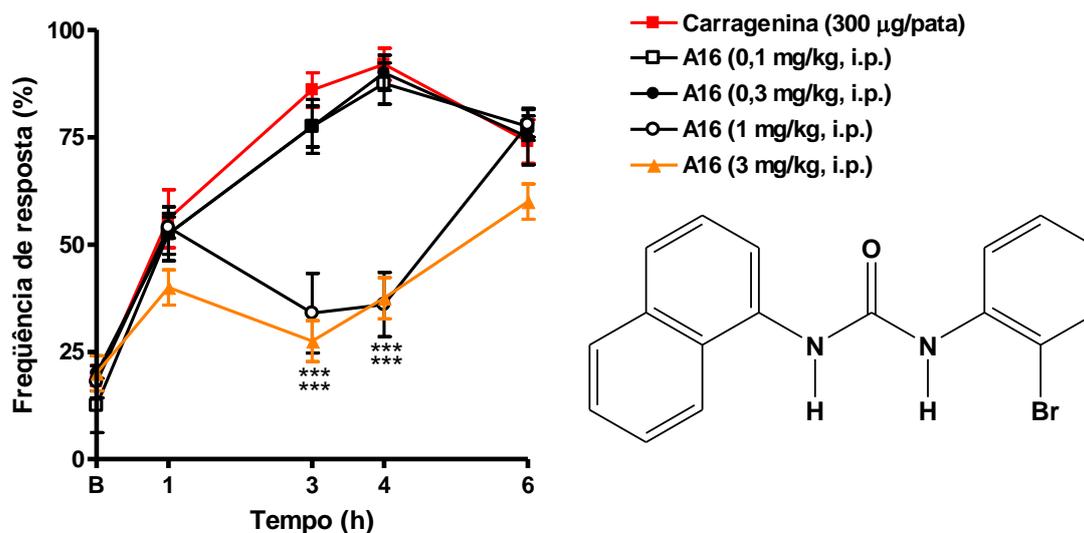


Gráfico 42 Curva dose resposta do análogo A16 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), 3 horas após a injeção de carragenina na dose de (300 µg/Kg).

5.3.9 Curva dose resposta do análogo A28 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), frente à carragenina na dose de (300 µg/Kg).

Podemos observar no gráfico 43 que os melhores resultados foram obtidos nas doses de (0,3-3mg/Kg) no intervalo de 3 horas após a injeção de carragenina.

O valor da DI_{50} = 3,29 (2,15-5,02) mg/kg ou 9,63 µmol/Kg.

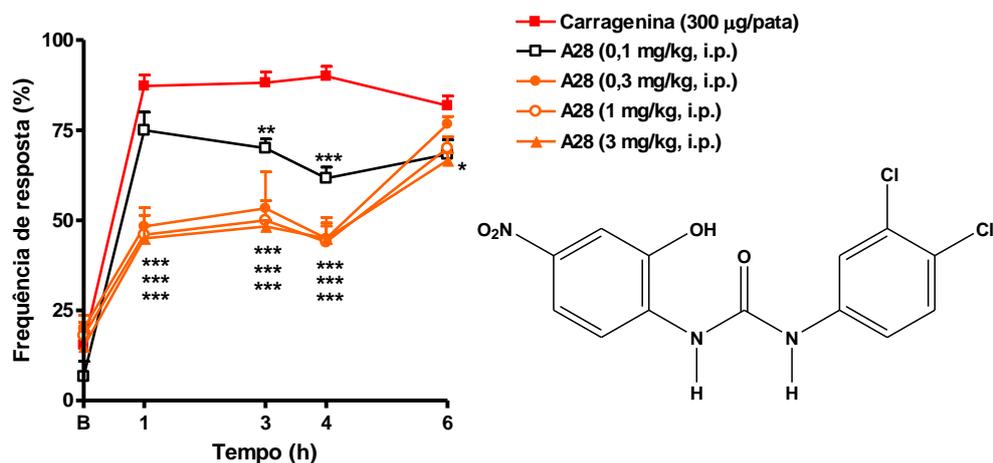
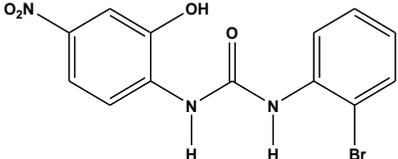
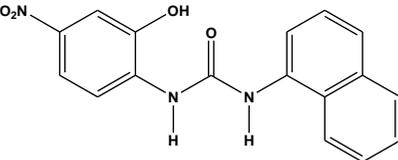
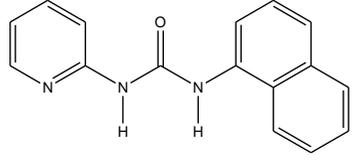
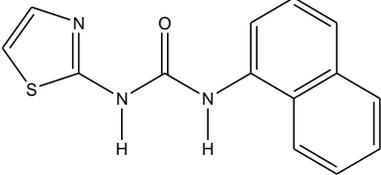
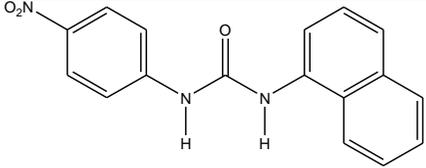
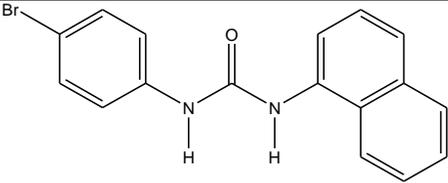
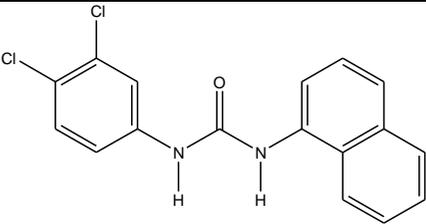


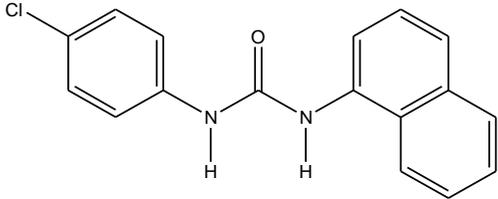
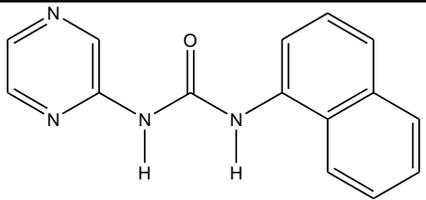
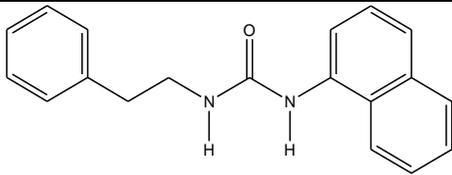
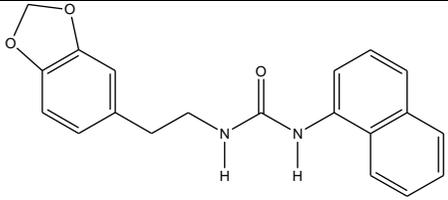
Gráfico 43 Curva dose resposta do análogo A28 nas doses (0,1 – 3 mg/Kg), 3 horas após a injeção de carragenina na dose de (300 µg/Kg).

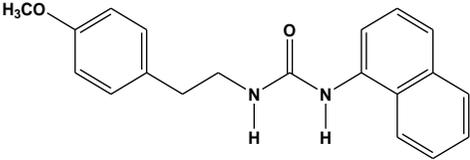
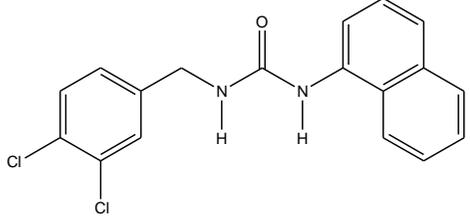
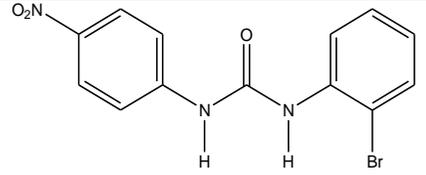
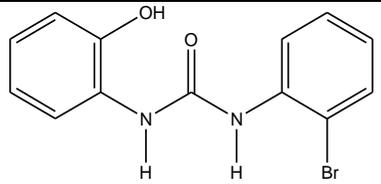
5.4 Resultados da inibição máxima no intervalo de 3 horas após o tratamento com carragenina na dose de (300 µg/pata) frente ao SB 225002 e seus 33 análogos sintéticos.

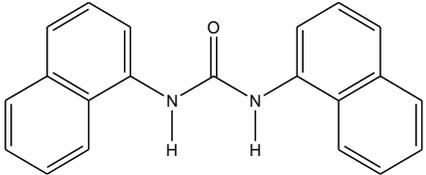
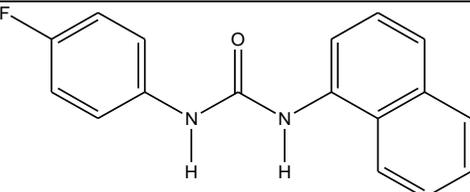
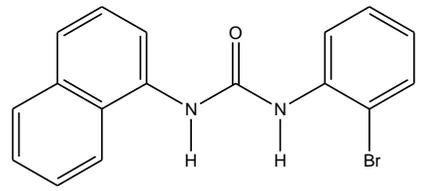
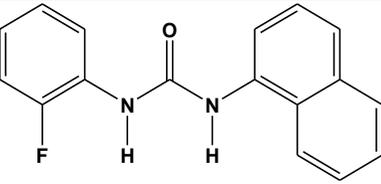
Tabela 3 Inibição máxima (%) no intervalo de 3 h após a injeção i.pl. de carragenina na dose de (300 µg/pata).

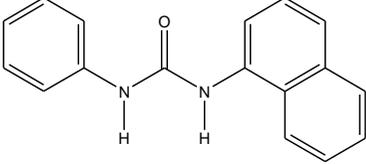
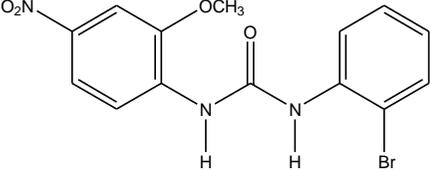
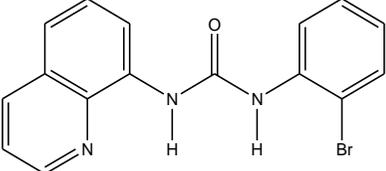
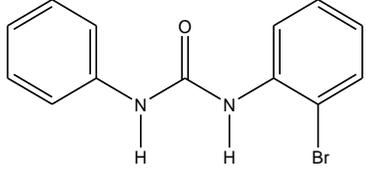
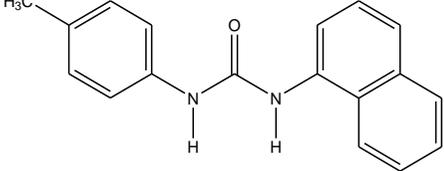
Droga	(<i>%</i>) inibição em 3h na dose de (1mg/Kg, i.p.)	Clog P	<i>DIC</i> ₅₀ mg/Kg	<i>IC</i> ₅₀ µmol/Kg	Estrutura química
SB225002	52 ± 3 %	2,99	1,192 (0,585-2,42)	3,38	
A00	66 ± 7 %	3,22	0,97 (0,585-2,42)	10,3	
A01	3 ± 3 %	2,89	---	---	

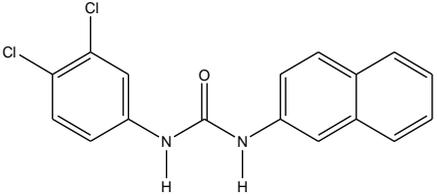
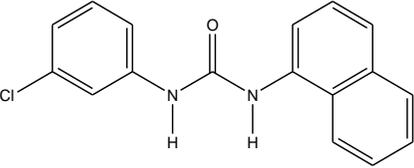
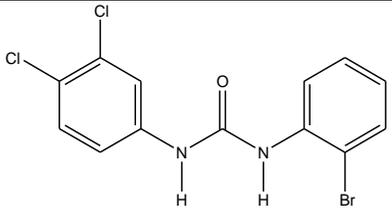
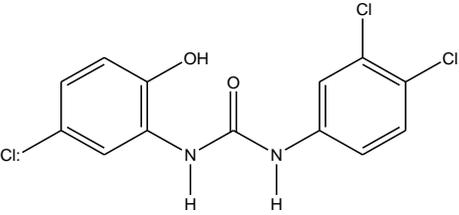
A02	$41 \pm 13 \%$	3,23	---	---	
A03	$61 \pm 4 \%$	3,61	2,33 (1,63- 3,31)	7,58	
A04	$82 \pm 6 \%$	4,34	1,46 (1,26-1,68)	4,27	
A05	$85 \pm 7 \%$	4,63	0,692 (0,455-1,45)	5,28	

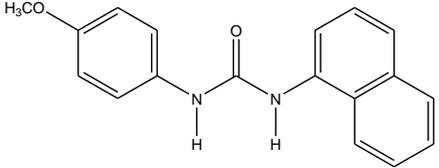
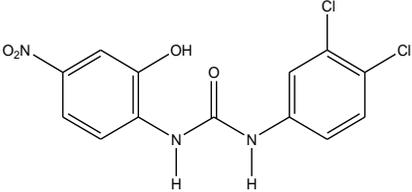
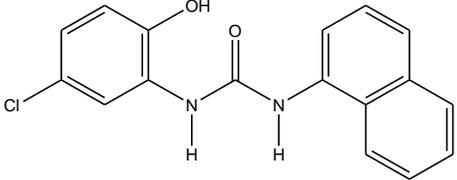
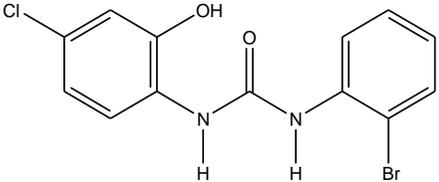
A06	$06 \pm 3 \%$	4,07	---	---	 The structure shows a central amide group (-NH-C(=O)-NH-) where the left nitrogen is attached to a 4-chlorophenyl ring and the right nitrogen is attached to a naphthalene ring system.
A07	$57 \pm 4 \%$	1,55	1,83 (1,37-2,25)	6,92	 The structure shows a central amide group (-NH-C(=O)-NH-) where the left nitrogen is attached to the 2-position of a pyridine ring and the right nitrogen is attached to a naphthalene ring system.
A08	$71 \pm 5 \%$	3,86	1,71 (1,42-2,06)	5,88	 The structure shows a central amide group (-NH-C(=O)-NH-) where the left nitrogen is attached to a 3-phenylpropyl chain and the right nitrogen is attached to a naphthalene ring system.
A09	$66 \pm 7 \%$	3,64	1,98 (1,39-2,84)	5,92	 The structure shows a central amide group (-NH-C(=O)-NH-) where the left nitrogen is attached to a 3-(benzofuran-2-yl)propyl chain and the right nitrogen is attached to a naphthalene ring system.

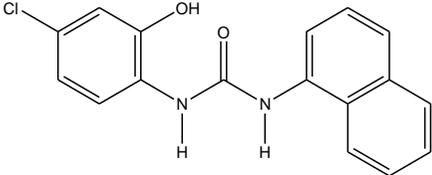
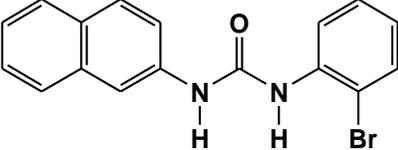
A10	$0 \pm 0 \%$	3,73	---	---	 <chem>COc1ccc(cc1)CCNC(=O)Nc2ccccc2</chem>
A11	$03 \pm 3 \%$ *	4,70	---	---	 <chem>Clc1cc(Cl)ccc1CCNC(=O)Nc2ccccc2</chem>
A12	$11 \pm 8 \%$	3,38	---	---	 <chem>O=[N+]([O-])c1ccc(cc1)NC(=O)Nc2ccccc2Br</chem>
A13	$05 \pm 4 \%$	2,95	---	---	 <chem>Oc1ccccc1NC(=O)Nc2ccccc2Br</chem>

A14	$33 \pm 6 \%$	4,51	---	---	
A15	$06 \pm 3 \%$	3,67	---	---	
A16	$60 \pm 10 \%$	4,34	1,81 (1,33-2,45)	5,3	
A17	$39 \pm 8 \%$ *	3,67	---	---	

A18	$24 \pm 3 \% ^*$	3,51	---	---	
A19	$28 \pm 5 \%$	3,51	---	---	
A20	$24 \pm 6 \%$	3,43	---	---	
A21	$28 \pm 5 \%$	3,34	---	---	
A22	$24 \pm 6 \% ^*$	4,00	---	---	

A23	$34 \pm 6 \%$	4,63	---	---	 <chem>CC(=O)Nc1ccc(Cl)c(Cl)c1</chem>
A24	$14 \pm 5 \%$	4,07	---	---	 <chem>CC(=O)Nc1cccc2ccccc12</chem>
A25	$34 \pm 8 \%$	4,46	---	---	 <chem>CC(=O)Nc1ccccc1Br</chem>
A26	$25 \pm 6 \%$	3,80	---	---	 <chem>CC(=O)Nc1cc(Cl)ccc1O</chem>

A27	$46 \pm 8 \%$	3,38	---	---	 <chem>COc1ccc(NC(=O)Nc2cccc3ccccc23)cc1</chem>
A28	$59 \pm 7 \%$	3,34	3,28 (2,15-5,02)	9,60	 <chem>Oc1cc(NC(=O)Nc2cc(Cl)cc(Cl)c2)cc([N+](=O)[O-])c1</chem>
A29	$25 \pm 6 \%$	3,68	---	---	 <chem>Oc1cc(NC(=O)Nc2cccc3ccccc23)cc(Cl)c1</chem>
A30	$48 \pm 8 \%$	3,51	---	---	 <chem>Oc1cc(NC(=O)Nc2ccccc2Br)cc(Cl)c1</chem>

A31	$10 \pm 4 \%$	3,68	---	---	 Chemical structure of N-(2-chloro-3-hydroxyphenyl)acetamide derivative. It features a benzene ring with a chlorine atom at the 2-position and a hydroxyl group at the 3-position. An acetamide group (-NH-C(=O)-NH-) is attached to the 1-position, with the second nitrogen atom connected to a naphthalene ring system.
A32	$23 \pm 8 \%$	4,34	---	---	 Chemical structure of N-(naphthalen-1-yl)acetamide derivative. It features a naphthalene ring system with an acetamide group (-NH-C(=O)-NH-) attached to the 1-position. The second nitrogen atom is connected to a benzene ring with a bromine atom at the 3-position.

5.5 Atividade dos análogos sintéticos.

No presente estudo nós investigamos os efeitos do bloqueio do receptor transmembrana CXCR2 no modelo de hipernocicepção induzido pela carragenina em ratos, tratando os animais com um antagonista não peptídico seletivo e competitivo do receptor transmembrana CXCR2, o SB225002 usado como controle e para efeito comparativo com os análogos sintetizados para avaliar a eficácia e potência dos novos compostos. Os dados atuais revelam que o SB225002 e seus 09 análogos sintéticos (A00, A03, A04, A05, A07, A08, A09, A16 e A28), podem diminuir significativamente as alterações nociceptivas no modelo experimental agudo. Nossos resultados corroboram e indicam que os receptores de quimiocinas sugerem um papel crucial no processamento da dor e chamam a atenção ao potencial terapêutico dos antagonistas do receptor transmembrana CXCR2 para tratar circunstâncias dolorosas agudas.

Os dados obtidos no atual estudo demonstram claramente que o tratamento i.p. dos ratos com o SB225002 e seus 09 análogos com eficácia superior produziram efeitos anti-hipernociceptivos, para até 4 h, no modelo agudo da dor induzido pela carragenina.

5.6 Ensaio Biológicos realizados com o SB225002 em diversos modelos de hipernociceção e na colite induzida por TNBS.

Os resultados obtidos com o SB225002 em diferentes modelos de nociceção espontânea são apresentados abaixo.

5.6.1 Hipernociceção induzida pelo ácido acético para o SB225002.

O (Gráfico 44) apresenta os resultados do SB225002 nas doses de (0,1 – 1mg/Kg), comparado com a dipirona.

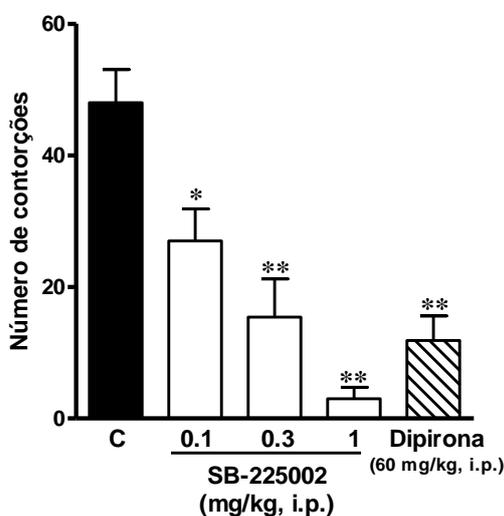


Gráfico 44 Avaliação da nociceção induzida pelo ácido acético frente ao SB225002 em diferentes doses, comparado com a dipirona.

Pode-se observar que o SB225002 nas doses de 0,1-1 mg/kg, i.p. causou significativa redução dose dependente das constrições abdominais induzidas por

ácido acético. A porcentagem da inibição observada na dose de 1 mg/kg, foi de $94 \pm 3\%$, com um valor DI_{50} estimado (acompanhado dos limites de confiança de 95%) de 0.3 mg/kg ($0.13 - 0.63$ mg/Kg = $0,85\mu\text{mol/Kg}$). Comparado com a dipirona ($311,35$ g/Mol; 60 mg/Kg = $192,7 \mu\text{mol/Kg}$) na hipernocicepção induzida pelo ácido acético. O SB225002 apresentou maior potência do que a dipirona em $\cong 227$ vezes.

5.6.2 Hipernocicepção induzida pela formalina para o SB225002.

Apresentamos os resultados do tratamento com SB225002 na primeira e segunda fase da nocicepção induzida pela formalina (Gráfico 45).

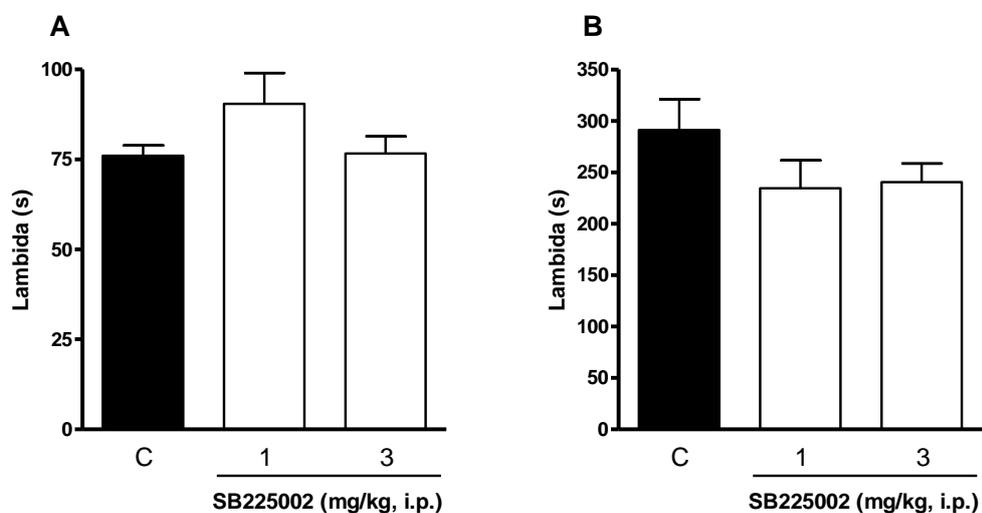


Gráfico 45 Efeito do tratamento com SB225002 na primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela formalina.

O modelo de dor induzido por formalina permite observar duas fases da sensibilidade à dor: a primeira fase aparece nos primeiros 05 minutos após a injeção de formalina (dor fásica) e a segunda fase ocorre entre 15 e 30 minutos após a

injeção de formalina, apresentando a resposta tônica da dor, acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada liberação dos mediadores pró-inflamatórios.

Entretanto, a injeção i.p. de SB225002 (1 e 3 mg/kg,) não afetou significativamente (as fases neurogênicas (0-5 minutos) ou inflamatórias de 15-30 minutos) no teste da formalina.

5.6.3 Hipernocicepção induzida pela carragenina, determinação da curva dose resposta para o SB 225002 em doses de (1 – 3 mg/Kg).

Apresentamos no (Figura 99), os resultados do modelo de dor causado pela carragenina onde foram avaliados realizando-se uma curva dose resposta para obter o valor da DI_{50} do SB225002.

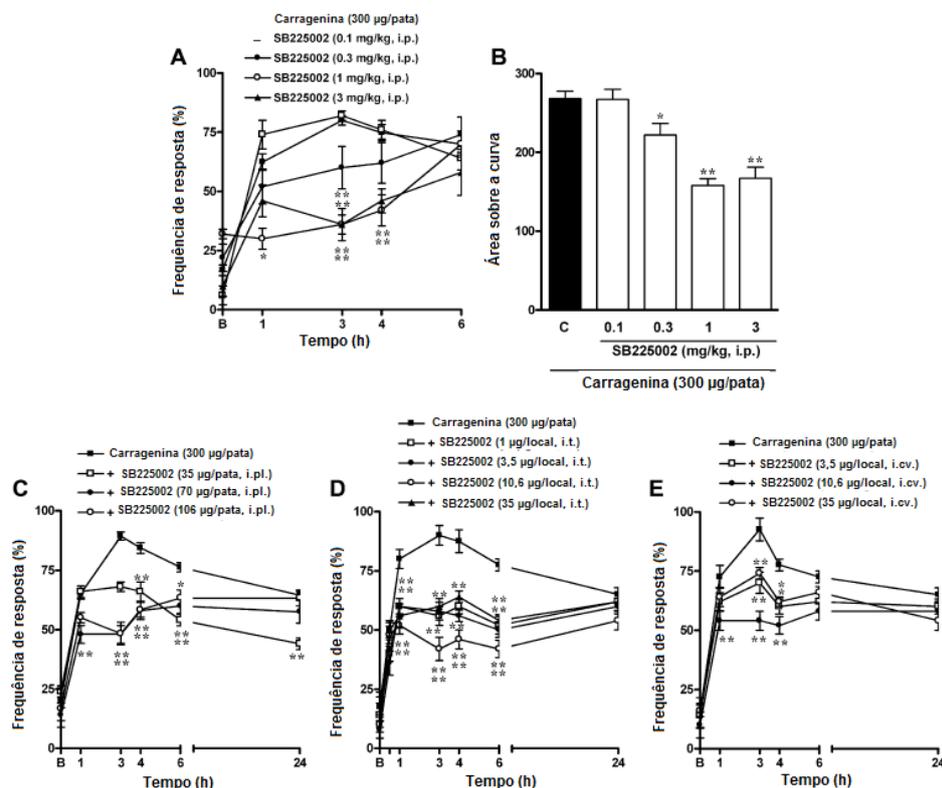


Figura 99 Efeito do SB225002 administrado via: (A) i.p. (0.1–3 mg/kg, 30 min. antes), (C) i.pl. (35–106 µg/pata, co-administrado), (D) i.t. (1–35 µg/local, 10 min. antes) ou (E) i.c.v. (3.5–35 µg/local, 10 min. antes) rotas de indução da hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.pl. de carragenina (300 µg/pata) em ratos. O gráfico B representa a area sobre a curva do gráfico A.

A injeção intraplantar (i.pl) de carragenina (300 µg/pata) induziu uma marcada hipernocicepção mecânica, com uma duração de 6 h, como mostrado por um grande aumento dos valores de linha de base em resposta aos estímulos com o filamento de Von Frey de 0,6g (Figura 99). A administração sistêmica de SB225002 i.p. (0,1 a 3 mg/kg,) produziu redução significativa e dose dependente da resposta à hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina, com uma inibição máxima de 52 do \pm 3% na dose de 1 mg/kg, e um com valor médio estimado da DI_{50} = 1.19 (0,58-2,42) mg/kg ou 3,38 µmol/Kg (Figura. 99A e B).

Na tentativa de verificar os locais periféricos ou centrais da ação do SB225002, este composto foi dosado por diferentes rotas de administração e foi

testado no modelo de carragenina da dor (Figura 99C) e demonstra que a co-injeção i.pl de SB225002 (35-106 $\mu\text{g/pata}$) foi capaz de reduzir marcadamente a hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina na dose (300 $\mu\text{g/pata}$). A inibição observada foi obtida na dose de 106 $\mu\text{g/pata}$ com $46 \pm 1\%$ de inibição. Além disso, a administração de SB225002 via i.t. (1-35 $\mu\text{g/local}$), ou i.c.v. (3,5-35) foi capaz de reduzir a hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina, com inibições $55 \pm 2\%$ e $41 \pm 1\%$, ambos nas doses de 10,6 $\mu\text{g/local}$ (Figura . 99D e E).

5.6.4 Hipernocicepção induzida pelo complexo adjuvante de Freund frente ao SB225002.

Foi investigado em seguida se o tratamento sistemático com o SB225002 (1 mg/kg), administrado durante 7 dias, duas vezes por dia pela via i.p., seria capaz de impedir a hipernocicepção mecânica persistente depois da aplicação de CFA (20 $\mu\text{l/pata}$). A administração repetida de SB225002 reduziu significativamente a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção de CFA, por até 5 dias (120 horas) após o tratamento; com uma inibição $76 \pm 9\%$, (Gráfico 46).

