



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, ALIMENTOS E NUTRIÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**



**JOSYELEN LOUSADA FELIPE**

**INIBIÇÃO DOS EFEITOS HIPERALGÉSICOS E INFLAMATÓRIOS  
POR ANÁLOGOS HÍBRIDOS TRIAZÓLICOS DE 1,4-DIARIL-1,2,3-  
TRIAZOL NEOLIGNANA-CELECOXIBE EM ARTRITE  
EXPERIMENTAL**

---

**CAMPO GRANDE  
DEZEMBRO/2023**

**JOSYELEN LOUSADA FELIPE**

**INIBIÇÃO DOS EFEITOS HIPERALGÉSICOS E INFLAMATÓRIOS  
POR ANÁLOGOS HÍBRIDOS TRIAZÓLICOS DE 1,4-DIARIL-1,2,3-  
TRIAZOL NEOLIGNANA-CELECOXIBE EM ARTRITE  
EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mônica Cristina Toffoli Kadri

**CAMPO GRANDE  
DEZEMBRO/2023**

**DEDICATÓRIA**

---

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais José Carlos Felipe e Elizabet Felipe, por sempre acreditarem em mim e sonharem meus sonhos. Meu marido, Guilherme Scapulatempo, meu suporte, meu amparo, força nos dias difíceis e amor em todos os dias. Minhas irmãs Ananda e Gracyelen, que sempre estão ao meu lado, me apoiando, me auxiliando e compartilhando cada momento da vida. Minha filha Ana Clara, que veio para trazer mais vida para minha vida e foi minha motivação diária para a conclusão deste trabalho.

A toda a minha família, sobrinhas, cunhados, tios e tias, minhas avós, meus sogros e cunhada, e a todos que sempre tiveram ao meu lado, que cuidaram da Ana Clara pra eu poder estudar, escrever e não mediram esforços para essa caminhada valer a pena.

Aos meus amigos, minha gratidão pela presença e pela compreensão de tantas ausências. Obrigada por chorarem meu choro e hoje poderem sorrir comigo.

A todos os professores, por terem lapidado e me ensinado a andar por caminhos até então desconhecidos, em especial a minha orientadora Mônica Kadri, por quem eu tenho profunda admiração e gratidão.

## **AGRADECIMENTOS**

---

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre me sustentou, me deu saúde e guiou meu caminho para eu encontrar tantas oportunidades e pessoas especiais nessa trajetória... essa vitória é fruto do meu trabalho e da minha fé... a ele, toda honra e toda glória...E a Nossa Senhora, minha mãezinha do Céu que intercedeu por mim e cuidou de mim em todos os momentos.

A minha família, que tem uma importância insubstituível na minha vida. Meus pais que hoje e sempre dedicaram todo amor que puderam a nós, suas filhas e sempre foram meus exemplos de persistência, dedicação, além de toda a dedicação e educação que me proporcionaram. Abriram mão muitas vezes de momentos de vocês, para estarem aqui comigo, me apoiando, me incentivando e não me deixando desistir. Vocês são a razão da minha vida e meu alicerce de sustentação.

Ao meu marido Guilherme, que eu escolhi para partilhar a vida comigo e sempre me dá forças para seguir em frente e não desistir. Agradeço pelo seu amor, paciência e dedicação. Obrigada pelo seu cuidado com nossa filha, e pela parceria constante, me incentivando a buscar meus sonhos e a lutar pelo meu futuro profissional. Agradeço à Deus, pela nossa família e por ter colocado em minha vida uma pessoa incrível como você. Nós somos um time e essa vitória é nossa. Amo você.

A minhas irmãs Ananda e Gracyelen, muito obrigada! Nosso amor é o elo que nos uni sempre. Obrigada por todo apoio, por toda conversa, por aguentarem meus choros, por todo tempo que se dispuseram pra me ajudar e por sempre estarem ao meu lado, independentemente de qualquer situação, tempo e circunstância... Amo vocês!

A todos meus familiares, meus tios, tias, primos e primas, minhas avós, meus cunhados, meus sogros, minha cunhada e, todos que sempre estão comigo e que de maneira direta ou indireta muito contribuíram para o sucesso desse trabalho. Minha família é minha vida.

À minha orientadora, professora Mônica Kadri, que é um exemplo de competência profissional, mas principalmente é um exemplo de ser humano. Eu tenho tanto a agradecer pelos 15 anos de aprendizado no LABFAR. Obrigada por sempre ter acreditado em mim, sempre ter segurado a minha mão, obrigada pelo carinho, amizade, paciência e respeito. Você é minha

inspiração e meu exemplo, se hoje eu sou professora, com certeza eu aprendi esse amor pela docência com você. Vou levar seus ensinamentos e a sua amizade comigo para sempre. Muito Obrigada!

As minhas amigas do LABFAR, Iluska, Joyce e Paloma sem vocês esse trabalho não seria concluído. Agradeço pela amizade, pela parceria, pela disponibilidade de me auxiliarem com experimentos, pela constante troca de ensinamentos e pela diferença que fazem na minha vida. Obrigada pelo apoio, por compartilharem comigo todos os desafios desse período e agora podermos comemorar essa vitória juntas. Vocês estarão sempre em meu coração.

A todos os meus amigos, que entenderam muitas vezes a minha ausência, que foram ao laboratório comigo em horários mais diversos, nem que seja para apoio moral, por todos que me apoiaram, rezaram por mim e comigo, amigos esses que são a família que eu escolhi e que tornam a minha vida e a minha caminhada mais leve. Vocês são essenciais, obrigada. Amo vocês.

Agradeço a minha filha Ana Clara, que nasceu em meio a essa fase da minha vida e mesmo tão pequena me ensinou tanto. Ficou longe várias vezes da mamãe, mas foi minha motivação e alegria diária, é o meu amor incondicional, e foi ela quem me deu forças pra concluir mais essa etapa da minha vida profissional. A mamãe te ama muito.

A toda equipe do Laboratório de Farmacologia da UFMS pelo apoio, amizade e carinho.

Ao professor Adriano Baroni e toda equipe do laboratório de Química Farmacêutica da UFMS pela síntese das substâncias testadas e por me ajudarem com a parte química deste trabalho.

Ao professor Saulo Euclides Silva Filho, por me ensinar a técnica do modelo de artrite experimental realizada neste trabalho.

A todos os professores e técnicos, a todos os colaboradores desse trabalho e a todos que não citei, mas que contribuíram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho, meu muito obrigada!

## **APRESENTAÇÃO**

---



## **APRESENTAÇÃO**

Conforme o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Artigo 33, 2º parágrafo, esta tese é composta por uma introdução com ampla revisão de literatura sobre o tema abordado, objetivos da pesquisa e um artigo científico publicado no periódico *Inflammopharmacology* (Fator de impacto JCR 5,8 - Qualis/CAPES A2).

**RESUMO**

---

FELIPE, Josyelen Lousada. Inibição dos Efeitos Hiperalgésicos e Inflamatórios por Análogos Híbridos Triazólicos de 1,4-Diaril-1,2,3-Triazol Neolignana-Celecoxibe em Artrite Experimental. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

## RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune crônica, simétrica e progressiva que causa danos à cartilagem. Os anti-inflamatórios estão entre os medicamentos mais utilizados para o manejo da AR porém, podem apresentar efeitos colaterais importantes como toxicidade renal e hepática, distúrbios gastrointestinais e cardiovasculares. Na busca de protótipos de fármacos mais seguros, análogos triazólicos derivados das lignanas Grandisina e Veraguensina hibridizados com o celecoxibe, denominados Lasquim (L), foram sintetizados e associados à sulfonamida (L15) ou ácido carboxílico (L18). Estudo publicado pelo nosso grupo mostrou que os análogos (L15) e (L18) exibiram atividade anti-inflamatória em um modelo agudo de inflamação, inibiram a expressão da P-selectina relacionada à ativação plaquetária e não induziram úlcera gástrica, minimizando os efeitos deletérios relacionados aos anti-inflamatórios disponíveis no mercado. Em continuação, o presente estudo avaliou os efeitos anti-inflamatórios desses análogos em um modelo experimental de inflamação crônica, por meio da avaliação da hiperalgesia mecânica, do edema articular, do recrutamento de leucócitos para a articulação e avaliação histológica da cápsula articular. Ainda, avaliou o efeito dos análogos sobre as funções celulares dos macrófagos, por meio da avaliação da citotoxicidade, da liberação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e a produção de óxido nítrico (NO). O espriamento dos macrófagos e a fagocitose dessas células também foram avaliados. Resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M., ANOVA, Bonferroni ( $p < 0,05$ ). Para os experimentos *in vivo* foram utilizados camundongos Swiss, machos, 25 a 30 g, distribuídos nos grupos salina (sham), água, L15 e L18 (1, 3 e 10 mg/Kg) e celecoxibe (10 mg/Kg). Sessenta minutos após o pré-tratamento (v.o.), a articulação do joelho dos camundongos recebeu injeção intra-articular (i.a.) de zymosam (200  $\mu$ g/10 $\mu$ L NaCl 0,9%). O pré-tratamento com L15 e L18 reduziram a hiperalgesia mecânica, o edema articular e o influxo de leucócitos na cavidade articular após diferentes períodos do estímulo. Na análise histológica das articulações de animais tratados com L15 e L18, estes reduziram danos a cápsula articular e não houve a formação de *pannus* reumatoide. Os efeitos observados não foram dose-dependente e, L15 e L18 foram tão eficazes quanto o celecoxibe nos ensaios realizados. Além disso, nos ensaios *in vitro* L15 e L18 não foram citotóxicos, reduziram o espriamento de macrófagos e a produção de NO e  $H_2O_2$  e, o L15 diminuiu a fagocitose. Concluiu-se que os análogos L15 e L18 reduziram os parâmetros inflamatórios da artrite experimental, reduziram o dano à cartilagem e cápsula articular. Ainda, os análogos demonstraram *in vitro* redução das funções de macrófagos, células relevantes em processos inflamatórios crônicos. Portanto, L15 e L18 podem ser considerados protótipos terapêuticos promissores para o tratamento de doenças inflamatórias, como a artrite reumatoide.

Palavras-chave: Inibidores seletivos COX-2; Inflamação crônica; Macrófagos; *In vitro*

**ABSTRACT**

---

FELIPE, Josyelen Lousada. Inhibition of Hyperalgesic and Inflammatory Effects by Triazole Hybrid Analogs of 1,4-Diaryl-1,2,3-Triazole Neolignan-Celecoxib in Experimental Arthritis. Thesis (Doctorate in Pharmaceutical Sciences). Federal University of Mato Grosso do Sul.

### ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, symmetric, and progressive autoimmune disease that causes damage to cartilage. Anti-inflammatories are among the most used medications for the management of RA, however, they can have important side effects such as renal and hepatic toxicity, and gastrointestinal and cardiovascular disorders. In the search for safer drug prototypes, triazole analogs derived from the lignans Grandisin and Veraguensin hybridized with celecoxib, called Lasquim (L), were synthesized and associated with sulfonamide (L15) or carboxylic acid (L18). A study published by our group showed that the analogs (L15) and (L18) exhibited anti-inflammatory activity in an acute model of inflammation, inhibited the expression of P-selectin related to platelet activation, and did not induce gastric ulcers, minimizing the related deleterious effects to anti-inflammatories available on the market. In continuation, the present study evaluated the anti-inflammatory effects of these analogs in an experimental model of chronic inflammation, through the evaluation of mechanical hyperalgesia, joint edema, recruitment of leukocytes to the joint, and histological evaluation of the joint capsule. Furthermore, the effect of analogs on the cellular functions of macrophages was evaluated, through the evaluation of cytotoxicity, the release of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), and the production of nitric oxide (NO). Macrophage spreading and phagocytosis of these cells were also evaluated. Results were expressed as mean  $\pm$  S.E.M., ANOVA, Bonferroni ( $p < 0.05$ ). For *in vivo* experiments, male Swiss mice weighing 25 to 30 g were used, distributed in the saline (sham), water, L15, and L18 (1, 3, and 10 mg/Kg) and celecoxib (10 mg/Kg) groups. Sixty minutes after pretreatment (v.o.), the mice's knee joint received an intra-articular (i.a.) injection of zymosam (200  $\mu$ g/10 $\mu$ L 0.9% NaCl). Pretreatment with L15 and L18 reduced mechanical hyperalgesia, joint edema, and the influx of leukocytes into the joint cavity after different periods of stimulation. In the histological analysis of the joints of animals treated with L15 and L18, they reduced damage to the joint capsule and there was no formation of rheumatoid pannus. The effects observed were not dose-dependent and L15 and L18 were as effective as celecoxib in the trials carried out. Additionally, *in vitro* tests, L15 and L18 were not cytotoxic, reduced the macrophage spreading and production of NO and  $H_2O_2$  and, L15 decreased phagocytosis. It was concluded that the L15 and L18 analogs reduced the inflammatory parameters of experimental arthritis, and reduced damage to cartilage and joint capsule. Moreover, the analogs demonstrated *in vitro* reduction of the functions of macrophages, relevant cells in chronic inflammatory processes. Therefore, L15 and L18 can be considered promising therapeutic prototypes for the treatment of inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis.

Keywords: Selective COX-2 inhibitors; Chronic inflammation; Macrophages; *In vitro*

## **LISTA DE FIGURAS**

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Esquema representativo da patogênese da Artrite Reumatoide.....	29
<b>Figura 2</b> - Imagem comparativa entre uma articulação saudável e articulação com AR.....	30
<b>Figura 3</b> - Esquema representativo de uma articulação saudável (A) e de uma articulação com <i>pannus</i> reumatoide na AR (B) .....	32
<b>Figura 4</b> - Eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória .....	35
<b>Figura 5</b> - Projeto de novos híbridos derivados de neolignanas-celecoxibe (L15 e L18) .....	48

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1</b> - Descrição Das Categorias Dos Medicamento - Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Artrite Reumatoide e da Artrite Idiopática Juvenil (2021) .....	44
---	----

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

---



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AAPC</b>	Anticorpos Anti-Proteínas Citrulinadas
<b>AINE</b>	Anti-inflamatório Não-Esteroidal
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>AR</b>	Artrite Reumatoide
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>DAMPs</b>	Padrões Moleculares Associados a Danos
<b>DMARDs</b>	Medicamentos Antirreumáticos Modificadores Da Doença
<b>ERO</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>ERN</b>	Espécies Reativas de Nitrogênio
<b>GRA</b>	Grandisina
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Oxigênio
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina-1 $\beta$
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IL-10</b>	Interleucina-10
<b>L</b>	Lasquim
<b>L15</b>	Lasquim 15
<b>L18</b>	Lasquim 18
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo Bacteriano
<b>LOX</b>	Lipoxigenase
<b>LTB<sub>4</sub></b>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
<b>MN</b>	Monócitos
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator Nuclear Kappa B
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>NOS</b>	Óxido Nítrico Sintase
<b>PG</b>	Prostaglandinas
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PGL<sub>2</sub></b>	Prostaglandina I <sub>2</sub>
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral

<b>TLR</b>	Receptores Toll-like
<b>TLR-1</b>	Receptores Toll- like 1
<b>TLR-2</b>	Receptores Toll-like 2
<b>TLR-6</b>	Receptores Toll-like 6
<b>VER</b>	Veraguensina

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	24
2 CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1 Artrite Reumatoide.....	28
2.1.1 Conceito e Prevalência.....	28
2.1.2 Fisiopatogenia da Artrite.....	29
2.1.3 Artrite e Inflamação.....	30
2.1.4 Agudização da Resposta Inflamatória na Artrite.....	32
2.1.5 Mediadores Lipídicos envolvidos na Inflamação e Artrite.....	37
2.1.6 Artrite e Dor.....	39
2.1.7 Artrite e Ativação Celular.....	40
2.2 Modelos Experimentais de Artrite.....	42
2.3 Fármacos Utilizados no Tratamento de Artrite.....	44
2.4 Protótipos de Novos Fármacos Seletivos COX-2.....	47
3 Objetivos.....	50
3.1 Objetivo geral.....	51
3.2 Objetivos específicos.....	51
4 REFERÊNCIAS .....	52
5 CAPÍTULO II - Artigo científico publicado no periódico Inflammopharmacology (Fator de impacto JCR 2023 5,8): 1,4-Diaryl-1,2,3-triazole neolignan–celecoxib hybrids inhibit experimental arthritis induced by zymosan .....	65
6 ANEXOS.....	81
6.1 Aprovação do protocolo experimental pela CEUA/UFMS.....	81

## **INTRODUÇÃO**

---

## Introdução

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica, autoimune, caracterizada por edema e dor articular, deformidade articular progressiva, destruição da membrana sinovial e remodelação das articulações (PRASAD et al., 2023). É uma das doenças de maior relevância clínica, caracterizada por sinovite simétrica que afeta uma ou mais articulações, preferencialmente dos pés e das mãos e, está associada à infiltração de leucócitos na cavidade articular (ZHANG et al., 2019, 2023). Ademais, leva à destruição progressiva da cartilagem e do osso pela membrana sinovial hiperplásica invasiva, sinal clássico da AR, conhecido por *pannus* reumatoide, que aumenta o risco de incapacidade articular (TANG et al., 2022).

A inflamação crônica que ocorre em doenças como AR ocorre por lesão tecidual persistente decorrente da não resolução do quadro inflamatório agudo e sem restauração da homeostase (BUCKLEY; GILROY; SERHAN, 2014). Desenvolve-se por um período de semanas ou meses e é caracterizada pela infiltração tecidual de células mononucleares (RADU; BUNGAU, 2021), como macrófagos, promovendo destruição, substituição de tecido danificado por tecido conjuntivo e angiogênese (DING et al., 2023).

A prevalência mundial de AR é de 0,5% a 1%, sendo uma doença que afeta principalmente as mulheres (DUDICS et al., 2018). Pacientes com AR têm expectativa de vida reduzida, devido à morbidade e complicações decorrentes da doença, que pode atingir também sistemas extra articulares causando comprometimento pulmonar e neurológico, doenças renais, hepáticas e cardiovasculares (SENA et al., 2021).

O tratamento para controlar os sintomas e a evolução da AR depende do uso de classes de medicamentos como: corticosteroides, anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), imunossupressores e medicamentos antirreumáticos modificadores da doença (DMARDs). Dentre esses, os AINEs amplamente comercializados em todo o mundo, são eficazes no tratamento da inflamação e dor decorrente da AR (WONG et al., 2019), por inibirem a enzima ciclooxigenase (COX). Essa enzima é classificada em COX-1, uma enzima constitutiva, responsável pela manutenção da função renal, proteção da mucosa gástrica e regulação da agregação de plaquetas, e COX-2 enzima expressa em processos inflamatórios e em pacientes com riscos de doenças cardiovasculares.

Os AINE seletivos COX-2 são utilizados para o tratamento de artrite, porém podem desencadear alterações cardiovasculares em indivíduos suscetíveis, aumentando o risco de eventos tromboembólicos, tornando-os fármacos não tão seguros para todos os pacientes. Tais observações

impulsionaram pesquisas por novos agentes terapêuticos com eficácia anti-inflamatória, porém com menores efeitos deletérios gástricos e cardiovasculares.

Neste contexto, o Laboratório de Química Farmacêutica da UFMS sintetizou análogos híbridos de neolignana-celecoxibe, denominados Lasquim (L), na tentativa de obtenção de agentes anti-inflamatórios mais eficazes e com menos reações adversas.

Em 2022, Felipe et al. mostraram que os análogos triazólicos híbridos de neolignana-celecoxibe, entre eles L15 e L18, apresentaram atividade anti-inflamatória em modelo agudo de inflamação, inibiram a expressão da glicoproteína (P-selectina) relacionada a ativação plaquetária e foram considerados não ulcerogênicos.

Em continuação a esse estudo, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito dos análogos L15 e L18 na inflamação crônica, utilizando de um modelo de artrite experimental, bem como avaliar as funções de uma das primeiras células envolvidas nesse processo, os macrófagos, em busca de um protótipo de medicamento seguro com propriedades anti-inflamatórias e menores efeitos colaterais para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas como a AR.