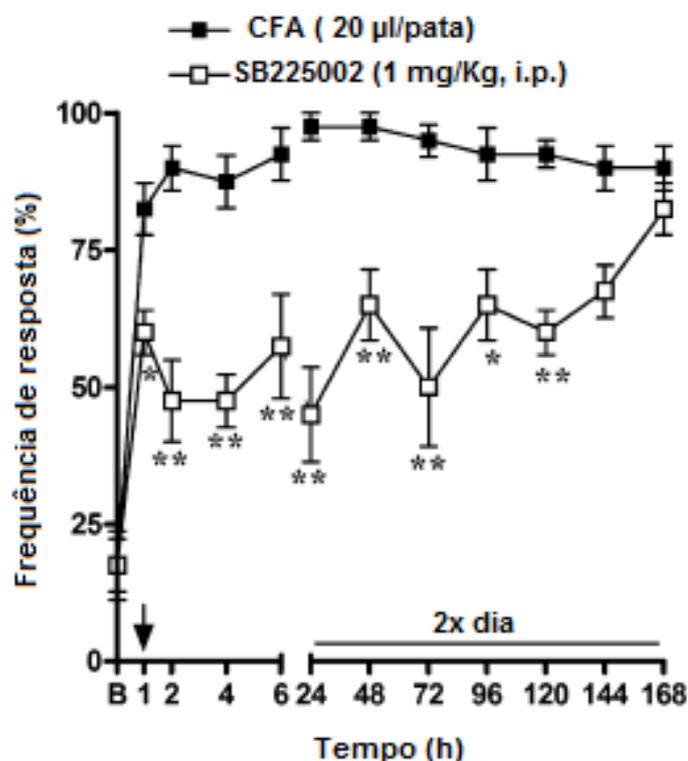


Gráfico 46 Frequência da resposta das retiradas da pata direita que foram injetadas com o complex adjuvante de Freund (CFA – 20 µl/pata) no grupo controle e nos ratos tratados com SB225002 (1 mg/kg, i.p., administrado duas vezes por dia) em diferentes intervalos de tempo após o tratamento com estas drogas.

5.6.5 Hipernocicepção induzida pela constrição parcial do nervo ciático frente ao SB225002.

O tratamento crônico com o SB225002 (1 mg/kg), dosado duas vezes por dia via i.p., apresentamos uma ação marcada e eficaz em reverter o alodinia mecânica induzida pela constrição parcial do nervo ciático, por até 4 dias após o tratamento. As porcentagens de redução foram $60 \pm 2\%$, 2 h após a primeira dose de SB225002, e $35 \pm 3\%$ no terceiro dia após o tratamento repetido (Gráfico 47).

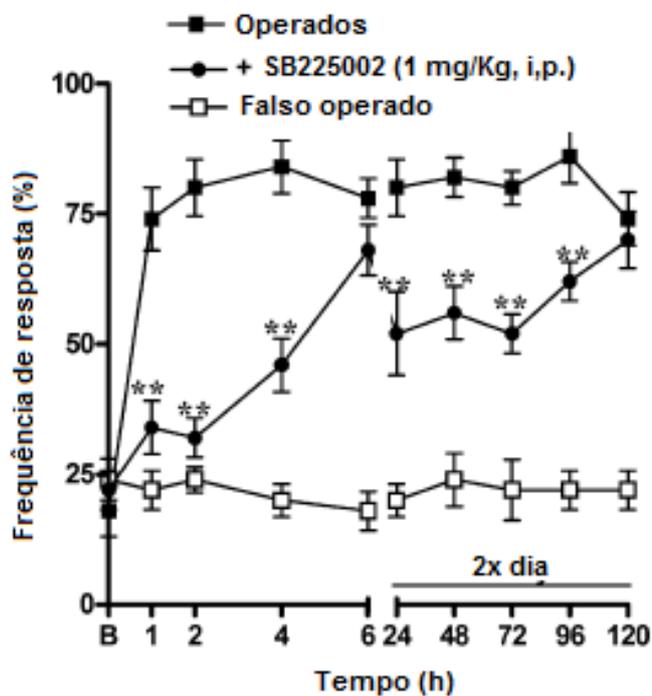


Gráfico 47 Frequência da resposta da retirada da pata direita nos falso operados e operados pela constrição parcial do nervo ciático, os ratos foram tratados com salina (10 ml/kg) ou SB225002 (1mg/Kg, i.p. administrado duas vezes por dia) em diferentes intervalos de tempo após o tratamento.

5.7 Resultados obtidos com o SB225002 em diferentes modelos de nocicepção.

O mesmo pré-tratamento i.p. do SB225002 (1 a 3 mg/kg,), 30 minutos antes da indução da nocicepção induzida pela capsaicina, glutamato ou PMA, não alterou significativamente a nocicepção espontânea induzida por estes agentes alôgenicos (Tabela 3). Entretanto, a administração sistemática (3 mg/kg, i.p.) de SB225002 apresentou diminuição produzida pela nocicepção induzida por 8-Br-cAMP (32 ± 7 %).

Tabela 4 Efeitos do SB225002 em vários modelos de nociceção em ratos.

Modelo	Tratamento (mg/kg, i.p., 30 min. antes)				
	Controle	SB 225002			Dipirona ^a
		0.3	1	3	60
Teste "Writhing" ^b	48 ± 5	5 ± 6 *	3 ± 2 *	---	12 ± 4 s *
Formalina 1 ^a Fase	76 ± 3 s	--	90 ± 8 s	76 ± 5 s	---
Formalina 2 ^a Fase	291 ± 30 s	--	234 ± 27 s	240 ± 18 s	---
Capsaicina	44 ± 3 s	--	43 ± 3 s	---	---
Glutamato	170 ± 13 s	--	118 ± 20 s	151 ± 16 s	50 ± 10 s *
PMA	114 ± 8 s	--	134 ± 8 s	116 ± 5 s	---
8-Br-cAMP	34 ± 3 s	--	28 ± 2 s	24 ± 2 s *	---

Todos os dados representam a média e o desvio padrão da média de 5 a 7 animais.

^aDipirona foi usada como uma fármaco de controle positivo. ^bOs dados são apresentados quanto ao número de retiradas.

Como ilustrado na (Figura 100), a injeção i.pl de PGE₂ (0,1 nmol/pata), epinefrina (100 ng/pata) ou KC (10 ng/pata) retirada da pata do rato, produziram efeitos hipernociceptivos mecânicos proeminentes que foram até 24 h, como indicado por um aumento marcado dos valores de linha de base em resposta a estímulos com filamento de Von Frey de 0.6g. O antagonista do receptor CXCR2, o SB225002 (1 mg/kg, i.p., 30min.) foi significativamente eficaz em impedir a

hipernociceção mecânica causada por PGE₂ (Figura 100 A) ou epinefrina (Figura 100 B). As porcentagens da redução foram $41 \pm 2\%$ e $55 \pm 1\%$, respectivamente. O tratamento com SB225002 (1 mg/kg, i.p., 30 minutos antes) produziu uma significativa redução da hipernociceção mecânica induzida pelo KC, com uma inibição $49 \pm 3\%$ (Figura 100 C).

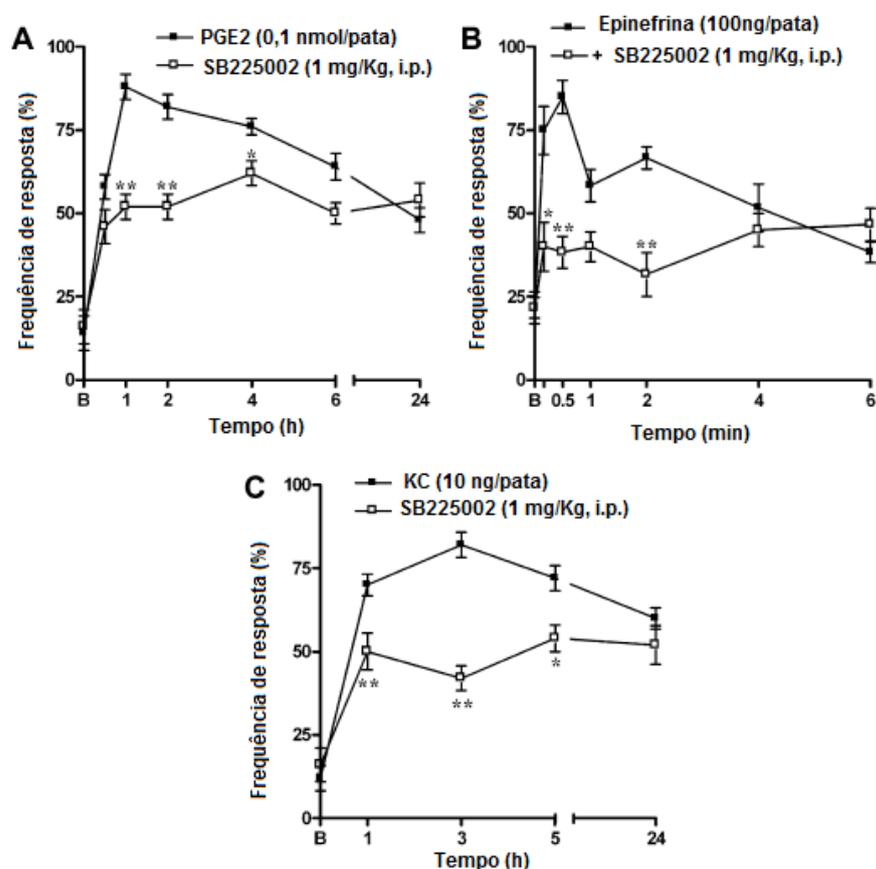


Figura 100 A frequência da resposta de retirada da pata direita foi avaliada no grupo de controle e nos ratos tratados sistematicamente com o SB225002 (1 mg/kg, 30 minutos antes) em intervalos diferentes depois da injeção i.p.i (A) PGE₂ (0,1 nmol/pata), (B) de epinefrina (100 ng/pata), ou (C) KC (10 ng/pata).

Ponto básico inicial (B), (em ANOVA dois sentidos, seguido pelo teste Bonferroni's).

Os resultados da (Figura 101A) indicam que o aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO) induzida pela injeção i.pl do carragenina (300 µg/pata) foi inibida significativamente pelo tratamento com SB225002 (0,3 e 1 mg/kg, i.p., 30 minutos antes), quando comparado com o grupo controle ($39 \pm 2\%$ e $46 \pm 3\%$, respectivamente). A injeção i.pl de carragenina (300 µg/pata) aumentou significativamente os níveis de KC, IL-1 β e do TNF- α (Fig. 101 BD) no tecido da pata do rato. O tratamento sistemático com SB225002 (0,1 - 3 mg/kg, i.p.) foi marcadamente dose dependente reduzindo os de níveis do KC, com uma inibição máxima $90 \pm 5\%$, na dose de 1 mg/kg, i.p. (Figura 101 C). O mesmo tratamento com SB225002 nas doses (0,1 - 3 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente a produção de IL-1 β (Figura 89C) e de TNF- α (Figura 101 D), de maneira dose dependente. As inibições observadas na dose de 3 mg/kg foram $25 \pm 1\%$ e $58 \pm 3\%$, para IL-1 β e TNF- α , respectivamente.

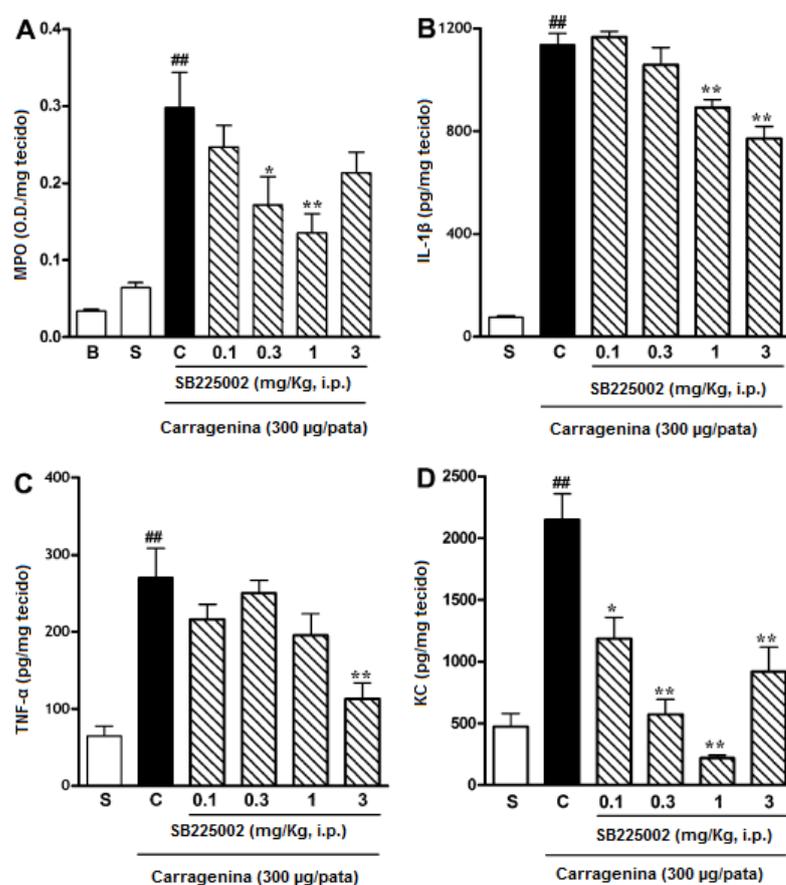


Figura 101 Efeito do SB225002 (0.1–3 mg/kg, i.p.) no aumento de: (A) MPO, (B) IL-1 β , (C) TNF α , or (D) KC produzido pela indução por uma injeção i.p. de carragenina (300 ng/pata) sobre a retirada da pata.

A administração via i.p. de SB225002 de (1 a 3 de mg/kg), dada 30 minutos antes, não afetou significativamente a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto (open-field test) (Tabela 4). Além disso, a administração via i.p. de SB225002 de (1 a 3 mg/kg, 30 minutos) não mudou significativamente a coordenação motora dos animais no teste de “rotarod” ou nas respostas de latência para estímulos térmicos, em comparação com o grupo controle (Tabela 4).

Tabela 5 Análise dos possíveis efeitos adversos do SB225002 em ratos.

Teste	Controle	SB 225002 (mg/kg, i.p.)	
		1	3
"Rota-rod"	54 ± 4 s	58 ± 1 s	55 ± 3 s
Campo aberto (Open-field ^a)	68 ± 7	68 ± 6	73 ± 10
Placa quente (Hot plate)	4 ± 1 s	3 ± 1 s	4 ± 1 s

^aOs dados foram expressos como o número de quadrados cruzados. Todos os dados representam a média e o desvio padrão da média de 5 a 7 animais.

5.8 Discussão dos resultados obtidos com o SB225002 em diferentes modelos de nocicepção.

No presente estudo investigamos os efeitos do bloqueio do receptor transmembrana CXCR2 em modelos diferentes de nocicepção nos ratos, tratando os animais com um antagonista não peptídico seletivo e competitivo do receptor transmembrana CXCR2, o SB225002. Os dados atuais revelam que o SB225002 pode diminuir significativamente as alterações nociceptivas em modelos experimentais agudos ou crônicos da dor. Nossos resultados corroboram e indicam que os receptores de quimiocinas indicam um papel crucial no processamento da dor e chamam a atenção ao potencial terapêutico dos antagonistas do receptor CXCR2 para tratar circunstâncias dolorosas agudas e persistentes.

Nós avaliamos inicialmente os efeitos do tratamento com o SB225002 em alguns modelos clássicos de comportamento nociceptivo agudo nos ratos. Nossos primeiros resultados apresentam o tratamento via i.p. com SB225002. Este produziu uma redução dose-dependente marcada das respostas de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. **Os dados apresentados previamente estendem as noções na relevância das quimiocinas no teste do ácido acético, e demonstram pela primeira vez o papel dos receptores CXCR2 neste modelo.**

O teste da formalina foi empregado extensamente para avaliar a ação antinociceptiva de novos compostos. A resposta nociceptiva causada pela formalina indicou um perfil bifásico desobstruído, com dois componentes distintos: um neurogênico e outro inflamatório. Surpreendentemente, o tratamento dos ratos com SB225002, na mesma escala das doses em que este antagonista foi testado no modelo induzido por ácido acético, não alterou significativamente uma ou outra fase de nocicepção da formalina na pata traseira. Neste momento, nós não podemos explicar este resultado divergente. Entretanto, podem existir algumas distinções entre nosso estudo como o uso da espécie animal diferente e das regiões anatômicas analisadas, devem ser tomadas em consideração.

Para ganhar umas introspecções adicionais nas ações antinociceptivas do SB225002, nós avaliamos em seguida os efeitos deste antagonista em alguns modelos mais específicos de nocicepção espontânea e aguda. A administração i.p. de SB225002 não produziu nenhuma alteração significativa das respostas nociceptivas do glutamato. Em ambos os modelos, há um componente neurogênico claro.

Similar ao modelo induzido pela capsaicina representa uma interessante ferramenta para estudar as drogas antinociceptivas que inibem a dor neurogênica e se reservam avaliar a participação de diversos mediadores, tais como aminoácidos e neuropeptídeos excitatórios. Além disso, (BEIRITH et al., 2003) demonstraram que a nocicepção induzida por glutamato apresentou igualmente um componente neurogênico importante. Conseqüentemente, é possível sugerir que os mecanismos adicionais, a interferência na liberação dos neuropeptídeos das fibras periféricas sensoriais possam ser relacionados aos efeitos antinociceptivos do SB225002.

E agora que a ativação da PKC foi reconhecida como uma etapa importante para os efeitos nociceptivos causados pelos numerosos estímulos fastigantes, incluindo aqueles causados por mediadores inflamatórios. Diversos componentes celulares PKC fosforilados, incluindo enzimas, canais do iônicos e membranas que limitam os receptores que são importantes reguladores nos processos de excitação e de sensibilização dos nociceptores. Além disso, a estimulação de PKC ϵ periférico está envolvida provavelmente na nocicepção aguda evocada pela epinefrina ou pelo TNF- α , assim como em modelos crônicos da inflamação ou de neuropatia. Os dados atuais revelaram que o tratamento com o SB225002 não afetou a nocicepção espontânea causada pelo ativador da PKC (proteína kinase C) ou PMA (acetato miristato de forbol); assim, nós pudemos igualmente rejeitar um efeito direto possível do SB225002 na estimulação da PKC. De fato, demonstrou-se recentemente que a PKC ϵ não representa um caminho de sinalização de ativação intracelular relativo aos receptores CXCR2.

A administração sistemática do SB225002, foi capaz de inibir a resposta das lambidas induzidas por PKC e o ativador 8-Br-cAMP. Isto nos sugere que a ativação do receptor CXCR2 durante o processamento da dor esteja relacionada

provavelmente a via do PKC. Esta premissa é suportada pelos resultados que demonstram que o SB225002 pode reduzir notavelmente a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.pl de PGE₂ ou de epinefrina nos ratos. Eicosanoides e as aminas simpáticas são mediadores preliminares responsáveis pela hipernocicepção mecânica nos ratos. Assim, obstruir o receptor CXCR2 usando o SB225002 pode conduzir à inibição de vias de PKA-cAMP, contribuindo para as ações antinociceptivas deste composto.

Demonstrou-se que a injeção de i.pl da quimiocina CXC, KC, conduz a hipernocicepção mecânica dose e tempo dependentes nos ratos que podem persistir em até 5 h, e a resposta hipernociceptiva foi marcadamente reduzida por indometacina (um inibidor não-seletivo da COX) ou por guanetidina (um agente de bloqueio simpatomimético). Nossos dados mostraram que a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção de i.pl de KC na pata do rato foi reduzida notavelmente pelo pré-tratamento com SB225002.

Os dados obtidos no atual estudo demonstram claramente que o tratamento i.p. dos ratos com o SB225002 produziu efeitos anti-hipernociceptivos, para até 4 h, no modelo agudo da dor induzido pela carragenina. A administração intratecal (i.t.) de SB225002 foi eficaz em inibir a hipernocicepção mecânica induzida pela carragenina nos ratos (em até 6 h). Também, a resposta hipernociceptiva causada pela carragenina foi reduzida significativamente quando o SB225002 foi administrado intraplantar (i.pl.) ou por rotas de i.c.v. A evidência relevante adicional fornecida em nosso estudo demonstra que o tratamento sistemático com o SB225002 impediu significativamente a migração de neutrófilos de IL-1 β e KC induzidos pela injeção de TNF α , pela injeção de carragenina na pata do rato. Podemos sugerir que os efeitos antinociceptivos descritos para SB225002 no

modelo da carragenina, estejam relacionados provavelmente a sua habilidade de reduzir a migração das células e a geração de citocinas pro-inflamatórias.

O interesse em identificar novas alternativas para o tratamento da dor persistente aumentou significativamente na última década; desde que as terapias atualmente disponíveis são parcialmente eficazes e a maioria das drogas analgésicas induzem igualmente aos efeitos secundários que impedem seu uso continuado.

Para avaliar os efeitos do SB225002 em modelos persistentes da dor, nós avaliamos primeiramente seu perfil de ação na hipernocicepção mecânica induzida pela injeção intraplantar (i.pl) do CFA (complexo adjuvante de Freund). A injeção i.pl de CFA produz uma resposta inflamatória que se torna dentro de algumas horas, um efeito que seja associado com uma modificação impressionante na atividade (V e VI) dos neurônios superficiais (I e II) e profundos do laminal que recebem entradas nocivas. Os resultados atuais demonstram claramente que o tratamento terapêutico com o SB225002 produziu uma inibição proeminente do hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.pl do CFA, por até 5 dias.

A fim de determinar mais ações do SB225002 em modelos duradouros de nocicepção, avaliamos seus efeitos na dor neuropática como no comportamento induzido pela CNPC (construção parcial do nervo ciático). Notavelmente, o tratamento crônico com o SB225002, em uma dose baixa como (1 mg/kg), podia reduzir marcadamente a alodinia mecânica depois da CNPC. **Apesar disso, em nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que mostra a habilidade de um antagonista CXCR2 seletivo em impedir as alterações hipernociceptivas induzidas por CNPC.**

As ações anti-hipernociceptivas do SB225002, na dose ativa farmacologicamente, não parecem estar associadas diretamente com as ações não específicas relaxantes ou sedativas do músculo, porque esta droga não afetou o desempenho dos ratos no teste de “rota-rod” nem a atividade locomotora no teste de campo aberto. **Além disso, o SB225002 não interferiu com a resposta da latência de estímulos térmicos. Estes dados são completamente favoráveis a uma aplicação terapêutica possível do SB225002 para tratar a dor duradoura, onde um tratamento crônico for exigido. Esta proposta é reforçada pela exibição dos dados que os efeitos antinociceptivos do SB225002 foram observados na maior parte em baixas doses, variando entre 0.3 e 1 mg/kg. Apesar disso, estudos toxicológicos pré-clínicos adicionais são necessários para confirmar essa possibilidade.**

Em resumo, os dados obtidos no presente trabalho demonstram que o antagonista do receptor transmembrana CXCR2 seletivo e não peptídico o SB225002, apresenta efeitos antinociceptivos marcados indicados em modelos experimentais agudos e crônicos da dor em ratos. Neste momento, nós não podemos indicar precisamente os mecanismos implicados nos efeitos antinociceptivos do SB225002. Além disso, o SB225002 parece interferir com as vias periféricas e centrais da sensibilização dos nociceptores. Quando comparados com dados da literatura, nossos resultados estendem a idéia no papel essencial dos receptores de quimiocinas em alterações dolorosas, e indicam os antagonistas seletivos do receptor transmembrana CXCR2 como uma promessa das escolhas terapêuticas para tratar a dor aguda e persistente (MANJAVACHI et al., 2009 – Anexo A).

5.9 Resultados obtidos da investigação da ação do antagonista seletivo do receptor CXCR2, SB225002, sobre parâmetros inflamatórios na colite experimental induzida por TNBS em camundongos.

Parte deste trabalho foi realizado em cooperação e os resultados aqui apresentados fazem parte da dissertação de mestrado (Bento, 2008 – Dissertação de Mestrado – UFSC). Os resultados obtidos com o SB225002 apresentados abaixo foram publicados em conjunto no Journal Leukocyte Biology (BENTO et al. 2008 – Anexo C).

5.9.1 Efeito do tratamento com SB225002 sobre o dano macroscópico

Com o objetivo de avaliar o antagonista do receptor CXCR2, SB225002, exercia algum efeito curativo sobre o dano tecidual causado pelo TNBS (na dose de 1,5 mg/animal), o composto foi administrado nas doses (0,1; 0,3 e 1mg/Kg, i.p.). A dexametasona (1mg/Kg, s.c.) foi usada como controle positivo para efeito de comparação. O tratamento com SB225002 foi capaz de reduzir o dano macroscópico nas doses de 0,3 e 1,0 mg/Kg, respectivamente. As porcentagens de inibição foram $89,3 \pm 3,2$ e $79,1 \pm 7\%$ para as doses de 0,3 e 1,0 mg/Kg, respectivamente.

A menor dose (0,1 mg/Kg) do SB225002, não foi capaz de reduzir os danos macroscópicos de forma significativa. O tratamento com dexametasona também reduziu de forma significativa o dano macroscópico com porcentagem de inibição de $82,7 \pm 1\%$ (Figura 102).

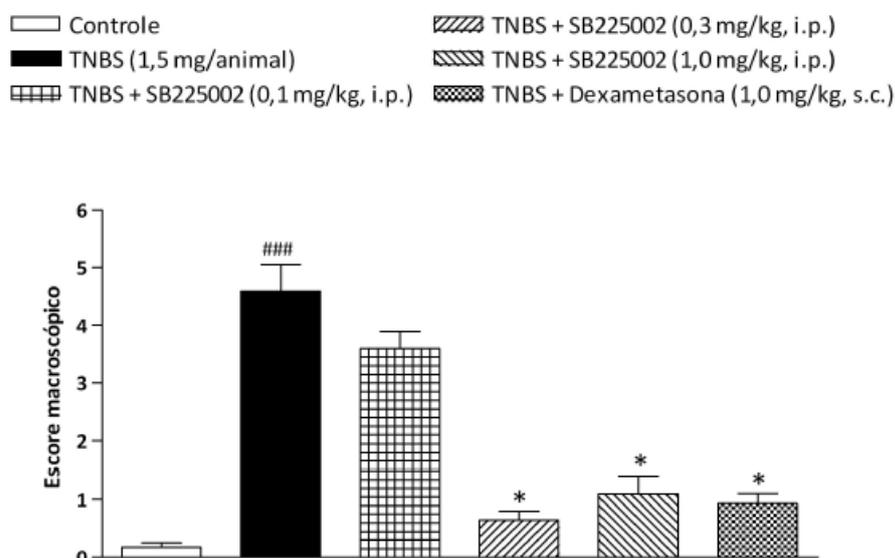


Figura 102 Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002 e dexametasona, sobre o dano macroscópico induzido pelo TNBS em camundongos.

Setenta e duas horas após a indução da colite os cólons foram removidos e avaliados quanto ao dano macroscópico. As colunas representam a média do escore macroscópico do cólon de 6 – 8 animais por grupo e as barras verticais o desvio padrão da média.

O resultado obtido para o SB225002 na dose de (0,3 mg/Kg) foi melhor ($89,3 \pm 3,2 \%$), comparado com o controle (dexametasona) que foi de $82,7 \pm 1\%$ (na dose de 1mg/Kg).

5.9.2 Efeito do SB225002 sobre o peso corporal e a mortalidade induzida pelo TNBS

Durante o período experimental os animais foram acompanhados com relação à possível mudança de peso corporal e o índice de sobrevivência, foram avaliados.

Podemos observar na Figura 103 os resultados obtidos. Os animais foram colocados em jejum por 24 horas (primeiro dia), o que levou a uma redução de peso em todos os grupos experimentais (dia 0). Neste, dia somente animais dos grupos TNBS e TNBS + SB225002 tiveram a colite induzida. Dessa forma, 24 horas após a administração do TNBS (dia 1), apenas esses dois grupos não recuperaram o peso corporal, sugerindo que estes dois grupos estavam com colite, enquanto o grupo controle que não recebeu TNBS, começou a recuperar o peso. No mesmo dia, após a pesagem dos animais o SB225002 (0,3 mg/Kg. i.p), foi administrado, sendo que no dia 2, ou seja 48 horas após a indução da colite, este grupo começou a recuperar significativamente o peso corporal, enquanto que o grupo administrado somente com TNBS continuou a apresentar redução do peso corporal. No terceiro dia os animais do grupo controle apresentaram peso acima dos níveis basais, enquanto os animais tratados com SB225002 apresentaram uma recuperação de peso próximo a estes níveis, diferindo de forma significativa em comparação ao grupo TNBS, que por sua vez não apresentou recuperação significativa do peso corporal.

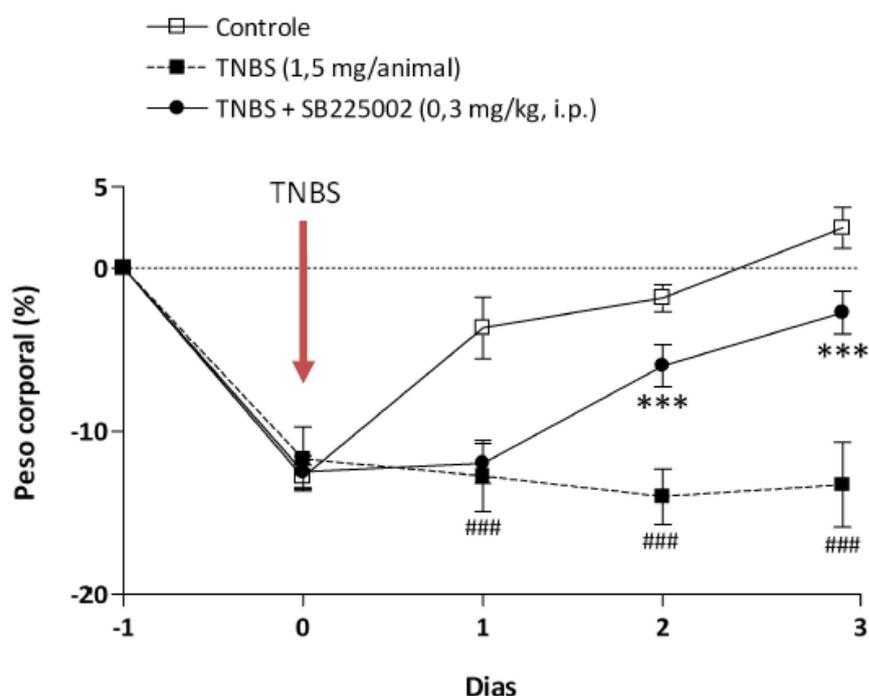


Figura 103 Efeito do tratamento com o antagonista do receptor CXCR2, sobre o peso corporal, na colite induzida por TNBS. Os resultados representam a média do peso corporal de 6-8 animais por grupo e as barras verticais os erros padrões das médias.

Vinte e quatro horas após a indução da colite por TNBS (1,5 mg/animal) o índice de mortalidade dos animais passou a ser monitorado. Como apresentado na Figura 96, ao longo dos dias 1, 2 e 3, após a indução da colite houve uma taxa de mortalidade de 65% nos animais do grupo que receberam apenas TNBS. O tratamento com SB225002 reduziu significativamente a taxa de mortalidade 44,4; 12,0 e 19,0 para as doses de (0,1; 0,3 e 1,0 mg/Kg, i.p), respectivamente. O tratamento com a dexametasona (1 mg/Kg, s.c) também reduziu de maneira significativa a mortalidade dos animais para 8% (Figura 104).

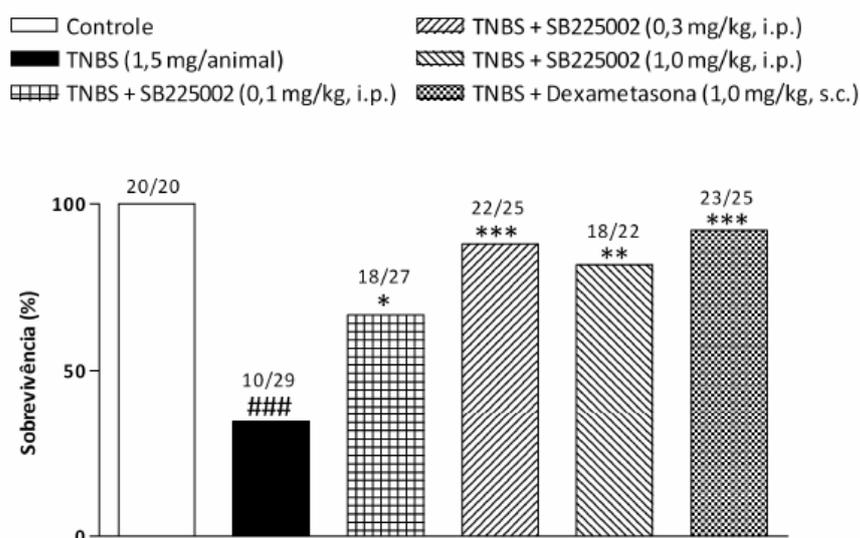


Figura 104 Efeito do antagonista do receptor CXCR2, o SB225002, ou da dexametasona, sobre a mortalidade induzida pelo TNBS em camundongos. As colunas representam a porcentagem de sobrevivência em relação ao número de animais utilizados em cada grupo experimental. Os números acima de cada barra representam a quantidade de animais mortos em relação ao número total de animais utilizados no experimento.

5.9.3 Efeito do SB225002 sobre o peso e comprimento do cólon, e peso do baço, no modelo de colite experimental induzida pelo TNBS em camundongos.

Três dias após a indução da colite por TNBS, os animais tiveram seus cólons removidos em sua porção final correspondendo a 4 cm. Os animais com colite apresentaram um aumento no peso do cólon de 3,4 vezes em comparação ao grupo controle. O tratamento com SB225002 (0,3 mg/Kg, i.p.) foi capaz de reverter de forma significativa esse aumento em $75,2 \pm 5,4$ % (Figura 105). Os animais que receberam dexametasona (1,0mg/Kg, s.c) apresentaram uma redução do índice de edema de cólon de 82 ± 1 %.

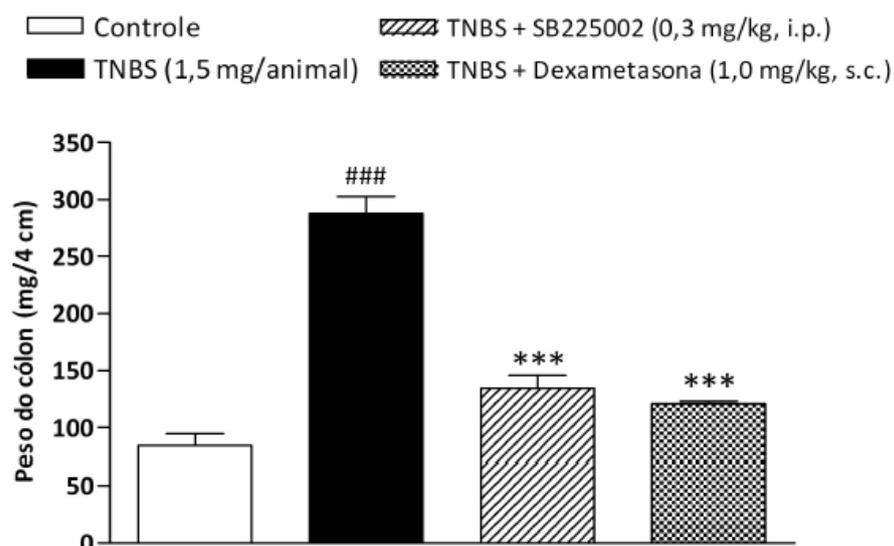


Figura 105 Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002, ou da dexametasona, sobre o aumento de peso do cólon de camundongos após a administração do TNBS. As colunas representam a média do peso dos cólons de 4-6 animais por grupo e as barras verticais o desvio padrão das média.

Para avaliar o efeito do SB225002 sobre a redução do comprimento do cólon induzida por TNBS, 72 horas após a indução da colite, a porção intestinal que compreende desde o cecum até ao ânus foi retirada e medida. Como demonstrado na Figura 106 (A e B), os animais que receberam apenas TNBS apresentaram uma redução no comprimento do cólon em cerca de 20 %, quando comparado ao grupo controle. Entretanto os animais que receberam TNBS + SB225002 (0,3 mg/Kg, i.p.) ou TNBS + dexametasona (1,0 mg/Kg, s.c) não apresentaram redução significativa no comprimento do cólon.

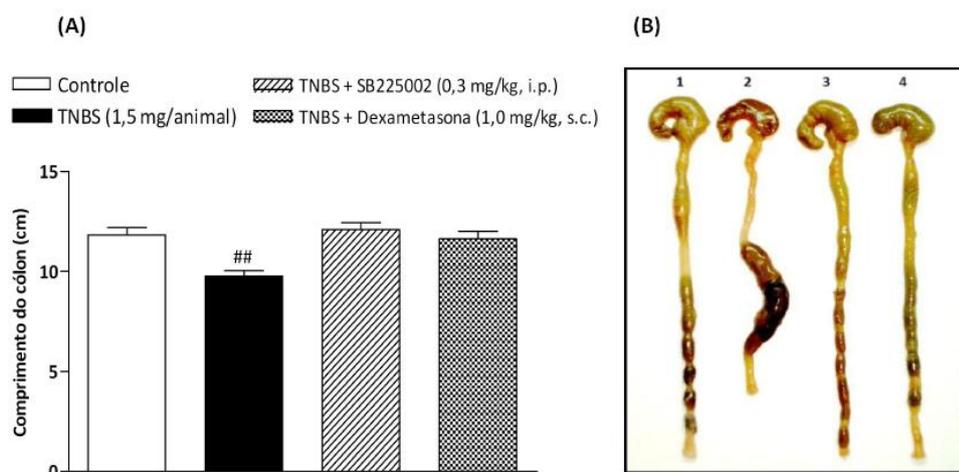


Figura 106 Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002, ou da dexametasona, sobre o encurtamento do cólon de camundongos após a administração do TNBS. (A) As colunas representam a média do comprimento dos cólons de 4 – 6 animais por grupo e as barras verticais o desvio padrão da média. (B) Foto representativa de cólons dos grupos experimentais, (1) controle, (2) TNBS, (3) TNBS + SB225002 e (4) TNBS + dexametasona).

Outro parâmetro avaliado foi o aumento do peso do baço, o qual pode ser considerado como indicativo de inflamação sistêmica, portanto este parâmetro também foi avaliado. Neste sentido, setenta e duas horas após a injeção de TNBS, os animais tiveram seus baços removidos e pesados. Os animais do grupo do TNBS apresentaram aumento significativo no peso do baço em cerca de 20% em comparação ao grupo controle. Os animais que receberam SB225002 (0,1; 0,3 e 1,0 mg/Kg, i.p.) não apresentaram nenhum aumento significativo no peso deste órgão (Figura 107). Entretanto, os animais tratados com a dexametasona (1,0 mg/Kg, s.c) mostraram uma diminuição do peso do baço abaixo dos níveis basais.

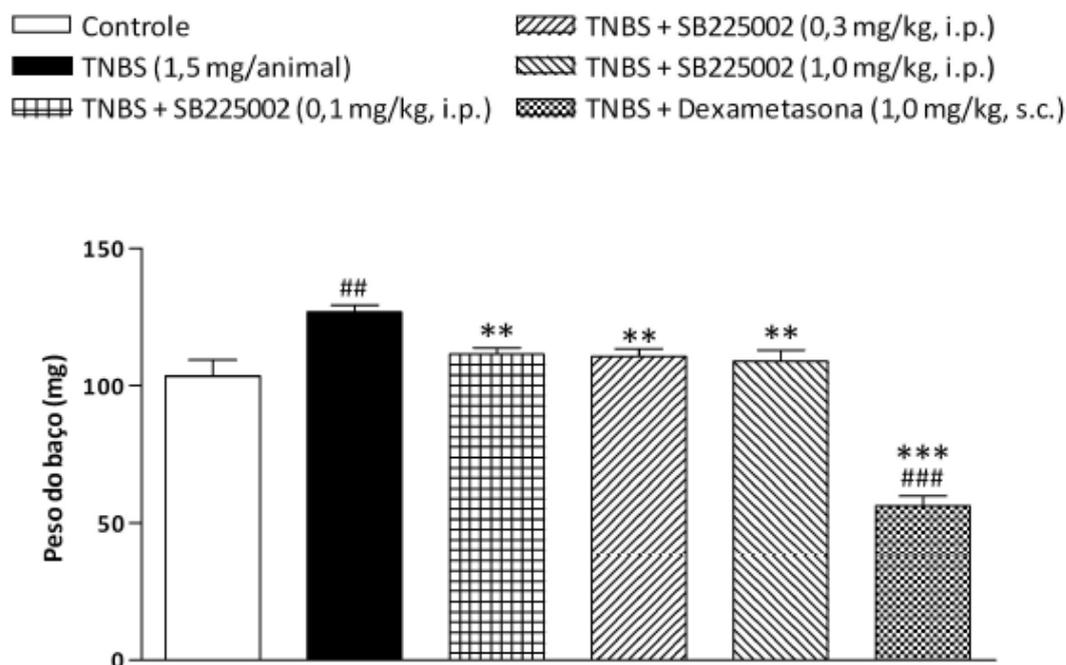


Figura 107 Efeito do antagonista do receptor CXCR2, ou da dexametasona, sobre o aumento do peso do baço após a administração do TNBS. As colunas representam a média do peso do baço de 6-8 animais por grupo e as barras verticais o desvio padrão da média.

5.9.4 Efeito do tratamento com SB225002 sobre o dano microscópico

De acordo com a Figura 108 (A-D), as imagens histológicas revelaram que, 72 horas após a indução de colite por TNBS, os cólons dos animais apresentaram grande infiltração de polimorfonucleares no interior da lâmina própria da mucosa, do cólon. Além disso, foi verificado sinais de espessamento da parede da mucosa, destruição das criptas e perda de células globet (células calciformes), resultando em dano tecidual. A avaliação do escore microscópico revelou um aumento do dano tecidual de 23 vezes em relação ao grupo controle (Figura 108 E). O tratamento sistêmico com SB225002 (0,3 mg/Kg, i.p.) causou redução da resposta inflamatória,

reduzindo a infiltração de polimorfonucleares, assim como o espessamento da parede intestinal, além de manter a integridade das criptas, conferindo a proteção da mucosa, reduzindo o dano microscópico em $89,2 \pm 6,7\%$. Nos cólons dos animais tratados com dexametasona (1,0 mg/Kg, s.c), pouquíssimo infiltrado celular e nenhum dano tecidual aparente pôde ser observado. Os cólons destes animais apresentaram uma redução tecidual do escore microscópico em $92,8 \pm 3\%$ (Figura 108 E).

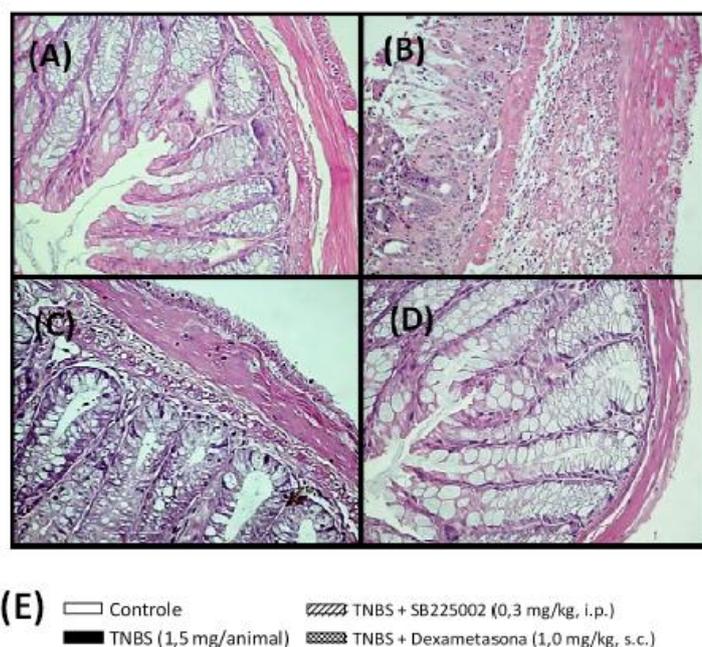


Figura 108 Efeito do antagonista do receptor CXCR2, SB225002, ou da dexametasona, sobre o dano tecidual microscópico induzido pelo TNBS. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do tecido de cólons fixados em H & E (aumento 200 X) dos grupos: (A) controle, (B) TNBS, (C) TNBS + SB225002 e (D) TNBS + dexametasona. (E) As colunas representam a média de 4-6 animais e as barras verticais o desvio padrão da média.

Os resultados apresentados indicam o relevante papel exercido pelos neutrófilos no dano tecidual e nos mecanismos relacionados ao desenvolvimento das IBDs, podemos concluir com base nos resultados do presente trabalho, que o antagonista seletivo para o receptor CXCR2, o SB225002, apresenta potencial terapêutico para o tratamento de colite ulcerativa, uma vez que esse composto revelou-se altamente eficaz em reduzir os parâmetros inflamatórios avaliados com colite induzida pelo TNBS.

No estudo atual, nós demonstramos pela primeira vez que o SB225002, um poderoso e seletivo antagonista não peptídico do receptor CXCR2, foi altamente eficaz em melhorar a colite induzida por TNBS nos ratos (Para mais detalhes: BENTO et al., 2008 - Anexo C).

Os 09 compostos análogos sintéticos (A00, A03, A04, A05, A07, A08, A09, A16 e A28) serão avaliados frente ao modelo de colite induzida por TNBS futuramente.

6.0 CONCLUSÃO

Foram sintetizados e caracterizados 33 compostos análogos ao 1-(2-hidroxi-4-nitrofenila)-3-(2-bromofenila)-uréia (SB225002) que foram testados somente no modelo de dor induzido pela carragenina para realizar a triagem dos compostos com potencial farmacológico. Os 09 compostos análogos com porcentagem de inibição \geq ao SB225002 na dose de 1mg/Kg serão futuramente avaliados frente aos modelos experimentais ao qual o SB225002 foi submetido, complementando o atual estudo.

Os resultados obtidos apresentam consistência e indicam que o método manual de Topliss dentre outras estratégias usadas em química medicinal, são boas ferramentas, para previsão de novos compostos com estruturas químicas semelhantes e que apresentam aumento no efeito farmacológico.

Os compostos antagonistas podem interagir com os aminoácidos presentes nos “loops” transmembrana (externo) bem como com parte da parede celular. A região e a maneira como o SB225002 interage no receptor transmembrana CXCR2 ainda não foi esclarecida.

Em conclusão, nossos resultados mostram que o SB225002 e 09 dos 33 análogos sintéticos exibiram porcentagem de inibição maior do que o SB225002 (na dose de 1mg/Kg) e apresentaram atividade farmacológica *in vivo*, sendo eficazes em reduzir a inflamação em modelos animais. Estes compostos podem ser relevantes como futuras estratégias para o estudo do papel de quimiocinas específicas ou mesmo terapeuticamente para o tratamento de doenças inflamatórias associadas a uma produção exacerbada de seus ligantes. Além disso, as N.N'-diariluréias podem

ser úteis para a obtenção de novos fármacos através do planejamento molecular racional.

7.0REFERÊNCIAS

- 1- ACD/SPECMANAGER, Analytical Data Management System, Ver. 4.09/21
Advanced Chemistry Development Inc., 1999;
- 2- ARMAREGO, W. L. F.; PERRIN, D. D. Purification of Laboratory Chemicals, 4 Ed.,
1996;
- 3- BARNES P. J. New Treatments for COPD, Nature Reviews Drug Discovery 1;
437-446, 2002;
- 4- BARREIRO JB, FRAGA C. A. M. Química Medicinal – As bases moleculares da
ação dos fármacos, Artmed, 2001.
- 5- BATCHELOR, J. D. et al. Recreation of Wöhler's Synthesis of Urea: An
Undergraduate Organic Laboratory Exercise THE CHEMICAL EDUCATOR, 1,
Vol. 3 , No. 6, 1998;
- 6- BEAVER, D. J. et al., The preparation and bacteriostatic activity of substituted
ureas, J. Am. Chem. Soc., 79 (5), p.1236–1245, 1957;
- 7- BEIRITH A.; Santos, A. R.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the
nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse
paw. Brain Res., 924, 219-28, 2002;
- 8- BENTO, F. A. Efeito do SB225002, antagonista seletivo do receptor para
quimiocinas CXCR2, na colite induzida pelo ácido 2,4,6-trinitrobenzeno
sulfônico (TNBS) em camundongos. Dissertação de mestrado-UFSC, 2008;

- 9- BENTO, F. A. et al. The selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates acute experimental colitis in mice, *Journal Leukocyte Biology*, vol. 84, p. 1213-1221, 2007;
- 10- BESSON J. M. The neurobiology of pain, *Lancet* 353:1610-1615, 1999;
- 11- BORTOLANZA L. B. et al. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. *Eur. J. Pharmacol.* v. 453, p. 203-8, 2002;
- 12- CARR D.B.; GOUDAS L.C. Acute pain. *Lancet* 353 (9169): 2051-8, 1999;
- 13- CATUSSE, J. et al. Characterization of the molecular interaction of interleukin-8 (CXCL8), growth related oncogen α (CXCL1) and a non-peptide antagonist (SB225002) with the human CXCR2, *Biochem. Pharmacol.* v.65, p.813-21, 2003.
- 14- CHEMDRAW® ULTRA, Chemical Structure Drawing Standard, Ver. 8.0 – Cambridgesoft, 1985-2003;
- 15- CLORE, G. M. Three-dimensional structure of interleukin 8 in solution, *Biochemistry*, 29(7), 1689-96, 1990;
- 16- CORREA, C. R. et al. Antinociceptive profile of the pseudopeptide B2 bradykinin receptor antagonist NPC 18688 in mice. *Br. J. Pharmacol.* v. 117, p. 552-58, 1996;
- 17- CRAIG, A, D. Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13:500-505, 2003;

- 18- CRAMER, R.D., et. al. Comparative molecular field analysis (COMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J. Am. Chem. Soc.* V. 110, p.5959-5967, 1998;
- 19- CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:1755-60, 2005;
- 20- DA CUNHA, F. M. et al. Caffeic acid derivatives: in vitro and in vivo anti-inflammatory properties. *Free Radic. Res.* 38:1241-53, 2004;
- 21- DAVIS, T. L. e Blanchard K. C. PHENYLUREA and sym.-DIPHENYLUREA, *Organic Synthesis*, CV 1, 453, 1923;
- 22- DRAY, A.; PERKINS, M. N. Kinins and pain. Farmer SG. *The Handbook of Immunopharmacology. The kinin system*: Academic Press, 157-172, 1997;
- 23- DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurobiological deficit in rats and mice. *J. Am. Pharm. Assoc.* v. 46, p.208-09, 1957;
- 24- GAOQUAN, L.; et al. Urea kinase inhibitors, US Pat. 7,056,925, 2006;
- 25- GILROY, D. W.; et. al. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3(5):401-16, 2004;
- 26- GOTTLIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities, *J. Org. Chem.* 62, 7512-7515, 1997;
- 27- GRAGG, G. M.; et. al. Review: Natural Products in Drug Discovery and Development, *J. Nat. Prod.*, 60 (1), pp 52–60, 1997;

- 28- HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 352(16):1685-95, 2005;
- 29- HENSON, P. M.; et. al..The matrix degrades, neutrophils invade. *Nature Medicine* 12, 280-281, 2006;
- 30- HERBERT, M. R. et. al. SUBSTITUTED THIAZOLE UREAS USEFUL AS INHIBITORS OF PROTEIN KINASES, WO2007/076460, 2007;
- 31- HIPKIN, R. W. et. al. Macaca Fascicularis CXCR1 and CXCR2 cloning and Pharmacology, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1-38, 2004;
- 32- HUNT, S. P. et. al. The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci* 2:83-91, 2001;
- 33- HYLLEN, J. L.; WILCOX, G. L. Intrathecal morphine in mice. A new technique, *Eur. J. Pharmacol*, 67:313-6, 1980;
- 34- IADAROLA, J. M.; CAUDLE R. M. Good pain, bad pain. *Science* 278:239-40, 1997;
- 35- JIM, Q. et. al. Discovery of potent and orally bioavailable N,N'-diarylurea antagonists for the CXCR2 chemokine receptor *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 14(17), 4375-8, 2004;
- 36- KASSUYA, C. A. et al. Intraplantar PGE2 causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptor and protein kinases. *Br. J. Pharmacol.* v. 150, p. 727-37, 2007;

- 37- KASSUYA, C. A. P. Atividade antiinflamatória e antinociceptiva de extratos e lignanas isolados de *Phyllanthus amarus*, Tese de doutorado UFSC, 2006;
- 38- KHLEBNIKOV, A. I. et. al. Quantitative structure-activity relationships for small non-peptide antagonists of CXCR2: indirect 3D Approach using the frontal polygon method. *Bioorganic & medicinal chemistry* 14(2), 352-65, 2006;
- 39- KUTEPOV, D. F. Chemical advances in synthesis and reactions of diarylureas, *Russian Chemical Reviews*, 633-655, 1962;
- 40- LAURSEN, S. E. E.; BELKNAP, J. K. Intracerebroventricular injections in mice: some methodological refinements. *J. Pharmacol. Methods*. v.16, p. 355-57, 1986;
- 41- LAWRENCE, T. et. al. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* 2(10):787-95, 2002;
- 42- LEVINE, J. D.; TAIWO, Y. Inflammatory Pain. In: Wall PD, Melzack R – *Textbook of Pain*, 3 rd Ed, Edin-burgh, Churchill Livingtone, 45-56, 1994;
- 43- LIPINSKI, C. A. et. al. "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings", *Adv. Drug Delivery Rev.*, 23(1-3), 3-25, 1997;
- 44- MALBERG, A. B.; BASBAUM, A. I. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* v.76, P215-22, 1998;

- 45- MANJAVACHI, M. N. et. al. The effect of the selective CXCR2 receptor antagonist SB225002 on acute and long lasting nociception in mice, *European Journal of Pain* (London), (in press) 2009;
- 46- MCCLELAND, B. W. et. al. Comparison of N,N'-diarylsquaramides and N,N'-diarylureas as antagonists of the CXCR2 chemokine receptor *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(6), 1713-7, 2007;
- 47- MENDES G. L ; SANTOS A. R.; Malheiros, A.; FILHO V.C.; YUNES R. A.; CALIXTO J. B. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by sesquiterpene polygodial. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292:164–72, 2000;
- 48- MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57:1-164, 1999;
- 49- MONTANARI, C. A. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais, *Química Nova*, vol. 24, n.1, 105-111, 2001;
- 50- MOORE, J. A.; REED, D. E. *Organic Syntheses*, Coll. Vol. 5, p.351 (1973); Vol. 41, p.16 (1961).
- 51- OTUKI, F. O. et al.. Antinociceptive properties of α -Amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. *The Journal of 52- Pharmacology and Experimental Therapeutics*. v.313, p. 310-18, 2005;
- 53- PARK, K. A.; VASKO, M. R. Lipid mediators of sensivity in sensory neurons. *Trends Pharmacol Sci* 26(11):571-7, 2005;

- 54- PATRICK, G. L. An introduction to Medicinal Chemistry, 2 ed. Oxford University Press, 2001;
- 55- QUINTÃO, N. L. et al. The effects of diacerhein on mechanical allodynia in inflammatory and neuropathic models of nociception in mice, *Anesth Analg*, 101:1763–9, 2005;
- 56- QUINTÃO, N. L. M. et al.. Long-lasting neuropathic pain induced by brachial plexus injury in mice: Role triggered by the pro-inflammatory cytokine, tumour necrosis factor alpha, *Neuropharmacology*, v. 50, n. 5, p. 614-620, 2006;
- 57- RAMI, H. K. et. al. Discovery of small molecule antagonists of TRPV1, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 14, Issue 14, 3631-3634, 2004;
- 58- RANG, H. P. et. al. *Farmacologia*, 5 Ed. Elsevier, 851-856, 2004;
- 59- ROBINSON L. et. al. Substituted Diarylureas as Stimulators for Fas-mediated Apoptosis, WO02/076930, 2003;
- 60- ROTH. I.; HERBERT, C. CXCR1 AND CXCR2, Academic Press Cytokine reference, 1981-2002, 2000;
- 61- RUSSO, C. M.; BROSE, W. G. Chronic pain, *Annu Rev Med* 49:123-133, 1997;
- 62- SANDNER, P. et. al. Diaryl urea for treating pulmonary hypertension, WO2007/054216, 2007;
- 63- SANT´ANA, C. M. R., Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da IUPAC para 1997), *Química Nova*, vol. 25, no. 3, 505-512, 2002;

- 64- SATCHELL, D. P. N.; SATCHELL, R. S. Acylation by Ketens and Isocyanates. Amechanistic Comparation, Chem. Soc. Rev, 4, 231-250, 1975;
- 65- TANIGUCHI, K. et al.. Antinociceptive activity of CP-101606 and NMDA receptor NR2B subunit antagonist. Br. J. Pharmacol. v. 122, p. 809-12, 1997;
- 66- TOPLISS, J. G. A manual method for applying the Hansch approach to drug design, J. Med. Chem, vol.20, 464, 1977;
- 67- TOPLISS, J.G. Utilization of Operacional Schemes for Analog Synthesis in Drug Design, J. Med. Chem., vol. 15, n. 10, 1006-1011, 1972;
- 68- TROWBRIGDE, H. O.; EMLING, R. C. Mediadores químicos da resposta vascular. In: Inflamação uma revisão do processo. Quitessence Publishing Co. Inc., São Paulo, 27-42, 172, 1996;
- 69- VAZ ZR, FILHO VC, YUNES RA, CALIXTO JB. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4, 6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxyline derivative on chemical and thermal models of nociception in mice, J. Pharmacol. Exp. Ther. 278:304–12, 1996;
- 70- WEBER, O. et. al. Diaryl urea for treating diabetic neuropathy, WO2007/054303, 2007;
- 71- WHITE, J.R. et. al. Identification of a Potent Selective Non-peptide CXCR2 Antagonist That Inhibits Interleukin-8-induced Neutrophil Migration, J. Biol. Chem. 273, 10095-10098, 1998;
- 72- WIDDOWSON, K. L., et. al. IL-8 receptor antagonists, US pat. 6,262,113, 2001;

- 73- WIDDOWSON, K.L. et. al. Evaluation of potent and selective small-molecule antagonists for the CXCR2 chemokine receptor *Journal of medicinal chemistry*, 47(6), 1319-21, 2004;
- 74- WILHEM, S. Treatment of cancer with Sorafenib, WO2007053573, 2007;
- 75- WOOD, J. N.; DOCHERTY, R. Chemical activators of sensory neurons, *Ann. Rev. Physiol*, 59:57-82, 1997;
- 76- YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna, 1ª Ed., Chapecó: Argos, 78, 2001;
- 77- ZIMMERMAN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16: 109-110, 1983;
- 78- ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: A new Classification System and Their Role in Immunity, *Immunity*, 12, 121-127, 2000;

8.0 PERPECTIVAS FUTURAS:

Os SB225002 e seus 09 compostos análogos mais ativos serão avaliados frente aos modelos que foram utilizados no caso do SB22002 e na colite induzida pelo TNBS.

O SB225002 bem como seus análogos mais potentes já estão sendo avaliados contra a leucemia linfóide aguda no Centro Boldrini em Campinas pelo pesquisador Dr. José Andres Yunes cujo título do projeto: Ação da CCL2 e IL-8 (CXCL8) na sobrevivência e proliferação da Leucemia Linfóide aguda pediátrica, em sistema de co-cultura com células de estroma de medula óssea (FAPESP).

O SB225002 e os análogos mais potentes já estão sendo avaliados pela Prof.^a Dr.^a Maria Martha Campos da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e o Prof. Dr. João B. Calixto do Departamento de Farmacologia da UFSC. O projeto teve início em 2007 cujo título: Efeito do antagonista dos receptores CXCR2 para quimiocinas, SB225002, no carcinoma oral de células escamosas *in vitro* e *in vivo*.