## **REVISÃO DE LITERATURA**

---

## **2 CAPÍTULO I - Revisão de Literatura**

### **2.1 Artrite Reumatoide**

#### **2.1.1 Conceito e prevalência**

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica de caráter autoimune que afeta uma ou mais articulações e, leva a destruição progressiva de cartilagem e osso pela membrana sinovial hiperplásica invasiva, aumentando o risco de incapacidade e mortalidade entre os pacientes acometidos (TANG et al., 2022).

As taxas de prevalência da AR é de 0,5-1% e as mulheres são de três a quatro vezes mais acometidas que os homens (DUDICS et al., 2018). Há um aumento da mortalidade dos pacientes com AR comparado à população geral, devido a doença atingir sistemas extra articulares causando amiloidose, vasculite reumatoide, comprometimento pulmonar e neurológico, doenças renais, hepáticas e cardiovasculares (RADU; BUNGAU, 2021).

A AR gera um impacto socioeconômico relevante, pois a progressão da doença interfere nas atividades cotidianas dos pacientes, causando um impacto negativo na qualidade de vida e custos individuais ao sistema de saúde (SENA et al., 2021). Costa et al. (2014) mostraram que, no Brasil, entre 2003 e 2006, o Sistema Único de Saúde (SUS) dispendeu em torno de R\$75.000.000,00 com a entrega de medicamentos para pacientes acometidos de AR, sem considerar os gastos associados aos serviços hospitalares e profissionais de saúde.

Valores ainda mais elevados foram observados entre os itens de maior gasto em 2016, pelo SUS, em medicamentos adquiridos por meio de ações judiciais utilizados principalmente no tratamento da AR como adalimumabe (R\$ 621,9 milhões); etanercepte (R\$ 322 milhões); e infliximabe (R\$ 298,5 milhões) e um hemoderivado (fator VIII – R\$ 471,5 milhões) (SOUZA et al., 2018).

Louzada-Junior et al. (2007) mostraram que, em um grupo de 1.381 pacientes com AR, um terço dos mesmos exerciam suas atividades profissionais. Ainda, Corbacho e Dapuetto (2010) observaram que esses pacientes deixam de trabalhar 20 anos antes da média da população, o que torna a doença um importante problema de saúde pública.

Apesar da etiologia da AR não estar totalmente esclarecida, sabe-se que fatores como predisposição genética, alterações imunológicas e ambientais (KARLSON et al., 2013) como exposição à poeira, solventes orgânicos, fertilizantes (OLSSON, 2004; HOOVESTOL; MIKULS, 2011), tabagismo, etilismo e obesidade (ANDRADE; DIAS, 2019) estão envolvidos em seu início e progressão.

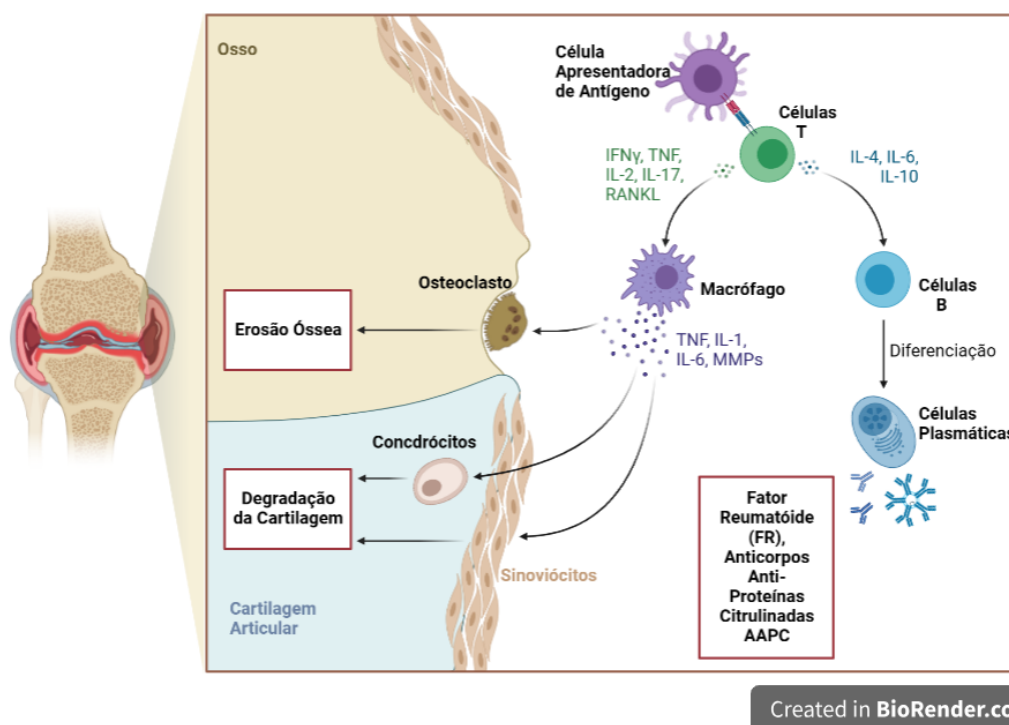
A partir disso, poderá ocorrer a instalação de um processo inflamatório crônico, que desencadeará as lesões características da AR, como destruição das cartilagens e espessamento das



membranas sinoviais, com sintomas clínicos como sinovite simétrica progressiva, aumento a sensibilidade à dor nas articulações e destruição óssea (PETRELLI et al., 2022).

O quadro inflamatório presente é fundamental para o surgimento da sensibilidade à dor local, caracterizada como monoartrite (RADU; BUNGAU, 2021), com deformidades nas articulações periféricas, destruição do tecido sinovial e remodelação (SMOLEN et al., 2018). Porém, também pode manifestar-se de forma extra articular com fadiga dor, anorexia, astenia e inchaço (CHEN et al., 2019), quadro conhecido como poliartrite.

A poliartrite crônica observada ocorre devido a sinovite mediada por respostas imunológicas celular e humoral, que desencadeiam o recrutamento e ativação de linfócitos T e linfócitos B (VENKATESHA et al., 2011), macrófagos, fibroblastos, além da produção de citocinas pró-inflamatórias e de espécies reativas de oxigênio, que atuam como mediadores da lesão tecidual (DUDICS et al., 2018) (**Figura 1**).



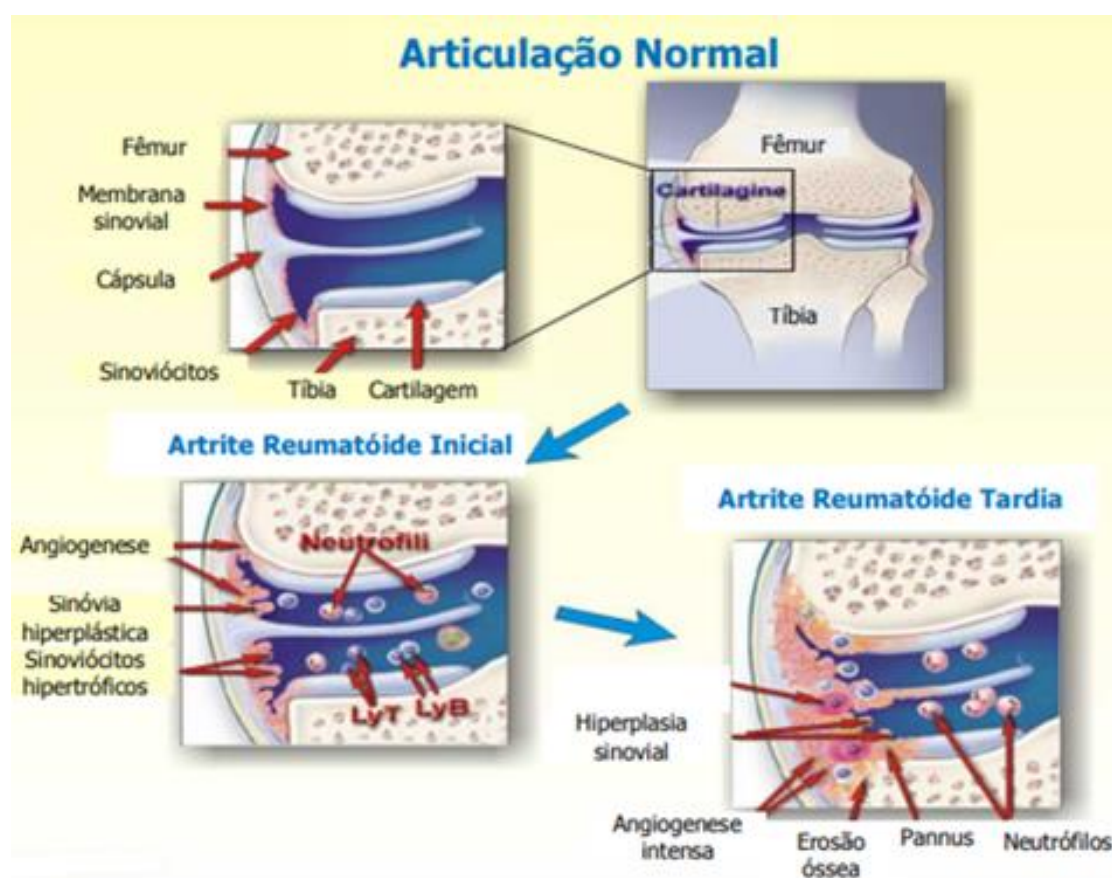
**Figura 1.** Esquema Representativo da Patogênese da Artrite Reumatóide.

### 2.1.2 Fisiopatogenia da Artrite

As articulações sinoviais estão localizadas nas extremidades ósseas e possuem cavidade articular, cartilagem, cápsula fibrosa, ligamentos, músculos e tendões periarticulares. A importância de cada uma dessas estruturas se inicia com a membrana sinovial, responsável pela limitação do espaço

articular e produção do líquido sinovial para lubrificação e nutrição da cartilagem articular. O líquido sinovial é derivado do plasma, constituído por mucopolissacarídeos e células da membrana sinovial (MARCONI, 2017).

Os sinoviócitos fazem parte dessa membrana, e são classificados como macrófagos fagocitários (tipo A) e fibroblastos-like (tipo B). A composição da cartilagem hialina é 70% água e 8% proteoglicanos (resistência à compressão e redução do atrito), 10% colágeno tipo II (resistência ao estresse de tensão e compressão), e condrócitos (síntese de matriz e secreção de enzimas catabólicas) (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016).



**Figura 2.** Imagem comparativa entre uma articulação saudável e articulação com AR. Adaptado de CHOY; PANAYI, 2001.

### 2.1.3 Artrite e Inflamação

A fisiopatologia da AR é complexa e inicia-se quando o sistema imunológico adaptativo, tanto celular como humoral, reconhece antígenos e desencadeia uma cascata inflamatória (DING et al., 2023). Vários fatores estão envolvidos na progressão da AR, incluindo fatores genéticos, ambientais

e defeitos na imunorregulação (DUDICS et al., 2018), que causam uma quebra da auto tolerância e ativam mecanismos que levam a danos teciduais (CHEN et al., 2019).

Entre os fatores genéticos predominante no desenvolvimento da AR, estão os genes do sistema antígenos leucocitários humanos (HLA) que atuam na apresentação de antígenos pelas células B às células T, por meio do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) (FIRESTEIN; MCINNES, 2017), desencadeando a produção do Fator Reumatóide (FR) e de anticorpos anti-proteínas citrulinadas (AAPC), que contribuem para maior agressividade da doença (WANG; WU; DENG, 2021).

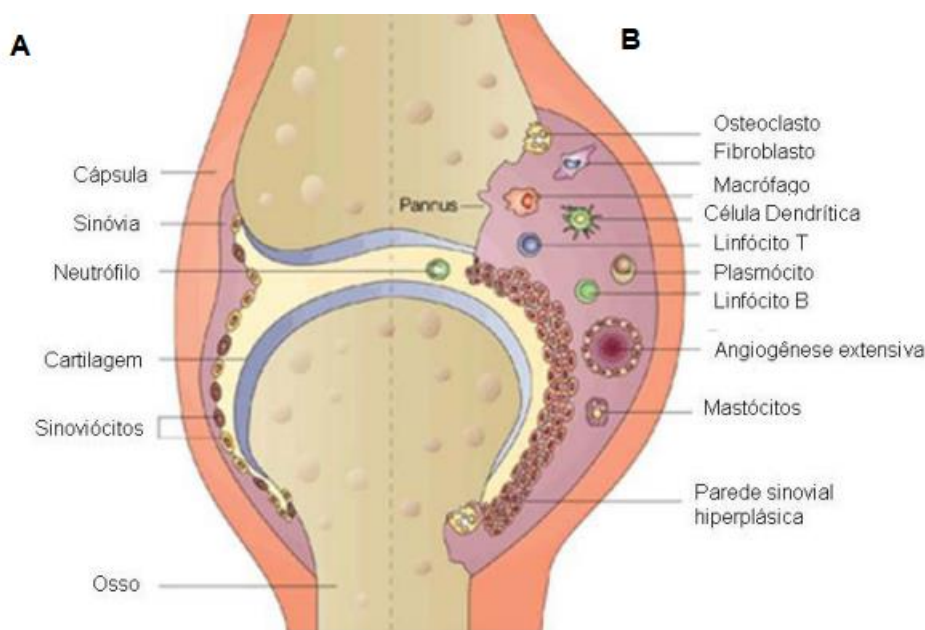
A presença desses auto anticorpos FR e AAPC é característica típica da AR e estes podem ser detectados previamente ao início da sinovite e sintomas clínicos da doença (ALETAHA; ALASTI; SMOLEN, 2015), e são autoanticorpos específicos contra imunoglobulina G (IgG) e proteínas citrulinadas (MALMSTRÖM; CATRINA; KLARESKOG, 2017).

O FR foi o primeiro anticorpo autoimune da AR descrito, sendo um marcador sérico clássico da doença, utilizado no prognóstico e diagnóstico da doença, e presente em cerca de 70% dos pacientes acometidos com AR (ALETAHA et al., 2010). Ainda, a detecção de AAPC também é utilizada para o diagnóstico da AR, já que 80% dos pacientes com a doença apresentam níveis séricos detectáveis deste marcador, considerado mais específico, e associado a maior dano articular e prognóstico desfavorável (SMOLEN et al., 2018).

A artrite é uma doença crônica, autoimune e progressiva, na qual a presença de autoanticorpos, a formação de complexos imunes, ativação do complemento e injúria microvascular desencadeiam a inflamação sinovial (FIRESTEIN; MCINNES, 2017), caracterizada por apresentar neovascularização, aumento da permeabilidade vascular, influxo de leucócitos, como macrófagos e linfócitos T CD4+ (DING et al., 2023). Esses, iniciam uma resposta autoimune, produzindo IFN- $\gamma$  capaz de estimular outras células inflamatórias, como células estromais, que passam a produzir citocinas inflamatórias como IL-17, TNF, IL-1, que ativam o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) no local da inflamação da AR (KULESZA; PACZEK; BURDZINSKA, 2023).

A inflamação articular resulta em mudanças na membrana sinovial, hiperplasia do tecido sinovial, proliferação dos vasos sanguíneos (MCINNES; SCHETT, 2011), ativação das células que são estimuladas a produzir moléculas de adesão e quimiocinas que facilitam o influxo de células inflamatórias (RADU; BUNGAU, 2021).

A migração leucocitária que ocorre, associada a hiperplasia sinovial e a neovascularização modificam a estrutura da sinóvia transformando-se em um tecido invasivo denominado *pannus* (**Figura 3**), capaz de invadir e destruir os tecidos cartilagosos e ósseos, considerado sinal cardinal da AR (WANG et al., 2023a).



**Figura 3.** Esquema representativo de uma articulação saudável (A) e de uma articulação com *pannus* reumatoide na AR (B). Adaptado de CHOY, 2012.

A produção de enzimas proteolíticas como metaloproteinases e serinoproteases, contribuem para a degradação que ocorre na sinóvia artrítica, juntamente com espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (ERN e ERO) (FIRESTEIN; MCINNES, 2017), que são liberadas após os leucócitos reconhecerem o agente agressor pelos receptores do tipo Toll (TLRs).

Estes receptores funcionam como receptores de reconhecimento padrão (PRR) presentes nos macrófagos, nas células dendríticas e nos neutrófilos, responsáveis pelo reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Após esta identificação, macrófagos e neutrófilos realizam a fagocitose destes PAMPs, na tentativa de degradação da partícula, principalmente pelos produtos derivados de óxido nítrico (NO) (PHULL et al., 2018). Estes produtos juntamente com as enzimas lisossômicas promovem a eliminação do patógeno e de seus produtos (QUINONEZ-FLORES et al., 2016).

Apesar da AR ser considerada uma doença inflamatória crônica, esta é marcada por intervalos de remissão e exacerbação dos sinais e sintomas (agudização) pelo paciente (FIRESTEIN; MCINNES, 2017). Neste contexto, há a necessidade da compreensão do processo inflamatório intenso que acontece nas membranas sinoviais (sinovite) e estruturas articulares, que levam à destruição óssea, dor e deformidades principalmente nas articulações (SMOLEN et al., 2018).

### 2.1.4 Agudização da Resposta Inflamatória na Artrite

Na fase aguda da inflamação ou reagudização da AR, a resposta pode durar horas ou até semanas e esse processo caracteriza-se por eventos vasculares e celulares, incluindo aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular da região lesionada, extravasamento de líquidos, edema, dor localizada, migração e acúmulo de leucócitos no local da lesão (SERHAN; CHIANG; DALLI, 2015).

Os receptores presentes na membrana plasmática, nos endossomos e no citosol de células epiteliais, dendríticas, macrófagos e outros leucócitos, pertencentes à família dos receptores Toll-like (TLRs) (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016) detectam a presença de microrganismos ou de corpos estranhos (reconhecimento de padrões moleculares associados a danos DAMPs), e induzem a produção de interleucina-1 (IL-1), Fator de Necrose Tumoral (TNF) e IL-6 (DE OLIVEIRA; ROSOWSKI; HUTTENLOCHER, 2016) capazes de alterar a permeabilidade do endotélio, além de aumentar a expressão de moléculas de adesão no endotélio, induzir o recrutamento de polimorfonucleares (PMN) para o foco inflamatório (YI; LEE, 2021).

#### **2.1.4.1 Eventos vasculares**

Os eventos vasculares que ocorrem no processo inflamatório se iniciam com uma breve vasoconstrição, mediada por tromboxanos, seguida de vasodilatação, mediada por aminas vasoativas como a histamina e a serotonina (BUCKLEY; GILROY; SERHAN, 2014), que origina os sinais cardinais da inflamação como o calor e o rubor, devido ao aumento da permeabilidade vascular, com consequente extravasamento de fluido do vaso sanguíneo (VANE; BOTTING, 2003).

Além dos mediadores inflamatórios citados acima, atuam nesse processo o fator ativador de plaquetas (PAF), prostaglandinas (PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>), fatores do complemento (C3a e C5a) e fatores do sistema de coagulação e/ou fibrinolítico (MCGARRY et al., 2018). Ainda, há a participação de cininas, como a bradicinina, considerada um mediador pró-inflamatório que atua causando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, com consequente extravasamento plasmático para o foco inflamatório (YI; LEE, 2021).

Dentre os mediadores lipídicos envolvidos no evento vascular, o PAF é secretado por células endoteliais e induz a produção e liberação de citocinas e histamina, e atua no aumento da permeabilidade vascular (MURAKAMI et al., 2020). Os derivados do metabolismo do ácido araquidônico (AA) como as prostaglandinas, principalmente PGD<sub>2</sub>, (JAIN; PANDEY; SHUKLA, 2015), também atuam no aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de líquidos e formação do edema (ETIENNE; PEREIRA DIAS VIEGAS; VIEGAS JR., 2021). O edema é uma das principais características clínicas da AR, sendo visível o aumento do volume ou inchaço das

articulações sinoviais (GEGOUT et al., 1994), resposta relacionada à vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e, deslocamento do plasma para o foco inflamatório (DING et al., 2023).