9.0 PUBLICAÇÕES

01 – MANJAVACHI, M. N.; QUINTÃO, N. L. M.; DESCHAMPS, I. K.; CAMPOS, M. M.; YUNES, R. A.; NUNES R. J.; LEAL, P. C.; CALIXTO, J. B. *The effect of the selective CXCR2 receptor antagonist SB225002 on acute and long lasting nociception in mice. **European Journal of Pain** (London), (in press 2009);*

02 – BENTO, F. A.; LEITE, D. F. P.; CLAUDINO, R. F.; HARA, D. B.; LEAL, P. C.; CALIXTO, J. B. *The selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates acute experimental colitis in mice, **Journal Leukocyte Biology**, vol. 84, p. 1213-1221, 2007;*

ANEXOS

Anexo A – WHITE, J.R. et. al. Identification of a Potent Selective Non-peptide CXCR2 Antagonist That Inhibits Interleukin-8-induced Neutrophil Migration, *J. Biol. Chem.* 273, 10095-10098, 1998;

Anexo B – MANJAVACHI, M. N.; Quintão, N. L. M.; Deschamps, I. K.; CAMPOS, M. M.; YUNES, R. A.; Nunes R. J.; LEAL, P. C.; CALIXTO, J. B. The effect of the selective CXCR2 receptor antagonist SB225002 on acute and long lasting nociception in mice, *European Journal of Pain* (London), (in press 2009);

Anexo C – BENTO, F. A.; LEITE, D. F. P.; CLAUDINO, R. F.; HARA, D. B.; LEAL, P. C.; CALIXTO, J. B. The selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates acute experimental colitis in mice, *Journal Leukocyte Biology*, vol. 84, p. 1213-1221, 2007;

Identification of a Potent, Selective Non-peptide CXCR2 Antagonist That Inhibits Interleukin-8-induced Neutrophil Migration*

(Received for publication, March 9, 1998)

John R. White^{‡§}, Judithann M. Lee[‡],
Peter R. Young[‡], Robert P. Hertzberg[¶],
Anthony J. Jurewicz[¶], Margery A. Chaikin[‡],
Katherine Widdowson[¶], James J. Foley^{**},
Lenox D. Martin^{‡‡}, Don E. Griswold^{‡‡},
and Henry M. Sarau^{**}

From the Departments of [‡]Molecular Immunology,
[¶]Biomolecular Discovery, ^{**}Pulmonary
Pharmacology, ^{¶¶}Medicinal Chemistry, and
^{‡‡}Immunopharmacology, SmithKline Beecham
Pharmaceuticals, King of Prussia, Pennsylvania 19406

Interleukin-8 (IL-8) and closely related Glu-Leu-Arg (ELR) containing CXC chemokines, including growth-related oncogene (GRO) α , GRO β , GRO γ , and epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 (ENA-78), are potent neutrophil chemotactic and activating peptides, which are proposed to be major mediators of inflammation. IL-8 activates neutrophils by binding to two distinct seven-transmembrane (7-TMR) G-protein coupled receptors CXCR1 (IL-8RA) and CXCR2 (IL-8RB), while GRO α , GRO β , GRO γ , and ENA-78 bind to and activate only CXCR2. A chemical lead, which selectively inhibited CXCR2 was discovered by high throughput screening and chemically optimized. SB 225002 (*N*-(2-hydroxy-4-nitrophenyl)-*N'*-(2-bromophenyl)urea) is the first reported potent and selective non-peptide inhibitor of a chemokine receptor. It is an antagonist of ¹²⁵I-IL-8 binding to CXCR2 with an IC₅₀ = 22 nM. SB 225002 showed >150-fold selectivity over CXCR1 and four other 7-TMRs tested. *In vitro*, SB 225002 potently inhibited human and rabbit neutrophil chemotaxis induced by both IL-8 and GRO α . *In vivo*, SB 225002 selectively blocked IL-8-induced neutrophil margination in rabbits. The present findings suggest that CXCR2 is responsible for neutrophil chemotaxis and margination induced by IL-8. This selective antagonist will be a useful tool compound to define the role of CXCR2 in inflammatory diseases where neutrophils play a major role.

The recruitment of inflammatory cells into sites of tissue damage is a normal physiological response designed to fight infection, remove damaged cells, and stimulate healing. However, the excessive recruitment of such cells often exacerbates tissue damage, slows healing, and in some cases leads to host

* The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ To whom correspondence should be addressed: Dept. Molecular Immunology, SmithKline Beecham Pharmaceuticals, 709 Swedeland Rd., King of Prussia, PA 19406. Tel.: 610-270-4854; Fax: 610-270-5114; E-mail: john_r_white@sbphrd.com.

death. Therefore, inhibition of inflammatory cell recruitment may be an appropriate therapeutic strategy in a number of inflammatory diseases, such as reperfusion injury, arthritis, asthma, and inflammatory bowel disease.

The recruitment of neutrophils from post-capillary venules depends initially upon rolling of neutrophils via the interaction of neutrophil expressed sLex with endothelial expressed E-selectin, followed by attachment through the up-regulation of CD11b/CD18 (Mac-1), and diapedesis via a haptotactic gradient of IL-8¹ (1). The up-regulation of CD11b/CD18 on neutrophils appears to be mediated via IL-8 binding to neutrophil cell surface receptors (2).

IL-8 is a member of the super family of proinflammatory proteins known as chemokines, which are approximately 8 kDa in size. In human neutrophils, IL-8 binds with similar affinity to two distinct 7-TMRs, CXCR1 (3) and CXCR2 (4), whereas closely related chemokines containing a common amino-terminal Glu⁴-Leu⁵-Arg⁶ (ELR) amino acid sequence, including GRO α , GRO β , GRO γ , NAP-2, and ENA-78, bind only to CXCR2 (5). Both CXCR1 and CXCR2 are present on the surface of human neutrophils and a subset of T-cells (3, 4, 6, 7). Recent reports indicate that transendothelial migration of CLA⁺ T-cells is dependent on CXCR2 (8). In human neutrophils it is unclear whether chemotaxis is mediated by one or both receptors. *In vitro* studies using anti-receptor monoclonal antibodies, and cell lines stably expressing CXCR1 and CXCR2, have led to conflicting reports as to the importance of the two receptors in human neutrophil IL-8-induced chemotaxis (9–11).

Evidence in support of a role for ELR containing CXC chemokines in the pathogenesis of inflammation has resulted from studies manipulating the chemokine system in animal models. Neutralization of IL-8 with a monoclonal antibody in rabbits resulted in the suppression of a delayed type hypersensitivity reaction, which correlated with inhibition of both lymphocyte and neutrophil infiltration in the skin lesions (12). Additional studies with a monoclonal antibody demonstrated potent inhibition of neutrophil recruitment in a rabbit model of endotoxin-induced pleurisy (13) and in rabbit lung reperfusion injury (14). In mice, both injection of a monoclonal antibody to MIP-2, the mouse homologue of GRO, or targeted disruption of the IL-8 receptor resulted in decreased neutrophil-mediated inflammatory responses (14–17).

In this paper, the identification of the first potent and selective non-peptide antagonist of a chemokine receptor is described. Using this small molecule antagonist it appears that inhibition of CXCR2 is sufficient to prevent IL-8-induced neutrophil chemotaxis *in vitro* and sequestration *in vivo*. SB 225002 should be a useful tool compound to define the pathophysiological role of CXCR2.

¹ The abbreviations used are: IL-8, interleukin-8; GRO, growth-related oncogene; ENA-78, epithelial cell-derived neutrophil activating peptide; 7-TMR, seven-transmembrane domain G-protein-coupled receptor; ELR, Glu⁴-Leu⁵-Arg⁶; CHO, Chinese hamster ovary; PBS, phosphate-buffered saline; HPF, high powered fields; LTB₄, leukotriene B₄; LTD₄, leukotriene D₄; fMLP, *N*-formyl-Met-Leu-Phe; C5a, serum complement fragment from C5; SB 225002, *N*-(2-hydroxy-4-nitrophenyl)-*N'*-(2-bromophenyl)urea; SK&F 83589, *N*-(2-hydroxy-4-nitrophenyl)-*N'*-phenylurea; bis-Tris, 2-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid; PMN(s), polymorphonuclear cell(s).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cloning of CXCR1 and CXCR2—The two IL-8 receptors were cloned by reverse transcription polymerase chain reaction. Total RNA from human neutrophils was prepared using a GuSCN/CsCl gradient and cDNA synthesis was primed with oligo(dT). Sequence specific primers (CXCR1 (5'-3'), CTAGAATCCCTGGCCGGTTCAGTTAGACTAA-ACC, GGTAGCTACTCTCTTATAGAGAGATCTCCTTCG; CXCR2 (5'-3'), GATGAATTCGTCAGGATTTAAGTTTACCTCAAAAATGG, GGA-GGACGGATTACGTCGGGAGATCTTAC) were used to amplify CXCR1 and CXCR2 cDNAs. Receptor sequences were identical to those published (3, 4), except for a conservative Thr to Ser change at residue 276 of CXCR1. These receptors were cloned into a mammalian expression vector containing a cytomegalovirus promoter and dihydrofolate reductase selection. Chinese hamster ovary (CHO) cell lines expressing either CXCR1 (CHO-CXCR1) or CXCR2 (CHO-CXCR2) were generated by single cell cloning following electroporation of the expression vector and selection by growth in nucleoside-free medium followed by amplification in 80 nM methotrexate. High expressing clones were identified using ^{125}I -IL-8 binding to cells.

Radioligand Binding Experiments—CHO-CXCR1 and CHO-CXCR2 membranes were prepared according to Kraft and Anderson (18). Assays were performed in 96-well microtiter plates where the reaction mixture contained 1.0 $\mu\text{g/ml}$ membrane protein in 20 mM Bis-Tris-propane, pH 8.0, with 1.2 mM MgSO_4 , 0.1 mM EDTA, 25 mM NaCl, and 0.03% CHAPS and SB 225002 (10 mM stock in Me_2SO) added at the indicated concentrations, the final Me_2SO concentration was <1% under standard binding conditions. Binding was initiated by addition of 0.25 nM ^{125}I -IL-8 (Amersham Pharmacia Biotech, 2,200 Ci/mmol). After 1-h incubation at room temperature the plate was harvested using a Tomtec 96-well harvester onto a glass fiber filtermat blocked with 1% polyethyleneimine, 0.5% BSA and washed three times with 25 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM MgSO_4 , 0.5 mM EDTA, 0.03% CHAPS, pH 7.4. The filter was dried, sealed in a sample bag containing 10 ml of Wallac 205 Betaplate liquid scintillation fluid, and counted with a Wallac 1205 Betaplate liquid scintillation counter. Other binding assays were performed according to previously published reports: C5a (19), fMLP (20), LTB₄ (21), and LTD₄ (22).

Synthesis of SB 225002—A solution of 2-hydroxy-4-nitroaniline (500 mg, 3.24 mmol) in *N,N*-dimethylformamide (1 ml) was treated with 2-bromophenylisocyanate (3.24 mmol) for 16 h at 80 °C. The product was purified by dilution with methylene chloride and precipitation with hexanes. Filtering afforded the title compound (530 mg, 47%), m.p. = 193–195 °C. ^1H NMR (Me_2SO): δ 11.05 (s), 9.49 (s), 9.12 (s), 8.47 (d), 7.93 (d), 7.74 (d), 7.68 (s), 7.34 (t), 7.00 (t); electron ionization-mass spectroscopy m/z 350 ($\text{M} - \text{H}$)⁺; analysis ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{BrN}_3\text{O}_4 \cdot 1\text{N,N}$ -dimethylformamide) C, H, N (23).

Inhibition of Ca^{2+} Mobilization—Human neutrophils were separated from whole blood of healthy volunteers by the one-step Hypaque-Ficoll method (24). HL60 cells were differentiated, under incubation conditions, with Me_2SO (0.5%) for 3 days. Cells (PMN, HL60, CXCR1-RBL-2H3, or 3ASubE) were loaded with Fura-2AM as described previously (25). For antagonist studies, SB 225002 (final Me_2SO < 0.35%) was added at the indicated concentrations, to 10^6 cells/ml in Krebs-Ringer-Henseleit buffer, followed 15 s later by agonist at the designated concentration. The maximal calcium concentration attained after agonist stimulation was quantitated as described previously (25).

Inhibition of Neutrophil Chemotaxis—Neutrophils were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in PBS containing 1 mM MgCl_2 and 1 mM CaCl_2 . Cell motility was determined using a modified Boyden chamber procedure as described (26). For measurement of chemotaxis, lower chambers were filled with 30 μl of IL-8 (1 nM) or GRO α (10 nM), the empty upper chambers were lowered into place, and 50 μl of a PMN suspension (5×10^6 cells/ml), without (control) or with SB 225002, was added at the indicated concentrations. SB 225002, dissolved in Me_2SO (100%) at 10 mg/ml, was diluted in PBS to the desired concentration; the final Me_2SO concentration was <0.1%. Neutrophil migration proceeded for 60 min at 37 °C in the cell incubator, after which the chamber was disassembled. Following fixation (75% methanol) and staining (Diff-Quick) migrated cells were counted in four successive high power fields (HPF).

Inhibition of Neutrophil Sequestration in Vivo—The *in vivo* neutrophil sequestration model was performed in rabbits as reported previously (27). Using sterile techniques, rabbits were surgically fitted with an implanted cannula in the external jugular vein. IL-8 (150 ng/kg/min) or fMLP (5 ng/kg/min) was directly infused into the blood in the absence or presence of SB 225002 (1.39–5.5 $\mu\text{g/kg/min}$) via the marginal ear vein. Blood samples were withdrawn at 2.5–5-min intervals via the

vascular access port in the external jugular. White blood cell counts were determined with a Coulter counter, and differential counts were done using blood smears stained with Diff-Quick. Percent change of PMN count was determined relative to the base-line value.

RESULTS AND DISCUSSION

To determine the feasibility of targeting individual IL-8 receptors with non-peptide, low molecular weight antagonists, a high throughput screen was configured using ^{125}I -IL-8 binding to membranes of CHO-CXCR1 or CHO-CXCR2 cells. One compound identified from this screen was SK&F 83589 (Fig. 1A), which selectively inhibited ^{125}I -IL-8 binding to CHO-CXCR2 with an IC_{50} of 500 nM. Chemical modification of SK&F 83589 led to SB 225002, *N*-(2-hydroxy-4-nitrophenyl)-*N'*-(2-bromophenyl)urea (Fig. 1B), which inhibited ^{125}I -IL-8 binding to CHO-CXCR2 membranes with an IC_{50} = 22 nM (Fig. 2). SB 225002, at concentrations up to 3.3 μM (Fig. 2), failed to significantly inhibit the binding of ^{125}I -IL-8 to CHO-CXCR1, or [^3H]fMLP, [^3H]LTB₄, [^3H]LTD₄, or ^{125}I -C5a to their cognate receptors. SB 225002 was, therefore, at least >150-fold selective for CXCR2 over the other 7-TMRs tested.

To determine if SB 225002 was a functional CXCR2 antagonist, we monitored its effects on intracellular calcium mobilization stimulated by IL-8 or GRO α . Cross-desensitization studies with Me_2SO differentiated HL60 cells indicated that these cells predominantly express CXCR2 (~80%) with a smaller number of CXCR1 (~20%) receptors (Fig. 3A). In these cells, SB 225002 produced a concentration-dependent inhibition of both IL-8- and GRO α -mediated calcium mobilization with IC_{50} values of 8 and 10 nM, respectively (Fig. 3B). Similarly, in 3ASubE (28) cells stably transfected with CXCR2, SB 225002 dose-dependently inhibited calcium mobilization induced by both GRO α and IL-8, with IC_{50} values of 20 and 40 nM, respectively (Fig. 3B). In contrast to HL60 cells, human neutrophils express equal numbers of CXCR1 and CXCR2 on their cell surface. In these cells, SB 225002 inhibited GRO α -, but not IL-8-, stimulated calcium mobilization (IC_{50} values = 30 nM and >10 μM , respectively, Fig. 3C). In addition, in RBL-2H3 cells, stably transfected with CXCR1, SB 225002 failed to inhibit calcium

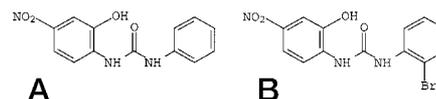


FIG. 1. Structures of SK&F 83589 (A) and the high affinity analog SB 225002 (B).

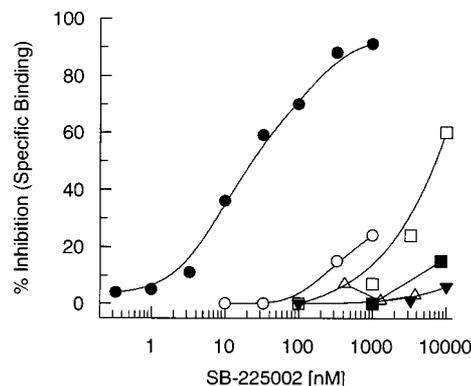


FIG. 2. Competition binding of ^{125}I -IL-8, [^3H]fMLP, [^3H]LTB₄, [^3H]LTD₄, or ^{125}I -C5a by SB 225002 to appropriate membranes expressing either cloned or primary receptors. Inhibition by SB 225002 of ^{125}I -IL-8 binding to CHO-CXCR1 (○) and CHO-CXCR2 (●), ^{125}I -C5a (△) to RBL-2H3-C5a, [^3H]fMLP (■) or [^3H]LTB₄ (□) to human PMNs or [^3H]LTD₄ to guinea pig lung membranes (▼). Results are expressed as percent of control specific binding and are the means of duplicate samples from a typical experiment performed three to five times.

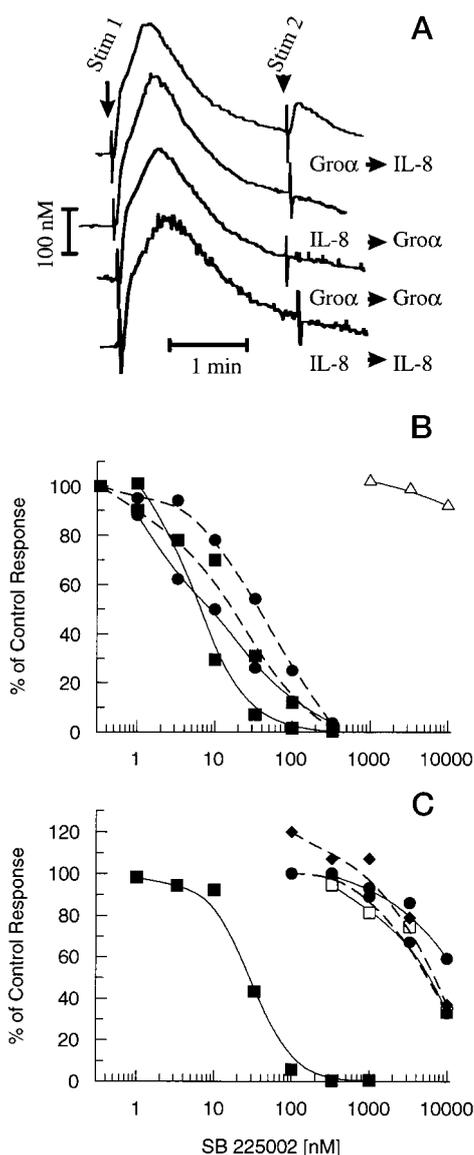


FIG. 3. Effect of SB 225002 on agonist-induced calcium mobilization. A, cross-desensitization of differentiated HL60 cells by IL-8 and GRO α . Stim 1 represents the addition of a 100 nM amount of either IL-8 or GRO α as indicated for each individual trace. Stim 2 represents the addition of a second stimulus of agonist (100 nM) to the same cells that had also received the first stimulation. Quantitation of the calcium change indicates that CXCR2 represents ~80% of the IL-8 receptors on differentiated HL60 cells. B, inhibition of calcium mobilization in Me₂SO-differentiated HL60 cells stimulated with 1 nM IL-8 (●), 10 nM GRO α (■), or 1 nM C5a (Δ with solid lines) or in CXCR2-3ASubE cells stimulated with 2 nM IL-8 (●) or 10 nM GRO α (■ with dotted lines). Calcium mobilized by HL60 cells in the absence of antagonist was 400–420, 385–410, and 410–425 nM for IL-8, GRO α , and C5a, respectively, and in 3ASubE cells was 350–375 and 320–335 nM for IL-8 and GRO α , respectively. C, isolated peripheral blood neutrophils were stimulated with 1 nM IL-8 (●), 10 nM GRO α (■), or 1 nM LTB₄ (□ with solid line), or CXCR1-RBL cells were stimulated with 1 nM IL-8 (●) or 1 μ M LTD₄ (◆ with dotted line). Cells were pretreated for 15 s with the indicated concentrations of SB 225002 (1–10,000 nM) before the addition of agonist. Calcium mobilized by PMNs in the absence of antagonist was 1200–1400, 900–1100, and 1600–1800 nM for IL-8, GRO α , or LTB₄, respectively. Data in B and C are the average of duplicate points and are representative of three individual experiments.

mobilization induced by either IL-8 or LTD₄ (IC₅₀ > 10 μ M, Fig. 3C). The failure of SB 225002 to block IL-8-induced calcium mobilization in human neutrophils, presumably reflects the ability of IL-8 to circumvent the blockade of CXCR2 by activating CXCR1, which was not inhibited by this compound. SB

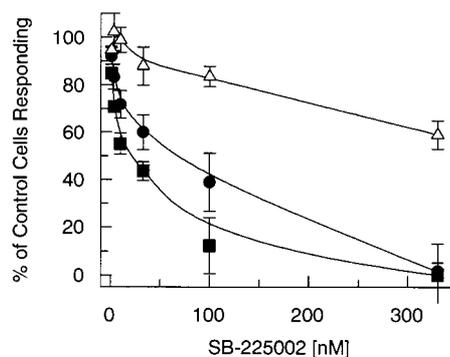


FIG. 4. Effect of SB 225002 on IL-8, GRO α , or C5a-induced human neutrophil chemotaxis. Chemotaxis was measured in 48-well Boyden chambers as described under “Experimental Procedures.” The effect of SB 225002 on chemotaxis induced by 1 nM IL-8 (●), 10 nM GRO α (■), or 50 nM C5a (Δ) was evaluated with PMNs. Control agonist responses were 269 \pm 32.6, 265 \pm 30.7, and 263 \pm 40.9 neutrophils/HPF for IL-8, GRO α , and C5a, respectively. The negative unstimulated response was 54.8 \pm 4.0 neutrophils/HPF. Results are expressed as a percent of control cells responding to their respective ligands. Each point represents an average of nine determinations from individual donors \pm S.E.

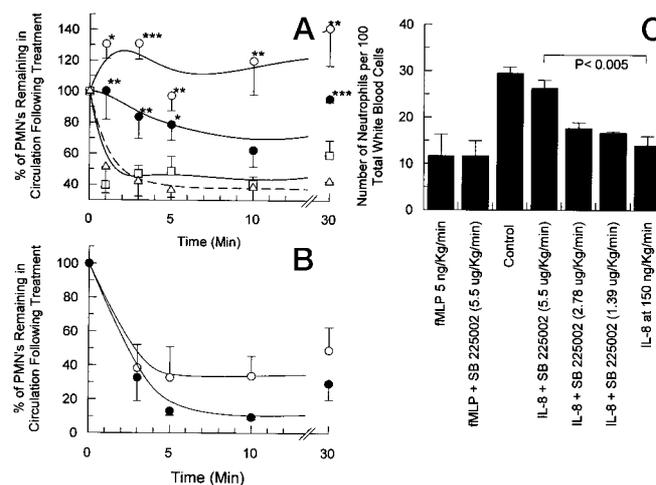


FIG. 5. Effect of SB 225002 on IL-8- and fMLP-induced neutrophil margination in rabbits. A, effect of a 30-min infusion of IL-8 (150 ng/kg/min, Δ) on the percent of neutrophils remaining in circulation. Co-administration of SB 225002 at 1.39 (□), 2.78 (●), or 5.5 (○) μ g/kg/min dose-dependently reversed the sequestration of neutrophils. Vehicle (10% Me₂SO, 90% diphosphate-buffered saline, pH 7.4) alone produced a 20% increase in circulating neutrophils, which lasted for the entire infusion period (30 min) but had no effect on the ability of IL-8 or fMLP to sequester neutrophils. B, PMN sequestration by fMLP (5 ng/kg/min, ○) co-administered with vehicle or SB 225002 (5.5 μ g/kg/min, ●). C, dose-dependent inhibition of PMN margination by SB 225002 induced by either fMLP or IL-8 taken (15 min) after addition of agonist. Each data point in A and B represent the average \pm S.E. of three independent experiments. *, $p < 0.01$; **, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ from control (IL-8) sequestration.

225002 also demonstrated functional selectivity, since it failed to inhibit calcium mobilization induced by optimal concentrations of LTB₄ in PMNs (Fig. 3C), or RANTES, MIP-1 α , or MCP-1 in monocytes (data not shown).

Having identified SB 225002 as a potent and selective CXCR2 antagonist, the compound was evaluated for inhibition of human neutrophil chemotaxis in response to maximally effective concentrations of IL-8, GRO α , or C5a. Using PMNs from nine individual subjects, SB 225002 inhibited both IL-8 (1 nM)- and GRO α (10 nM)-mediated chemotaxis with similar IC₅₀ values (20 and 60 nM, respectively) but did not affect chemotaxis induced by 50 nM C5a at concentrations up to 330 nM (Fig. 4). These data provide evidence that *in vitro* neutrophil chemo-

taxis is mediated predominantly by CXCR2.

Rabbits, like humans, express both IL-8 receptors on their neutrophils (29). Therefore, this species was utilized to evaluate the *in vivo* effects of SB 225002. *In vitro* studies confirmed that SB 225002 is a potent antagonist of rabbit CXCR2, inhibiting rabbit PMN chemotaxis in response to optimal concentrations of human IL-8 or GRO α (IC₅₀ values of 30 and 70 nM, respectively).

In rabbits, an intravenous infusion of LTB₄, or other chemotactic factors, rapidly promotes neutrophil shape change and margination of neutrophils to the microcapillary endothelial cells of the lung (27, 30–32). Thus, this is the basis of a useful model to study the initial stages of neutrophil activation and attachment to the endothelium. As seen in Fig. 5, A and B, administration of IL-8 or fMLP resulted in rapid margination of neutrophils (62 and 68%, respectively), which lasted throughout the infusion period (30 min). Co-administration of SB 225002 (Fig. 5, A and B) inhibited, in a dose-dependent manner, IL-8-, but not fMLP-, mediated PMN sequestration (Fig. 5C).

The *in vitro* and *in vivo* findings presented provide evidence that inhibition of CXCR2 is sufficient to prevent neutrophil margination and chemotaxis mediated by IL-8 and suggests that CXCR1 does not play a major role in neutrophil migration. The functional role of CXCR1 is not clear; however, a recent report, using modified antagonist forms of IL-8 and human neutrophils, demonstrated the importance of CXCR1 in IL-8-mediated superoxide generation and release of granular enzymes (33). This is consistent with the previous suggestion that CXCR1 on human neutrophils may require higher concentrations of IL-8 for chemotaxis and, therefore, may be involved in neutrophil activities closer to the site of injury and not in the early attachment and extravasation events (10). This hypothesis agrees with the finding in rodents, which appear to possess only the CXCR2 homologue, yet retain the ability to localize neutrophils to sites of inflammation (17).

The present study represents the first reported discovery of a potent and selective non-peptide antagonist of a chemokine receptor and the first low molecular weight inhibitor of a large (72 amino acid) agonist 7-TMR interaction. A number of small molecule antagonists have been reported for small peptide receptors, *e.g.* tachykinin (34), angiotensin (35), and endothelin (36), but to our knowledge the only antagonist reported for a large peptide receptor was a micromolar antagonist of the C5a receptor (37). As chemokine receptors are part of the 7-TMR family, which have traditionally been productive targets for drug discovery, it is anticipated that small molecule receptor antagonists may have potential as novel therapeutics. The availability of potent and selective non-peptide antagonists, such as SB 225002, will help define the apparent overlap in activities of the chemokines and their receptors and elucidate their relative importance. In particular, SB 225002 will be an important tool compound to assess the role of IL-8 and CXCR2 in neutrophil recruitment, a process that is thought to be important in several inflammatory diseases, including adult respiratory distress syndrome, chronic bronchitis, and asthma (38–41).

Acknowledgments—We thank Dr. Robert Ames for providing ¹²⁵I-C5a and membranes for the C5a binding assay, Dr. Douglas W. P. Hay for the critical reading of the manuscript, and Dr. Ann Richmond for the gift of CXCR2-transfected 3ASubE cells. All animal procedures were reviewed and approved by the SmithKline Beecham Animal Care and Use Committee.

REFERENCES

- Rot, A., Hub, E., Middleton, J., Pons, F., Rabeck, C., Thierer, K., Wintle, J., Wolff, B., Zsak, M., and Dukor, P. (1996) *J. Leukocyte Biol.* **59**, 39–44
- Detmers, P. A., Lo, S. K., Olsen-Egbert, E., Walz, A., Baggiolini, M., and Cohn, Z. A. (1990) *J. Exp. Med.* **171**, 1155–1162
- Holmes, W. E., Lee, J., Kuang, W. J., Rice, G. C., and Wood, W. I. (1991) *Science* **253**, 1278–1280
- Murphy, P. M., and Tiffany, H. L. (1991) *Science* **253**, 1280–1283
- Hebert, C. A., Vitangcol, R. V., and Baker, J. B. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 18989–18994
- Chuntharapai, A., Lee, J., Hebert, C. A., and Kim, K. J. (1994) *J. Immunol.* **153**, 5682–5688
- Xu, L., Kelvin, D. J., Ye, G. Q., Taub, D. D., Ben Baruch, A., Oppenheim, J. J., and Wang, J. M. (1995) *J. Leukocyte Biol.* **57**, 335–342
- Santamaria-Babi, L. F., Moser, B., Perez-Soler, M. T., Moser, R., Loetscher, P., Villiger, B., Blaser, K., and Hauser, C. (1996) *Eur. J. Immunol.* **26**, 2056–2061
- Quan, J. M., Martin, T. R., Rosenberg, G. B., Foster, D. C., Whitmore, T., and Goodman, R. B. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **219**, 405–411
- Chuntharapai, A., and Kim, K. J. (1995) *J. Immunol.* **155**, 2587–2594
- Hammond, M. E., Lapointe, G. R., Feucht, P. H., Hilt, S., Gallegos, C. A., Gordon, C. A., Giedlin, M. A., Mullenbach, G., and Tekamp Olson, P. (1995) *J. Immunol.* **155**, 1428–1433
- Larsen, C. G., Thomsen, M. K., Gesser, B., Thomsen, P. D., Deleuran, B. W., Nowak, J., Skodt, V., Thomsen, H. K., Deleuran, M., Thestrup Pedersen, K., Harada, A., Matsushima, K., and Menne, T. (1995) *J. Immunol.* **155**, 2151–2157
- Broadbent, V. C., Boylan, A. M., Hoeffel, J. M., Kim, K. J., Sadick, M., Chuntharapai, A., and Hebert, C. A. (1994) *J. Immunol.* **152**, 2960–2967
- Sekido, N., Mukaida, N., Harada, A., Nakanishi, I., Watanabe, Y., and Matsushima, K. (1993) *Nature* **365**, 654–657
- Vedder, N. B., Winn, R. K., Rice, C. L., Chi, E. Y., Arfors, K. E., and Harlan, J. M. (1988) *J. Clin. Invest.* **81**, 939–944
- Mulligan, M. S., Varani, J., Dame, M. K., Lane, C. L., Smith, C. W., Anderson, D. C., and Ward, P. A. (1991) *J. Clin. Invest.* **88**, 1396–1406
- Cacalano, G., Lee, J., Kikly, K., Ryan, A. M., Pitts Meek, S., Hultgren, B., Wood, W. I., and Moore, M. W. (1994) *Science* **265**, 682–684
- Kraft, A. S., and Anderson, W. B. (1983) *Nature* **301**, 621–623
- Rollins, T. E., Siciliano, S., and Springer, M. S. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 520–526
- Lane, T. A., Lamkin, G. E., and Windle, B. E. (1981) *Blood* **58**, 228–236
- Boehm, J. C., Gleason, J. G., Pendrak, I., Sarau, H. M., Schmidt, D. B., Foley, J. J., and Kingsbury, W. D. (1993) *J. Med. Chem.* **36**, 3333–3340
- Hay, D. W., Muccitelli, R. M., Vickery Clark, L. M., Novak, L. S., Osborn, R. R., Gleason, J. G., Yodis, L. A., Saverino, C. M., Eckardt, R. D., Sarau, H. M., Wasserman, M. A., Torphy, T. J., and Newton, J. F. (1991) *Pulm. Pharmacol.* **4**, 177–189
- Widdowson, K. L., Veber, D. F., Nie, H., Jurewicz, A. J., Foley, J. J., Sarau, H. M., Lee, J., and White, J. R. (1998) in *Peptides Escrom* (Ramage, R., ed) Leiden, The Netherlands, in press
- Ferrante, A., and Thong, Y. H. (1982) *J. Immunol. Methods* **48**, 81–85
- Berkhout, T. A., Sarau, H., Moores, K., White, J. R., Elshourbagy, N., Appelbaum, E., Reape, T. J., Brawner, M., Makwana, J., Foley, J. J., Schmidt, D. B., Imburgia, C., McNulty, D., Matthews, J., O'Donnell, K., O'Shannessy, D., Scott, M., Groot, P. H. E., and Macphee, C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 16404–16410
- Bigbold, L. P., and Ferrante, A. (1987) *J. Immunol. Methods* **96**, 29–33
- Griswold, D. E., Martin, L., Ventre, J., Meunier, L., and Perry, L. (1991) *J. Pharmacol. Methods* **25**, 319–328
- Mueller, S. G., White, J. R., Schraw, W. P., Lam, V., and Richmond, A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 8207–8214
- Suzuki, H., Prado, G. N., Wilkinson, N., and Navarro, J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 18263–18266
- Motosugi, H., Graham, L., Noblitt, T. W., Doyle, N. A., Quinlan, W. M., Li, Y., and Doerschuk, C. M. (1996) *Am. J. Pathol.* **149**, 963–973
- Doerschuk, C. M. (1992) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **7**, 140–148
- Laterveer, L., Lindley, I. J., Heemskerck, D. P., Camps, J. A., Pauwels, E. K., Willemze, R., and Fiebbe, W. E. (1996) *Blood* **87**, 781–788
- Jones, S. A., Dewald, B., Clark-Lewis, I., and Baggiolini, M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 16166–16169
- Emonds Alt, X., Vilain, P., Goulaouic, P., Proietto, V., Van Broeck, D., Adevnier, C., Naline, E., Neliat, G., Le Fur, G., and Breliere, J. C. (1992) *Life Sci.* **50**, PL101–PL106
- Brooks, D. P., Fredrickson, T. A., Weinstock, J., Ruffolo, R. R., Jr., Edwards, R. M., and Gellai, M. (1992) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **345**, 673–678
- Clozel, M., Breu, V., Burri, K., Cassal, J. M., Fischli, W., Gray, G. A., Hirth, G., Loffler, B. M., Muller, M., Neidhart, W., and Ramuz, H. (1993) *Nature* **365**, 759–761
- Lanza, T. J., Durette, P. L., Rollins, T., Siciliano, S., Cianciarulo, D. N., Kobayashi, S. V., Caldwell, C. G., Springer, M. S., and Hagemann, W. K. (1992) *J. Med. Chem.* **35**, 252–258
- Grau, G. E., Mili, N., Lou, J. N., Morel, D. R., Ricou, B., Lucas, R., and Suter, P. M. (1996) *Lab. Invest.* **74**, 761–770
- Marini, M., Vittori, E., Hollemberg, J., and Mattoli, S. (1992) *J. Allergy Clin. Immunol.* **89**, 1001–1009
- Nakamura, H., Abe, S., Shibata, Y., Sata, M., Kato, S., Saito, H., Hino, T., Takahashi, H., and Tomoike, H. (1997) *Int. Arch. Allergy Immunol.* **112**, 157–162
- Khair, O. A., Davies, R. J., and Devalia, J. L. (1996) *Eur. Respir. J.* **9**, 1913–1922



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pain

journal homepage: www.EuropeanJournalPain.com



The effects of the selective and non-peptide CXCR2 receptor antagonist SB225002 on acute and long-lasting models of nociception in mice

Marianne N. Manjavachi^a, Nara L.M. Quintão^a, Maria Martha Campos^b, Isa K. Deschamps^a, Rosendo A. Yunes^c, Ricardo J. Nunes^c, Paulo C. Leal^c, João B. Calixto^{a,*}

^a Department of Pharmacology, Campus Universitário, Universidade Federal de Santa Catarina, 88049-900 Florianópolis, SC, Brazil

^b School of Dentistry (M.M.C.), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Department of Chemistry, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 September 2008

Received in revised form 7 January 2009

Accepted 27 January 2009

Available online xxxx

Keywords:

Nociception

SB225002

CXCR2

Competitive antagonists

Mice

ABSTRACT

This study evaluated the antinociceptive effects of the selective and non-peptide CXCR2 antagonist SB225002 in mouse models of pain. As assessed in different tests of spontaneous nociception, intraperitoneal (i.p.) administration of SB225002 caused consistent and dose-related reduction of acetic acid-induced abdominal constrictions, whereas it did not significantly affect the nociception evoked by formalin, capsaicin, glutamate or phorbol ester acetate (PMA). Systemic treatment with SB225002 strikingly reduced the spontaneous nociception induced by 8-bromo-cAMP (8-Br-cAMP), or mechanical hypernociception induced by prostaglandin E₂ (PGE₂), epinephrine, or the keratinocyte-derived chemokine (KC). In the carrageenan model, SB225002 markedly reduced mechanical hypernociception when administered by i.p., intrathecal (i.t.) or intracerebroventricular (i.c.v.) routes, or even when co-administered with carrageenan into the mouse paw, indicating peripheral and central sites of action for SB225002. In addition, i.p. treatment with SB225002 significantly attenuated the increase in MPO activity or the elevation of IL-1 β , TNF α or KC levels following carrageenan injection. In the persistent models of pain evoked by complete Freund's adjuvant (CFA) or by the partial ligation of the sciatic nerve (PLSN), the repeated administration of SB225002 displayed prominent and long-lasting antinociceptive effects. Notably, SB225002 did not evoke unspecific central effects, as evaluated in the open-field and rota-rod tests, or even in the latency responses for thermal stimuli. Our data confirm the previous notion on the critical role exerted by chemokines in pain, indicating that selective CXCR2 antagonists, such as SB225002, might well represent interesting and innovative alternatives for the management of both acute and chronic pain.

© 2009 European Federation of Chapters of the International Association for the Study of Pain. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Inflammation is the most common cause of clinical pain resulting from tissue injury. It is well known that several biological mediators, such as neurotrophic factors, neuropeptides, prostanooids and kinins, are all able to conduct and amplify the nociceptive responses (Coutaux et al., 2005). In addition, it is broadly accepted that cytokines, produced by either immune or central nervous system cells, might directly sensitize the peripheral nociceptors (Obreja et al., 2002). Chemokines are a group of small cytokines (8–10 kDa) which regulate the recruitment and migration of leucocytes from the blood stream to the inflamed tissue by interacting with G protein-coupled receptors (Baggiolini, 2001). They are classified in different families according to the number and localization of amino terminal cysteine residues. For instance, in

the CXC chemokine family, the cysteine residues are separated by any amino acid residue (Charo and Ransohoff, 2006). Of high interest, the last decade of research revealed that chemokines are probably implicated in several pathophysiological events, including the processing of both acute and chronic pain (Charo and Ransohoff, 2006; White et al., 2007).

Some members of the CXC chemokine family display a glutamate-leucine-arginine (ELR⁺) domain in the amino terminal portion of the molecule and are known especially for their ability to attract neutrophils to the sites of inflammation. The best known components of this subfamily are represented by CXCL8 (interleukin-8, IL-8), CXCL1 (keratinocyte-derived chemokine, KC; GRO α), CXCL2 (GRO β) and CXCL5 (ENA-78) (Bizzarri et al., 2006; Charo and Ransohoff, 2006), which display their effects by interaction with CXCR1 and CXCR2 receptors. Relevantly, compelling evidence demonstrates that CXCL8 (IL-8) induces marked nociceptive alterations in several animal models (Endo et al., 1994; Ahn et al., 2005; Verri et al., 2006).

* Corresponding author. Tel.: +55 48 331 9491; fax: +55 48 232 9139.

E-mail addresses: calixto@farmaco.ufsc.br, calixto3@terra.com.br (J.B. Calixto).

The compound SB225002 (*N*-(2-hydroxy-4-nitrophenyl)-*N'*-(2-bromophenyl) urea) was identified in 1998 as the first non-peptide, selective and competitive CXCR2 receptor antagonist, and it was later reported that this compound is able to inhibit IL-8 binding to the CXCR2 receptor in a nanomolar range (White et al., 1998). Further studies confirmed the selectivity of SB225002 for the CXCR2 receptor and demonstrated striking effects for this antagonist in certain models of neutrophil migration (Rosenkilde and Schwartz, 2004; Bizzarri et al. 2006). As neutrophils are implicated in a series of pathological alterations, a potential therapeutic application for CXCR2 antagonists, including SB225002, is forthrightly expected (Reutershan et al., 2006; Chapman et al., 2007). In fact, a recent publication (Barsante et al., 2008) revealed that DF 2162, a non-competitive allosteric inhibitor of CXCR1 and CXCR2, significantly ameliorated adjuvant-induced arthritis in rats. The present study was designed to further evaluate whether the selective blocking of CXCR2 receptors might be useful in the control of painful alterations by assessing the effects of treatment with SB225002 in different models of acute and long-lasting nociception in mice. Taken in concert with the literature data, the present work brings new evidence on the therapeutic potential of CXCR2 antagonists for the treatment of painful states.

2. Material and methods

2.1. Animals

Male Swiss mice (20–28 g) obtained from the Department of Pharmacology, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, Brazil), were used in this study. Animals were housed under conditions of optimum light, temperature and humidity (12 h light-dark cycle, 22 ± 2 °C, 60–80% humidity), with food and water provided *ad libitum*. All procedures used in the present study followed the “Principles of Laboratory Animal Care” from NIH publication Nos. 85-23 and were approved by the Animal Ethics Committee of the Universidade Federal de Santa Catarina. (protocol numbers 262/CEUA and 23080.035334/2003-16/UFSC). The number of animals and the intensity of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects.

2.2. Acute nociceptive behavior

2.2.1. Acetic acid-induced abdominal constrictions

Abdominal constrictions induced by the intraperitoneal (i.p.) injection of acetic acid (0.6%) were accomplished according to the procedures described previously (Vaz et al., 1996). Animals were treated with different doses of SB225002 (0.1–1 mg/kg, i.p.) or vehicle (10 ml/kg, 1% Tween 80 in 0.9% NaCl solution), 30 min prior to the injection of acetic acid. The animals were observed individually and the number of abdominal constrictions was cumulatively counted over a period of 20 min after acetic acid injection, and considered as indicative of nociception. Dipyron (60 mg/kg, i.p., 30 min) was used as a positive control drug.

2.3. Formalin-induced nociception

The procedure used was similar to that described previously (Mendes et al., 2000). Animals were treated with SB225002 (1 or 3 mg/kg, i.p.) or with vehicle (10 ml/kg, 1% Tween 80 in 0.9% NaCl solution), 30 min before formalin injection. Subsequently, mice received a 20- μ l intraplantar (i.pl.) injection of 2.5% formalin solution into the right hindpaw. The animals were placed immediately in a glass cylinder (20 cm in diameter), and the time spent licking the injected paw over a period of 30 min was considered as indicative of nociception.

2.4. Overt nociception models

The effects of SB225002 were further evaluated in other mouse models of spontaneous nociception. For that purpose, animals were pre-treated with SB225002 (1 or 3 mg/kg, i.p.) or vehicle (10 ml/kg, 1% Tween 80 in 0.9% NaCl solution), 30 min before the algogen injection. Mice received a 20- μ l i.pl. injection of one of the following agents: capsaicin (5.2 nmol/paw; Sakurada et al., 1992), glutamate (30 μ mol/paw; Beirith et al., 2002), phorbol myristate acetate (PMA) (30 ng/paw; Taniguchi et al., 1997), or 8-Br-cAMP (10 nmol/paw; Otuki et al., 2005), into the right hindpaw. The animals were observed individually in transparent glass cylinders (20 cm in diameter) during a period of 5 min after capsaicin, 15 min after glutamate, 45 min after PMA, or 10 min after 8-Br-cAMP. The amount of time spent licking the injected paw was registered with a chronometer and considered as indicative of nociception.

2.5. Mechanical hypernociception induced by KC, PGE₂ or epinephrine

To evaluate mechanical hypernociception, mice were treated with SB225002 (1 mg/kg, i.p.) or vehicle (10 ml/kg, 1% Tween 80 in 0.9% NaCl solution), 30 min before the i.pl. injection of KC (10 ng/paw, Cunha et al., 2005), prostaglandin E₂ (PGE₂) (0.1 nmol/paw, Kassuya et al., 2007) or epinephrine (100 ng/paw, Khasar et al., 2005). The mechanical hypernociception was measured with Von Frey filaments (VFH), as described below, at different time-points after the i.pl. injection of the algogenic mediators.

2.6. Mechanical hypernociception induced by carrageenan

For the induction of inflammatory pain, mice received an i.pl. injection of 50 μ l of carrageenan (300 μ g/paw) under the surface of the right hindpaw (Quintão et al., 2005). To assess the systemic effect of drug treatment, mice received SB225002 (0.1–3 mg/kg, i.p.) or vehicle (10 ml/kg, 1% Tween 80 in 0.9% NaCl solution), 30 min before carrageenan injection. In order to evaluate the possible site of action of SB225002 (central or peripheral), a separate group of animals received an i.pl. injection of SB225002 (35–106 μ g/paw), co-administered with carrageenan (300 μ g/paw). Additional groups of animals received an intrathecal (i.t.) or intracerebroventricular (i.c.v.) injection of 5 μ l of SB225002 (3.5–35 μ g/site), 10 min before the application of carrageenan. The i.t. injections were performed according to the method described by Hyliden and Wilcox (1980) with some modifications. For the i.t. injections, the animals were conscious to avoid possible anesthetic interference. The needle connected to a microsyringe by a polyethylene tube was introduced through the skin, and a volume of 5 μ l of vehicle solution (control) or SB225002 was injected into the L5–L6 vertebral space. For i.c.v. injections, the animals were lightly anesthetized with isoflurane and 5 μ l of SB225002 solution was injected directly into the lateral ventricle (coordinates from bregma: 1 mm lateral; 1 mm rostral; 3 mm vertical) as described previously by Laursen and Belknap (1986). The mechanical hypernociception of all groups was assessed by means of VFH, for up to 24 h after carrageenan administration, as described below.

2.7. Mechanical hypernociception induced by complete Freund adjuvant (CFA)

To produce a persistent inflammatory response, mice received a 20- μ l i.pl. injection of CFA (1 mg/ml heat-killed and dried *Mycobacterium tuberculosis*; each ml of vehicle contained 0.85 ml paraffin oil plus 0.15 ml mannide monooleate) into the right hindpaw (Quintão et al., 2005). To observe the effects of repeated treatment, SB225002 (1 mg/kg) was administered orally twice a day

(12 × 12 h) for a period of 7 days. The evaluation of the mechanical hypernociception was assessed every day using VFH, 6 h after the first daily administration. Control animals received the vehicle (10 ml/kg, 1% Tween 80 in 0.9% NaCl solution), under the same schedule of treatment adopted for SB225002.

2.8. Surgical procedures of partial ligation of sciatic nerve (PLSN)

To evaluate neuropathic pain-like behaviour, the procedure used was similar to that described by Quintão et al. (2005). Mice were anesthetized with 7% chloral hydrate (8 ml/kg; i.p.). PLSN was performed by tying 1/3–1/2 of the dorsal portion of the sciatic nerve with an 8.0 silk suture (Ethicon, Edinburgh). In sham-operated control group, the sciatic nerve was exposed without ligation. Following a period of recovery (4 days after the surgical procedures), animals submitted to PLSN were treated systemically with SB225002 (1 mg/kg, i.p.) or vehicle (10 ml/kg, Tween 80 plus 0.9% NaCl solution), twice a day (12 × 12 h) for a period of 5 days after the surgery, and then evaluated with VFH for up to 6 h after the treatment.

2.9. Hindpaw withdrawal response induced by von Frey hairs

For the evaluation of mechanical allodynia, mice were placed individually in clear Plexiglas boxes (9 × 7 × 11 cm) on elevated wire mesh platforms to allow access to the ventral surface of the right hindpaw. The withdrawal response frequency was measured following 10 applications (duration of 1 s each) of von Frey hairs (VFH, Stoelting, Chicago, IL, USA). Stimuli were delivered from below, to the plantar surface of the right hindpaw. The animals were acclimatized for 30 min before behavioural testing and the mechanical hypernociception was evaluated at several time-points. The VFH of 0.6 g produces a mean withdrawal frequency of about 15%, which is considered to be an adequate value for the measurement of mechanical hypernociception (Quintão et al., 2005). Therefore, 0.6 g VFH was used throughout this study. In order to determine the basal mechanical thresholds, all the groups were evaluated before the test or surgical procedures.

2.10. Biochemical assays

2.10.1. Myeloperoxidase (MPO) activity

Neutrophil recruitment to the mouse paw was assessed indirectly by means of tissue myeloperoxidase (MPO) activity, according to the method described beforehand (Cunha et al., 2005). For this purpose, animals were treated with SB225002 (0.1–3 mg/kg, i.p.) and 30 min after, they received a 50- μ l i.pl. injection of carrageenan (300 μ g/paw) into the right paw. Saline-injected paws were used as control. Animals were sacrificed 6 h after the application of carrageenan. The subcutaneous tissue of the paws was removed, homogenized at 5% (w/v) in EDTA/NaCl buffer (pH 4.7) and centrifuged at 10,000 rpm for 15 min at 4 °C. The pellet was resuspended in 0.5% hexadecyltrimethyl ammonium bromide buffer (pH 5.4), and the samples were frozen and thawed three times in liquid nitrogen. Upon thawing, the samples were recentrifuged (10,000 rpm, 15 min, 4 °C), and 25 μ l of the supernatant was used for the MPO assay. The enzymatic reaction was assessed with 1.6 mM tetramethylbenzidine, 80 mM NaPO₄, and 0.3 mM hydrogen peroxide. The absorbance was measured at 650 nm, and the results are expressed as OD per milligram of tissue.

2.11. Determination of IL-1 β , TNF α or KC levels in the mouse paw

Tissue levels of the proinflammatory cytokines IL-1 β , TNF α or KC were measured according to the protocol described by Cunha et al. (2005). The animals were treated with SB225002 (0.1–

3 mg/kg, i.p.), and after 30 min they received a 50- μ l i.pl. injection of carrageenan (300 μ g/paw) into the right paw. The mice were sacrificed 6 h after the injection of carrageenan. Saline-injected paws were used as control. Tissues were placed in PBS (PBS; pH 7.4; NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM) containing NaCl 0.4 M, PMSF 0.1 M, EDTA 10 mM, 0.05% of Tween 20, 0.5% of BSA and 2 mg/ml of aprotinin, homogenized, centrifuged at 3000g for 10 min and stored at –70 °C until further analysis. Cytokine levels were evaluated using an ELISA kit according to the manufacturer's recommendations (R&D Systems).

2.12. Measurement of non-specific effects

To exclude possible non-specific effects of SB225002 on motor coordination, locomotor activity, or the response latencies, mice were tested on the rota-rod, open-field and hot-plate paradigms, respectively (Quintão et al., 2005). Different groups of animals were pre-treated with SB225002 (1 and 3 mg/kg i.p.) or vehicle (10 ml/kg, i.p.) and they were submitted to all tests.

2.13. Drugs and reagents

N-(2-hydroxy-4-nitrophenyl)-N9-(2-bromophenyl) Urea (SB225002) was synthesized as described before (White et al., 1998). SB225002 was identified by comparing the ¹H NMR data with those published beforehand (Yield 70%, m.p. = 193–194 °C. ¹H NMR (400 MHz) (ppm) (DMSO-d₆) 11.05 (br. s, 1H), 9.48 (s, 1H), 9.12 (s, 1H), 8.36 (d, 1H), 7.93 (d, 1H), 7.75 (dd, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.63 (d, 1H), 7.36 (t, 1H), 7.03 (t, 1H); IR (cm⁻¹) 3364, 3212, 1692, 1588, 1536, 1507, 1430, 1306, 1267, 1212, 1086, 746, 649. LC–MS–ESI (m/z) 350 (M-H)⁻. SB225002 was dissolved in 1% Tween 80 in 0.9% NaCl solution. Formalin and acetic acid were from Merck (Darmstadt, Germany); capsaicin was from Calbiochem (San Diego, CA); glutamate, 8-Br-cAMP, PGE₂, carrageenan, PMA, epinephrine, dipyrone, Tween 80, EDTA, aprotinin, phosphate-buffered saline and CFA were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA). Mouse KC, KC, IL-1 β and TNF- α DuoSet kits were obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

2.14. Statistical analysis

The results are presented as the mean \pm S.E.M. of 5–7 animals, except for the ID₅₀ values (i.e. the dose of SB225002 that reduced the nociceptive responses by 50% relative to control values), which are presented as the means accompanied by their respective 95% confidence limits. The ID₅₀ values were determined by the use of the least squares method. The percentages of inhibition are reported as the mean \pm S.E.M. of inhibitions obtained for each individual experiment. Statistical comparison of the data was performed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post-test or one-way ANOVA followed by Newman–Keuls' test. *P*-values less than 0.05 (*P* < 0.05 or less) were considered significant.

3. Results

The results obtained with SB225002 in different models of spontaneous nociception are presented in Table 1. SB225002 (0.1–1 mg/kg, i.p.) caused a significant and dose-related reduction of acetic acid-evoked abdominal constrictions. The percentage of inhibition observed at the dose of 1 mg/kg was 94 \pm 3%, with an estimated mean ID₅₀ value (accompanied by the 95% confidence limit) of 0.3 (0.13–0.63) mg/kg. However, SB225002 (1–3 mg/kg, i.p.) was not able to significantly affect either the neurogenic (0–5 min) or the inflammatory (15–30 min) phases of the formalin

Table 1
Effect of SB225002 in several mouse models of nociception.

Model	Control	Treatment (mg/kg, i.p., 30 min prior)			
		SB 225002 0.3	1	3	Dipyron ^a 60
Writhing test ^b	48 ± 5	15 ± 6 [*]	3 ± 2 [*]	–	12 ± 4 s [*]
Formalin 1st phase	76 ± 3 s	–	90 ± 8 s	76 ± 5 s	–
Formalin 2nd phase	291 ± 30 s	–	234 ± 27 s	240 ± 18 s	–
Capsaicin	44 ± 3 s	–	43 ± 3 s	–	–
Glutamate	170 ± 13 s	–	118 ± 20 s	151 ± 16 s	50 ± 10 s [*]
PMA	114 ± 8 s	–	134 ± 8 s	116 ± 5 s	–
8-Br-cAMP	34 ± 3 s	–	28 ± 2 s	24 ± 2 s [*]	–

All the data represents the mean ± S.E.M. of 5 to 7 animals. Significantly differ from control values ^{*}*p* < 0.05.

^a Dipyron was used as a positive control drug.

^b This data is presented as the number of writhes.

test. The same pretreatment with SB225002 (1–3 mg/kg, i.p.), dosed 30 min before the induction of nociception by capsaicin, glutamate or PMA, also did not significantly alter the spontaneous nociception evoked by these algogenic agents (Table 1). Conversely, the systemic administration of SB225002 (3 mg/kg, i.p.) produced a marked decrease of the nociception induced by 8-Br-cAMP (32 ± 7%, Table 1).

As illustrated in Fig. 1, the i.pl. injection of PGE₂ (0.1 nmol/paw), epinephrine (100 ng/paw) or KC (10 ng/paw) into the mouse hind-paw produced prominent mechanical hypernociceptive effects that lasted for up to 24 h, as indicated by a marked increase from baseline values in response to 0.6 g VFH stimulation. The CXCR2 recep-

tor antagonist SB225002 (1 mg/kg, i.p., 30 min) was found to be effective in significantly preventing the mechanical hypernociception caused by either PGE₂ (Fig. 1A) or epinephrine (Fig. 1B). The percentages of reduction were 41 ± 2% and 55 ± 1%, respectively. The treatment with SB225002 (1 mg/kg, i.p., 30 min prior) also produced a significant reduction of the mechanical hypernociception evoked by KC, with an inhibition of 49 ± 3% (Fig. 1C).

The i.pl. injection of carrageenan (300 µg/paw) induced a marked mechanical hypernociception, with a duration of 6 h, as shown by a large increase from baseline values in response to 0.6 g VFH stimulation (Fig. 2). The systemic administration of SB225002 (0.1 to 3 mg/kg, i.p.) produced a significant and dose-

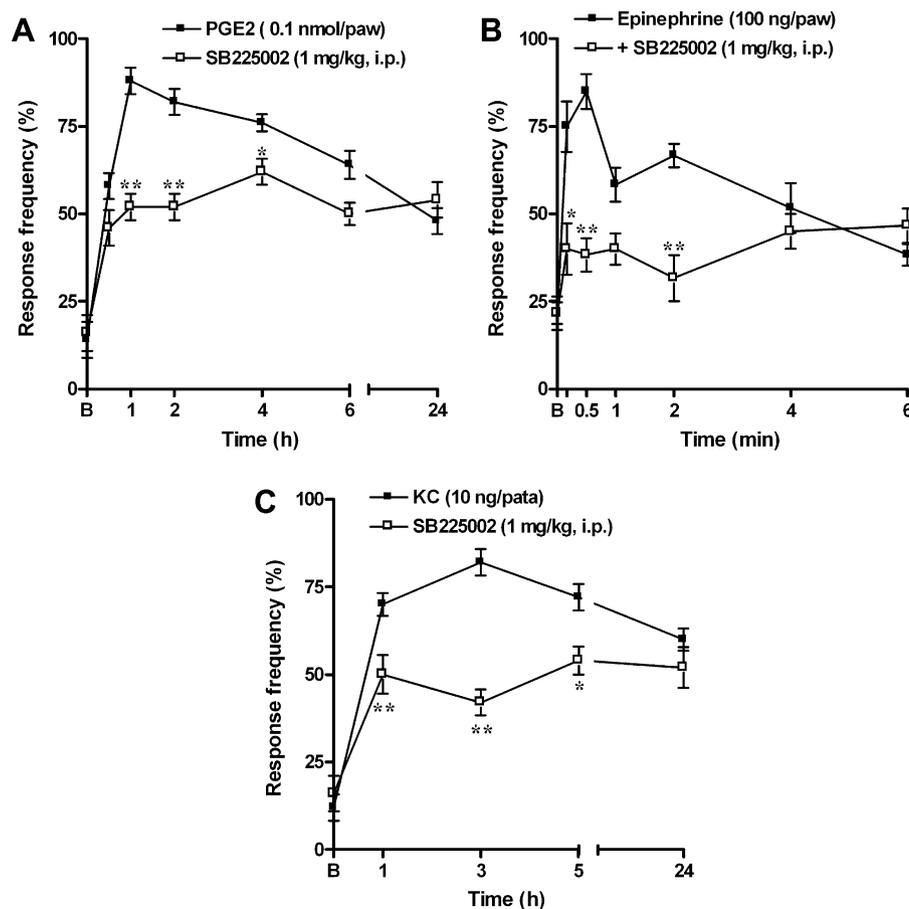


Fig. 1. Response frequency of the right hindpaw assessed in control group and in mice treated systemically with SB225002 (1 mg/kg, 30 min before) at different intervals following i.pl. injection of (A) PGE₂ (0.1 nmol/paw), (B) epinephrine (100 ng/paw), or (C) KC (10 ng/paw). Significantly different from control values ^{*}*p* < 0.05, ^{**}*p* < 0.01. Basal threshold (B), (two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test).

dependent reduction of the mechanical hypernociceptive response induced by carrageenan, with a maximal inhibition of $52 \pm 3\%$ at the dose of 1 mg/kg, and an estimated mean ID_{50} value of 1.19 (0.58–2.42) mg/kg (Fig. 2A and B).

In an attempt to verify the peripheral or central sites of action of SB225002, this compound was dosed by different routes of administration and tested in the carrageenan model of pain. Fig. 2C demonstrates that i.pl. co-injection of SB225002 (35–106 $\mu\text{g/paw}$) markedly reduced the mechanical hypernociception induced by carrageenan (300 $\mu\text{g/paw}$). The observed inhibition obtained at the dose of 106 $\mu\text{g/paw}$ was $46 \pm 1\%$. Moreover, the administration of SB225002, by either i.t. or i.c.v. pathways (3.5–35 $\mu\text{g/site}$), was capable of reducing the mechanical hypernociception induced by carrageenan, with inhibitions of $55 \pm 2\%$ and $41 \pm 1\%$, both at the doses of 10.6 $\mu\text{g/site}$ (Fig. 2D and E).