A natureza do edema depende do estágio da doença (aguda ou crônica), já que na fase crônica este evento pode ocorrer devido ao espessamento da membrana sinovial e cápsula fibrosa, além do inchaço dos tecidos periarticulares (RADU; BUNGAU, 2021).

Na fase aguda, as alterações vasculares ocorrem por eventos complexos inter-relacionados as alterações celulares, já que mediadores como histamina, prostaglandinas e NO promovem vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo (MCGARRY et al., 2018), e de forma simultânea, fragmentos do complemento, leucotrienos e (PAF), atuam sobre células endoteliais, aumentando a permeabilidade vascular (MURAKAMI et al., 2020). Citocinas, como TNF e IL-1, também estão envolvidas neste processo, pois aumentam a expressão de moléculas de adesão no endotélio, facilitando a transmigração de leucócitos para o foco inflamatório (ETIENNE; PEREIRA DIAS VIEGAS; VIEGAS JR., 2021).

#### **2.1.4.2 Alterações Celulares**

O recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório depende da natureza do estímulo, dos mediadores quimiotáticos liberados e da expressão de moléculas de adesão (JAIN; PANDEY; SHUKLA, 2015). Entre os fatores quimiotáticos estão o fragmento C5a do complemento, leucotrienos (LT), tromboxanos, TNF, IL-1 e IL-8 (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016).

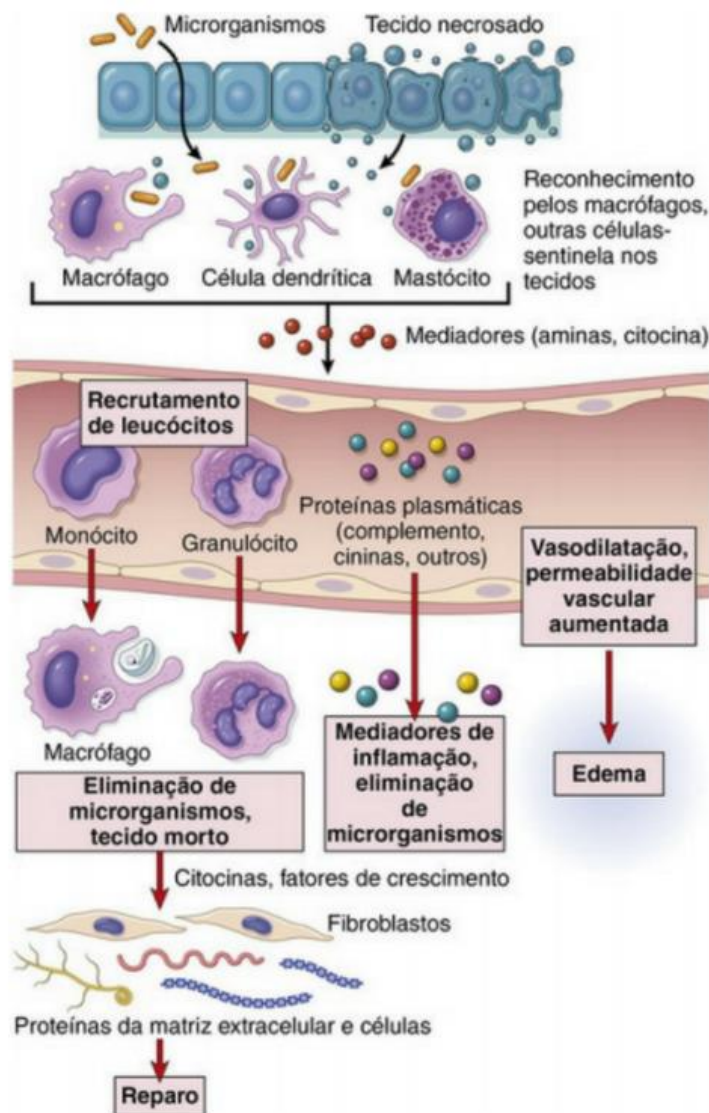
Os componentes celulares envolvidos na resposta inflamatória incluem mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, linfócitos, células endoteliais, além das plaquetas (MURAKAMI et al., 2020). Os mastócitos, são células residentes que desempenham um papel chave na imunidade inata inicial, secretam as quimiocinas CXCL1 e CXCL2 que contribuem com o influxo de neutrófilos, assim como induz a liberação de leucotrieno B4 (LTB<sub>4</sub>), derivado da lipo-oxigenase (5-LOX) que atua como mediador quimiotático (GONZÁLEZ-DEOLANO; ÁLVAREZ-TWOSE, 2018).

Os PMN são o primeiro tipo celular a migrar para o sítio inflamatório, o que também é observado na patogênese da artrite, sendo encontrado neutrófilos no líquido sinovial e nas cartilagens artríticas (BASSI et al., 2016).

Há uma interação inicial dos leucócitos circulantes no sangue com as células do endotélio, por meio de moléculas de adesão, denominadas selectinas, integrinas e imunoglobulinas (FREIRE; VAN DYKE, 2013; PEREIRA et al., 2021). A IL-1 e o TNF são capazes de ativar as células

endoteliais a expressarem essas moléculas de adesão (selectinas e integrinas) (MURAKAMI ET AL., 2020).

As selectinas (E-selectina, P-selectina e L-selectina) são responsáveis pelo rolamento, movimento de rotação dos leucócitos ao longo da parede do vaso sanguíneo (DE OLIVEIRA; ROSOWSKI; HUTTENLOCHER, 2016; MENDEL NZOGANG; BORIS DONKENG, 2020) juntamente com a expressão das integrinas pelos PMN, como a LFA-1 e a MAC-1 que se ligam às imunoglobulinas ICAM-1 presentes no endotélio, promovendo a adesão celular (JAIN; PANDEY; SHUKLA, 2015). Em seguida, moléculas de adesão endotélio/plaqueta (PECAM-1) são expressas tanto pelos leucócitos quanto pelo endotélio, promovendo o processo de transmigração (MENDEL NZOGANG; BORIS DONKENG, 2020).



**Figura 4.** Eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória. Adaptado de (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016)

Paralelamente, sabe-se que os neutrófilos presentes no líquido sinovial participam do reconhecimento do agente agressor pelos TLRs e outros receptores, e realizam a fagocitose e a degradação da partícula por meio das espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (PHULL et al., 2018), principalmente NO e peroxinitrito que podem gerar erosão óssea e danos nas cartilagens das articulações (ANDERSEN et al., 2018).

Os neutrófilos ativados ainda podem causar danos teciduais pela liberação de proteases como metaloproteinases, elastases, catepsinas, defensinas e proteinases, que são serinoproteases formadas durante o processo de maturação dos neutrófilos (MATEEN et al., 2016).

Dentre os radicais livres liberados por essas células, podemos destacar o NO, que tem produção aumentada em doenças inflamatórias crônicas, como a AR (CHEN et al., 2019), e está envolvido no recrutamento e rolamento de leucócitos, produção de citocinas, proliferação celular e apoptose (PRASAD et al., 2023).

O NO pode causar lesão tecidual por reagir com o radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), produzido pelos fagócitos e produzir peroxinitrito (MCGARRY et al., 2018) além disso sua produção excessiva no meio extracelular, leva a peroxidação lipídica e danos em proteínas, ácidos nucleicos e componentes da matriz na AR causando danos nos tecidos (WANG et al., 2023). O estresse oxidativo desencadeado pela ativação de células inflamatórias é um fator considerável na patogênese de doenças, como a AR (ZHANG et al., 2023).

No decorrer do processo, células mononucleares (MN) como monócitos também são recrutados para o foco inflamatório, atraídos principalmente pelas quimiocinas CXCL1 e CXCL2 para o sítio inflamatório, onde se diferenciam em macrófagos (CASTANHEIRA; KUBES, 2019), que são ativados por padrões moleculares associados a danos (DAMPs) ou a patógenos (PAMPs) e iniciam o recrutamento de células PMN por meio de mediadores inflamatórios, como TNF, IL-1 e IL-6 (MALMSTRÖM; CATRINA; KLARESKOG, 2017). Ainda, promovem a eliminação do patógeno por meio da secreção de EROs, ERNs, promovendo a remoção apoptótica dos PMN e detritos por fagocitose, visando a resolução da inflamação (YI; LEE, 2021).

O processo inflamatório crônico evolui quando não ocorre resolução da inflamação e este evento se desenvolve por um período indeterminado, podendo durar semanas ou até anos, sendo uma das principais causas de doenças crônicas como a AR (RADU; BUNGAU, 2021).

Essa fase da resposta inflamatória está relacionada ao recrutamento de MN, como macrófagos, linfócitos e monócitos, que produzem mediadores pró-inflamatórios e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio ocorrendo simultânea ativação inflamatória e destruição tecidual (DE OLIVEIRA; ROSOWSKI; HUTTENLOCHER, 2016). Ainda, há substituição do tecido danificado



por tecido conjuntivo (fibrose) e proliferação de vasos sanguíneos, processo conhecido como angiogênese (YEUNG et al., 2018).

### **2.1.5 Mediadores Lipídicos envolvidos na Inflamação e Artrite**

Diante de um estímulo inflamatório, o AA é liberado a partir de fosfolipídios clivados pela enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>), a partir de fosfolipídios da membrana de células inflamatórias ativadas (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016). Após sua liberação, o AA sofre metabolização por meio das enzimas COX (ciclooxigenases) ou LOX (lipoxigenases), dando origem aos eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos) e os quais são responsáveis por importantes funções fisiológicas nos organismos (VANE; BOTTING, 2003) e na resposta inflamatória como vasodilatação, quimiotaxia e agregação plaquetária (KULESZA; PACZEK; BURDZINSKA, 2023).

As prostaglandinas (PGs) estão relacionadas à hiperalgesia ocasionada durante a inflamação por meio de sua ação sobre os neurônios sensoriais (SEIXAS et al., 2022), e desempenham papel importante na inflamação, causando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular levando ao edema, dor e febre (VANE; BOTTING, 2003). Estes mediadores podem ser formados pela ação da COX-1, 2 ou COX-3 (MURAKAMI et al., 2020).

A COX-1 é constitutiva expressa principalmente nos vasos sanguíneos, estômago, rins e plaquetas, catalisa a síntese de prostaglandinas, e é responsável por manter a homeostasia do organismo (KULESZA; PACZEK; BURDZINSKA, 2023). A COX-2 está presente em condições normais nos rins e cérebro, porém na maioria dos tecidos a síntese é induzida por mediadores inflamatórios, como IL-1, TNF e NO (YEUNG et al., 2018) e correlacionada como a maior responsável pela produção de prostanoídes durante o processo inflamatório e doloroso (KASSUYA, 2013). A COX-3 é expressa nas células do cérebro, fígado e coração e, é considerada uma variante da COX-1 e está envolvida nos efeitos antipiréticos e analgésicos de alguns AINE, como o paracetamol e a aspirina (PEREIRA et al., 2021).

Além das PGs, os tromboxanos também são formados a partir da metabolização do ácido araquidônico pela via das enzimas COX (VANE; BOTTING, 2003). Os TX, principalmente o TXA<sub>2</sub>, é um mediador que causa agregação plaquetária produzido principalmente por plaquetas por meio da ação da COX-1 e inibem a formação de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (KULESZA; PACZEK; BURDZINSKA, 2023), além disso causa vasoconstrição e indução da migração de monócitos por meio do aumento da expressão de MCP-1 (YEUNG et al., 2018).

Na AR a produção de PGs ocorre principalmente pela ativação e expressão da enzima COX-2, e este mediador participa do evento algico na articulação, e esse fenômeno ocorre simultaneamente

a produção do TNF (MCINNES; SCHETT, 2011). Os principais mediadores lipídicos envolvidos na AR com potencial pró-inflamatório são PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> (CHEN et al., 2019). A PGE<sub>2</sub> potencializa a dor e o edema e o LTB<sub>4</sub> devido sua grande afinidade por neutrófilos, torna-se potente fator quimiotático (ZHANG et al., 2023).

Além da oxidação do AA pela via da enzima COX, que leva a formação de prostaglandinas (PG) e tromboxanos (TXA), há a oxidação do AA pela via da enzima lipoxigenase (LOX), que resulta na síntese de leucotrienos (JAIN; PANDEY; SHUKLA, 2015). Quando a FLA<sub>2</sub> cliva os fosfolípidios também há liberação de uma molécula inativa conhecida como liso-PAF (fator de ativação plaquetária) (BUCKLEY; GILROY; SERHAN, 2014). Este, é um mediador vasoativo importante na resposta vascular inflamatória e leva a quimiotaxia de neutrófilos, agregação plaquetária e alteração da permeabilidade vascular (MURAKAMI et al., 2020).

A via da 5-lipoxigenase (5-LOX) dá origem aos leucotrienos e lipoxinas (KULESZA; PACZEK; BURDZINSKA, 2023). O LTB<sub>4</sub>, como já dito, apresenta potente ação quimiotática, sendo este seu principal papel na patogenia da AR atraindo neutrófilos e induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL- $\beta$ , IL-6 e TNF (YEUNG et al., 2018). Os leucotrienos LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub> causam intensa vasoconstricção, broncoespasmo e aumento da permeabilidade vascular e são responsáveis pela constrição da musculatura lisa das vias aéreas (PEREIRA et al., 2021).

As lipoxinas (LXs) apresentam papel relevante no processo inflamatório, são mediadores anti-inflamatórios e interrompem a migração de células PMN, induzem a fagocitose de células PMN pelos macrófagos, além de reduzir a dor inflamatória (SERHAN; CHIANG; DALLI, 2015), um dos primeiros mediadores a serem reconhecidos por apresentarem atividades pró-resolutivas.

Outros mediadores envolvidos na resolução do processo inflamatório são as resolvinas, protectinas e maresinas, biosintetizados a partir de ácidos graxos essenciais como o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA) (BUCKLEY; GILROY; SERHAN, 2014). Estes, estão associadas à resolução da resposta inflamatória aguda e implicadas na patogênese de doenças inflamatórias crônicas como a artrite (CHEN et al., 2019).

Nesta fase de resolução da inflamação a interação desses mediadores derivados do EPA e DHA com os respectivos receptores celulares reduz o influxo de neutrófilos para o foco inflamatório (LI et al., 2020). Além disso, estes mediadores em macrófagos induzem a fagocitose de neutrófilos apoptóticos e, em células dendríticas inibem a indução de TNF e NF- $\kappa$ B e a liberação de IL-6 e IL-2, promovendo a regeneração de tecido, reestabelecendo a homeostase (SERHAN; ROSA; JOUVENE, 2019).

Quando não há resolução da inflamação aguda e/ou não se concluiu uma resposta imune adaptativa, o processo inflamatório pode evoluir para a inflamação crônica, que ocorre em uma grande variedade de doenças, como por exemplo na AR (YEUNG et al., 2018).

As enzimas inflamatórias COX-2 e 5-LOX, metaloproteinases e as moléculas de adesão como já dito, participam da patogênese da AR (WANG et al., 2023), evidenciando que leucotrienos e prostaglandinas estão envolvidos na fisiopatologia desta doença e participam do processo de dor, acúmulo de neutrófilos e dano articular (PRASAD et al., 2023).

### **2.1.6 Artrite e Dor**

A AR é uma doença que tem como um dos principais sintomas a dor articular (SCHNEIDER et al., 2019), que impacta a qualidade de vida em pacientes com AR, levando a diminuição da produtividade, problemas psicológicos, incapacidade de se movimentar, distúrbios do sono e uso crônico de medicamentos (MCWILLIAMS; WALSH, 2017). Os sintomas inflamatórios da AR como edema, rigidez articular e dor estão diretamente relacionados com a perda de movimento da articulação na fase inicial da doença (SEIXAS et al., 2022).

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada à lesão tecidual real ou potencial” (LOESER; TREEDE, 2008), um mecanismo de proteção fisiológica, considerada uma experiência subjetiva que agrega aspectos psicológicos, sociais, culturais, emocionais e ambientais, além de envolver transdução de estímulos nocivos ambientais (RONCHETTI; MIGLIORATI; DELFINO, 2017).

A dor é um sinal de alerta para estímulos nocivos e o conceito de dor envolve dois termos distintos: nocicepção e a percepção (NEVES et al., 2020). Segundo a IASP, a nocicepção está relacionada a processos neurais de codificação e processamento de estímulos nocivos (BASBAUM et al., 2009), enquanto a percepção é uma resposta afetiva e/ou emocional a estes estímulos (ZHANG et al., 2019).

O termo nocicepção refere-se ao estímulo doloroso, e não leva em consideração a resposta emocional, engloba as vias neuroanatômicas e os mecanismos neurológicos (GUERRERO et al., 2011), além da percepção do sinal que o estímulo lesivo causa em receptores específicos (RONCHETTI; MIGLIORATI; DELFINO, 2017).

Em modelos experimentais de dor, utiliza-se o termo nocicepção, uma vez que os animais não são capazes de expressar resposta emocional a dor (ALVES et al., 2017). Os nociceptores são fibras nervosas periféricas, mielinizadas e não mielinizadas, fibras do tipo A $\sigma$  e tipo C, respectivamente

(DMYTRIIEV; MARCHUK; DMYTRIIEV, 2018). São estes nociceptores que recebem, codificam e transduzem o estímulo nocivo, que quando capazes de causar dano ao tecido e ativar nociceptores, são chamados estímulos nociceptivos (ALVES et al., 2017).

Os nociceptores localizados no tecido danificado, como nas articulações, sofrem sensibilização e ocorre diminuição do seu limiar de excitabilidade (NEVES et al., 2020) desencadeando um processo conhecido como hiperalgesia (SEIXAS et al., 2022).

A dor inflamatória ocorre pela sensibilidade do sistema nociceptivo aumentada por um dano tecidual ou por mudanças ocorridas no tecido lesado, como a liberação de mediadores inflamatórios (DMYTRIIEV; MARCHUK; DMYTRIIEV, 2018), por exemplo as citocinas, que podem provocar sensibilização de nociceptores, contribuindo para o aumento da dor na AR (SCHNEIDER et al., 2019).

A dor é um dos principais sintomas em pacientes com AR, e a produção de mediadores inflamatórios e citocinas no tecido sinovial destes pacientes é um processo importante na patogênese dessa doença autoimune (MATOS LEITÃO et al., 2023).

Durante a dor inflamatória, ou hiperalgesia, mediadores químicos são liberados pelas células lesadas e células do infiltrado inflamatório (ZHANG et al., 2019), como as citocinas IL-1 $\beta$ , TNF (CHEN; YANG; GROSSER, 2013), quimiocinas (proteína quimiotática de monócitos [MCP-1]), prostaglandinas (PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  e PGI<sub>2</sub>) (BASBAUM et al., 2009), bradicininas e purinas (CHEN et al., 2019), além dos peptídeos (substância P, bradicinina, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), e as aminas simpatomiméticas, entre outros (NEVES et al., 2020). Esses atuam sensibilizando e diminuindo o limiar de ativação dos nociceptores, além de agir de forma sinérgica no mecanismo de transdução periférica do estímulo nociceptivo (SEIXAS et al., 2022).

Na avaliação da hiperalgesia em modelos experimentais, observa-se a redução do limiar nociceptivo, a partir de um estímulo inflamatório (GUERRERO et al., 2011) com agentes como zymosan, carragenina, ácido acético e formalina, que permitem relacionar o processo inflamatório com a hipernocicepção (DMYTRIIEV; MARCHUK; DMYTRIIEV, 2018).

Esses modelos são utilizados para melhor entender a fisiopatologia da doença ou para buscar potenciais alvos terapêuticos ou estratégia (WANG et al., 2023). Demonstram comportamentos que ocorrem porque os estímulos nociceptivos ativam ou induzem a produção rápida de mediadores endógenos que sensibilizam nociceptores e reproduzem efeitos que se assemelham aos encontrados na prática clínica (ALVES et al., 2017).