We next investigated whether the systemic treatment with SB225002 (1 mg/kg), administered for 7 days, twice a day by i.p. route, was able to prevent the persistent mechanical hypernociception following CFA application (20 $\mu\text{l/paw}$). The repeated administration of SB225002 significantly reduced the mechanical hypernociception induced by CFA injection for up to 5 days after

the treatment with an inhibition of $76 \pm 9\%$, (Fig. 3A). Interestingly, the prolonged treatment with SB225002 (1 mg/kg), dosed twice a day by i.p. route, was also found to be markedly effective in reverting the mechanical allodynia induced by PLSN, for up to 4 days after the treatment. The percentages of reduction were $60 \pm 2\%$, 2 h after the first dose of SB225002, and $35 \pm 3\%$ on the 3rd day of repeated treatment (Fig. 3B).

The results in Fig. 4A indicate that the increase of MPO activity induced by the i.pl. injection of carrageenan (300 $\mu\text{g/paw}$) was significantly inhibited by the treatment with SB225002 (0.3 and 1 mg/kg, i.p., 30 min prior), when compared to the control group ($39 \pm 2\%$ and $46 \pm 3\%$, respectively). The i.pl. injection of carrageenan (300 $\mu\text{g/paw}$) significantly increased the levels of KC, IL-1 β and TNF- α (Fig. 4B–D) in the mouse paw tissue. Systemic treatment with SB225002 (0.1–3 mg/kg, i.p.) markedly and dose-dependently reduced the enhancement of KC levels, with a maximal inhibition of $90 \pm 5\%$, at the dose of 1 mg/kg, i.p. (Fig. 4B). The same treatment with SB225002 (0.1–3 mg/kg, i.p.) significantly reduced the production of IL-1 β (Fig. 4C) and TNF α (Fig. 4D), in a dose-dependent manner. The observed inhibitions at the dose of 3 mg/kg were $25 \pm 1\%$ and $58 \pm 3\%$, for IL-1 β and TNF α , respectively.

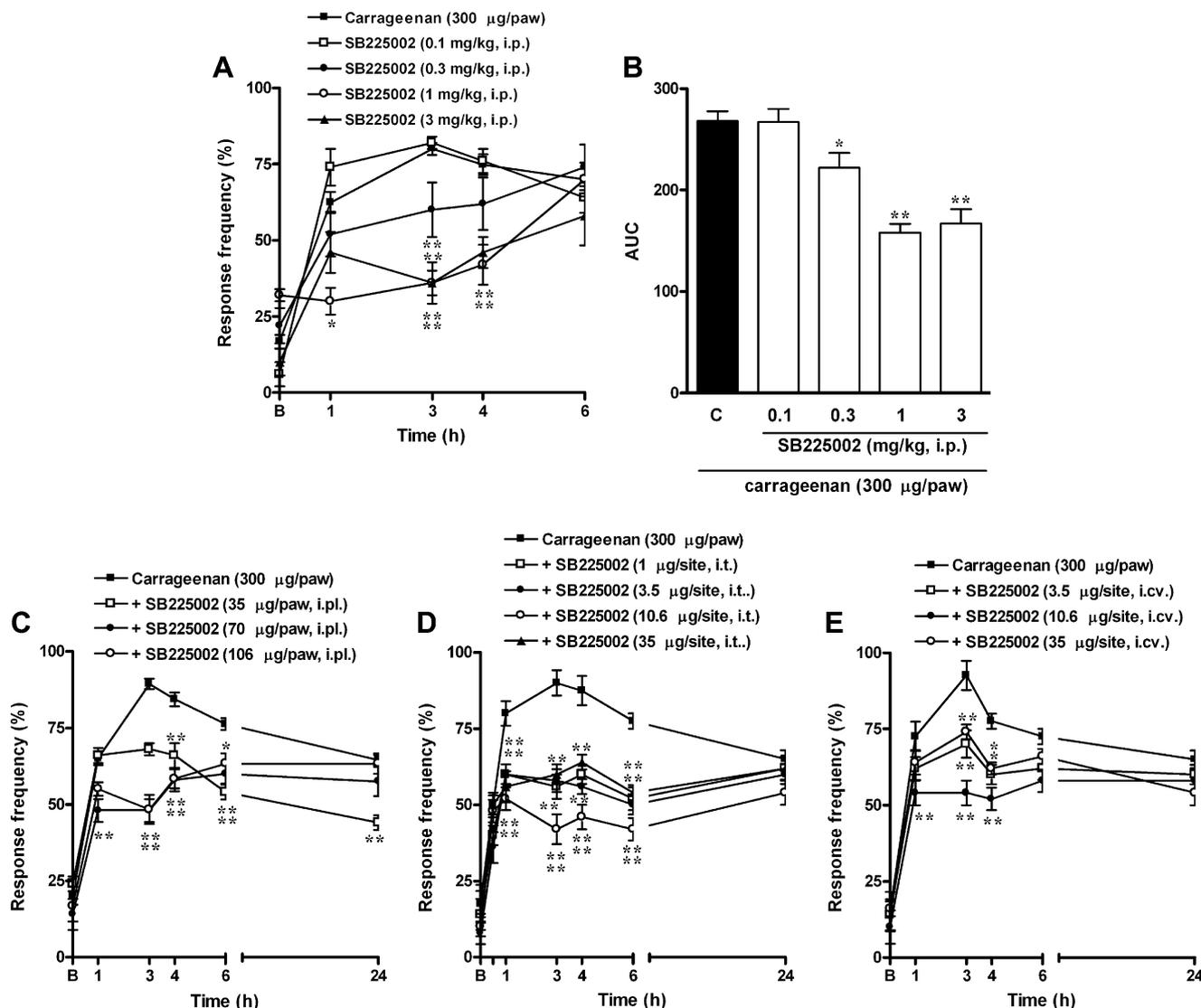


Fig. 2. Effect of SB225002 administered by (A) i.p. (0.1–3 mg/kg, 30 min prior), (C) i.pl. (35–106 $\mu\text{g/paw}$, co-administrated), (D) i.t. (1–35 $\mu\text{g/site}$, 10 min prior) or (E) i.c.v. (3.5–35 $\mu\text{g/site}$, 10 min prior) routes on mechanical hypernociception induced by i.pl. injection of carrageenan (300 $\mu\text{g/paw}$) in mice. Panel B represents areas under the curves of panel A. Significantly different from control values * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, (two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test).

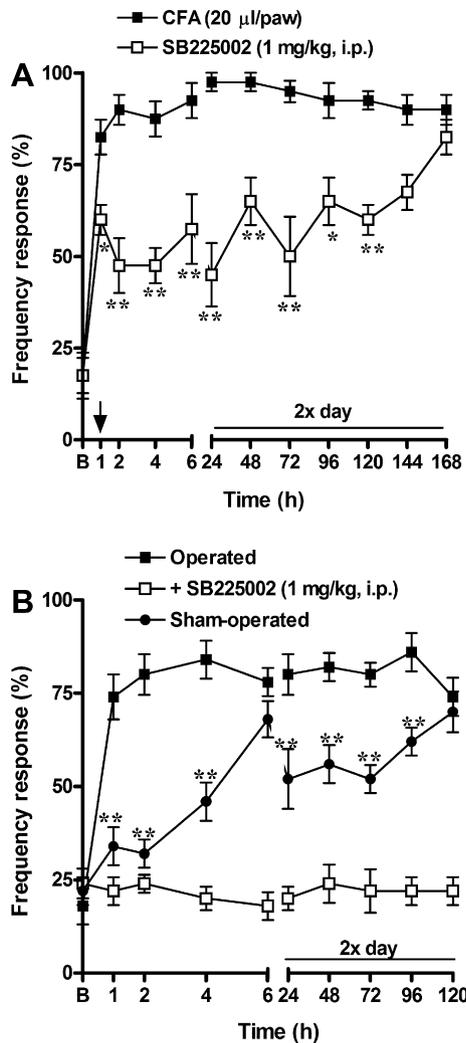


Fig. 3. (A) Response frequency of the right hindpaws injected with complete Freud's adjuvant (CFA – 20 µl/paw) in control group and in mice treated with SB225002 (1 mg/kg, i.p., administered twice a day) at different time intervals after the treatment with these drugs. (B) Response frequency of the right hindpaw in sham-operated and operated (PLSN) mice treated with saline (10 ml/kg) or SB225002 (1 mg/kg, i.p., administered twice a day) at different intervals of time after the treatment. Significantly different from control values * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, (two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test).

The administration of SB225002 (1–3 mg/kg, i.p.), given 30 min before, did not significantly affect the locomotor activity of the animals in the open-field test (Table 2). Moreover, SB225002 (1–3 mg/kg, i.p., 30 min) did not significantly change the motor coordination of the animals in the rotarod test or the latency responses for thermal stimuli, in comparison to the control group (Table 2).

4. Discussion

This study evaluated the effects of the non-peptide, competitive and selective CXCR2 antagonist SB225002 in different models of nociception in mice. SB225002 significantly diminished nociception in either acute or chronic models, corroborating the notion that chemokine receptors display a crucial role in pain.

SB225002 produced a dose-related and marked reduction of acetic acid-induced writhes. Ribeiro et al. (2000) previously demonstrated that acetic acid-evoked writhes are dependent on TNF α , IL-1 β and IL-8 generation, from resident peritoneal macrophages and mast cells. Additionally, Duarte et al. (1988) evidenced the

chemokine involvement in the sympathetic component of this model. Present data extend previous evidence on the relevance of chemokines, and demonstrate for the first time the role of CXCR2 in the acetic acid test.

The formalin model presents a clear biphasic profile, with two distinct components: neurogenic and inflammatory. Chichorro et al. (2004) demonstrated that orofacial nociception caused by formalin in rats can either be increased by IL-8, or even reduced by anti-IL-8. Surprisingly, mouse treatment with SB225002 did not affect either of the phases of formalin test. Some distinctions between our study and that conducted by Chichorro et al. (2004), such as the use of different animal species and the anatomical site, might explain this discrepancy. SB225002 also failed to significantly affect capsaicin- or glutamate-elicited nociception. Similar to the formalin model, nociceptive responses induced by capsaicin or glutamate represent useful tools for investigating the involvement of neurogenic pathways (Sakurada et al., 1992; Beirith et al., 2002). Therefore, the antinociceptive effects of SB225002 do not seem to be related to an interference with neuropeptide release from sensory peripheral fibres.

PKC activation is an important step for the nociception caused by numerous stimuli (Ji and Woolf, 2001; Ferreira et al., 2005). The upregulation and activation of PKC γ and PKC β in the spinal cord appear to exert a key role in chronic pain (Ji and Woolf, 2001). Furthermore, the stimulation of peripheral PKC ϵ is probably involved in the acute nociception evoked by epinephrine or TNF α , and in chronic models of pain (Dina et al., 2001; Parada et al., 2003). SB225002 failed to affect the spontaneous nociception caused by the PKC activator PMA; thus, we might discard a possible direct effect of SB225002 on PKC stimulation. In fact, PKC ϵ activation does not seem to represent a signalling pathway related to CXCR2 (Nasser et al., 2005).

The administration of SB225002 was capable of inhibiting the licking induced by the PKA activator 8-Br-cAMP, what suggests that CXCR2 activation during pain processing is related to the PKA pathway. This premise is supported by the results demonstrating that SB225002 markedly reduces the mechanical hypernociception induced by PGE $_2$ or epinephrine. Both mediators activate second messenger pathways involving cAMP and PKA, which consequently reduce the nociceptor threshold and increase neuronal membrane excitability (Samad et al., 2002). Thus, blocking CXCR2 by SB225002 might result in the inhibition of PKA-cAMP pathways, contributing to its antinociceptive actions.

It has been demonstrated that i.pl. injection of the CXC chemokine KC results in a dose- and time-dependent mechanical hypernociception in mice, and this hypernociceptive response is reduced by indomethacin (a non-selective COX inhibitor) or guanethidine (a sympathomimetic neuron-blocking agent) (Cunha et al., 2005). Our data revealed that mechanical hypernociception induced by KC is greatly reduced by SB225002. In this regard, we might suggest that prostanoids and sympathomimetic amines are implicated in the sensorial sensitization mediated by CXCR2 receptor activation, in a mechanism involving the activation of PKA.

Cunha and co-workers (2008) demonstrated that systemic treatment with DF 2162, a non-competitive allosteric inhibitor of CXCR1/CXCR2 receptors, greatly prevented the hypernociception induced by KC, carrageenan, LPS or zymosan in mice. The treatment of mice with SB225002 produced anti-hypernociceptive effects, for up to 4 h, in the carrageenan acute model of pain. Interestingly, i.t. administration of SB225002 markedly inhibited carrageenan-induced mechanical hypernociception (for up to 6 h). Also, the hypernociception caused by carrageenan was significantly reduced when SB225002 was dosed by either i.pl. or i.c.v. routes. Hence, SB225002 probably controls inflammatory pain, by interfering with both peripheral and central nociceptive pathways, although we might not affirm the potential of SB225002 in crossing

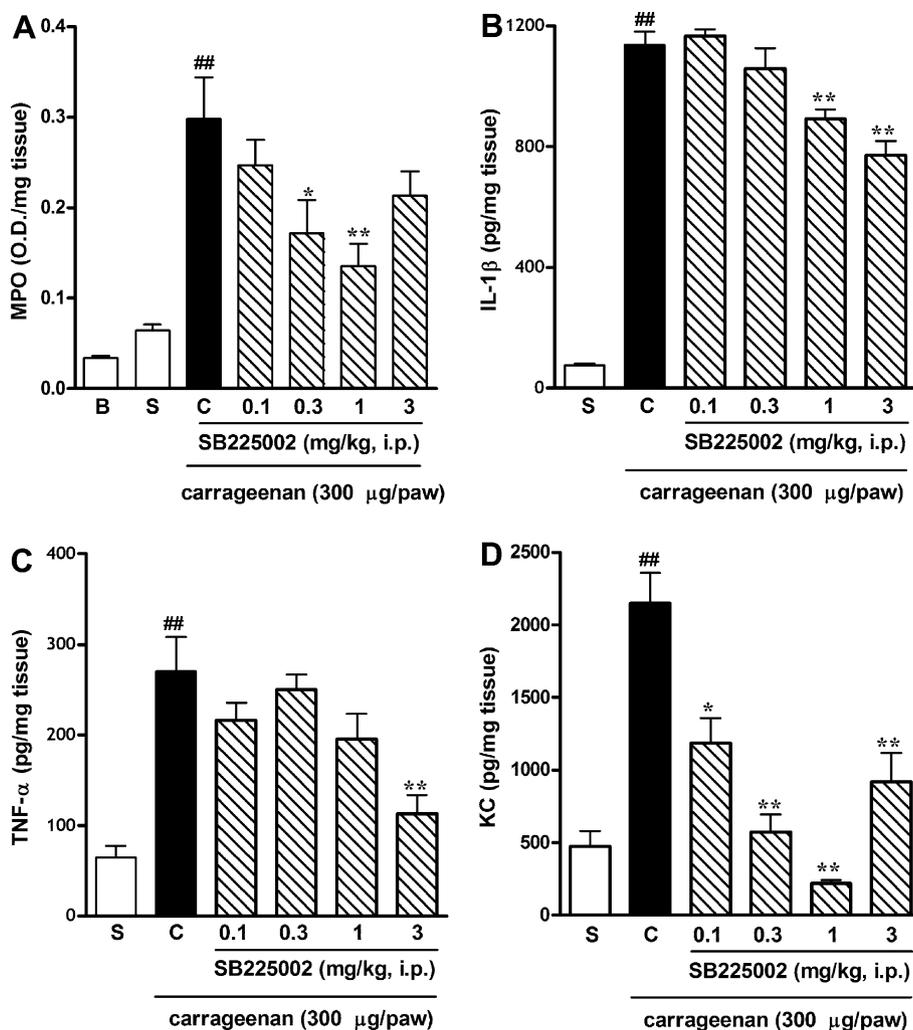


Fig. 4. Effects of SB225002 (0.1–3 mg/kg, i.p.) on the increase of: (A) MPO, (B) IL-1 β , (C) TNF α , or (D) KC production induced by i.p.l. injection of carrageenan (300 μ g/paw) into the mice hindpaw. Significantly different from saline group values $^{##}p < 0.001$, and significantly different from control values $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, (ANOVA followed by Newmann–Keuls post-hoc test).

the blood–brain–barrier (BBB). Considering that i.p.l. injection of carrageenan is followed by an inflammatory response, accompanied by cell migration and release of inflammatory mediators (such as bradykinin and substance P), it is feasible to believe that the BBB has its function altered. It is generally accepted that neutrophils, through the release of cytotoxic enzymes and reactive oxygen species (ROS), contribute to the BBB disruption with consequent exacerbation of inflammatory conditions (Koennecke et al., 1999). Of high interest, Mitchell et al. (2008) recently demonstrated that peripheral inflammation elicited by carrageenan injection into the rat paw results in increased MPO activity in the spinal cord,

which carry on the expression of some relevant partners of the inflammatory process.

Cunha et al. (2005) have suggested that release of primary mediators responsible for carrageenan-induced mechanical hypernociception is preceded by cytokine production. Likewise, neutrophil migration appears to represent a pivotal step in the events leading to carrageenan-evoked mechanical hypernociception (Cunha et al., 2008). Relevantly, the systemic treatment with SB225002 significantly prevented the neutrophil migration and production of TNF α , IL-1 β and KC induced by carrageenan. Augmented KC levels can lead to an increased production of other cytokines and inflammatory mediators, including KC itself; this might explain the effects of SB225002 in the production of KC in the mouse paw. The effects of SB225002 on neutrophil influx to the mouse paw might also have consequences in the generation of inflammatory mediators at distant sites (peripheral or central), contributing to the resultant antinociception.

I.p.l. injection of CFA produces an inflammatory response that develops within a few hours, an effect that is associated with a striking modification in the activity of superficial (I and II) and deep (V and VI) laminal dorsal horn neurons receiving noxious inputs (Chan et al., 2000). The present results show that therapeutic treatment with SB225002 produces a prominent inhibition of the

Table 2

Analysis of possible adverse effects induced by SB225002 in mice.

Test	Control	SB 225002 (mg/kg, i.p.)	
		1	3
Rota-rod	54 \pm 4 s	58 \pm 1 s	55 \pm 3 s
Open-field ^a	68 \pm 7	68 \pm 6	73 \pm 10
Hot plate	4 \pm 1 s	3 \pm 1 s	4 \pm 1 s

^a This data is expressed as the number of crossed squares. All the data represents the mean \pm S.E.M. of 5–7 animals.

mechanical hypernociception induced by CFA, for up to 5 days. Supporting our findings, a recent report has shown that allosteric inhibition of CXCR1/CXCR2 receptors by DF 2162 significantly prevents CFA-induced arthritis in rats (Barsante et al., 2008).

Notably, the repeated treatment with SB225002, at a low dose such as 1 mg/kg, markedly reduced the neuropathic pain-like behaviour induced by PLSN. Chemokines have been implicated in the pathophysiology of neuropathic pain, by mechanisms involving changed expression of chemokine receptors, the modulation of neuronal electrical activity, and interference with other neurotransmitters (White et al., 2007). Recent evidence has demonstrated the effectiveness of CCR2 and CXCR4 selective antagonists in reducing hypernociception in animal models of neuropathy (Bhangoo et al., 2007; White et al., 2007). However, to our knowledge, this is the first study showing the ability of a selective CXCR2 antagonist to prevent the long-lasting hypernociceptive alterations induced by PLSN. Certainly, the use of CXCR2 knockout mice could be a valuable instrument to extend the experimental evidence obtained with SB225002. In the PLSN model, the antihypernociceptive effects of SB225002 might be allied to an indirect effect on the mechanisms of neuronal plasticity observed in neuropathies. There are compelling pieces of evidence indicating the relevance of neutrophil migration in pain mechanisms (Cunha et al., 2008; Saab et al., 2008). In this regard, Shaw et al. (2008) have shown that activated neutrophils can aggravate neuronal injury and cause functional changes to peripheral sensory neurons, when co-cultured with DRG cells. These pieces of evidence confirm the notion that anti-neutrophil strategies, such as CXCR2 antagonists, might be useful for treating neuropathic pain-like states.

The antihypernociceptive actions of SB225002 do not seem to be associated with non-specific central actions, as this drug did not significantly influence the performance of mice on the rotarod or the open-field tests, and it did not interfere with the thermal latency. This is quite favourable to a possible therapeutic application of SB225002 for the treatment of long-lasting pain, where chronic treatment is required.

In this study, we show that SB225002 displayed marked antinociceptive effects in acute and persistent mouse models of pain. It is well known that either CXCR2 ligands or receptors are expressed by several cell types, including neutrophils, monocytes, endothelial and neuronal cells (Charo and Ransohoff, 2006). The chemokines produced by these cells, in the different experimental models evaluated in this work, might well reach sensory nerve endings, causing nociceptor sensitization. Alternatively, these chemokines might also induce the stimulation of additional pathways implicated in pain generation (White and Wilson, 2008), such as PKA-cAMP activation, or the release of prostanoids and sympathomimetic amines. Finally, the induction of inflammation and/or damage at peripheral sites has been associated to the up-regulation of chemokines and their receptors at the central nervous (Gosselin et al., 2008). It is reasonable to propose that SB225002 could block the generation of pain, by inhibiting CXCR2 activation at any of these levels. Taken together, our findings extend the idea on the pivotal role played by chemokine receptors in painful alterations, and point out selective CXCR2 antagonists as promising therapeutic choices.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX) and the Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC). M.M.N. is a Pharmacy & Biochemistry undergraduate

student supported by CNPq. N.L.M.Q. and P.C.L. are Ph.D. students in Pharmacology and Chemistry, respectively, and are recipients of CNPq grants.

References

- Ahn DK, Lee KR, Lee HJ, Kim SK, Choi HS, Lim EJ, et al. Intracisternal administration of chemokines facilitated formalin-induced behavioral responses in the orofacial area of freely moving rats. *Brain Res Bull* 2005;66:50–8.
- Baggiolini M. Chemokines in pathology and medicine. *J Int Med* 2001;250:91–104.
- Barsante MM, Cunha TM, Allegretti M, Cattani F, Policani F, Bizzarri C, et al. Blockade of the chemokine receptor CXCR2 ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats. *Brit J Pharmacol* 2008;153:992–1002.
- Beirith A, Santos AR, Calixto JB. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res* 2002;924:219–28.
- Bhangoo SK, Ren D, Miller RJ, Chan DM, Ripsch MS, Weiss C, et al. CXCR4 chemokine receptor signaling mediates pain hypersensitivity in association with antiretroviral toxic neuropathy. *Brain Behav Immun* 2007;21:581–91.
- Bizzarri C, Beccari AR, Bertini R, Cavicchia MR, Giorgini S, Allegretti M. ELR+ CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets. *Pharmacol Ther* 2006;112:139–49.
- Chan CF, Sun WZ, Lin JK, Lin Shiau SY. Activation of transcription factors of nuclear factor kappa B, activator protein-1 and octamer factors in hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* 2000;402:61–8.
- Chapman RW, Minnicozzi M, Celly CS, Phillips JE, Kung TT, Hipkin RW, et al. A novel, orally active CXCR1/2 receptor antagonist, sch527123, inhibits neutrophil recruitment, mucus production, and goblet cell hyperplasia in animal models of pulmonary inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;322:486–93.
- Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *New Eng J Med* 2006;354:610–21.
- Chichorro JG, Lorenzetti BB, Zampronio AR. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. *Brit J Pharmacol* 2004;141:1175–84.
- Coutaux A, Adam F, Willer JC, Le Bars D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine* 2005;72:359–71.
- Cunha TM, Verri Jr WA, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102:1755–60.
- Cunha TM, Barsante MM, Guerrero AT, Verri Jr WA, Ferreira SH, Coelho FM, et al. Treatment with DF 2162, a non-competitive allosteric inhibitor of CXCR1/2, diminishes neutrophil influx and inflammatory hypernociception in mice. *Brit J Pharmacol* 2008;54:460–70.
- Dina OA, Chen X, Reichling D, Levine JD. Role of protein kinase C-epsilon and protein kinase A in a model of paclitaxel-induced painful peripheral neuropathy in the rat. *Neuroscience* 2001;108:507–15.
- Duarte ID, Nakamura M, Ferreira SH. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. *Braz J Med Biol Res* 1988;21:341–3.
- Endo H, Akahoshi T, Nishimura A, Tonegawa M, Takagishi K, Kashiwazaki S, et al. Experimental arthritis induced by continuous infusion of IL-8 into rabbit knee joints. *Clin Exp Immunol* 1994;96:31–5.
- Ferreira J, Trichês KM Medeiros R, Calixto JB. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. *Pain* 2005;117:171–81.
- Gosselin RD, Dansereau MA, Pohl M, Kitabgi P, Beaudet N, Sarret P, et al. Chemokine network in the nervous system: a new target for pain relief. *Curr Med Chem* 2008;15:2866–75.
- Hylden JL, Wilcox GL. Intrathecal morphine in mice. A new technique. *Eur J Pharmacol* 1980;67:313–6.
- Ji RR, Woolf CJ. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol Dis* 2001;8:1–10.
- Kassuya CA, Ferreira J, Claudino RF, Calixto JB. Intraplantar PGE2 causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. *Brit J Pharmacol* 2007;150:727–37.
- Khasar SG, Dina OA, Green PG, Levine JD. Estrogen regulates adrenal medullary function producing sexual dimorphism in nociceptive threshold and beta-adrenergic receptor-mediated hyperalgesia in the rat. *Eur J Neurosci* 2005;21:3379–86.
- Koennecke LA, Zito MA, Proescholdt MG, van Rooijen N, Heyes MP. Depletion of systemic macrophages by liposome-encapsulated clodronate attenuates increases in brain quinolinic acid during CNS-localized and systemic immune activation. *J Neurochem* 1999;73:770–9.
- Laursen SE, Belknap JK. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. *J Pharmacol Meth* 1986;16:355–7.
- Mendes GL, Santos AR, Malheiros A, Filho VC, Yunes RA, Calixto JB. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by sesquiterpene polygodial. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;292:164–72.
- Mitchell K, Yang HY, Tessier PA, Muhly WT, Swaim WD, Szalayova I, et al. Localization of S100A8 and S100A9 expressing neutrophils to spinal cord during peripheral tissue inflammation. *Pain* 2008;134:216–31.

- Nasser MW, Marjoram RJ, Brown SL, Richardson RM. Cross-desensitization among CXCR1, CXCR2, and CCR5: role of protein kinase C-epsilon. *J Immunol* 2005;174:6927–33.
- Obreja O, Rathee PK, Lips KS, Distler C, Kress M. IL-1 beta potentiates heat-activated currents in rat sensory neurons: involvement of IL-1RI, tyrosine kinase, and protein kinase C. *FASEB J* 2002;16:1497–503.
- Otuki FO, Ferreira J, Lima FV, Meyer-Silva C, Malheiros A, Muller LA, et al. Antinociceptive properties of mixture of α -amyrin and β -amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase c and protein kinase a pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;313:310–8.
- Parada CA, Yeh JJ, Reichling DB, Levine JD. Transient attenuation of protein kinase C-epsilon can terminate a chronic hyperalgesic state in the rat. *Neuroscience* 2003;120:219–26.
- Quintão NL, Medeiros R, Santos AR, Campos MM, Calixto JB. The effects of diacerein on mechanical allodynia in inflammatory and neuropathic models of nociception in mice. *Anesth Analg* 2005;101:1763–9.
- Reutershan J, Morris MM, Burcin TL, Smith DF, Chang D, Saprito MS, et al. Critical role of endothelial CXCR2 in LPS induced neutrophil migration into the lung. *J Clin Invest* 2006;116:695–702.
- Ribeiro RA, Vale ML, Thomazzi SM, Paschoalato AB, Poole S, Ferreira SH, et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol* 2000;387:111–8.
- Rosenkilde MM, Schwartz TW. The chemokine system – a major regulator of angiogenesis in health and disease. *APMIS* 2004;112:481–95.
- Saab CY, Waxman SG, Hains BC. Alarm or curse? The pain of neuroinflammation. *Brain Res Rev* 2008;58:226–35.
- Sakurada T, Katsumata K, Tan-No K, Sakurada S, Kisara K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. *Neuropharmacology* 1992;31:1279–85.
- Samad TA, Saperstein A, Woolf CJ. Prostanoids and pain: unraveling mechanisms and revealing therapeutic targets. *Trend Mol Med* 2002;8:390–6.
- Shaw SK, Owolabi SA, Bagley J, Morin N, Cheng E, LeBlanc BW, et al. Activated polymorphonuclear cells promote injury and excitability of dorsal root ganglia neurons. *Exp Neurol* 2008;210:286–94.
- Taniguchi K, Shinjo K, Mizutani M, Shimada K, Ishikawa T, Menniti FS, et al. Antinociceptive activity of CP-101606, an NMDA receptor NR2B subunit antagonist. *Brit J Pharmacol* 1997;122:809–12.
- Vaz ZR, Filho VC, Yunes RA, Calixto JB. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3-methyl-4, 6-dimethoxy benzofuran, a novel xanthoxylone derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;278:304–12.
- Verri Jr WA, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther* 2006;112:116–38.
- White Jr, Lee JM, Young PR, Hertzberg RP, Jurewicz AJ, Chaikin MA, et al. Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *J Biol Chem* 1998;273:10095–108.
- White FA, Jung H, Miller RJ. Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104:20151–8.
- White FA, Wilson NM. Chemokines as pain mediators and modulators. *Curr Opin Anaesthesiol* 2008;21:580–5.

The selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates acute experimental colitis in mice

Allisson Freire Bento,* Daniela Ferraz Pereira Leite,* Rafaela Franco Claudino,* Daniela Balz Hara,* Paulo César Leal,[†] and João B. Calixto*.¹

*Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, and [†]Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

Abstract: Although neutrophils are strongly implicated in eliminating pathogens, excessive recruitment may cause tissue damage. Therefore, reducing cell influx during an inflammatory process may be a potential target for treating inflammatory bowel diseases (IBD). As CXCR2 is involved in neutrophil migration, this study aimed to evaluate whether the systemic therapeutic treatment with selective CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates experimental colitis, which was induced in mice by 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS). After colitis establishment (24 h), mice were treated with SB225002. At later time-points, up to 72 h, mice were monitored for body weight loss and overall mortality. At the time of sacrifice, colonic tissues were scored for macro- and microscopic damage, and cytokine levels, myeloperoxidase (MPO) activity, and protein expression were analyzed. TNBS administration induced macro- and microscopic damage in colon tissue, leading in most cases to animal death. Curative treatment with SB225002 significantly reduced all of the parameters analyzed, leading to an improvement of inflammatory signs. SB225002 reduced neutrophil influx, MPO activity, IL-1 β , MIP-2, and keratinocyte-derived chemokine (KC) levels and the expression of vascular endothelial growth factor, inducible NO synthase, and cyclooxygenase-2 proteins into colon tissue. Levels of IL-4 and IL-10 were increased significantly in the colons of animals treated with SB225002. Additionally, curative treatment with mouse anti-KC significantly reduced MPO activity and colonic damage. These results taken together demonstrate that a selective blockade of CXCR2 consistently reduced TNBS-induced colitis, suggesting that the use of SB225002 is a potential therapeutic approach for the treatment of IBD and other related inflammatory disorders. *J. Leukoc. Biol.* 84: 000–000; 2008.

Key Words: chemokines · neutrophil migration · trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis · mouse

INTRODUCTION

Inflammatory bowel disease (IBD) is a generic classification for a group of inflammatory disorders of the gastrointestinal tract

characterized by mucosal damage with leukocyte infiltration. The etiology of IBD is complex and is likely to involve an interaction of environmental, genetic, and immunologic factors [1]. Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) represent the two main types of IBD. CD is a relapsing, transmural inflammatory disease of the gastrointestinal mucosa that can affect the entire gastrointestinal tract from the mouth to the anus, and UC is a relapsing, nontransmural inflammatory disease that is generally restricted to the colon [2].

Over the past decade, a substantial amount of evidence has been generated to support a crucial role of neutrophils in the pathogenesis of colitis [3, 4]. The infiltration of polymorphonuclear leukocyte (PMN) into the colonic mucosa is believed to play a key role in mediating tissue damage and clinical symptoms in human and experimental colitis [3–5] by releasing harmful inflammatory mediators, such as cytokines, proteases, and reactive oxygen species. Therefore, inhibition of neutrophil influx might be an attractive and relevant, therapeutic strategy to treat IBD [6].

Neutrophils express two CXC chemokine receptors, CXCR1 and CXCR2 [7], which play an important role in the pathogenesis of inflammatory responses [8]. In the human system, IL-8/CXCL8 and granulocyte chemotactic protein-2 (GCP-2)/CXCL6 can bind and activate CXCR1 and CXCR2, promoting neutrophil migration, and CXCL1, -2, -3, -5, and -7 are potent agonists only for CXCR2 [9]. Once CXCL8 is absent in the mouse, it is assumed that neutrophil migration in this species is mediated mainly by keratinocyte-derived chemokine (KC), MIP-2, LPS-induced CXC chemokine (LIX), and GCP-2 [10]. Disparity between human and rodent systems is implied further by the affinity of CXCR1 and CXCR2 to chemokines. Fan and colleagues [11] have demonstrated recently that mouse CXCR1 binds with high affinity to mouse GCP-2 but with low affinity to mouse MIP-2 and KC. As in the human system, mouse CXCR2 is more promiscuous than CXCR1, binding to mouse KC, MIP-2 [12], GCP-2 [11], and LIX [13].

It is now well characterized that activation of CXCR1 and CXCR2 is able to promote neutrophil degranulation and chemotaxis at sites of inflammation [8]. Evidence suggests that

¹ Correspondence: Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Trindade, Bloco D, CCB, Caixa Postal 476, CEP 88049-900, Florianópolis, SC, Brazil. E-mail: calixto@farmaco.ufsc.br or calixto3@terra.com.br

Received April 7, 2008; revised June 26, 2008; accepted June 27, 2008.
doi: 10.1189/jlb.0408231

CXCR1 is implicated in superoxide production [14], and CXCR2 seems to be associated with the initiation of this cell migration [6]. CXCR2 signaling may also act as an angiogenic factor after KC engagement, contributing in concert with vascular endothelial growth factor (VEGF) and CXCL1 to the angiogenesis, a phenomenon that is thought to be involved in the initiation and perpetuation of IBD. Of note, CXCL8, VEGF, and CXCL1 are found to be increased in CD and UC [15, 16].

Previous studies have reported that selective and competitive CXCR2 antagonist SB225002 is able to reduce neutrophil recruitment in many pathophysiological states [6, 17]. Likewise, studies carried out on CXCR2-knockout mice have shown limited mucosal damage and reduced inflammatory signs following dextran sulfate sodium-induced colitis [3]. However, it has been demonstrated by the use of CXCR2 antibody neutralization that neutrophil influx in the rat is critically dependent on CXCR2 signaling when assessed in the early phase (8 h) but not in the late phase (Day 7) after 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis [18].

In the present study, we have investigated the potential beneficial effects of a potent and selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 in TNBS-induced colitis in mice. We have found enhanced levels of CXCR2 ligands, namely MIP-2 and KC, in colonic tissues. Moreover, treatment with mouse anti-KC or with SB225002 was able to ameliorate TNBS-induced colitis significantly, decreasing inflammatory cell influx and tissue damage. In addition, we have further clarified other mechanisms involved in SB225002 anti-inflammatory effects such as decreased VEGF, inducible NO synthase (iNOS), and cyclooxygenase-2 (COX-2) protein expression.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male BALB/c mice, at 8–10 weeks of age, were obtained from the Universidade Estadual de Campinas (Campinas, SP, Brazil). Animals were kept in chambers under a 12-h light/dark cycle with controlled humidity (60–80%) and temperature (22±1°C). Food and water were available freely. Experiments were performed during the light phase of the cycle. The Ethics Committee of the Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, SC, Brazil) approved all experimental protocols used in this study.

Animal treatment

N-(2-Hydroxy-4-nitrophenyl)-*N*9-(2-bromophenyl) urea (SB225002) was synthesized as described before [6]. To evaluate the potential therapeutic effect of SB225002 in the experimental colitis, animals received different doses of SB225002 twice per day (0.1, 0.3, and 1 mg/kg, i.p.), 24 h after the colitis induction. At 24 h or 72 h following colitis induction, the macroscopic score and myeloperoxidase (MPO) activity were analyzed. The most effective dose (0.3 mg/Kg) was used for the other experiments, such as cytokine contents, COX-2, VEGF, and iNOS protein expression. Similar protocol treatments were carried out using the positive control drug dexamethasone (1 mg/kg, s.c.) and anti-mouse KC (30 µg/kg, i.v.). SB225002 was dissolved in 0.9% NaCl solution containing 0.33% Tween 80 just before use, and control mice were treated with this vehicle.

Induction and assessment of TNBS-induced colitis

Colitis was induced by intracolonic administration of TNBS, as described previously [19]. Briefly, 1-day fasted mice were anesthetized slightly with an i.p. injection of xylazine, 10 mg/kg, and ketamine, 80 mg/kg. TNBS (1.5 mg in

100 µL 35% ethanol) was administered intrarectally using a polyethylene PE-50 catheter slowly inserted into the colon 4 cm proximal to the anus. The animals were kept in a head-down, vertical position for 2 min. Control mice received 100 µL sterile 0.9% NaCl solution. Four hours later, the animals were given free access to food and water. Throughout the experiment, mice were monitored for body-weight loss and overall mortality. At the time of sacrifice, the weight of the spleen and colon length and weight were also measured.

Twenty-four hours or 3 days following TNBS administration, mice were killed, and the colonic tissues were excised longitudinally. They were then rinsed with saline and scored for macroscopic damage as described previously [19, 20]. Macroscopic damage was graded according to **Table 1**. In another set of experiments, each excised portion of distal colon was fixed immediately in 10% formaldehyde solution. All tissues were embedded in paraffin and sectioned to 5 µm thickness, mounted on glass slides, and deparaffinized. For general histology and morphometric analysis, slices were stained using H&E standard techniques. Samples were analyzed by light microscopy and scored as described in **Table 2** [21].

MPO, eosinophil peroxidase (EPO), and N-acetylglucosaminidase (NAG) assays

Neutrophil, eosinophil, and macrophage infiltration into the colon was assessed indirectly by measuring the MPO, EPO, and NAG activities. Colon segments were homogenized at 5% in EDTA/NaCl buffer (pH 4.7) and centrifuged at 10,000 *g* for 15 min at 4°C. The pellet was resuspended in 0.5% hexadecyl trimethyl ammonium bromide buffer (pH 5.4), and the samples were frozen in liquid nitrogen and thawed three times. Upon thawing, the samples were similarly centrifuged, and 25 µL of the supernatant was used for the MPO, EPO, and NAG assays. The MPO enzymatic reaction was assessed by addition of 1.6 mM tetramethylbenzidine (TMB), 80 mM NaPO₄, and 0.3 mM hydrogen peroxide (H₂O₂). The EPO enzymatic reaction was assessed by addition of 1.5 mM *O*-phenylenediamine (OPD), 0.075 mM Tris-HC, and 6.6 mM H₂O₂. Finally, the NAG activity measurement was determined by adding 2.25 mM *p*-nitrophenil-2-acetamide β-D-glucopyranoside and 100 µL 50 mM citrate buffer (pH 4.5). The absorbance was measured spectrophotometrically at 690, 490, and 405 nm for MPO, EPO, and NAG, respectively, and the results are expressed in OD/mg tissue.

Determination of cytokine levels

Briefly, colon segments were homogenized in phosphate buffer containing 0.05% Tween 20, 0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA, and 20 UI aprotinin A. The homogenate was centrifuged at 3000 *g* for 10 min, and supernatants were stored at -70°C until further analysis. IL-1β, KC, MIP-2, IL-4, and IL-10 levels were evaluated using ELISA kits from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's recommendations. The amount of protein in each sample was measured using the Bradford method [22].

Preparation of cytosolic fractions

The colons were homogenized in lysis buffer containing 10 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM PMSF, 1 mg/mL leupeptin, 1 mg/mL pepstatin A, 1 mg/mL leupeptin, 1 mg/mL aprotinin, 1 mM sodium orthovana-

TABLE 1. Macroscopic Score

Score	Parameter
0	No damage
1	Hyperemia without ulcers
2	Hyperemia and thickening of bowel wall without ulcers
3	One site of ulceration without bowel wall thickness
4	Two or more sites of ulceration or inflammation
5	0.5 cm inflammation and major damage
6–10	1 cm major damage. The score is increased by one for every 0.5 cm damage observed to a maximum of 10
0 or 1	Absence or presence of diarrhea
0 or 1	Absence or presence of stricture
0, 1, or 2	Absence or presence (mild or severe) of adhesions

TABLE 2. Microscopic Score

Score	Parameter
0	no inflammation
1	very low level
2	low level of leukocytic infiltration
3	high level of leukocytic infiltration, high vascular density, thickening of the colon wall
4	transmural infiltrations, loss of goblet cells, high vascular density, thickening of the colon wall

date, 10 mM b-glycerophosphate, 50 mM sodium fluoride, and 0.5 mM DTT. After centrifugation (14,000 *g* for 60 min), the supernatant containing the cytosolic fraction was collected and stored at -70°C until analysis.

Western blot analysis

Equivalent amounts of proteins (35 µg) were mixed in a buffer containing 200 mM Tris, 10% glycerol, 2% SDS, 2.75 mM β-ME, and 0.04% bromophenol blue and boiled for 5 min. Proteins were resolved in a 10% SDS gel by electrophoresis. After transfer to a polyvinylidene fluoride membrane, the blots were blocked with 5% fat-free dry milk-TBS buffer overnight at 4°C and then washed with TBS and 5% Tween-20 (TBST). The membranes were incubated for 2 h at room temperature with 1:1000 dilutions of primary antibodies for COX-2 or β-actin, 1:2000 for VEGF, and 1:150 for iNOS. Blots were washed four times with TBST for 5 min, followed by incubation with 1:80,000-adjusted, peroxidase-coupled biotinylated secondary antibodies for 1 h. The membranes were washed four times with TBST for 5 min and then incubated for 30 min with streptavidin-HRP reagent. The transferred proteins were visualized with an ECL detection kit according to the manufacturer's instructions.

Drugs and reagents

Dexamethasone, H₂O₂, Tween 20, Tween 80, EDTA, aprotinin, PBS, H&E, TMB, H₂O₂, OPD, and TNBS were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Formaldehyde was obtained from Merck (Frankfurt, Darmstadt, Germany). Bradford reagent was purchased from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA, USA). Anti mouse-KC, mouse KC, IL-4, MIP-2, IL-10, and IL-1β/IL-1F2 DuoSet kits were obtained from R&D Systems. COX-2, β-actin, VEGF (C-1), and iNOS primary antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Secondary antibody Envision Plus, streptavidin-HRP reagent, and 3,3-diaminobenzidine chromogen were purchased from Dako Cytomation (Carpinteria, CA, USA).

Statistical analysis

All data are expressed as means ± SEM. For nonparametric data, Kruskal-Wallis followed by Dunn's test was used. For parametric data, the statistical significance of differences between the groups was determined by one-way ANOVA, followed by the Student Newman-Keuls test. The χ² method was used for the survive curve. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 4 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A *P* value of less than 0.05 (*P*<0.05) was considered to be statistically significant.

RESULTS

SB225002 ameliorates TNBS-induced colitis

Colitis was induced in BALB/c mice by the administration of TNBS into the colon. At 24 h after TNBS administration, severe macroscopic damage allied to increased MPO activity was observed, suggesting that colitis was well established (Fig. 1,

A and B). At later time-points up to 72 h after TNBS administration, mice developed signs of a severe illness characterized by bloody diarrhea, rectal prolapse, and a profound and sustained weight loss, which resulted in a high mortality rate (65%), whereas control mice rapidly recovered weight after the starvation period and did not die (Fig. 2, A and B). To evaluate the potential therapeutic effect of SB225002 24 h after TNBS administration (i.e., after colitis establishment), mice were treated twice per day with SB225002 i.p. SB225002 (0.3 mg/kg)-treated mice rapidly recovered the lost body weight, regained a healthy appearance similar to control mice, and had a survival rate of 88% (Fig. 2A). In contrast, mice treated with the positive control drug dexamethasone (1 mg/kg, s.c.) did not recover the body weight significantly (Fig. 2A).

Three days following TNBS administration, animals were killed, and colon length and weight as well as macroscopic damage were assessed. TNBS administration resulted in decreased colon length (by 20%, Fig. 2C), increased colon weight (by 3.42-fold, Fig. 2D), and severe inflammation associated with hyperemia, ulceration, and sometimes adhesion. SB225002 was administered in three different doses (0.1, 0.3, and 1 mg/kg) to detect potential dose-dependent effects. Treatment with 0.3 or 1 mg/kg SB225002 but not with 0.1 mg/kg significantly reduced macro-

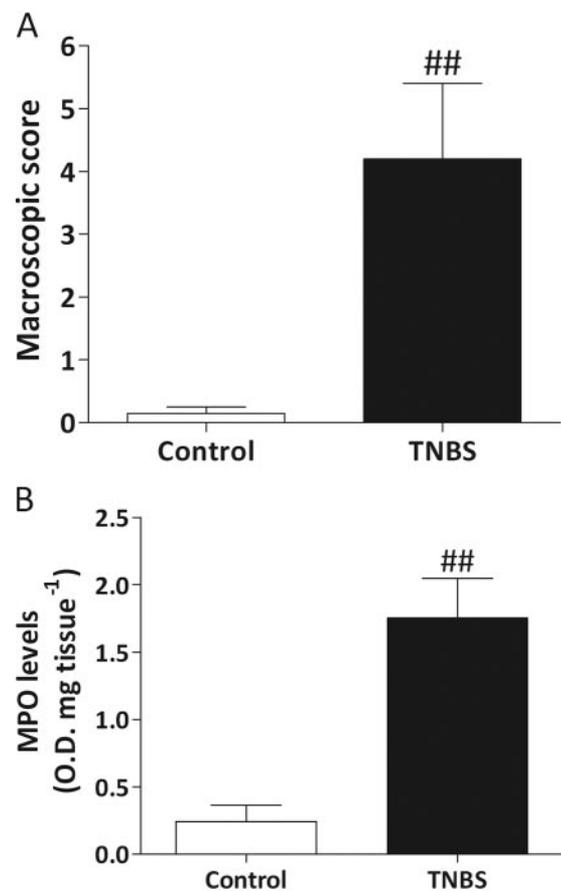


Fig. 1. Twenty-four hours after TNBS administration, colitis was already established. Twenty-four hours following colitis, induction of severe macroscopic damage (A) and a high MPO activity (B) was observed. Each column represents the mean ± SEM of five to seven mice per group. ##, *P* < 0.01, versus control group.

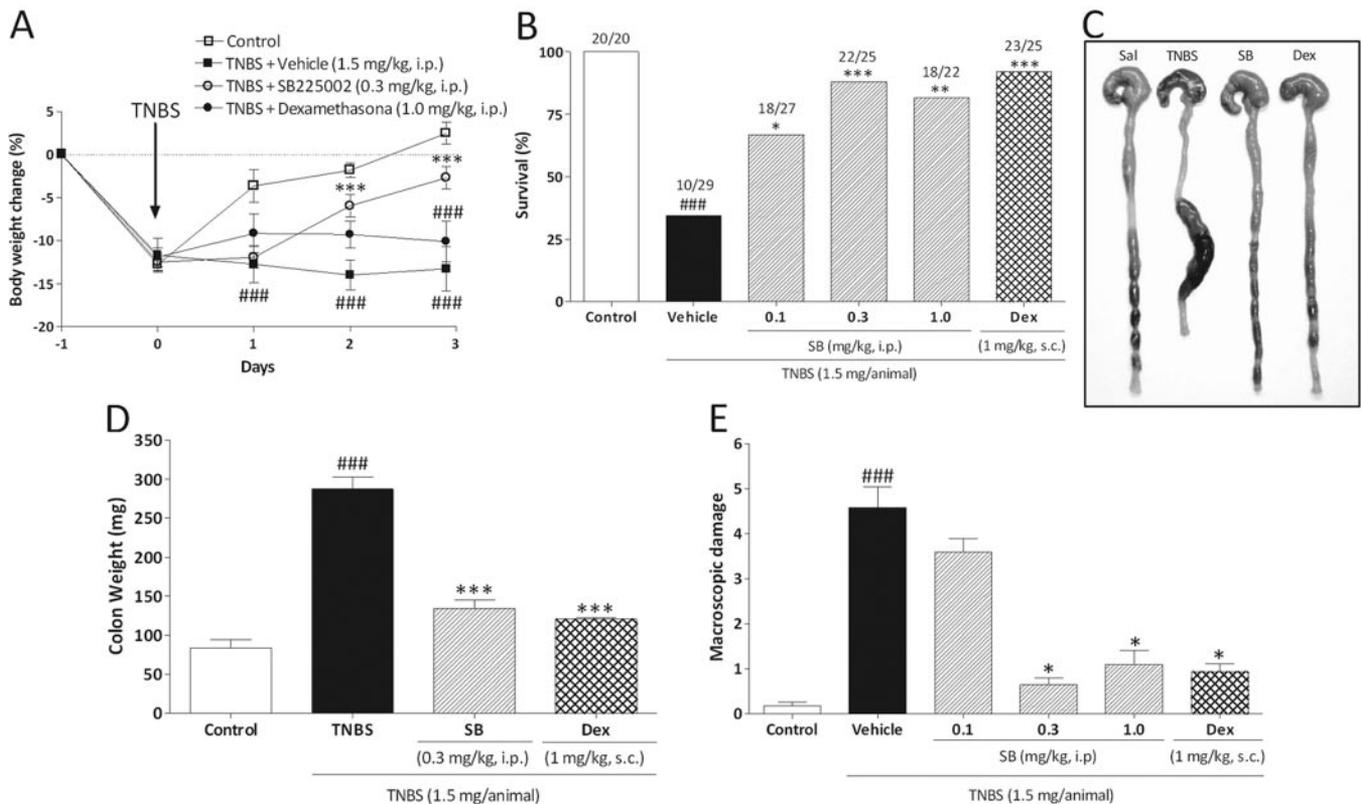


Fig. 2. Pharmacological blockage of CXCR2 ameliorates TNBS-induced colitis. Throughout the experiment, mice were monitored for body weight loss and overall mortality, and at 72 h after TNBS administration, colitis severity was assessed. Treatment with SB225002 (SB) recovered mouse weight (A), increased survival (B), improved colon length (C), decreased colon weight (D), and reduced the macroscopic score (E). Dex, Dexamethasone; Sal, saline. Each column represents the mean \pm SEM of five to seven mice per group. #, $P < 0.05$, ##, $P < 0.01$, and ###, $P < 0.001$, versus control group; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, and ***, $P < 0.001$, versus TNBS-treated group.

scopic colonic damage by $89.3 \pm 3.4\%$ and $79.1 \pm 7.0\%$, respectively (Fig. 2E). SB225002 curative treatment also restored colon length (Fig. 2C) and decreased colon edema by $75.2 \pm 5.4\%$ (Fig. 2D). Likewise, dexamethasone significantly reversed TNBS-induced colon reduction (Fig. 2C) and decreased colon weight by $82 \pm 1.0\%$ (Fig. 2D).

SB225002 treatment inhibits neutrophil influx, decreasing colon damage

Colitis has been associated with the influx of neutrophils and eosinophils into the intestinal mucosa [23, 24]. Moreover, CXCR2 is implicated in neutrophil migration [6]. Therefore, we determined whether the diminished severity of TNBS-mediated colitis in the SB225002-treated mice was associated with alterations in the composition of inflammatory cell populations in the intestinal mucosa. Three days following TNBS administration, mucosal neutrophil and eosinophil infiltration was quantified by analysis of colonic MPO and EPO activity, respectively. TNBS-treated mice displayed a marked increase in colonic MPO levels (3.3 ± 0.3 OD/mg tissue) by 22.8-fold when compared with control animals (0.14 ± 0.06 OD/mg tissue; Fig. 3A). Treatment with SB225002 (0.1, 0.3, or 1 mg/kg) significantly reduced TNBS-induced colonic tissue MPO activity by $48.7 \pm 14.0\%$, $82.5 \pm 1.6\%$, or $63.8 \pm 8.0\%$, respectively (Fig. 3A). In addition, EPO activity in the colon of TNBS-treated mice (2.0 ± 0.09 OD/mg tissue) was enhanced by $\sim 30\%$ when compared with control mice (1.5 ± 0.1 OD/mg tissue; Fig. 3B). However, SB225002 treatment had no

effect on EPO activity. In contrast, dexamethasone significantly reduced MPO levels by $93.6 \pm 6.3\%$ compared with the TNBS and suppressed EPO levels under basal levels (Fig. 3, A and B). Finally, mononuclear cells were also analyzed indirectly by NAG activity; nonetheless, 72 h after colitis induction, this parameter was not altered in TNBS-treated mice when compared with control mice (data not shown).

Colons were then processed for histological observation (the representative sections of H&E staining revealed) in the TNBS-treated colon—a dramatic infiltration of PMN into the lamina propria and colonic mucosa corroborating the increased MPO activity described above. TNBS-treated colons also appeared thickened and ulcerated, showing distortion of crypts and loss of goblet cells (Fig. 3, C and D). Histological evaluation of bowel tissue showed a marked reduction in the inflammatory response and mucosal ulcerations in SB225002 as well as in dexamethasone-treated mice (Fig. 3, C and D). The histological damage score of colonic tissues obtained from inflamed mice was 23-fold higher when compared with control mice, whereas treatment with SB225002 or with dexamethasone resulted in score reductions of $89.2 \pm 6.7\%$ and $93.8 \pm 3.0\%$, respectively (Fig. 3E).

SB225002 administration altered the inflammatory profile of cytokines released during colitis

As shown in **Figure 4**, TNBS instillation resulted in a marked increase in IL-1 β , MIP-2, and KC levels by ~ 16.3 -, 2.4-, and 3.7-fold, respectively (Fig. 4, A–C). SB225002 administration

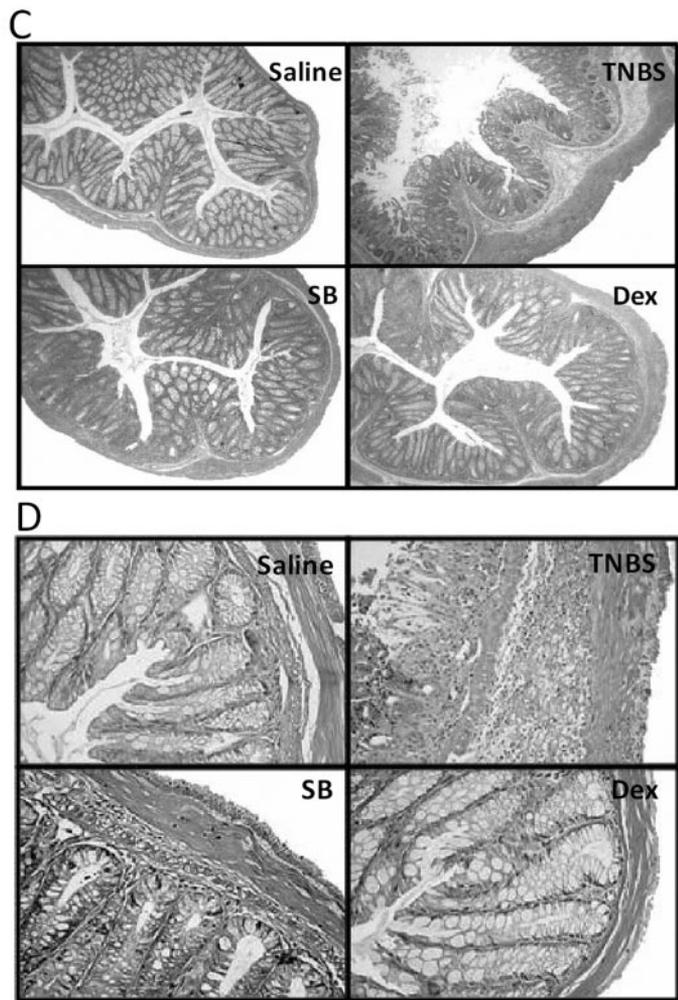
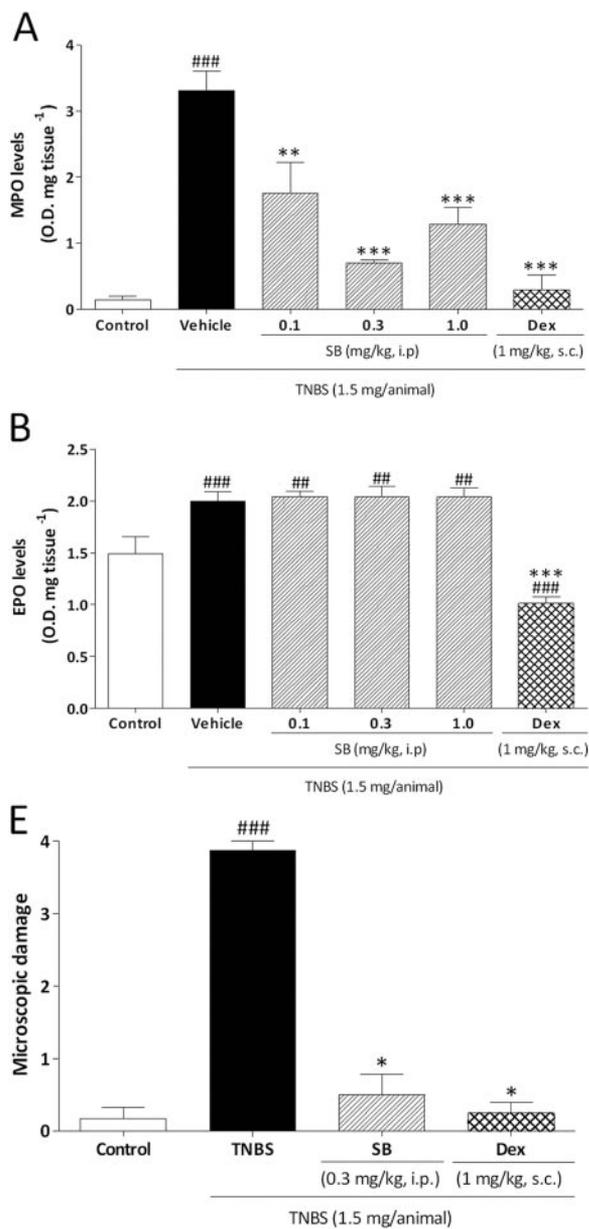


Fig. 3. Pharmacological blockage of CXCR2 inhibits cell influx and colon damage. Seventy-two hours following colitis induction, the histopathological tissue damage, the MPO, and EPO activities were determined. Treatment with SB225002 decreased MPO activity (A), although it did not alter EPO activity (B). Colon sections from control mice, TNBS, SB225002, or dexamethasone-treated mice were stained with H&E (C and D). The images are representative of at least three mice per group. Original magnifications, 50 \times (C) and 200 \times (D). The microscopic damage (E) was scored according to Table 2. Each column

represents the mean \pm SEM of five to seven mice per group. #, $P < 0.05$, ##, $P < 0.01$, and ###, $P < 0.001$, versus TNBS-treated group; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, and ***, $P < 0.001$, versus TNBS-treated group.

resulted in a striking decrease in IL-1 β , MIP-2, and KC levels (80.5 \pm 7.8%, 80.0 \pm 10.0%, and 76.8 \pm 9.0%, respectively; Fig. 4, A–C). Moreover, colons from TNBS-treated mice showed a reduction in the anti-inflammatory cytokines, namely, IL-4 and IL-10 (51.4 \pm 8.9% and 49.9 \pm 5.6%, respectively), when compared with colons from control mice, whereas colons from mice subjected to SB225002 treatment displayed a significant enhancement in these cytokine levels (~2.6- and 2.9-fold, respectively) when compared with colons from TNBS-treated mice (Fig. 4, D and E). Similar results were observed by treatment with dexamethasone (Fig. 4, D and E).