### **2.1.7 Artrite e Ativação Celular**

Entre as células inflamatórias envolvidas na patogênese da AR, os macrófagos desempenham um papel fundamental (TARDITO et al., 2019). Estes, são as primeiras células a serem ativadas e podem secretar diversas substâncias como enzimas, citocinas, fatores de crescimento (LASKIN et al., 2011), mediadores lipídicos e espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (MURRAY, 2017) que são responsáveis por regular a sua própria atividade e a de outras células (YANG; ZHAO; JIA, 2023).

Os macrófagos podem polarizar-se em diferentes fenótipos (MOSSER; EDWARDS, 2008) e mediar a reação imune / inflamatória, bem como a fase reparatória, quando possível (MA et al., 2019). Estes fenótipos são classificados em dois tipos: a) macrófagos classicamente ativados (M1) na presença de citocinas liberadas por linfócitos *T helper* (Th) 1, como a TNF e a IFN- $\gamma$  (ZHANG et al., 2023), sendo considerados pró-inflamatórios e secretam IL-1, IL-6, além de NO (JAIN; MOELLER; VOGEL, 2019) e b) macrófagos de ativação alternativa (M2) (BONIAKOWSKI et al., 2017) que são anti-inflamatórios e estão envolvidos no reparo e reconstrução tecidual.

A polarização para M2 ocorre após indução por citocinas liberadas por linfócitos *T helper* (Th) 2, como IL-4, IL-13 e IL-33 (TARDITO et al., 2019). O fenótipo M2 secreta citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, com relevante atividade fagocitária e relacionada com o processo de reparação tecidual (YANG; ZHAO; JIA, 2023).

Na AR, os macrófagos M1 estimulam a produção de citocinas inflamatórias e enzimas degradadoras de matriz, promovendo diferenciação hipertrófica de condrócitos e destruição da cartilagem (MURRAY, 2017). Em contraste, macrófagos M2 são caracterizados pela expressão de genes pró-condrogênicos, que contribuem na regeneração da cartilagem (ZHANG et al., 2018).

Em pacientes com AR há um desequilíbrio de macrófagos com os marcadores M1 e M2, mais especificamente no tecido sinovial, há, ambos presentes na superfície das células (TARDITO et al., 2019). O que também foi observado em modelos animais (ZHANG et al., 2023). No tecido sinovial da AR há macrófagos e fenótipos mistos M1/M2 (LASKIN et al., 2011), porém a polarização muda ao longo das fases de atividade da doença, de reagudização ou estabilidade (YANG; ZHAO; JIA, 2023).

Os macrófagos M1, quando ativados, além das citocinas, aumentam a liberação de AA e, por meio da ação da COX-2, podem produzir PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> (MURRAY, 2017). Além disso, outro mediador secretado pelos macrófagos durante o processo inflamatório é o NO, um radical livre altamente reativo sintetizado a partir da enzima NO sintase (NOS), que catalisa a oxidação de L-arginina a L-citrulina (MARLETTA, 1994) .

A NOS apresenta diferentes isoformas, NOS constitutiva (cNOS) - envolvida na sinalização celular, e NOS induzível (iNOS) (BAUEROVA; BEZEK, 1999), produzida por indução em

macrófagos, e em outras células ativadas por citocinas como os linfócitos T, célula endotelial, miócitos, hepatócitos, condrócitos, neutrófilos e plaquetas (MATEEN et al., 2016).

O NO desencadeia vários efeitos reguladores no processo inflamatório (COFTA et al., 2009) como ativação celular e apoptose, produção de citocinas, aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, influxo leucocitário (MCGARRY et al., 2018).

A produção do NO via iNOS se inicia horas após a ativação das células inflamatórias, e o NO decorrente dessa via é considerado pró-inflamatório, podendo até ser deletério (PHULL et al., 2018). Baixas concentrações causam vasodilatação e recrutamento de neutrófilos, enquanto que elevadas concentrações reduzem a atração de neutrófilos para o local da lesão (FARRELL; BLAKE, 1996).

Pesquisas identificaram o NO como um importante mediador inflamatório na AR, com base na detecção de concentrações elevadas de nitritos no soro e líquido sinovial de pacientes com AR (BAUEROVA; BEZEK, 1999). Ainda, o aumento da atividade de iNOS e a produção de NO foram observados em leucócitos do sangue periférico de pacientes com AR e correlacionados com a contagem celular obtidas dos respectivos (MATEEN et al., 2016).

Os macrófagos possuem receptores de reconhecimento de padrões (RRPs) que podem reconhecer padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (MOTOYOSHI et al., 2014) como por exemplo o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), utilizado como estímulo inflamatórios (BONIAKOWSKI et al., 2017). A ativação destes receptores leva os macrófagos a espriarem a fim de aumentar a superfície de contato entre o macrófago e o estímulo, sendo um passo necessário para facilitar a fagocitose (BINKER et al., 2007).

No quadro de artrite, o processo de fagocitose e do estresse oxidativo é relevante (LASKIN et al., 2011), já que os macrófagos ativados são encontrados em quantidade considerável no local da lesão (MA et al., 2019) e estes processos se não modulado, pode potencializar o dano tecidual (YANG; ZHAO; JIA, 2023).

## **2.2 Modelos Experimentais de Artrite**

Os modelos experimentais de AR têm sido utilizados com o objetivo de caracterizar o processo inflamatório nas articulações, incluindo a dor, formação de edema articular, influxo leucocitário e incapacitação articular (ROCHA et al., 2003; PENIDO et al., 2006; WANG et al., 2023).

A artrite induzida por zymosan (Zy) foi descrita por Keystone et al. (1977), e sabe-se que este é um polissacarídeo derivado da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae* (GUAZELLI et

al., 2018) e sua injeção intra-articular promove de forma aguda: sinovite erosiva, aumento de permeabilidade vascular e migração celular, principalmente de PMN (GEGOUT et al., 1994).

De forma tardia, desenvolve-se sinovite progressiva com hiperplasia sinovial, caracterizada pelo acúmulo predominante de células mononucleares e intensa proliferação de fibroblastos (ROCHA et al., 2003), semelhante ao pannus reumatóide característico de pacientes com AR (WANG et al., 2023).

O Zy quando administrado por via intra-articular, atua como um agente indutor de intensa reação inflamatória por ativação da via alternativa do sistema complemento (BEZERRA et al., 2004), degranulação de mastócitos, estimulação de macrófagos e neutrófilos com liberação de mediadores inflamatórios (ROCHA et al., 1999).

Este polissacarídeo ativa receptores toll-like 2 (TLR-2) e toll-like receptor 6 (TLR-6), além de ativar o fator de transcrição NF- $\kappa$ B (GUERRERO et al., 2011a), um regulador da expressão de várias citocinas pró-inflamatórias (LIU et al., 2017), incluindo TNF, IL-1, IL-6, quimiocinas e NO (BELLAVITA et al., 2020). Esses eventos que ocorrem no modelo experimental de artrite (ASQUITH et al., 2009), ocorrem de forma semelhante na clínica da AR (PEREIRA-LEITE et al., 2017).

Além disso, na artrite induzida por Zy, após a segunda hora os animais apresentam incapacidade articular progressiva e pico de hipernocicepção entre a terceira e quarta horas (ASQUITH et al., 2009). Após a terceira hora há aumento da permeabilidade vascular, levando a intenso edema local e ocorre um influxo celular de PMN que se torna máximo na sexta hora (ROCHA et al., 1999, 2003).

Rocha et al. (1999) demonstrou que a fase crônica do modelo persiste com sinovite até 28 dias após a injeção do Zy, havendo formação de células gigantes, e proliferação de linfócitos e monócitos no líquido sinovial. Corroborando com esta informação, Bezerra et al. (2004) descreve que após 21 dias de indução do Zy em ratos há um intenso infiltrado mononuclear, proliferação de fibroblastos, presença de células gigantes, neovascularização, perda de proteoglicanos da cartilagem articular e erosão do osso subcondral. Adicionalmente, Rocha et al. (2003) demonstrou a participação do NO nesse modelo experimental, através do aumento dos níveis de nitrito nos exsudatos articulares.

Estudos demonstraram o envolvimento das espécies reativas NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com a gravidade da AR, implicados indiretamente no dano articular (BEZERRA et al., 2004), já que desempenham um papel importante como mensageiros secundários na resposta celular inflamatória e imunológica da AR (QUINONEZ-FLORES et al., 2016), levando à reabsorção óssea e danos à cartilagem, contribuindo para danos nas articulações afetadas (PHULL et al., 2018).

Esta associação relevante entre ERO e ERN e a gravidade da AR foi encontrada em modelos experimentais e pacientes com AR (MATEEN et al., 2016), justificando a avaliação do efeito dos análogos sobre as funções dos macrófagos, células importantes nesse processo inflamatório.

### **2.3 Fármacos Utilizados no Tratamento de Artrite**

O tratamento da AR tem como principal objetivo a remissão clínica, ou seja, ausência de sinais e sintomas da doença inflamatória crônica (SMOLEN et al., 2018) e consiste em medicamentos para controlar os sintomas e a evolução da doença, a regressão das limitações funcionais assim como a prevenção de complicações e os danos estruturais, a melhora da qualidade de vida e o aumento da sobrevida do paciente (PRASAD et al., 2023).

Sabe-se que ainda não existem opções de tratamentos disponíveis que levem a cura da doença, e os medicamentos que são utilizados no tratamento da AR possuem efeitos direcionados à remissão ou baixa atividade da doença (PRASAD et al., 2023), levando à diminuição dos efeitos da autoimunidade, impedindo a progressão do dano das articulações, minimizando a inflamação articular e suas consequências, como a incapacidade articular e a dor (RADU; BUNGAU, 2021).

Os fármacos empregados no tratamento da AR são capazes de interferir com o processo inflamatório (SMOLEN et al., 2018), como por exemplo: os glicocorticoides ou anti-inflamatórios esteroidais (AIEs), imunossupressores, anti-reumáticos modificadores da doença (DARMDs) e anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) (DING et al., 2023). Ainda, há os imunobiológicos, que bloqueiam a ação de citocinas e de moléculas coestimulatórias e, trouxeram novas perspectivas para o tratamento da AR. Porém, apesar dos grandes avanços, nem todos os pacientes respondem a esta terapia farmacológica (ALETAHA; ALASTI; SMOLEN, 2015).

A PORTARIA CONJUNTA Nº 16, DE 3 DE SETEMBRO DE 2021 Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Artrite Reumatoide e da Artrite Idiopática Juvenil (BRASIL, 2021) e determina que o tratamento medicamentoso de AR inclui o uso de AINE, AIE, imunossupressores e DMARDs – sintéticos e biológicos (BRASIL, 2021), conforme a **TABELA 1** resume a descrição dos fármacos por categorias.

**Tabela 1- Descrição Das Categorias Dos Medicamento - Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Artrite Reumatoide e da Artrite Idiopática Juvenil (2021)**



<b>Categoria de medicamentos</b>	<b>Descrições</b>
MMCDs	Medicamentos modificadores do curso da doença sintéticos: hidroxicloroquina, cloroquina, leflunomida, metotrexato ou sulfassalazina.
MMCDsae – baricitinibe, tofacitinibe ou upadacitinibe	Medicamento modificador do curso da doença sintético alvo-específico.
Monoterapia MMCDs	Frequentemente definida com o uso de monoterapia MTX, mas também pode ser LEF, SSZ, HCQ/cloroquina.
Terapia combinada dupla MMCDs	MTX + HCQ, MTX + SSZ, SSZ + HCQ ou combinações com LEF (LEF + MTX, LEF + HCQ, LEF + SSZ).
Terapia combinada tripla MMCDs	MTX + SSZ + HCQ.
MMCDbio	Medicamentos modificadores do curso da doença biológicos incluindo anti-TNF ou não anti-TNF.
Biológicos anti-TNF	Adalimumabe, certolizumabe pegol, etanercepte, golimumabe e infliximabe.
Biológicos não anti-TNF	Abatacepte, rituximabe e tocilizumabe.
Glicocorticoides orais em doses baixas	≤ 10 mg/dia de prednisona (ou equivalente).
Glicocorticoides orais em doses altas	> 10 mg/dia a ≤ 60 mg/dia de prednisona (ou equivalente) com redução rápida da dose.
Glicocorticoide em curto prazo	< 3 meses de tratamento.
Glicocorticoide intravenoso	Metilprednisolona.
Imunossupressores	Azatioprina, ciclosporina e ciclofosfamida
AINE	Anti-inflamatórios não esteroidais (AINE): naproxeno e ibuprofeno
Analgésicos	Paracetamol e dipirona.

\*HCQ, hidroxicloroquina; LEF, leflunomida; MTX, metotrexato; SSZ, sulfassalazina; TNF, fator de necrose tumoral. Fonte: Brasil, 2021, p.11.

Os AINEs e AIEs, inibidores da lipoxigenase e (DARMDs) são medicamentos clássicos muito utilizados no tratamento de doenças inflamatórias como a AR por minimizar a inflamação e reduzir o processo algico (PRASAD et al., 2023). Os anti-inflamatórios esteroidais (AIE) ou hormonais (prednisona, hidrocortisona, prednisolona, dexametasona), também conhecidos como glicocorticoides, têm maior potência e eficácia que os AINE, na inflamação e imunossupressão (BULLOCK et al., 2018), e com a capacidade de retardar o aparecimento das erosões ósseas, devido aos seus efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores, porém apresentam maiores efeitos deletérios (HUA; BUTTGEREIT; COMBE, 2020).

Os AIEs inibem a expressão das substâncias inflamatórias ou promovem a redução da transcrição gênica capazes de codificar COX-2, fosfolipase A2, citocinas pro-inflamatórias, como por exemplo: IL-1, TNF e iNOS (DEL GROSSI MOURA et al., 2018). Embora os AIEs tenham diversas vantagens, como o baixo custo e grande efetividade, a sua utilização prolongada como no tratamento da AR está associada a efeitos colaterais que incluem ganho de peso, retenção de água, fraqueza muscular, diabetes, fragilidade óssea e síndrome de Cushing (RADU; BUNGAU, 2021).

Os DMARDs como o metotrexato (MTX), leflunomida (LEF), hidroxicloroquina (HCQ) e sulfassalazina (SSZ) são agentes farmacológicos utilizados para promover a remissão, suprimindo a atividade autoimune e retardando ou prevenindo a degeneração articular (WANG et al., 2021).

As DMARDs foram classificadas como DMARDs sintéticas convencionais (csDMARDs), DMARDs biológicas (bDMARDs) e DMARDs sintéticas direcionadas (tsDMARDs) capazes de

deter ou retardar a progressão da doença promovendo modificações no seu curso (BULLOCK et al., 2018). O tratamento deve ser iniciado o mais precocemente possível, pois as DMARDs são fármacos de ação lenta com início tardio entre 6 semanas e 6 meses (PRASAD et al., 2023).

Apesar dos fármacos DMARDs apresentarem resultados satisfatórios no tratamento da AR modificando o curso da doença, estes possuem diversas contraindicações (RADU; BUNGAU, 2021), sendo as mais comuns: hipersensibilidade ao medicamento, classe ou componentes; tuberculose; infecção bacteriana; infecção fúngica; infecção por herpes zoster ativa; hepatites B ou C aguda (BYWALL et al., 2020). Ainda apresentam efeitos adversos que devem ser monitorados durante o tratamento (SMOLEN et al., 2018) como: anemia; leucopenia ou trombocitopenia; elevação de Aspartato Aminotransferase/Transaminase glutâmico-oxalacética (AST/TGO), Alamina aminotransferase/Transaminase glutâmico-oxalacética (ALT/TGP) (DING et al., 2023).

O tratamento farmacológico da AR inclui alívio sintomático da doença, e medicamentos como AINEs são utilizados por reduzirem a inflamação e o processo algico, por inibirem a síntese de prostaglandinas, mediadores inflamatórios, envolvidos na vasodilatação, edema, febre e hiperalgesia (SMOLEN et al., 2018). A utilização de AINEs no tratamento farmacológico da AR, apesar de relevante efeito anti-inflamatório, não evitam as deformidades articulares (BYWALL et al., 2020).

Os AINEs (naproxeno, ibuprofeno, diclofenaco, coxibes) são conhecidos pela sua atividade anti-inflamatória, antipirética e analgésica (MCWILLIAMS; WALSH, 2017), e apresentam como mecanismo de ação inibição das enzimas ciclooxigenases (COX: COX-1 e COX-2), especialmente a COX-2, que está aumentada durante a inflamação (RADU; BUNGAU, 2021).

No entanto, há o risco de efeitos adversos, uma vez que a COX-1 é responsável pela produção de PG que está relacionada à inflamação e ao equilíbrio homeostático, e a inibição desta enzima e produção de PGs pode levar a sangramento, ulceração gastrointestinal, insuficiência renal, insuficiência cardíaca, erupções cutâneas, tonturas, confusão e convulsões (DEL GROSSI MOURA et al., 2018).

Alguns destes efeitos podem ser evitados com o uso de AINEs seletivos para COX-2 (celecoxibe, rofecoxibe, valdecoxibe), anti-inflamatórios com menor risco de desenvolvimento de úlcera gástrica (PEREIRA-LEITE et al., 2017). No entanto, podem aumentar o risco de eventos cardiovasculares por desenvolvimento de trombose vascular, pois bloqueiam seletivamente a COX-2, reduzindo a produção de PGI<sub>2</sub>, importante anti-agregante plaquetário e por não inibir a COX-1, há um desequilíbrio na produção de TXA<sub>2</sub>, importante mediador da vasoconstrição e de agregação plaquetária (PEREIRA-LEITE et al., 2017).

Apesar das várias opções disponíveis, os AINEs apresentam limitações (SMOLEN et al., 2018) que podem comprometer o tratamento da AR como efeitos deletérios gastrointestinais graves, eventos tromboembólicos, toxicidade hepática e renal (WANG et al., 2023).

Diante do exposto, mesmo com a evolução no tratamento da AR, os medicamentos atuais ainda possuem limitações por seus efeitos deletérios ou por não promoverem a resposta adequada em alguns pacientes, além de não atingir a remissão completa da doença. Assim, há uma busca por opções terapêuticas para AR que possam contribuir para uma melhora significativa para os pacientes com a doença, descobrindo novos alvos moleculares e /ou novos agentes terapêuticos eficazes com menores efeitos colaterais.

## **2.4 Protótipos de Novos Fármacos Seletivos COX-2**

As pesquisas por novos protótipos seletivos para COX-2 são constantes, entre as estratégias de síntese com foco em agentes terapêuticos com eficácia anti-inflamatória e perfil de segurança aprimorado (AR et al., 2020), que supere o risco de cardiotoxicidade dos coxibes, e que apresentem menores efeitos tóxicos gastrointestinais que os AINES (FELIPE et al., 2022).

As modificações moleculares, como a hibridização molecular e o bioisosterismo, são estratégias de síntese de fármacos, que transformam a estrutura química de compostos conhecidos, naturais ou sintéticos, com validada atividade biológica, visando otimizar os perfis farmacodinâmico e/ou farmacocinético (ETIENNE; PEREIRA DIAS VIEGAS; VIEGAS JR., 2021).

A hibridização molecular é uma técnica de modificação molecular que pode ser utilizada com objetivo de um desenho aprimorado de fármacos eficazes, com melhor perfil de segurança e mínimos efeitos adversos (ARORA et al., 2020). Já o bioisosterismo é definido como a substituição de um átomo ou grupo de átomos presentes em um composto bioativo por outros que possuam semelhanças entre si, eletrônicas ou espaciais, compartilhando propriedades biológicas (MEANWELL, 2021).

A busca por novos fármacos ainda é um grande desafio para a indústria farmacêutica. Nesse sentido, a síntese de compostos surgiu como alternativa à utilização de plantas medicinais (SHAHRASBI et al., 2018). O uso de produtos naturais como matriz para modificação molecular é outra abordagem potencial no processo de descoberta de anti-inflamatórios com efeito dual na inibição das enzimas COX e LOX (PEREIRA-LEITE et al., 2017).