Anti-mouse KC treatment inhibits neutrophil influx and decreases colon damage

Once KC is one of the main CXCR2 ligands that is most expressed 72 h after TNBS-induced colitis and as KC does not

bind mouse CXCR1 with a high affinity [11], we next treat mice with anti-mouse KC to analyze by another strategy the possible involvement of CXCR2 in this model. Mice treated with anti-mouse KC (30 μ g/kg, i.v., twice per day) after colitis establishment had a survival rate of 75% associated with a significant reduction of macroscopic colonic damage (76.3 \pm 6.6%). In addition, colons from mice treated with anti-mouse KC displayed a marked decrease in MPO levels by 75.5 \pm 9.9% when compared with TNBS-treated animals (Fig. 5, A and B).

Mechanisms underlying the colitis improvement caused by SB225002 treatment

Colitis severity has been associated with increased iNOS and COX-2 protein expression in the bowel tissue [25, 26]. Therefore, we assessed whether treatment with SB225002 diminished these protein expressions. TNBS administration induced

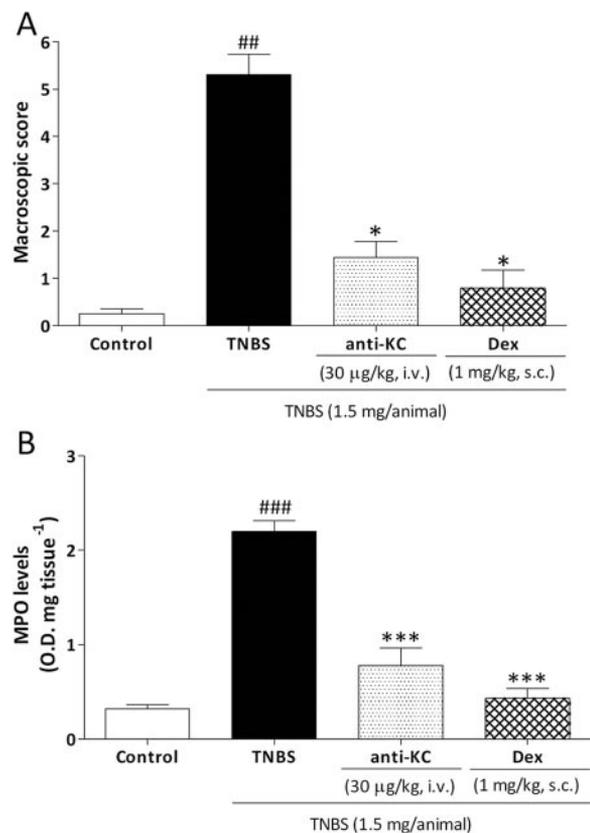
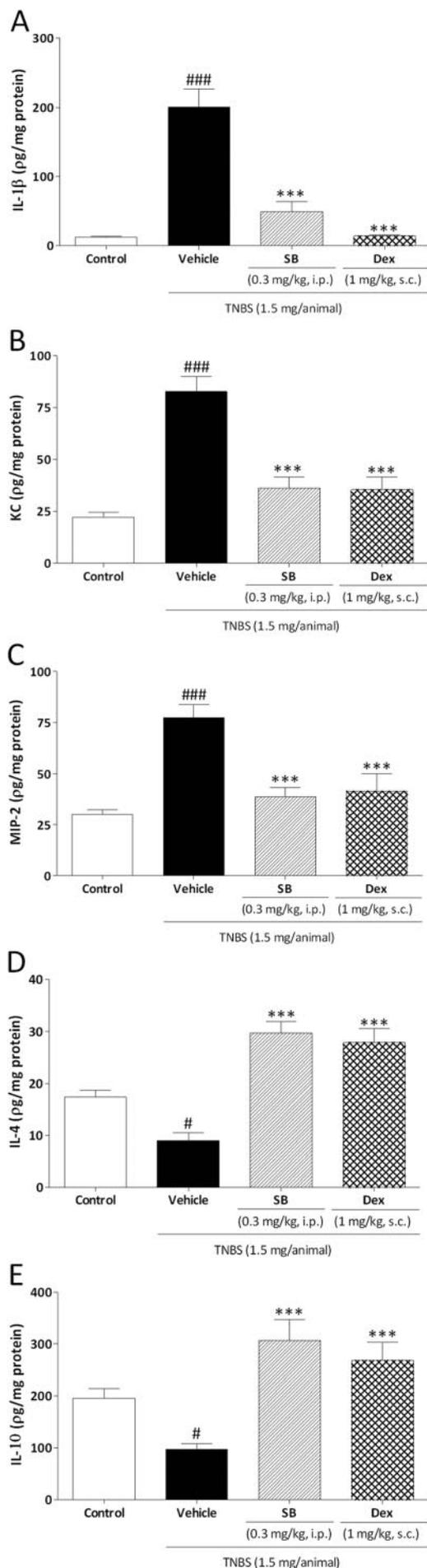


Fig. 5. Anti-mouse KC treatment inhibits neutrophil influx and decreases colon damage. Twenty-four hours following colitis induction, severe mice were treated with anti-KC (30 μ g/kg, i.v.) or dexamethasone (1 mg/kg, s.c.). Treatment with anti-KC or dexamethasone decreased macroscopic damage (A) and MPO activity (B). Each column represents the mean \pm SEM of five to seven mice per group. ##, $P < 0.01$, and ###, $P < 0.001$, versus control group; *, $P < 0.05$, and ***, $P < 0.001$, versus TNBS-treated group.

a prominent expression of iNOS and COX-2 by ~ 1.7 - and 2.3 -fold, respectively (**Fig. 6, A and B**), when compared with basal values. As revealed by densitometry analysis, iNOS and COX-2 expression was decreased by $87.5 \pm 6.1\%$ and $51.1 \pm 2.2\%$ in colons from mice treated with 0.3 mg/kg SB225002 (Fig. 6, A and B). Dexamethasone also significantly reduced iNOS and COX-2 expression by $\sim 90.0 \pm 3.6\%$ and $55.4 \pm 1.8\%$, respectively (Fig. 6, A and B).

It has also been demonstrated that COX-2 and iNOS are implicated in the induction of VEGF [27], a cytokine that has a relevant role in angiogenesis and is increased in patients with IBD [15]. Induction of colitis was associated with a significant increase of VEGF expression (~ 7.5 -fold) when compared with control colons (Fig. 6C), and colons from mice treated with SB225002 or

Fig. 4. CXCR2 inhibition alters cytokine production. Seventy-two hours following colitis induction, the levels of IL-1 β , KC, MIP-2, IL-4, and IL-10 were measured in the colon tissue. Treatment with SB225002 decreased IL-1 β (A), KC (B), and MIP-2 (C) production induced by TNBS, and TNBS decreased IL-4 (D) and IL-10 (E) levels; SB225002 treatment increased the cytokine production over basal levels. Each column represents the mean \pm SEM of five to seven mice per group. #, $P < 0.05$, ##, $P < 0.01$, and ###, $P < 0.001$, versus control group; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, and ***, $P < 0.001$, versus TNBS-treated group.

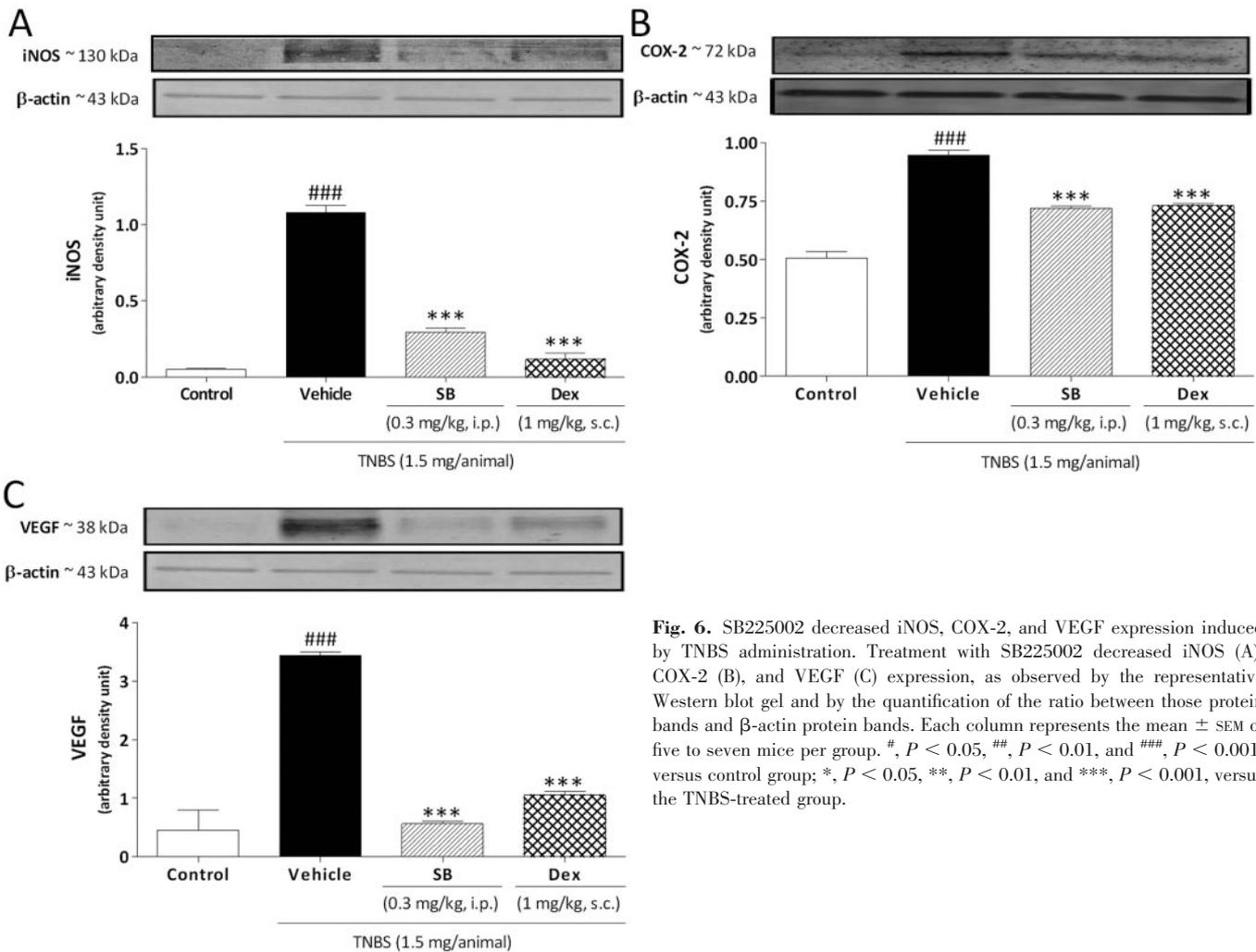


Fig. 6. SB225002 decreased iNOS, COX-2, and VEGF expression induced by TNBS administration. Treatment with SB225002 decreased iNOS (A), COX-2 (B), and VEGF (C) expression, as observed by the representative Western blot gel and by the quantification of the ratio between those protein bands and β-actin protein bands. Each column represents the mean ± SEM of five to seven mice per group. #, $P < 0.05$, ##, $P < 0.01$, and ###, $P < 0.001$, versus control group; *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, and ***, $P < 0.001$, versus the TNBS-treated group.

with dexamethasone had significant reductions in VEGF expression ($96.4 \pm 1.4\%$ and $79.8 \pm 1.9\%$), respectively (Fig. 6C).

DISCUSSION

Recent advances in the understanding of the mechanisms involved in neutrophil migration have indicated an important role exerted by the chemokine receptor CXCR2 [6]. The infiltration of these cells mediates tissue damage and inflammatory signs in experimental colitis [3–5]. In the present study, we show for the first time that SB225002, a potent and selective nonpeptide CXCR2 antagonist, is highly effective in ameliorating TNBS-induced colitis in mice.

In this model, TNBS penetrates into the colon and causes transmural lesions, ulcerations, necrosis, loss of crypt epithelium, thickening of the bowel wall, edema, colon length reduction, and a massive infiltration of PMN cells, characterizing macroscopic and histological damage [28]. Furthermore, diarrhea, rectal prolapse, weight loss, and a high mortality rate are observed [21]. These parameters resemble some features of CD in humans. Our study reports that after colitis establishment, the systemic, curative, therapeutic regimen of SB225002 administration significantly reduced colon edema, attenuated

macroscopic and histological damage, restored colon length, and recovered mouse body weight, greatly reducing mortality. In addition, mice treated with dexamethasone did not recover body weight, unlike those that received the curative treatment with SB225002, suggesting that the CXCR2 antagonist produces less intense side-effects.

It has been shown in different inflammatory models that massive infiltration of PMN cells, characteristic of an inflamed colon [21], is mediated mainly by CXCR2 engagement [3, 6]. In the mouse system, at least four ligands were described for CXCR2, among them KC and MIP-2 [10], which were associated with colitis [29, 30]. Some studies have identified increased levels of CXCR2 ligands, which correlate with MPO activity increments in colon biopsies from patients with IBD [31]. Accordingly, the present results demonstrate a great increase in KC, MIP-2 levels, and MPO activity in colonic tissue. Similar effects allied to enhancement of CXCR2 levels have been reported in rats after TNBS administration [18]. In the present study, we have also demonstrated that a KC increment in colonic tissue was more prominent than MIP-2. Once KC does not bind mouse CXCR1 with a high affinity [11], we next analyzed the involvement of CXCR2 by treating animals with mouse anti-KC and observed that this treatment greatly reduced MPO activity and tissue damage, thus suggesting a

minor role of CXCR1 in this subject. Most important, we have also demonstrated the occurrence of MPO activity reduction and minor cell infiltration in colon tissue from mice treated with the CXCR2 antagonist SB225002. Those results demonstrated that the reduction of CXCR2 ligands and the blockage CXCR2 exert a critical role in neutrophil migration induced by TNBS; however, we cannot totally discard a role exerted by CXCR1 in TNBS-induced colitis.

Although SB225002 administration inhibited MPO activity, it failed to reduce EPO activity, suggesting that eosinophil infiltration was not altered by CXCR2 antagonism. In agreement with this data, it has been shown that CXCR2 is not expressed on the eosinophil surface [32]. The relevance of eosinophils in gut inflammation has been described by several authors [33]. Nevertheless, in the time period analyzed by us in TNBS-induced colitis, neutrophils seem to have had a major involvement in tissue damage, as SB225002 treatment almost highly decreases mucosal injury, without interfering in EPO activity.

Many other studies in different inflammatory conditions have addressed the relevance of neutrophils in tissue damage [34, 35]. It has been demonstrated that inhibition of neutrophil adhesion by anti-integrins (CD11b/CD18) decreases tissue damage in TNBS-induced colitis [36]. Upholding these data, the work of Buanne and collaborators [3], who use CXCR2 knockout mice, and the present results, which applied the CXCR2 antagonist SB2205002, point to a role of neutrophils in tissue damage. In contrast, it has been shown that neutrophil depletion exacerbates TNBS-induced colitis in rats [37]. In fact, other works suggest a dual role of neutrophil in IBD [38].

It has been shown that iNOS, COX-2 inhibition, or IL-1R blockade decreases colitis severity significantly [25, 26, 39]. Furthermore, the existence of a positive correlation among enhancement of KC, MIP-2 levels, and colitis exacerbation has been suggested [30]. Notably, colons from mice treated with SB2205002 show a diminished iNOS and COX-2 protein expression, besides reduction of IL-1 β , MIP-2, and KC levels, suggesting that these decreases constitute one of the mechanisms involved in SB2205002 effectiveness. As there are some reports suggesting that these proteins are directly or indirectly related to cell migration [40, 41], their reduction by SB2205002 treatment could contribute to a lower cell infiltration, inflammation, and consequently, damage to colonic tissue.

Evidence suggests that the influx of inflammatory cells to the colon tissue might also be facilitated by angiogenesis [15]. VEGF is one of the main factors involved in this phenomenon, as it is found to be enhanced significantly in patients with IBD and in experimental models of colitis [15]. Corroborating these findings, the present data demonstrate that VEGF expression is increased markedly in inflamed colons. It has been shown that CXCL8 elicits angiogenic responses in microvascular endothelial cells isolated from human intestine, an effect that is believed to be associated with CXCR2 engagement [7]. Hence, CXCR2 antagonism or decreased levels of KC might diminish the endothelial angiogenic response. Of note, SB225002 markedly decreased KC levels, as well VEGF protein expression. Furthermore, CXCL8 is able to stimulate neutrophil-derived VEGF secretion [42]. Therefore, SB225002 may also reduce VEGF levels by decreasing neutrophil influx.

We next investigated the role exerted by the anti-inflammatory cytokines in the effectiveness of SB225002. It is well documented that IL-4 possesses immunosuppressive and anti-inflammatory properties and that it is reduced in IBD [43], which supports our data. It has also been shown that IL-4 suppresses CXCL8 production by neutrophils [44], and indeed, our results suggest an inverse correlation between the KC and IL-4 levels. Furthermore, IL-4 induces IL-10 production by T cells and macrophages [45]. This cytokine is known to deactivate respiratory burst and to inhibit proinflammatory mediator production, playing a negative modulatory role, with an effect on PMN accumulation and chemokine generation [45]. In addition, neutrophil depletion enhances IL-10 levels [46]. These data substantiate our results, which demonstrated an increased level of IL-4 and IL-10 in colons from mice treated with SB225002.

Finally, the increment in the anti-inflammatory cytokine (IL-4 and IL-10), the decreased levels of IL-1 β , MIP-2, and KC, as well as the reduction of iNOS, VEGF, and COX-2 protein expression were effects of SB225002 treatment that contributed greatly to the reduction of tissue damage, signs of inflammation, and most important, to the great increase in mouse survival in TNBS-induced colitis. Of high interest, SB225002 has a curative property; i.e., it was able to attenuate TNBS-induced colitis after the establishment of inflammation. Our data not only points to the CXCR2 as an interesting and attractive target for the management of IBD, for which current therapies remain inadequate, but strongly suggest that the selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 is a potential candidate for the treatment of IBD.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Apoio aos Grupos de Excelência (PRONEX), and Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC; Brazil). A. F. B. is a postgraduate student in pharmacology and is the recipient of a MSc fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). R. F. C. is a Ph.D. student in pharmacology receiving grants from CNPq. D. F. P. L. and D. B. H. hold postdoctoral fellowships from CNPq. The authors thank Aline Mariana Venâncio and Juliana Gonçalves da Cunha for their excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Strober, W., Fuss, I., Mannon, P. (2007) The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J. Clin. Invest.* **117**, 514–521.
2. Baumgart, D. C., Sandborn, W. J. (2007) Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* **369**, 1641–1657.
3. Buanne, P., Di Carlo, E., Caputi, L., Brandolini, L., Mosca, M., Cattani, F., Pellegrini, L., Biordi, L., Coletti, G., Sorrentino, C., Fedele, G., Colotta, F., Melillo, G., Bertini, R. (2007) Crucial pathophysiological role of CXCR2 in experimental ulcerative colitis in mice. *J. Leukoc. Biol.* **82**, 1239–1246.
4. Wallace, J. L., McKnight, W., Asfaha, S., Liu, D. Y. (1998) Reduction of acute and reactivated colitis in rats by an inhibitor of neutrophil activation. *Am. J. Physiol.* **274**, G802–G808.

5. Peterson, C. G., Sangfelt, P., Wagner, M., Hansson, T., Lettesjo, H., Carlson, M. (2007) Fecal levels of leukocyte markers reflect disease activity in patients with ulcerative colitis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **67**, 810–820.
6. White, J. R., Lee, J. M., Young, P. R., Hertzberg, R. P., Jurewicz, A. J., Chaikin, M. A., Widdowson, K., Foley, J. J., Martin, L. D., Griswold, D. E., Sarau, H. M. (1998) Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *J. Biol. Chem.* **273**, 10095–10098.
7. Heidemann, J., Ogawa, H., Dwinell, M. B., Raffee, P., Maaser, C., Gockel, H. R., Otterson, M. F., Ota, D. M., Lugerling, N., Domschke, W., Binion, D. G. (2003) Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2. *J. Biol. Chem.* **278**, 8508–8515.
8. Hipkin, R. W., Deno, G., Fine, J., Sun, Y., Wilburn, B., Fan, X., Gonsiorek, W., Wiekowski, M. T. (2004) Cloning and pharmacological characterization of CXCR1 and CXCR2 from *Macaca fascicularis*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **310**, 291–300.
9. Wuyts, A., Van Osselaer, N., Haelens, A., Samson, I., Herdewijn, P., Ben-Baruch, A., Oppenheim, J. J., Proost, P., Van Damme, J. (1997) Characterization of synthetic human granulocyte chemotactic protein 2: usage of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 and in vivo inflammatory properties. *Biochemistry* **36**, 2716–2723.
10. Lin, M., Carlson, E., Diaconu, E., Pearlman, E. (2007) CXCL1/KC and CXCL5/LIX are selectively produced by corneal fibroblasts and mediate neutrophil infiltration to the corneal stroma in LPS keratitis. *J. Leukoc. Biol.* **81**, 786–792.
11. Fan, X., Patera, A. C., Pong-Kennedy, A., Deno, G., Gonsiorek, W., Manfra, D. J., Vassileva, G., Zeng, M., Jackson, C., Sullivan, L., Sharif-Rodríguez, W., Opendakker, G., Van Damme, J., Hedrick, J. A., Lundell, D., Lira, S. A., Hipkin, R. W. (2007) Murine CXCR1 is a functional receptor for GCP-2/CXCL6 and interleukin-8/CXCL8. *J. Biol. Chem.* **282**, 11658–11666.
12. Lee, J., Cacalano, G., Camerato, T., Toy, K., Moore, M. W., Wood, W. I. (1995) Chemokine binding and activities mediated by the mouse IL-8 receptor. *J. Immunol.* **155**, 2158–2164.
13. Chandrasekar, B., Melby, P. C., Sarau, H. M., Raveendran, M., Perla, R. P., Marelli-Berg, F. M., Dulin, N. O., Singh, I. S. (2003) Chemokine-cytokine cross-talk. The ELR+ CXC chemokine LIX (CXCL5) amplifies a proinflammatory cytokine response via a phosphatidylinositol 3-kinase-NF- κ B pathway. *J. Biol. Chem.* **278**, 4675–4686.
14. Jones, S. A., Dewald, B., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M. (1997) Chemokine antagonists that discriminate between interleukin-8 receptors. Selective blockers of CXCR2. *J. Biol. Chem.* **272**, 16166–16169.
15. Danese, S., Sans, M., de la Motte, C., Graziani, C., West, G., Phillips, M. H., Pola, R., Rutella, S., Willis, J., Gasbarrini, A., Fiocchi, C. (2006) Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology* **130**, 2060–2073.
16. Romagnani, P., Lasagni, L., Annunziato, F., Serio, M., Romagnani, S. (2004) CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol.* **25**, 201–209.
17. Auten, R. L., Richardson, R. M., White, J. R., Mason, S. N., Vozzelli, M. A., Whorton, M. H. (2001) Nonpeptide CXCR2 antagonist prevents neutrophil accumulation in hyperoxia-exposed newborn rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 90–95.
18. Ajuebor, M. N., Zagorski, J., Kunkel, S. L., Strieter, R. M., Hogaboam, C. M. (2004) Contrasting roles for CXCR2 during experimental colitis. *Exp. Mol. Pathol.* **76**, 1–8.
19. Hara, D. B., Fernandes, E. S., Campos, M. M., Calixto, J. B. (2007) Pharmacological and biochemical characterization of bradykinin B2 receptors in the mouse colon: influence of the TNBS-induced colitis. *Regul. Pept.* **141**, 25–34.
20. Wallace, J. L., MacNaughton, W. K., Morris, G. P., Beck, P. L. (1989) Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **96**, 29–36.
21. Neurath, M. F., Fuss, I., Kelsall, B. L., Stuber, E., Strober, W. (1995) Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J. Exp. Med.* **182**, 1281–1290.
22. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
23. Daig, R., Andus, T., Aschenbrenner, E., Falk, W., Scholmerich, J., Gross, V. (1996) Increased interleukin 8 expression in the colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **38**, 216–222.
24. Anezaki, K., Asakura, H., Honma, T., Ishizuka, K., Funakoshi, K., Tsukada, Y., Narisawa, R. (1998) Correlations between interleukin-8, and myeloperoxidase or luminol-dependent chemiluminescence in inflamed mucosa of ulcerative colitis. *Intern. Med.* **37**, 253–258.
25. Kankuri, E., Vaali, K., Knowles, R. G., Lahde, M., Korpela, R., Vapaatalo, H., Moilanen, E. (2001) Suppression of acute experimental colitis by a highly selective inducible nitric-oxide synthase inhibitor, N-[3-(amino-methyl)benzyl]acetamidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **298**, 1128–1132.
26. Martin, A. R., Villegas, I., La Casa, C., Alarcon de la Lastra, C. (2003) The cyclo-oxygenase-2 inhibitor, rofecoxib, attenuates mucosal damage due to colitis induced by trinitrobenzene sulphonic acid in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **481**, 281–291.
27. Wang, X., Klein, R. D. (2007) Prostaglandin E2 induces vascular endothelial growth factor secretion in prostate cancer cells through EP2 receptor-mediated cAMP pathway. *Mol. Carcinog.* **46**, 912–923.
28. Ukil, A., Maity, S., Das, P. K. (2006) Protection from experimental colitis by theaflavin-3,3'-digallate correlates with inhibition of IKK and NF- κ B activation. *Br. J. Pharmacol.* **149**, 121–131.
29. Siegmund, B., Lehr, H. A., Fantuzzi, G. (2002) Leptin: a pivotal mediator of intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology* **122**, 2011–2025.
30. Berndt, B. E., Zhang, M., Chen, G. H., Huffnagle, G. B., Kao, J. Y. (2007) The role of dendritic cells in the development of acute dextran sulfate sodium colitis. *J. Immunol.* **179**, 6255–6262.
31. Mahida, Y. R., Ceska, M., Effenberger, F., Kurlak, L., Lindley, I., Hawkey, C. J. (1992) Enhanced synthesis of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in active ulcerative colitis. *Clin. Sci. (Lond.)* **82**, 273–275.
32. Petering, H., Gotze, O., Kimmig, D., Smolarski, R., Kapp, A., Elsner, J. (1999) The biologic role of interleukin-8: functional analysis and expression of CXCR1 and CXCR2 on human eosinophils. *Blood* **93**, 694–702.
33. Forbes, E., Murase, T., Yang, M., Matthaei, K. I., Lee, J. J., Lee, N. A., Foster, P. S., Hogan, S. P. (2004) Immunopathogenesis of experimental ulcerative colitis is mediated by eosinophil peroxidase. *J. Immunol.* **172**, 5664–5675.
34. Barsante, M. M., Cunha, T. M., Allegretti, M., Cattani, F., Policani, F., Bizzarri, C., Tafuri, W. L., Poole, S., Cunha, F. Q., Bertini, R., Teixeira, M. M. (2007) Blockade of the chemokine receptor CXCR2 ameliorates adjuvant-induced arthritis in rats. *Br. J. Pharmacol.* **153**, 992–1002.
35. Bhatia, M., Hegde, A. (2007) Treatment with antileukinate, a CXCR2 chemokine receptor antagonist, protects mice against acute pancreatitis and associated lung injury. *Regul. Pept.* **138**, 40–48.
36. Palmen, M. J., Dijkstra, C. D., van der Ende, M. B., Pena, A. S., van Rees, E. P. (1995) Anti-CD11b/CD18 antibodies reduce inflammation in acute colitis in rats. *Clin. Exp. Immunol.* **101**, 351–356.
37. Kuhl, A. A., Kakirman, H., Janotta, M., Dreher, S., Cremer, P., Pawlowski, N. N., Loddenkemper, C., Heimesaat, M. M., Grollich, K., Zeitz, M., Farkas, S., Hoffmann, J. C. (2007) Aggravation of different types of experimental colitis by depletion or adhesion blockade of neutrophils. *Gastroenterology* **133**, 1882–1892.
38. Williams, I. R., Parkos, C. A. (2007) Colonic neutrophils in inflammatory bowel disease: double-edged swords of the innate immune system with protective and destructive capacity. *Gastroenterology* **133**, 2049–2052.
39. Bachmann, M. F., Kopf, M., Marsland, B. J. (2006) Chemokines: more than just road signs. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 159–164.
40. Lin, T. J., Garduno, R., Boudreau, R. T., Issekutz, A. C. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* activates human mast cells to induce neutrophil trans-endothelial migration via mast cell-derived IL-1 α and β . *J. Immunol.* **169**, 4522–4530.
41. Eijkelkamp, N., Heijnen, C. J., Lucas, A., Premont, R. T., Elsenbruch, S., Schedlowski, M., Kavelaars, A. (2007) G protein-coupled receptor kinase 6 controls chronicity and severity of dextran sodium sulphate-induced colitis in mice. *Gut* **56**, 847–854.
42. Cullen, V. C., Mackarel, A. J., Hislip, S. J., O'Connor, C. M., Keenan, A. K. (2000) Investigation of vascular endothelial growth factor effects on pulmonary endothelial monolayer permeability and neutrophil transmigration. *Gen. Pharmacol.* **35**, 149–157.
43. Ukil, A., Maity, S., Karmakar, S., Datta, N., Vedasiromoni, J. R., Das, P. K. (2003) Curcumin, the major component of food flavor turmeric, reduces mucosal injury in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. *Br. J. Pharmacol.* **139**, 209–218.
44. Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, M. Y., Sarawar, S. R., Carson, R. T., Tripp, R. A., Chu, C., Quelle, F. W., Nosaka, T., Vignali, D. A., Doherty, P. C., Grosveld, G., Paul, W. E., Ihle, J. N. (1996) Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* **380**, 630–633.
45. Saleem, S., Dai, Z., Coelho, S. N., Konieczny, B. T., Assmann, K. J., Baddoura, F. K., Lakkis, F. G. (1998) IL-4 is an endogenous inhibitor of neutrophil influx and subsequent pathology in acute antibody-mediated inflammation. *J. Immunol.* **160**, 979–984.
46. Lomas-Neira, J. L., Chung, C. S., Grutkoski, P. S., Miller, E. J., Ayala, A. (2004) CXCR2 inhibition suppresses hemorrhage-induced priming for acute lung injury in mice. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 58–64.