Entre os produtos naturais destacam-se as neolignanas, como veraguensina, grandisina e machilina G, que exibem diversas atividades biológicas, como anti-inflamatória, anti-hiperalgésica, antioxidante, neuroprotetora e antiparasitária (WU et al., 2005; CASSAMALE et al., 2016; COSTA et al., 2016; FILHO et al., 2010; NEVES et al., 2019; TREFZGER et al., 2019), além de inibição do

fator de ativação plaquetária (PAF) (YOUNG JUNG et al., 1998) e inibição da síntese de NO (KONISHI et al., 2005), podendo ser protótipos promissores a novos candidatos a fármacos anti-inflamatórios utilizando estratégias de modificação molecular (FELIPE et al., 2022).

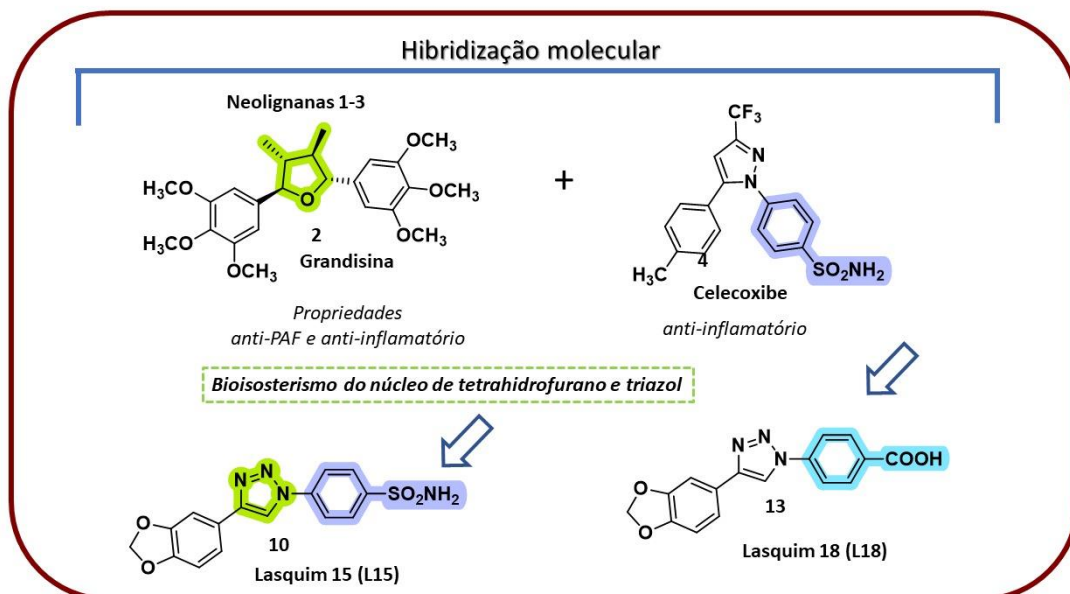
A estrutura de inibidores específicos COX-2, como o celecoxibe, apresenta uma subunidade aril-pirazol-aryl inspirando o desenho e síntese de outros inibidores da COX-2 (WERMUTH, 2011), possibilitando o uso do bioisosterismo como estratégia de modificação molecular (LOKWANI et al., 2015), que gera protótipos a partir de estruturas líderes, com atividade biológica comprovada (ARORA et al., 2020).

As modificações que incluem os anéis 1,2,3-triazólicos estão presentes em diversos compostos com atividades biológicas e estes vêm sendo amplamente estudados na descoberta de novos agentes anti-inflamatórios (DHEER; SINGH; SHANKAR, 2017). A literatura descreve o desenvolvimento de novos fármacos triazólicos com atividades biológicas comprovadas como anti-HIV, antimicrobiana antifúngica, anticancerígena, anti-hipertensiva, anticolinérgica e anti-inflamatória (WERMUTH, 2011; H. ZHOU; WANG, 2012; FELIPE et al., 2022).

O núcleo 1,2,3-triazóis são heterociclos promissores na descoberta de novos agentes anti-inflamatórios e principal interesse sobre o núcleo diz respeito às suas características estruturais intrínsecas, como polaridade, rigidez, possibilidade de aceitar ligações de hidrogênio e resistência ao metabolismo (DHEER; SINGH; SHANKAR, 2017). Ainda, diminuem o Log P das moléculas modificadas, melhorando sua dissolução no meio aquoso e permitem sintetizar uma variedade de compostos auxiliando de forma efetiva nos estudos de relação estrutura-atividade (FELIPE et al., 2022).

Os compostos lignânicos naturais da família da Grandisina e Veraguensina possuem atividade anti-inflamatória e antinociceptiva já relatadas (CARVALHO et al., 2010; FILHO et al., 2010), porém apresentam log P considerados altos, com conseqüente baixa capacidade de dissolução em água, o que limita o uso destes por via oral (CASSAMALE et al., 2016).

Neste sentido, a **figura 5** mostra o planejamento estrutural, realizado por nosso grupo de pesquisa de análogos triazólicos das lignanas grandisina (GRA) e veraguensina (VER) hibridizados com uma parte da estrutura do celecoxibe, associados ao grupamento ácido carboxílico (COOH) ou sulfonamida (SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), com intuito de sintetizar protótipos para minimizar a inflamação e a hiperalgesia nos processos agudos e crônicos da AR, tendo como diferencial maior segurança gástrica e cardiovascular.



**Figura 5.** Projeto de novos híbridos derivados de neolignanas-celecoxibe (L15 e L18) (Felipe et al, 2022)

O tratamento para AR objetiva o controle da doença, a regressão das limitações funcionais assim como a prevenção de complicações e os danos estruturais, além da melhora da qualidade de vida do paciente. Embora as opções de tratamento tenham evoluído nos últimos anos, a completa remissão da AR ainda é distante. Diante desta realidade, se faz necessário a busca e o desenvolvimento de novas moléculas que tenham potencial para novos protótipos terapêuticos, e os estudos na área têm focado em estratégias que busquem novos fármacos com atividades anti-inflamatórias e analgésicas, que apresentem menor riscos de efeitos colaterais dos AINEs que já estão disponíveis no mercado.

## **OBJETIVOS**

---

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de análogos triazólicos híbridos de neolignana–celecoxibe, Lasquim 15 (L15) e Lasquim 18 (L18), na inflamação crônica utilizando um modelo experimental de artrite, bem como avaliar as funções celulares dos macrófagos envolvidos nesse processo.

#### 3.2 Objetivos Específicos

Avaliar a atividade de análogos triazólicos híbridos de neolignana–celecoxibe L15 e L18 nos modelos experimentais de:

a) *In vivo*: Artrite induzida por Zymosan (AZy)

- Analisar a hiperalgesia mecânica em animais submetidos ao modelo de AZy;
- Analisar o Edema articular de joelho em animais submetidos ao modelo de AZy;
- Analisar a infiltração leucocitária na cavidade articular em animais submetidos ao modelo de AZy;
- Analisar alterações histopatológicas no tecido da cavidade articular de animais submetidos ao modelo de AZy;

b) *In vitro*

- Determinar a viabilidade celular de macrófagos por meio do ensaio do MTT;
- Avaliar o espriamento dos macrófagos peritoneais murinos;
- Avaliar a capacidade fagocítica dos macrófagos peritoneais murinos;
- Determinar a produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por macrófagos peritoneais murinos;
- Determinar a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais murinos;

## **REFERÊNCIAS**

---



#### 4 REFERÊNCIAS

AI, R. et al. Joint-specific DNA methylation and transcriptome signatures in rheumatoid arthritis identify distinct pathogenic processes. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 11849, 10 jun. 2016.

ALETAHA, D. et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Arthritis & Rheumatism**, v. 62, n. 9, p. 2569–2581, set. 2010.

ALETAHA, D.; ALASTI, F.; SMOLEN, J. S. Rheumatoid factor, not antibodies against citrullinated proteins, is associated with baseline disease activity in rheumatoid arthritis clinical trials. **Arthritis Research & Therapy**, v. 17, n. 1, p. 229, 26 dez. 2015.

ALVES, J. E. D. O. et al. Mecanismos Fisiopatológicos Da Nocicepção E Bases Da Analgesia Perioperatória Em Pequenos Animais. **Acta Biomédica Brasiliensia**, v. 8, n. 1, p. 56, 21 jul. 2017.

ANDERSEN, N. S. et al. Methotrexate prodrugs sensitive to reactive oxygen species for the improved treatment of rheumatoid arthritis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 156, p. 738–746, 5 ago. 2018.

ANDRADE, T. F.; DIAS, S. R. C. Etiologia da artrite reumatoide: revisão bibliográfica. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 4, p. 3698–3718, 2019.

ARORA, M. et al. Structural investigation on the selective COX-2 inhibitors mediated cardiotoxicity: A review. **Life Sciences**, v. 251, p. 117631, jun. 2020.

ASQUITH, D. L. et al. Animal models of rheumatoid arthritis. **European Journal of Immunology**, ago. 2009.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**. Elsevier B.V., , 16 out. 2009.

BASSI, G. S. et al. Spinal GABA-B receptor modulates neutrophil recruitment to the knee joint in zymosan-induced arthritis. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 389, n. 8, p. 851–861, 1 ago. 2016.

BAUEROVA, K.; BEZEK, A. Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. **General physiology and biophysics**, v. 18 Spec No, p. 15–20, 1 nov. 1999.

BELLAVITA, R. et al. Temporin L-derived peptide as a regulator of the acute inflammatory response in zymosan-induced peritonitis. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 123, 1 mar. 2020.

BEZERRA, M. M. et al. Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, n. 1, p. 172–182, jan. 2004.

BINKER, M. G. et al. Cytoplasmic Linker Protein-170 Enhances Spreading and Phagocytosis in Activated Macrophages by Stabilizing Microtubules1. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 6, p. 3780–3791, 15 set. 2007.

BONIAKOWSKI, A. E. et al. Macrophage-Mediated Inflammation in Normal and Diabetic Wound Healing. **The Journal of Immunology**, v. 199, n. 1, p. 17–24, 1 jul. 2017.

BRASIL: Ministério da Saúde. PORTARIA CONJUNTA Nº 16, DE 03 DE SETEMBRO DE 2021: Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Artrite Reumatoide, disponível em: [http://portal-portaria-conjunta-no-16\\_pcdt\\_ar-e-aij\\_.pdf\(www.gov.br\)](http://portal-portaria-conjunta-no-16_pcdt_ar-e-aij_.pdf(www.gov.br)) Acesso: 12 de dezembro de 2023 11:00.

BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; SERHAN, C. N. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity Cell Press*, 20 mar. 2014.

BULLOCK, J. et al. Rheumatoid Arthritis: A Brief Overview of the Treatment. **Medical Principles and Practice**, v. 27, n. 6, p. 501–507, 2018.

BYWALL, K. S. et al. Patient preferences on rheumatoid arthritis second-line treatment: a discrete choice experiment of Swedish patients. **Arthritis Research & Therapy**, v. 22, n. 1, p. 288, 19 dez. 2020.

CARVALHO, A. A. V. et al. Antinociceptive and antiinflammatory activities of grandisin extracted from *Virola surinamensis*. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 1, p. 113–118, jan. 2010.

CASSAMALE, T. B. et al. Synthesis and Antitrypanosomastid Activity of 1,4-Diaryl-1,2,3-triazole Analogues of Neolignans Veraguensin, Grandisin and Machilin G. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 7, p. 1217–1228, 1 jul. 2016.

CASTANHEIRA, F. V. S.; KUBES, P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. **Blood**, v. 133, n. 20, p. 2178–2185, 16 maio 2019.

CHEN, L.; YANG, G.; GROSSER, T. **Prostanoids and inflammatory pain**. Prostaglandins and Other Lipid Mediators. **Anais...** jul. 2013.

CHEN, Z. et al. **Anti-inflammatory and immune-regulatory cytokines in rheumatoid arthritis**. **Nature Reviews Rheumatology** Nature Publishing Group, 1 jan. 2019.

CHOY, E. H. S.; PANAYI, G. S. Cytokine Pathways and Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 12, p. 907–916, 22 mar. 2001.

COFTA, S. et al. Oxidative stress markers in the blood of persons with different stages of obstructive sleep apnea syndrome. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 59 Suppl 6, p. 183–190, 1 jan. 2009.

CORBACHO, M. I.; DAPUETO, J. J. Assessing the functional status and quality of life of patients with rheumatoid arthritis. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 50, n. 1, p. 31–43, 2010.

COSTA, E. et al. Antileishmanial Activity and Structure-Activity Relationship of Triazolic Compounds Derived from the Neolignans Grandisin, Veraguensin, and Machilin G. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 802, 20 jun. 2016.

COSTA, J. DE O. et al. Tratamento da artrite reumatoide no Sistema Único de Saúde, Brasil: Gastos com infliximabe em comparação com medicamentos modificadores do curso da doença sintéticos, 2003 a 2006. **Cadernos de Saude Publica**, v. 30, n. 2, p. 283–295, 2014.

COUTAUX, A. et al. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, n. 5, p. 359–371, out. 2005.

DE OLIVEIRA, S.; ROSOWSKI, E. E.; HUTTENLOCHER, A. Neutrophil migration in infection and wound repair: Going forward in reverse. **Nature Reviews Immunology**. Nature Publishing Group, 1 jun. 2016.

DEL GROSSIMOURA, M. et al. Use of steroid and nonsteroidal anti-inflammatories in the treatment of rheumatoid arthritis. **Medicine**, v. 97, n. 41, p. e12658, out. 2018.

DHEER, D.; SINGH, V.; SHANKAR, R. Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. **Bioorganic Chemistry**, v. 71, p. 30–54, abr. 2017.

DING, Q. et al. Signaling pathways in rheumatoid arthritis: implications for targeted therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**. Springer Nature, 1 dez. 2023.

DMYTRIIEV, K. D.; MARCHUK, O. V.; DMYTRIIEV, K. D. Allodynia and hyperalgesia: review. **Pain medicine**, v. 3, n. 2, p. 24–28, 6 set. 2018.

DUDICS, S. et al. Natural products for the treatment of autoimmune arthritis: Their mechanisms of action, targeted delivery, and interplay with the host microbiome. **International Journal of Molecular Sciences**, MDPI AG, 1 set. 2018.

ELSHABRAWY, H. A. et al. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. **Angiogenesis**. Kluwer Academic Publishers, 1 out. 2015.

ETIENNE, R.; PEREIRA DIAS VIEGAS, F.; VIEGAS JR., C. Pathophysiological Aspects of Inflammation and Drug Design: an Updated Overview. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 1, p. 167–191, 2021.

FARRELL, A. J.; BLAKE, D. R. Nitric oxide. **Annals of the Rheumatic Diseases**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://ard.bmj.com/>>.

FELIPE, J. L. et al. Anti-inflammatory, ulcerogenic and platelet activation evaluation of novel 1,4-diaryl-1,2,3-triazole neolignan-celecoxib hybrids. **Bioorganic Chemistry**, v. 119, 1 fev. 2022.

FILHO, A. A. DA S. et al. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) in mice and rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 9, p. 1179–1184, 18 fev. 2010.

FIRESTEIN, G. S.; MCINNES, I. B. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **Immunity**. Cell Press, , 21 fev. 2017.

FREIRE, M. O.; VAN DYKE, T. E. Natural resolution of inflammation. **Periodontology 2000**, v. 63, n. 1, p. 149–164, 2013.

GEGOUT, P. et al. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: Effects on joint inflammation and cartilage metabolism. **Life Sciences**, v. 55, n. 17, p. PL321–PL326, jan. 1994.

GILROY, D. W. et al. Inflammatory Resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 5, p. 401–416, maio 2004.

GONZÁLEZ-DEOLANO, D.; ÁLVAREZ-TWOSE, I. Mast cells as key players in allergy and inflammation. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**. ESMON Publicidad S.A., 2018.

GUAZELLI, C. F. S. et al. Quercetin attenuates zymosan-induced arthritis in mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 102, p. 175–184, 1 jun. 2018.

GUERRERO, A. T. G. et al. Toll-like receptor 2/MyD88 signaling mediates zymosan-induced joint hypernociception in mice: Participation of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CXCL1/KC. **European Journal of Pharmacology**, v. 674, n. 1, p. 51–57, 5 jan. 2011.

H. ZHOU, C.; WANG, Y. Recent Researches in Triazole Compounds as Medicinal Drugs. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 239–280, 1 jan. 2012.

HOOVESTOL, R. A.; MIKULS, T. R. Environmental Exposures and Rheumatoid Arthritis Risk. **Current Rheumatology Reports**, v. 13, n. 5, p. 431–439, 23 out. 2011.

HUA, C.; BUTTGEREIT, F.; COMBE, B. Glucocorticoids in rheumatoid arthritis: current status and future studies. **RMD Open**, v. 6, n. 1, p. e000536, 7 jan. 2020.

JAIN, N.; MOELLER, J.; VOGEL, V. Mechanobiology of Macrophages: How Physical Factors Coregulate Macrophage Plasticity and Phagocytosis. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 21, p. 267–297, 2019.

JAIN, P.; PANDEY, R.; SHUKLA, S. S. **Inflammation: Natural Resources and Its Applications**. New Delhi: Springer India, 2015.

KARLSON, E. W. et al. Association of Environmental and Genetic Factors and Gene-Environment Interactions With Risk of Developing Rheumatoid Arthritis. **Arthritis Care & Research**, v. 65, n. 7, p. 1147–1156, jul. 2013.

KASSUYA, C. A. L. Aspectos gerais da inflamação e da dor. Em: DOURADOS MS: EDITORA UFGD, 2013. p. 102.

KEYSTONE, E. C. et al. Zymosan—Induced Arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 20, n. 7, p. 1396–1401, set. 1977.

KONISHI, T. et al. Neolignans from Piper futokadsura and Their Inhibition of Nitric Oxide Production. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 1, p. 121–124, 2005.

KULESZA, A.; PACZEK, L.; BURDZINSKA, A. The Role of COX-2 and PGE2 in the Regulation of Immunomodulation and Other Functions of Mesenchymal Stromal Cells. **Biomedicines**, v. 11, n. 2, p. 445, 3 fev. 2023.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; ASTER, J. **Robbins & Cotran, patologia: bases patológicas das doenças**. 9<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

LASKIN, D. L. et al. Macrophages and tissue injury: Agents of defense or destruction? **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 51, p. 267–288, 10 fev. 2011.

LI, C. et al. Role of Resolvins in the Inflammatory Resolution of Neurological Diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 8 maio 2020.

LIU, T. et al. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy** Springer Nature, 2017.

LOESER, J. D.; TREEDE, R.-D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473–477, 31 jul. 2008.

LOKWANI, D. et al. Structure Based Library Design (SBLD) for new 1,4-dihydropyrimidine scaffold as simultaneous COX-1/COX-2 and 5-LOX inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 15, p. 4533–4543, ago. 2015.

LOUZADA-JUNIOR, P. et al. Análise descritiva das características demográficas e clínicas de pacientes com artrite reumatóide no estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 47, n. 2, p. 84–90, abr. 2007.

MA, W.-T. et al. The Role of Monocytes and Macrophages in Autoimmune Diseases: A Comprehensive Review. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 24 maio 2019.

MALMSTRÖM, V.; CATRINA, A. I.; KLARESKOG, L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 1, p. 60–75, 5 jan. 2017.

MARCONI, Eloá Moreira. Exercícios de vibração de corpo inteiro podem beneficiar indivíduos com osteoartrite do joelho com relação à dor e a capacidade funcional de membros inferiores. 2017.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase: Aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 927–930, 1994.

MATEEN, S. et al. Increased reactive oxygen species formation and oxidative stress in rheumatoid arthritis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, 1 abr. 2016.

MATOS LEITÃO, M. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of aqueous extract obtained from *Serjania marginata* Casar leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 304, p. 116018, mar. 2023.

MCGARRY, T. et al. **Hypoxia, oxidative stress and inflammation**. **Free Radical Biology and Medicine**. Elsevier Inc., 1 set. 2018.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 23, p. 2205–2219, 2011.

MCWILLIAMS, D. F.; WALSH, D. A. Pain mechanisms in rheumatoid arthritis. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 35 Suppl 107, n. 5, p. 94–101, 2017.

MEANWELL, N. A. The Design and Application of Bioisosteres in Drug Design. Em: **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**. [s.l.] Wiley, 2021. p. 1–81.

MEDZHITOV, R. **Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame**. CellElsevier B.V., 2010.

MENDEL NZOGANG, P.; BORIS DONKENG, M. Neuroprotection: The Way of Anti-Inflammatory Agents. Em: **Neuroprotection - New Approaches and Prospects**. [s.l.] IntechOpen, 2020.

MONTI, S. et al. Factors influencing the choice of first- and second-line biologic therapy for the treatment of rheumatoid arthritis: real-life data from the Italian LORHEN Registry. **Clinical Rheumatology**, v. 36, n. 4, p. 753–761, 5 abr. 2017.

MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. Designed Multiple Ligands. An Emerging Drug Discovery Paradigm. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 21, p. 6523–6543, 1 out. 2005.



MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. **Exploring the full spectrum of macrophage activation.** *Nature Reviews Immunology*, dez. 2008.

MURAKAMI, Y. et al. **Innate immune response in retinal homeostasis and inflammatory disorders.** *Progress in Retinal and Eye Research.* Elsevier Ltd, 1 jan. 2020.

MURRAY, P. J. Macrophage Polarization. *Annual Review of Physiology*, v. 79, n. 1, p. 541–566, 10 fev. 2017.

NEVES, A. F. et al. Peripheral Inflammatory Hyperalgesia Depends on P2X7 Receptors in Satellite Glial Cells. *Frontiers in Physiology*, v. 11, 25 maio 2020.

NEVES, A. R. et al. Effect of isoxazole derivatives of tetrahydrofuran neolignans on intracellular amastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: A structure–activity relationship comparative study with triazole-neolignan-based compounds. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 94, n. 6, p. 2004–2012, 12 dez. 2019.

OLSSON, A. R. Occupations and exposures in the work environment as determinants for rheumatoid arthritis. *Occupational and Environmental Medicine*, v. 61, n. 3, p. 233–238, 1 mar. 2004.

PATANI, G. A.; LAVOIE, E. J. Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. *Chemical Reviews*, v. 96, n. 8, p. 3147–3176, 1 jan. 1996.

PENIDO, C. et al. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. *Inflammation Research*, v. 55, n. 11, p. 457–464, nov. 2006.

PEREIRA, D. C. et al. Network Dos Mediadores Lipídicos Com Doenças Autoimunes: Uma Revisão De Literatura. *RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar - ISSN 2675-6218*, v. 2, n. 4, p. e24238, 19 maio 2021.

PEREIRA-LEITE, C. et al. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Therapy: A Journey Toward Safety. *Medicinal Research Reviews.* John Wiley and Sons Inc., 1 jul. 2017.

PETRELLI, F. et al. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: one year in review 2022. **Pathogenesis of rheumatoid arthritis: one year in review 2022**, v. 40, n. 3, p. 475–482, 22 mar. 2022.

PHULL, A. R. et al. Oxidative stress, consequences and ROS mediated cellular signaling in rheumatoid arthritis. **Chemico-Biological Interactions**. Elsevier Ireland Ltd, 1 fev. 2018.

PRASAD, P. et al. Rheumatoid arthritis: advances in treatment strategies. **Molecular and Cellular Biochemistry** Springer, 1 jan. 2023.

QUINONEZ-FLORES, C. M. et al. **Oxidative Stress Relevance in the Pathogenesis of the Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review**. **BioMed Research International** Hindawi Limited, 2016.

RADU, A. F.; BUNGAU, S. G. **Management of rheumatoid arthritis: An overview**. **Cells** MDPI, , 1 nov. 2021.

ROCHA, F. et al. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v. 48, p. 485–490, 1 out. 1999.

ROCHA, F. et al. Effect of nitric oxide syntase in articular inflammatory pain and cellular influx of zymosan-induced arthritis in rats. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 43, p. 206–217, 1 ago. 2003.

RONCHETTI, S.; MIGLIORATI, G.; DELFINO, D. V. **Association of inflammatory mediators with pain perception**. **Biomedicine and Pharmacotherapy** Elsevier Masson SAS, 1 dez. 2017.

SAFERDING, V.; BLÜML, S. Innate immunity as the trigger of systemic autoimmune diseases. **Journal of Autoimmunity**, v. 110, p. 102382, jun. 2020.

SCHNEIDER, A. H. et al. Estradiol replacement therapy regulates innate immune response in ovariectomized arthritic mice. **International Immunopharmacology**, v. 72, p. 504–510, 1 jul. 2019.

SEIXAS, D. et al. Pain and wrist joint in rheumatoid arthritis: The impact on functional capacity. **Revista de Enfermagem Referencia**, v. 6, n. 1, 1 dez. 2022.

SENA, L. et al. C3 Gene Functional Polymorphisms and C3 Serum Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis. **Immunological Investigations**, v. 50, n. 8, p. 1027–1041, 2021.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; DALLI, J. The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 3, p. 200–215, maio 2015.

SERHAN, C. N.; ROSA, X.; JOUVENE, C. Novel mediators and mechanisms in the resolution of infectious inflammation: evidence for vagus regulation. **Journal of Internal Medicine**, v. 286, n. 3, p. 240–258, 18 set. 2019.

SHAHRASBI, M. et al. Design, Synthesis and Biological Evaluation of New Imidazo[2,1-b]Thiazole Derivatives as Selective COX-2 Inhibitors. **Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR**, v. 17, n. 4, p. 1288–1296, 2018.

SILVA JÚNIOR, F. S.; ROCHA, F. A. C. Artrite induzida por Zymosan em ratos—Mecanismos envolvidos na hipernocicepção e finalise da cartilagem articular. **Acta Reum. Port**, v. 31, p. 143–149, 2006.

SMOLEN, J. S. et al. Rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, 8 fev. 2018.

SOUZA, K. A. DE O.; SOUZA, L. E. P. F. DE; LISBOA, E. S. Ações judiciais e incorporação de medicamentos ao SUS: a atuação da Conitec. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 119, p. 837–848, out. 2018.

TANG, M. et al. **Pharmacological Aspects of Natural Quercetin in Rheumatoid Arthritis. Drug Design, Development and Therapy**. Dove Medical Press Ltd, 2022.

TARDITO, S. et al. **Macrophage M1/M2 polarization and rheumatoid arthritis: A systematic review. Autoimmunity Reviews**. Elsevier B.V., 1 nov. 2019.

TREFZGER, O. S. et al. Design, synthesis and antitrypanosomatid activities of 3,5-diaryl-isoxazole analogues based on neolignans veraguensin, grandisin and machilin G. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 93, n. 3, p. 313–324, mar. 2019.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. The mechanism of action of aspirin. **Thrombosis Research**, v. 110, n. 5–6, p. 255–258, jun. 2003.

VENKATESHA, S. H. et al. Immunomodulation of Autoimmune Arthritis by Herbal CAM. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1–13, 2011.

VERRI, W. A. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology and Therapeutics**, out. 2006.

WALSH, D. A.; MCWILLIAMS, D. F. Mechanisms, impact and management of pain in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 10, p. 581–592, 27 out. 2014.

WANG, S. et al. Advances in experimental models of rheumatoid arthritis. **European Journal of Immunology** John Wiley and Sons Inc, 1 jan. 2023.

WANG, Y. et al. Traditional herbal medicine: Therapeutic potential in rheumatoid arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**. Elsevier Ireland Ltd, 28 out. 2021.

WANG, Y.; WU, H.; DENG, R. Angiogenesis as a potential treatment strategy for rheumatoid arthritis. **European Journal of Pharmacology**. Elsevier B.V., 5 nov. 2021.

WERMUTH, C. G. **The practice of medicinal chemistry**. 3rd. ed. [s.l.] Academic Press, 2011.

WONG, V. K. W. et al. Ca<sup>2+</sup> signalling plays a role in celastrol-mediated suppression of synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients and experimental arthritis in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n. 16, p. 2922–2944, 1 ago. 2019.

WU, J. et al. Bioactive Tetrahydrofuran Lignans from *Peperomia d indygulensis*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 11, p. 1656–1660, 1 nov. 2005.

YANG, S.; ZHAO, M.; JIA, S. Macrophage: Key player in the pathogenesis of autoimmune diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 14 fev. 2023.

YEUNG, Y. T. et al. Signaling Pathways in Inflammation and Anti-inflammatory Therapies. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 14, p. 1449–1484, 13 jul. 2018.

YI, Y.-S.; LEE, T. J. Role of Inflammasomes in Inflammatory and Infectious Diseases. **Mediators of Inflammation**, v. 2021, p. 1–2, 2 ago. 2021.

YOUNG JUNG, K. et al. Magnone A and B, Novel Anti-PAF Tetrahydrofuran Lignans from the Flower Buds of *Magnolia fargesii*. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>, 1998.

ZHANG, H. et al. Synovial macrophage M1 polarisation exacerbates experimental osteoarthritis partially through R-spondin-2. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 77, n. 10, p. 1524–1534, out. 2018.

ZHANG, S. et al. Remodeling articular immune homeostasis with an efferocytosis-informed nanoimitator mitigates rheumatoid arthritis in mice. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 817, 13 fev. 2023.

ZHANG, Y. et al. The Presence of High Levels of Circulating Trimethylamine N-Oxide Exacerbates Central and Peripheral Inflammation and Inflammatory Hyperalgesia in Rats Following Carrageenan Injection. **Inflammation**, v. 42, n. 6, p. 2257–2266, 5 dez. 2019.

## CAPÍTULO II

---



## 1,4-Diaryl-1,2,3-triazole neolignan–celecoxib hybrids inhibit experimental arthritis induced by zymosan

Josylen L. Felipe<sup>1</sup> · Iluska S. Bonfá<sup>1</sup> · Paloma K. M. B. Lossavaro<sup>1</sup> · Joyce S. Lencina<sup>1</sup> · Diego B. Carvalho<sup>2</sup> · Luciane Candeloro<sup>3</sup> · Giovanni I. S. Ferreira<sup>3</sup> · Amarith R. das Neves<sup>2</sup> · Maria Inês L. Souza<sup>4</sup> · Saulo E. Silva-Filho<sup>1</sup> · Adriano C. M. Baroni<sup>2</sup> · Mônica C. Toffoli-Kadri<sup>1</sup>

Received: 6 June 2023 / Accepted: 14 September 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2023

### Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease that causes cartilage damage. Anti-inflammatories are widely used in the management of RA, but they can have side effects such as gastrointestinal and/or cardiovascular disorders. Studies published by our group showed that the synthesis of hybrid triazole analogs neolignan–celecoxib containing the substituent groups sulfonamide (**L15**) or carboxylic acid (**L18**) exhibited anti-inflammatory activity in an acute model of inflammation, inhibited expression of P-selectin related to platelet activation and did not induce gastric ulcer, minimizing the related side effects. In continuation, the present study evaluated the anti-inflammatory effects of these analogs in an experimental model of arthritis and on the functions of one of the important cells in this process, macrophages. Mechanical hyperalgesia, joint edema, leukocyte recruitment to the joint and damage to cartilage in experimental arthritis and cytotoxicity, spread of disease, phagocytic activity and nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide production by macrophages were evaluated. Pre-treatment with **L15** and **L18** reduced mechanical hyperalgesia, joint edema and the influx of leukocytes into the joint cavity after different periods of the stimulus. The histological evaluation of the joint showed that **L15** and **L18** reduced cartilage damage and there was no formation of rheumatoid *pannus*. Furthermore, **L15** and **L18** were non-cytotoxic. The analogs inhibited the spreading, the production of NO and hydrogen peroxide. **L15** decreased the phagocytosis. Therefore, **L15** and **L18** may be potential therapeutic prototypes to treat chronic inflammatory diseases such as RA.

**Keywords** Selective COX-2 inhibitors · Chronic inflammation · Macrophages · In vitro

### Abbreviations

ANOVA	Analysis of variance
CO <sub>2</sub>	Carbon dioxide
COX	Cyclooxygenase
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
GRA	Grandisin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogen peroxide
I.A.	Intra-articular
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
L15	Lasquim 15
L18	Lasquim 18
LOX	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharide bacterial
LTB <sub>4</sub>	Leukotrien B <sub>4</sub>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2 yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NF-κB	Factor nuclear kappa B

✉ Adriano C. M. Baroni  
adriano.baroni@ufms.br

✉ Mônica C. Toffoli-Kadri  
monica.kadri@ufms.br

<sup>1</sup> Laboratory of Pharmacology and Inflammation, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition, Federal University of Mato Grosso Do Sul, UFMS, Campo Grande, MS 79070-900, Brazil

<sup>2</sup> Laboratory of Synthesis and Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition, Federal University of Mato Grosso Do Sul, UFMS, Campo Grande, MS, Brazil

<sup>3</sup> Laboratory of Hystology, Institute of Biosciences, Federal University of Mato Grosso Do Sul, Campo Grande, MS, Brazil

<sup>4</sup> Department of Biophysiopharmacology, Institute of Biosciences, Federal University of Mato Grosso Do Sul, Campo Grande, MS, Brazil

NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory
NO	Nitric oxide
PBS	Buffered saline solution
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub>
PMN	Polymorphonuclear
RA	Rheumatoid arthritis
ROS	Reactive oxygen species
RNS	Reactive nitrogen species
SOD	Superoxide dismutase
TNF	Tumor necrosis factor
TLR	Toll-like receptors
TLR-1	Toll-like receptors-1
TLR-2	Toll-like receptors-2
TLR-6	Toll-like receptors-6
VER	Veraguensin
Zy	Zymosan

## Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is one of the most clinically relevant chronic inflammatory diseases, considered autoimmune, characterized by symmetrical synovitis that occurs preferentially in the peripheral joints of the feet and hands and is associated with infiltration of leukocytes in the joint cavity (Zhang et al. 2021). RA affects one or more joints and leads to progressive cartilage and bone destruction by the invasive hyperplastic synovial membrane and rheumatoid pannus, increasing the risk of joint disability and mortality (Tang et al. 2022). Joint inflammation promotes changes in the synovial membrane, hyperplasia of the synovial tissue, proliferation of blood vessels and cellular activation to produce mediators that facilitate the influx of inflammatory cells to the joint involved (Radu and Bungau 2021).

Chronic inflammation presents persistent tissue injury resulting from the non-resolution of the acute inflammatory phase and no restoring homeostasis (Buckley et al. 2014). It develops for a period of weeks or months and is characterized by tissue infiltration of mononuclear cells (Radu and Bungau 2021), such as macrophages, promoting tissue destruction, replacement of damaged tissue by connective tissue and angiogenesis, and presents modifications in RA (Ding et al. 2023).

Corticosteroids, non-steroidal anti-inflammatory (NSAID), immunosuppressants, and anti-rheumatic drugs are used to control the symptoms and evolution of RA (Wang et al. 2023). NSAIDs are widely marketed worldwide and are highly effective in treating inflammation and pain due to RA (Wong et al. 2019) by inhibiting cyclooxygenases enzymes (COX-1 and COX-2). COX-1 is constitutive, responsible for the maintenance of renal function, protection of gastric mucosa, and regulation of

platelet aggregation. COX-2 is inducible in inflammatory processes. COX-2 selective inhibitors show minor gastrointestinal side effects compared with NSAIDs, suggesting improved safety in long-term use. However, susceptible individuals or those with prolonged use exhibit cardiovascular problems, increased risk of thromboembolic events, and myocardial infarction (Nailwal and Doshi 2021).

In this context, triazole neolignan–celecoxib hybrid analogs were synthesized by our research group to obtain anti-inflammatory agents that are more effective and with less adverse reactions. Felipe et al. (2022) showed that these analogs (**L15** or **L18**) presented acute anti-inflammatory activity in an acute model of inflammation, inhibited glycoprotein expression (P-selectin) related to platelet activation, and were considered non-ulcerogenic. Therefore, this work aims to continue the studies about the effect of **L15** and **L18** on chronic inflammation in an experimental model of arthritis, as well as to evaluate the cellular functions of macrophages in the inflammatory process in search of a safe prototype drug with relevant anti-inflammatory properties and minor side effects for the treatment of chronic inflammatory diseases such as RA.

## Materials and methods

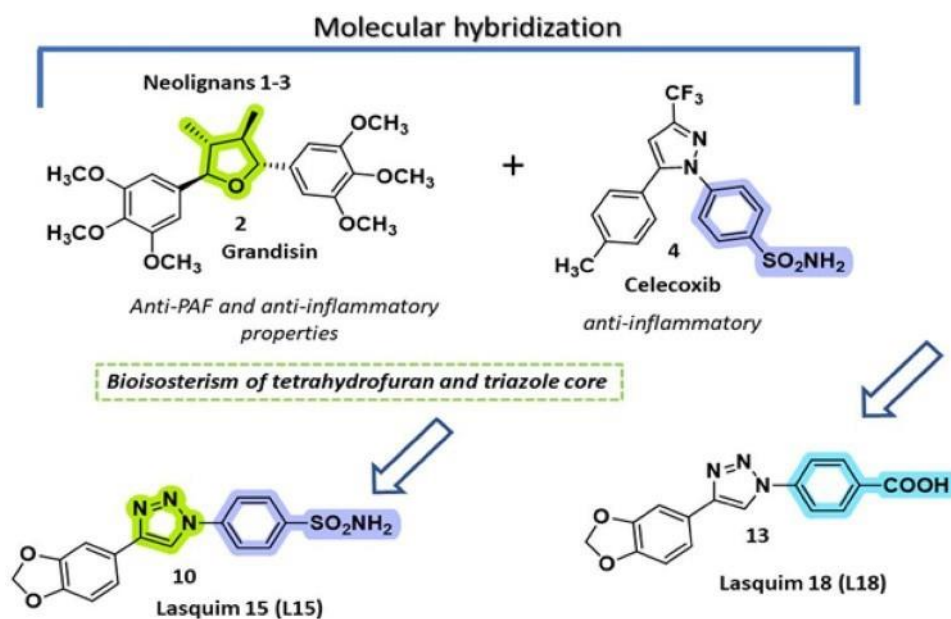
### Triazole compounds

The synthesis of triazole neolignan–celecoxib hybrid analogs with the sulfonamide group (–SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, **L15**) or its bioisoster carboxylic acid (–COOH, **L18**) was inspired by the scaffold of tetrahydrofuran neolignans, such as grandisin (Cassamale et al. 2016). These analogs were synthesized by the click chemistry approach and molecular modification strategies such as bioisosterism and molecular hybridization (Felipe et al. 2022) (Fig. 1).

### Animals

Male *Swiss* mice (25–30 g) were obtained from the Central Bioterium of the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS). Animals were maintained under standard laboratory environmental conditions with 12-h light/dark cycles, in a temperature-controlled room (22 °C ± 2 °C), with food (Nuvital CR) and water ad libitum. Six hours before the start of each experiment, the animals received only water to avoid food–drug interactions. After the experiments, mice were euthanized in a CO<sub>2</sub> chamber. The experiments were approved by the Animal Ethics Committee of UFMS (protocol number 1049/2019).

**Fig. 1** Design of new 1,4-diaryl-1,2,3-triazole of tetrahydrofuran neolignan–celecoxib hybrids (L15 and L18) (Felipe et al. 2022)



### Zymosan-induced arthritis model

The mice were distributed in groups ( $n = 5-7$  animals / group) and were intra-articularly injected with 10  $\mu\text{L}$  of zymosan solution (Zy, Sigma-Aldrich®, 200  $\mu\text{g}$ /knee joint, Sigma-Aldrich®) in the right knee joint of animals. The same volume of saline solution 0.9% was injected into the control group. Sixty minutes before Zy injection, the animals were treated with **L15** or **L18** (1, 3 and 10 mg/kg), celecoxibe (10 mg/kg, Sigma-Aldrich®, reference drug), or vehicle by the oral route (10 mL/kg, p.o). The animals were euthanized at 6 h and 7 and 21 days after Zy-induced arthritis. At the times of 7 and 21 days, the animals were also treated once a day for the whole period of the assay.

### Mechanical hyperalgesia in an experimental model of zymosan-induced arthritis

The assay was conducted according to Möller et al. 1998. Mechanical hyperalgesia was determined using an electronic von Frey analgesimeter (Insight®), 3 and 4 h after Zy injection. This device works as a pressure transducer, recording the applied force (g) until the paw withdrawal reflex. Results were expressed in force (g).

### Joint edema of the knee in an experimental model of zymosan-induced arthritis

Knee joint edema of animals was measured using a digital micrometer (Mitotoyo®) as described by Kuraoka-Oliveira et al. (2020). Values of knee joint edema were expressed by the difference between the diameter of the tested knee and

the contralateral knee, 4 and 6 h after Zy injection. Results were expressed in millimeters (mm).

### Determination of the leukocyte infiltrate into the joint cavity

The leukocyte infiltrate was evaluated at 6 h, 7 days, and 21 days after the Zy injection. The determination of leukocytes in the joint cavity followed the methodology described by Yamada et al. (2013). At first, the knee joint was exposed by surgical incision and washed twice with 5  $\mu\text{L}$  of buffered saline solution (PBS/ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA, Pro Analys®)). The joint lavage fluid was diluted in PBS/EDTA to a final volume of 50  $\mu\text{L}$  for the subsequent total leukocyte count, using a Neubauer chamber. Results were expressed as the number of leukocytes per joint cavity.

### Histological analysis

The histological analysis was performed 7 days after Zy injection as described by Yamada et al. (2013). The right knee joint was demineralized in a 10% formaldehyde solution for 3 days. Then, the formaldehyde solution was replaced by a saline solution with dissolved EDTA (3 g EDTA/30 mL) and stored in 70% ethanol. The samples were dehydrated using increasing serial ethanol solutions (70, 80, 90, and 100 GL), cleared in xylene, and embedded in paraffin. The samples were then serially sectioned (4  $\mu\text{m}$  thickness) using a rotating microtome (Leica® RM2245). All histological sections were stained with hematoxylin and eosin dyes (H&E). Slides were examined under an optical microscope (Olympus® BX41; 400x),



using a gradient rating scale of 0–2 according to the degradation cartilage (Table 1).

### Collection and counting of mice macrophages

Macrophages were obtained from the peritoneal cavity of mice, 96 h after intraperitoneal injection (i.p.) of 1 mL of sterile 3% thioglycollate solution (Sigma-Aldrich®). Animals were euthanized in a CO<sub>2</sub> chamber. The assay was performed in a laminar flow chamber, and the peritoneal cavity was washed with 3 mL of sterile saline solution (0.9% NaCl). Then, the peritoneal lavage was centrifuged and the supernatant was discarded. Cells were resuspended in RPMI culture medium (Sigma-Aldrich®) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich®). Cell concentration was adjusted to  $1 \times 10^5$  cells/well/assay.

### Cytotoxicity evaluation using the MTT assay

The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich®) assay was performed according to Mosmann (1983). Peritoneal macrophages were added in 96-well culture plates and placed in an incubator at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. After 24 h, 10 µL of a solution with RPMI 1640 medium and **L15** or **L18** were added to the plates in three concentrations (0.039 µM, 0.078 µM, and 0.156 µM). As a negative control, cells were maintained without stimuli. The supernatant was removed after 48 h and 10 µL of the MTT solution (5 mg/mL PBS) was added to the adhered cells. Plates were incubated for 2 h, at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Afterward, the MTT solution was removed and the lysis solution (200 µL of DMSO, Neon®) was added and homogenized in each well. After 20 min, the optical density (OD) was measured at 540 nm in a microplate reader (ELISA® Human Reader HS). Results were expressed as percentage values (%) of viable cells compared to the control group.

### Cell spreading

Spreading capacity was assessed according to the method described by Rabinovitch and Destefano (1973). Peritoneal macrophages were dispensed in 24-well plates and incubated for 2 h, at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, in a humidified environment. After that, the wells were washed three times with PBS to remove non-adherent cells. The RPMI culture medium (100 µL) was added to the wells, and cells were incubated with 10 µL of lipopolysaccharide bacterial (LPS, 1 µg/mL, Sigma-Aldrich®) in the absence or presence of **L15** or **L18** (10 µL, 0.039 µM, 0.078 µM, and 0.156 µM). Cells without stimulus were used as the negative control. Next, the culture medium was removed and 600 µL of glutaraldehyde (Sigma-Aldrich®) was added to each well for cell fixation. After 20 min, glutaraldehyde was removed, and 1 mL of distilled water was added to each well. Plates were sealed and stored in a refrigerator (2–8 °C) for cell counting by phase-contrast microscopy (Optiphase® INV-403). Cells adhered to the coverslips and emitting pseudopods were considered spread out. The number of spread cells in a total of 100 cells was counted. Results were expressed as percentage values (%) of spreading.

### Phagocytic activity of macrophages

A suspension of Zy was prepared at 5 mg/mL in PBS (pH 7.2) and incubated with mouse serum in a 1:1 ratio, at 37 °C, under constant agitation. After 30 min, the mixture was centrifuged at 2000 rpm (Centribio®) for 15 min. The precipitate was resuspended three times in 1 mL of PBS and then the precipitate was resuspended in 1 mL of RPMI containing 5 mM glucose and 2% albumin (Costa Rosa et al. 1994). The cell suspension,  $1 \times 10^5$  cells/100 µL of RPMI medium, contained 5 mM glucose and 2% albumin. Then, 100 µL of Zy suspension was added to the cell suspension. 100 µL of **L15** or **L18** (0.039 µM, 0.078 µM, and 0.156 µM) or RPMI (control) was also added to the plastic tubes and incubated as mentioned before. Subsequently, 100 µL aliquots of the samples were collected and spread

**Table 1** Joint capsule histopathology grade assessment by the degrading methodology (adapted from Pritzker et al. 2006)

Grade	Key feature	Associated criteria (tissue reaction)
0	Intact surface, intact cartilage morphology	Matrix: normal architecture Cells: intact, appropriate orientation
1	Intact surface	Matrix: superficial cartilage intact, few edemas and/or fibrillation (abrasion), focal superficial matrix condensation. Cells: proliferation (clusters) and hypertrophy
2	Surface discontinuity	Matrix discontinuity, superficial (erosion) Deep fibrillation near the bone Cell: disorientation of chondrocyte columns, death, proliferation (clusters), and hypertrophy of chondrocytes

on glass slides with the aid of a tip. After air drying, slides were stained with HEMA 3 dye for the determination of phagocytosis in a light microscope. A total of 100 cells were counted per field and macrophages that phagocytized one or more Zy particles were considered positive. Results were expressed as percentage values (%) of phagocytosis.

### Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) production by macrophages

Hydrogen peroxide release was quantified by the peroxidase oxidation method dependent on phenol red described by Pick and Keisari (1980), adapted for microassay by Pick and Mizel (1981), and modified (Russo et al. 1989). Cells were dispensed in phenol red solution into 96-well plates (TPP®). The cells were incubated with 10 µL of PMA (100 ng/mL; Sigma-Aldrich®) in the presence or absence of 10 µL of **L15** or **L18** (0.039 µM, 0.078 µM, and 0.156 µM). For negative control, cells were kept without stimulus. The plate was then incubated for 1 h in a humidified environment at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Subsequently, the supernatant was transferred to a reading plate and the reaction was stopped by adding 10 µL of 1N NaOH (Sigma-Aldrich®). The plate was kept in the dark for 15 min until the measurement of the optical density (OD) at 620 nm in a microplate reader (ELISA Human Reader HS®). The concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was obtained by comparison with a standard curve (5–40 µM). Results were expressed in µM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### Nitric oxide (NO) production by macrophages

NO production and release were evaluated as described by Ding et al. (1988) for nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) quantification. For this purpose, the cells were dispensed into 96-well plates (TPP®) and incubated in a humidified environment at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. After 24 h, the cells were washed three times with PBS to remove the non-adherent cells. Then, 100 µL of supplemented RPMI culture medium was added and the cells were incubated under the same conditions mentioned before, with 10 µL of LPS (1 µg/mL) in the presence or absence of 10 µL of **L15** or **L18** (0.039 µM, 0.078 µM, and 0.156 µM). As a negative control of NO release, cells were kept without stimulation. To determine the release of NO by peritoneal macrophages, after the incubation period, the supernatants of the cells were transferred to a reading plate, where Griess reagent was added in a ratio of 1:1 (v/v) to the supernatant of the culture. The optical density (OD) was determined at 540 nm in a microplate reader (ELISA Human Reader HS®). Values were compared with the NaNO<sub>2</sub> standard curve (5–80 µM). Results were expressed in µM of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

### Statistical analysis

Data were expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.M.). Statistical differences were determined by analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's post-test using GraphPad Prism 5 software (GraphPad, USA). Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## Results

### Effect of L15 and L18 on mechanical hyperalgesia in zymosan-induced arthritis model

Animals pre-treated orally with water and Zy injection into the knee joint cavity showed increased mechanical hyperalgesia in 76.8% (1.9 ± 0.3 g) at 3 h and 69.9% (2.2 ± 0.2 g) at 4 h, compared to the saline group (8.2 ± 0.2 g) and (7.3 ± 0.4 g) at 3 and 4 h, respectively (Fig. 2).

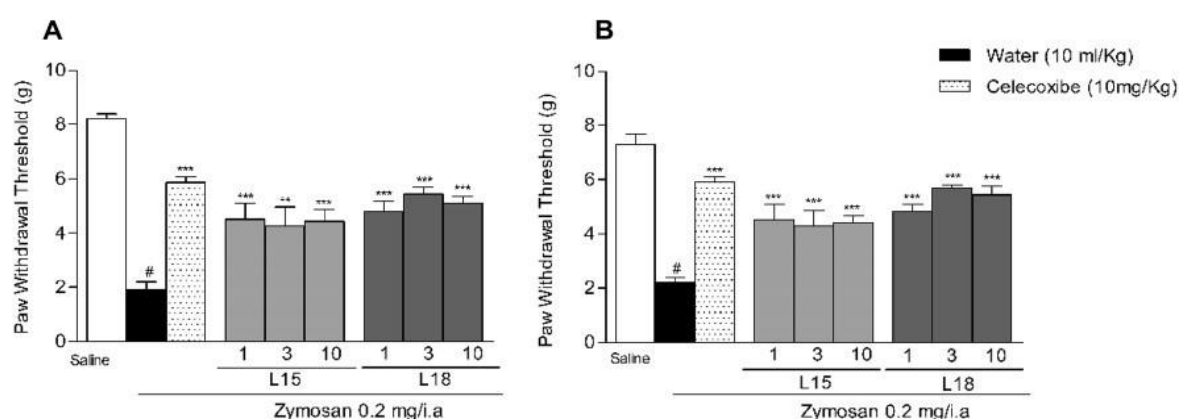
After 3 h of Zy-induced arthritis, celecoxib (10 mg/kg) reduced mechanical hyperalgesia by 66.1% (5.6 ± 0.2 g). A similar effect was observed with triazole-treated groups, in which **L15** (1, 3, and 10 mg/kg) reduced mechanical hyperalgesia by 57.8% (4.5 ± 0.6 g), 55.8% (4.3 ± 0.7 g), and 57.1% (4.4 ± 0.4 g), respectively. Moreover, **L18** (1, 3, and 10 mg/kg) reduced mechanical hyperalgesia by 60.4% (4.8 ± 0.4 g), 65.1% (5.5 ± 0.2 g), and 62.8% (5.1 ± 0.3 g), respectively (Fig. 2A), both compared to the water-treated control group.

After 4 h of Zy-induced arthritis, the standard anti-inflammatory celecoxib (10 mg/kg) reduced mechanical hyperalgesia by 62.8% (5.9 ± 0.2 g). Thus, the treatment with **L15** (1, 3, and 10 mg/kg) reduced mechanical hyperalgesia by 51.1% (4.5 ± 0.6 g), 48.8% (4.3 ± 0.6 g), and 50.0% (4.4 ± 0.3 g), respectively. **L18** (1, 3, and 10 mg/kg) reduced mechanical hyperalgesia by 54.2% (4.8 ± 0.3 g), 61.4% (5.7 ± 0.1 g), and 60.0% (5.5 ± 0.3 g), respectively (Fig. 2B), compared to the water-treated control group. There was no statistically significant difference between the **L15** and **L18** doses ( $p > 0.05$ ) and between the triazole-treated groups and celecoxib at the same periods.

### Effect of L15 and L18 on joint edema of the knee in zymosan-induced arthritis model

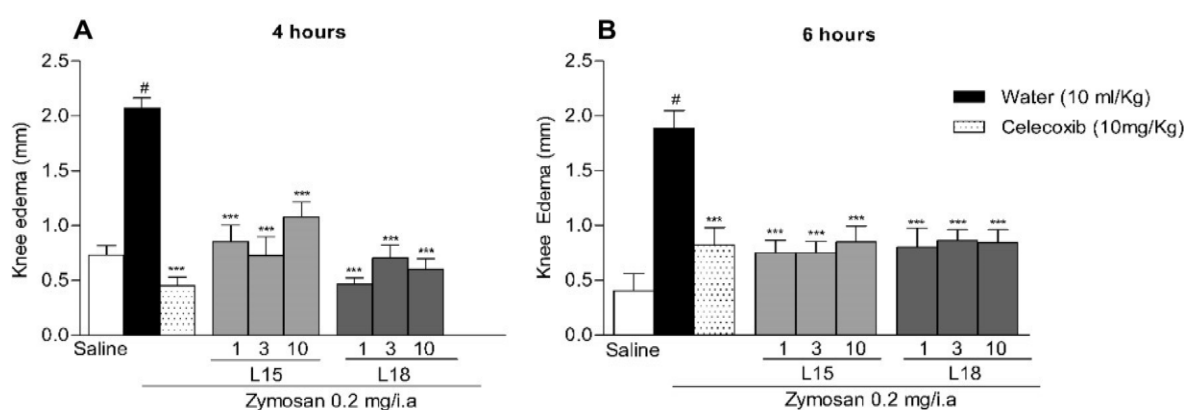
Knee intra-articular Zy injection caused edema in mice at 4 h (2.1 ± 0.1 mm) and 6 h (1.9 ± 0.2 mm) after the stimulus compared to the saline group (0.7 ± 0.1 mm and 0.4 ± 0.1 mm), respectively. **L15** and **L18** and the standard anti-inflammatory celecoxib significantly reduced the edema observed at 4 and 6 h, as shown in Fig. 3.

After 4 h of Zy-induced arthritis (Fig. 3A), celecoxib (10 mg/kg) inhibited edema by 78.1% (0.5 ± 0.1 mm),



**Fig. 2** Effect of L15 and L18 on mechanical hyperalgesia in zymosan-induced arthritis model. Mice were pre-treated 60 min before the stimulus, p.o., with **L15** and **L18**. The control group received water or celecoxib. Mechanical hyperalgesia was evaluated 3 (Fig. 2A) and 4 h (Fig. 2B) after the Zy injection (i.a) in the

knee of mice ( $n=6$  animals/group). Results were expressed as mean  $\pm$  SEM. # $p < 0.001$  (compared to the saline group). \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  (compared to the control group). ANOVA, followed by Bonferroni's test



**Fig. 3** Effect of L15 and L18 on the joint edema of the knee in zymosan-induced arthritis model. Mice were pre-treated 60 min before the stimulus, p.o., with **L15** and **L18**. The control group was treated with water or celecoxib 10 mg/kg. Knee edema was evaluated at 4 h (Fig. 3A) and 6 h (Fig. 3B) after the Zy injection (i.a)

in the knee of mice ( $n=5$  animals/group). Results were expressed as mean  $\pm$  SEM. # $p < 0.001$  (compared to the saline group); \*\*\* $p < 0.001$  (compared to the control group). ANOVA, followed by Bonferroni's test

while **L15** (1, 3, and 10 mg/kg) inhibited edema by 59.1% ( $0.9 \pm 0.2$  mm), 65.2% ( $0.7 \pm 0.2$  mm), and 47.6% ( $1.2 \pm 0.1$  mm), respectively. Pre-treated animals with **L18** (1, 3, and 10 mg/kg) reduced edema by 77.6% ( $0.5 \pm 0.1$  mm), 66.2% ( $0.7 \pm 0.1$  mm), and 71.4% ( $0.6 \pm 0.1$  mm), respectively.

In the period analyzed, 6 h after Zy-induced arthritis (Fig. 3B), celecoxib (10 mg/kg) inhibited by 47.4% ( $1.0 \pm 0.1$  mm), and **L15** (1, 3, and 10 mg/kg) reduced knee edema by 68.9% ( $0.6 \pm 0.1$  mm), 62.3% ( $0.7 \pm 0.1$  mm), and 42.1% ( $1.1 \pm 0.04$  mm), respectively. The inhibition of edema in pre-treated animals with **L18** (1, 3, and 10 mg/kg) after the same time frame was 48.4% ( $0.9 \pm 0.2$  mm), 47.9% ( $0.9 \pm 0.07$  mm) and 48.4% ( $0.98 \pm 0.10$  mm), respectively. No significant difference between **L15** and **L18** doses

( $p > 0.05$ ) and between the triazole-treated groups and celecoxib-treated groups at the same periods was found.

### Effect of L15 and L18 on leukocyte infiltrate into the joint cavity in zymosan-induced arthritis model

Six hours after Zy-induced arthritis, an increase in the influx of total cells ( $6050 \pm 121$  cells/mm<sup>3</sup>) into the joint cavity of mice was observed compared to the saline group ( $2264 \pm 39$  cells/mm<sup>3</sup>). Pre-treatment with celecoxib (10 mg/kg) inhibited the migration of leukocytes by 72.5% ( $1664 \pm 222$  cells/mm<sup>3</sup>). Animals pre-treated with **L15** (1, 3 and 10 mg/kg) showed a reduction in total cell influx of 63.3% ( $2221 \pm 370$  cells/mm<sup>3</sup>), 73.9% ( $1575 \pm 221$  cells/mm<sup>3</sup>), and 72.2%

( $1679 \pm 237$  cells/mm<sup>3</sup>), respectively (Fig. 4A). At the same time frame, animals pre-treated with **L18** (1, 3, and 10 mg/kg) had reduced influx of total cells into the joint cavity by 63.0% ( $2236 \pm 402$  cells/mm<sup>3</sup>), 65.0% ( $2114 \pm 198$  cells/mm<sup>3</sup>), and 67.8% ( $1950 \pm 190$  cells/mm<sup>3</sup>), respectively (Fig. 4A).

Seven days after Zy-induced arthritis, an increase in the total number of leukocytes ( $1300 \pm 67$  cells/mm<sup>3</sup>) was observed in the intra-articular cavity compared to the saline group ( $475 \pm 56$  cells/mm<sup>3</sup>). Animals pre-treated with either celecoxib or **L15** and **L18** showed a significant reduction in the total cell number that migrated into the intra-articular cavity compared to animals treated with water. This reduction represents 53.9% ( $600 \pm 57$  cells/mm<sup>3</sup>) in animals pre-treated with celecoxib (10 mg/kg) and 54.6% ( $590 \pm 68$  cells/mm<sup>3</sup>), 66.9% ( $430 \pm 25$  cells/mm<sup>3</sup>), and 52.3% ( $620 \pm 25$  cells/mm<sup>3</sup>) in animals pre-treated with **L15** (1 mg, 3 mg, and 10 mg/kg), respectively (Fig. 4B).

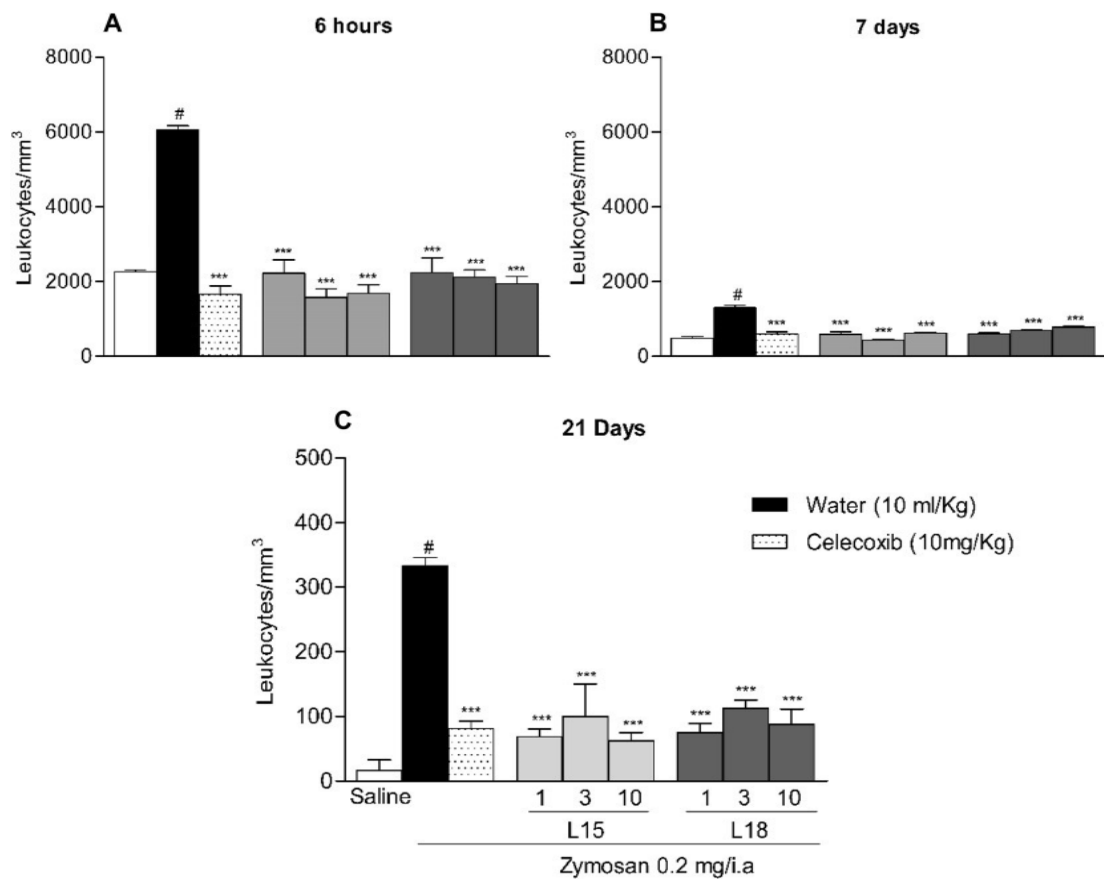
Furthermore, groups pre-treated with **L18** (1 mg, 3 mg and 10 mg/kg) had decreased total cell migration by 53.9%

( $600 \pm 27$  cells/mm<sup>3</sup>), 46.9% ( $690 \pm 29$  cells/mm<sup>3</sup>), and 40.4% ( $775 \pm 25$  cells/mm<sup>3</sup>), respectively (Fig. 4B).

After 21 days, the leukocytes that migrated to the knee joint cavity of the mice were represented by  $333 \pm 12$  cells/mm<sup>3</sup>. In animals pre-treated with celecoxib, this was reduced by 75.68%. In addition, **L15** (1, 3, and 10 mg/kg) reduced cell migration by 79.3%, 70.0%, and 81.1%, while **L18** showed a decrease of 77.5%, 66.1%, and 73.6%, respectively (Fig. 4C). No significant difference between **L15** and **L18** doses ( $p > 0.05$ ) and between the triazole-treated groups and celecoxib-treated groups was found in the same periods.

### Effect of L15 and L18 on the joint capsule of mice in zymosan-induced arthritis model

After 7 days of Zy-induced arthritis, the positive control group (treated with water and injected with Zy into the joint) demonstrated cartilaginous matrix of the joint surface with mild erosion and chondrocyte condensation. The joint capsule of this group and the synovial membrane showed



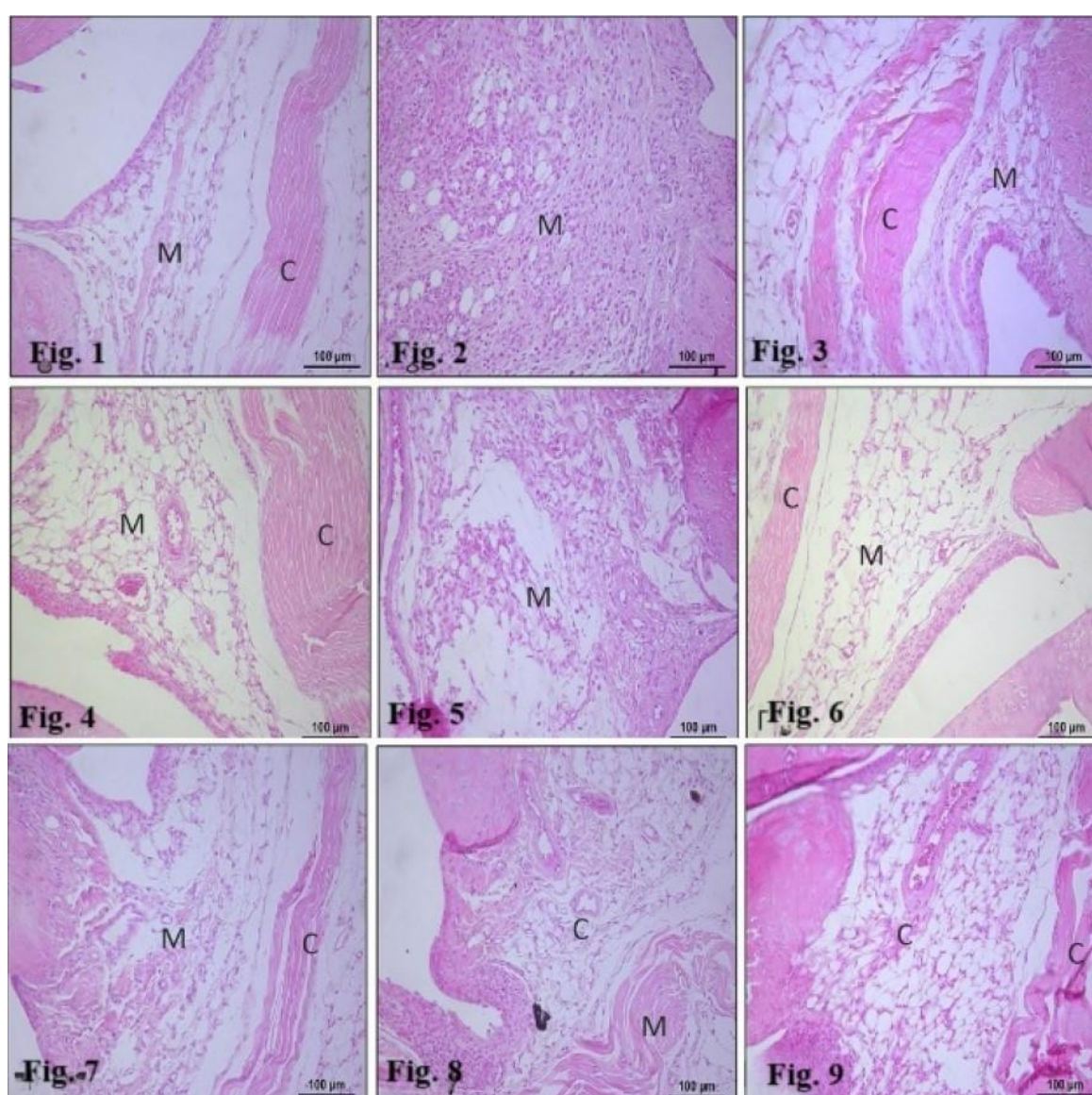
**Fig. 4** Effect of L15 and L18 on leukocyte infiltrate into the joint cavity in zymosan-induced arthritis model. Mice were pre-treated 60 min before the stimulus, p.o., with L15 and L18, daily, during the assay period. Total cellular influx was evaluated 6 h (n=7 animals/group) (Fig. 4A), 7 days (n=5 animals/group) (Fig. 4B), and 21 days (n=5 animals/group) after the Zy injection (i.a) in the knee of mice. Con-

trol groups received water or celecoxib, p.o., 60 min before the experiments or daily. Results were expressed as mean ± SEM. # $p < 0.001$  (compared to the saline group) and \*\*\* $p < 0.001$  (compared to the control group). ANOVA, followed by Bonferroni's test was conducted.

a leukocyte infiltrate with pannus formation (Fig. 5) and grade 2 surface damage (Table 1) compared to the saline group (Fig. 5). This group, which received saline solution orally and intra-articularly, presented joint capsule with normal histological pattern and chondrocytes oriented in columns and without cell death. Furthermore, the cartilaginous matrix of the joint surface did not show signs of erosion or flattened chondrocytes, while the synovial membrane and joint capsule were without leukocyte infiltration (Grade 0).

The groups treated with L15 and L18 at the three evaluated doses showed similar results, joints without evidence of erosion or condensation on the joint surface, and without

fibrillation of the cartilaginous matrix. Clusters (cell proliferation) of hypertrophic and non-hypertrophic chondrocytes were observed, varying between the superficial and intermediate zones. There was a slight leukocyte infiltrate in the synovial membrane and joint capsule, without formation of rheumatoid pannus, Grade 0 (Fig. 5). This finding was similar to that observed in the joints of mice treated with celecoxib 10 mg/kg (Fig. 5). The group that received only zymosan was the only one that presented thickening of the joint capsule, with an increase in inflammatory cells and extracellular matrix and with the formation of rheumatoid pannus.



**Fig. 5** Histological analysis of the joint capsule region of mice treated with L15 and L18 in an experimental model of arthritis induced by zymosan. Joint sections were stained with H&E (original magnification, 200x). Zymosan: 200 µg/knee, 10 µL, intra-articularly. The groups were treated, p.o., daily, for 7 days. The results are expressed

as in: Fig. 1—saline, 10 µL, i.a, control, Fig. 2—water, 10 mL/kg, Fig. 3—celecoxib 10 mg/kg, Fig. 4—L15 1 mg/kg, Fig. 5—L15 3 mg/kg, Fig. 6—L15 10 mg/kg, Fig. 7—L18 1 mg/kg, Fig. 8—L18 3 mg/kg, Fig. 9—L18 10 mg/kg. Fibrous capsule (C); synovial membrane (M)

### Effect of L15 and L18 on cell viability

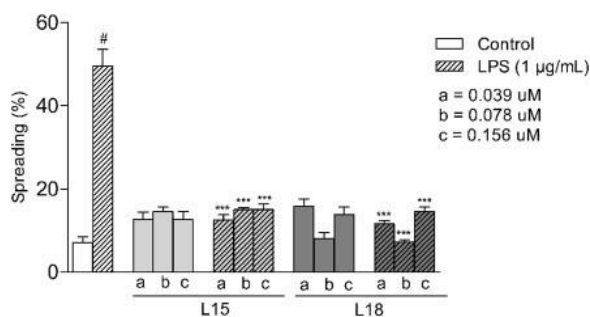
In the cytotoxicity assay, **L15** and **L18** at all evaluated concentrations (0.039  $\mu\text{M}$ , 0.078  $\mu\text{M}$  and 0.156  $\mu\text{M}$ ) did not decrease cell viability after 48 h treatment. Cell viability was 100% and equivalent to the control group ( $p > 0.05$ ; data not shown).

### Effect of L15 and L18 on macrophage spreading

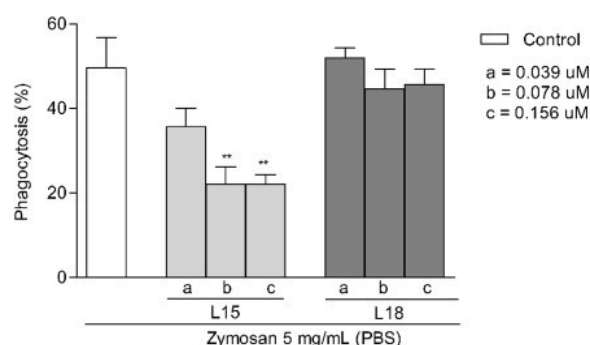
In this assay, the LPS used as a positive control induced macrophage spreading after 2 h of incubation ( $49.5 \pm 4.1$  spread cells). **L15** and **L18** at all concentrations, in the presence of LPS, reduced the spreading of these cells. **L15** (0.039  $\mu\text{M}$ ,  $12.5 \pm 1.3$ ; 0.078  $\mu\text{M}$ ,  $15.0 \pm 0.6$ ; 0.156  $\mu\text{M}$ ,  $15.0 \pm 1.4$  spread cells) and **L18** (0.039  $\mu\text{M}$ ,  $1.7 \pm 0.7$ ; 0.078  $\mu\text{M}$ ,  $7.2 \pm 0.6$ ; and 0.156  $\mu\text{M}$ ,  $14.5 \pm 1.2$   $\mu\text{M}$  spread cells) when compared to positive control ( $49.5 \pm 4.1$  spread cells) (Fig. 6). **L15** and **L18** did not increase spreading cells in the absence of LPS when compared to macrophages without stimulation ( $7.0 \pm 1.5$  spread cells) (Fig. 6).

### Effect of L15 and L18 on macrophage phagocytic activity

Zy suspension (5 mg/mL in PBS) increased the macrophage phagocytic activity after 1 h by  $53.7 \pm 6.1\%$ . **L15** at concentrations of 0.078  $\mu\text{M}$  and 0.156  $\mu\text{M}$  reduced by  $22.0 \pm 4.2$  and  $22.0 \pm 2.3\%$  the macrophage phagocytic activity, respectively, in this same time. This effect was not observed with **L18**. (Fig. 7).



**Fig. 6** Effect of L15 and L18 on macrophage spreading. The cells ( $1 \times 10^5$  cells/well) were incubated with LPS in the presence or absence of L15 and L18. Control: macrophages without stimulus. Results were expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  in duplicate). ANOVA, followed by Bonferroni's test. # $p < 0.001$  compared to the control group and \*\*\* $p < 0.001$  compared to the group LPS

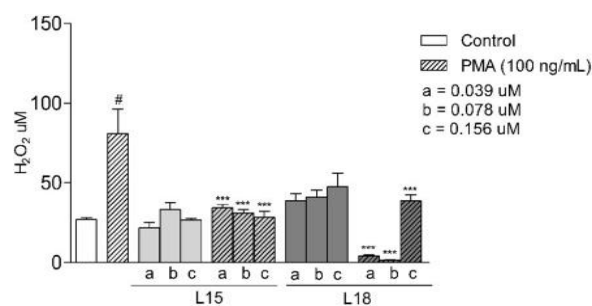


**Fig. 7** Effect of L15 and L18 on macrophage phagocytic activity. The cells ( $1 \times 10^5$  cells/well) were incubated with Zy suspension (control group) in the presence or absence of **L15** or **L18**. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  in triplicate). ANOVA, followed by Bonferroni's test. \*\* $p < 0.01$  compared to the control group (Zy)

### Effect of L15 and L18 on $\text{H}_2\text{O}_2$ production by macrophages

In this assay, we observed that PMA significantly increased the production and release of  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $80.8 \pm 15.5$   $\mu\text{M}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) compared to the macrophage without stimulus ( $27.0 \pm 1.3$   $\mu\text{M}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). The treatment with **L15** and **L18** did not affect the basal release of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , regardless of the concentration used (0.039  $\mu\text{M}$ , 0.078  $\mu\text{M}$ , and 0.156  $\mu\text{M}$ ; Macrophage without stimulus:  $27.0 \pm 1.3$   $\mu\text{M}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $p > 0.05$  (Fig. 8).

Macrophages stimulated with PMA and treated with **L15** and **L18** decreased the release of  $\text{H}_2\text{O}_2$ —**L15** 0.039  $\mu\text{M}$ ,  $34.4 \pm 2.2$   $\mu\text{M}$ ; **L15** 0.078  $\mu\text{M}$ ,  $31.1 \pm 2.2$   $\mu\text{M}$ ; **L15** 0.156  $\mu\text{M}$ ,  $28.4 \pm 3.7$   $\mu\text{M}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; and **L18** 0.039  $\mu\text{M}$ ,  $4.2 \pm 0.8$   $\mu\text{M}$ ; **L18** 0.078  $\mu\text{M}$ ,  $1.7 \pm 0.2$   $\mu\text{M}$ ; **L18** 0.156  $\mu\text{M}$ ,  $38.9 \pm 3.6$   $\mu\text{M}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  when compared to the macrophages stimulated with PMA ( $80.8 \pm 15.6$   $\mu\text{M}$ , positive) (Fig. 8).



**Fig. 8** Effect of L15 and L18 on  $\text{H}_2\text{O}_2$  production by macrophages. The cells ( $1 \times 10^5$  cells/well) were incubated with PMA in the presence or absence of L15 and L18. Control: macrophages without stimulus. The results were expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  in triplicate). ANOVA, followed by Bonferroni's test. # $p < 0.001$  (compared to the control group) and \*\*\* $p < 0.001$  compared to the group PMA

## Effect of L15 and L18 on NO production by macrophages

LPS significantly increased the NO production and release ( $13.4 \pm 0.6 \mu\text{M}$  of  $\text{NO}_2^-$ ) compared to the macrophages without stimulus ( $3.6 \pm 0.1 \mu\text{M}$  of  $\text{NO}_2^-$ ). Stimulation with **L15** and **L18** did not promote changes in basal NO release, regardless of the tested concentration. Furthermore, in the presence of LPS, macrophages treated with **L15** (0.039  $\mu\text{M}$ , 0.078  $\mu\text{M}$ , and 0.156  $\mu\text{M}$ ) decreased NO release ( $7.1 \pm 0.6 \mu\text{M}$ ,  $3.4 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ,  $4.6 \pm 0.4 \mu\text{M}$   $\text{NO}_2^-$ , respectively). The same effect was observed in macrophages treated with **L18** (0.039  $\mu\text{M}$ , 0.078  $\mu\text{M}$ , and 0.156  $\mu\text{M}$ ) in the presence of LPS ( $9.1 \pm 1.4 \mu\text{M}$ ,  $4.9 \pm 0.6 \mu\text{M}$ ,  $6.7 \pm 1.0 \mu\text{M}$  of  $\text{NO}_2^-$ , respectively) when compared to the LPS stimulated macrophages (Fig. 9).

## Discussion

Our findings herein showed that the triazole neolignan–celecoxib hybrid analogs **L15** and **L18**, at previously defined doses (Felipe et al. 2022) reduced the inflammatory events in vivo and in vitro in mice exposed to induced experimental arthritis, a prolonged condition that presents differentiated inflammatory features such as temporal evolution, cell profile, mediators, and joint damage.

This experimental model of arthritis contributes to the development of new therapeutic targets for this inflammatory condition (Asquith et al. 2009; Wang et al. 2023). For this evaluation, we used the model of experimental arthritis-induced Zy injection into the knee joint of Swiss mice, which represents a classic inflammatory model of RA (Gegout et al. 1994; Guazelli et al. 2018).

Zy is an inflammatory stimulus capable of binding receptors to Toll-like receptor 2 (TLR-2) on macrophages, leading to the activation of the NF- $\kappa$ B factor (Asquith et al. 2009). In

this model, the parameters analyzed mimic those observed in RA such as hyperalgesia, joint edema, leukocyte infiltrate, and cartilage damage (Guerrero et al. 2011; Guazelli et al. 2018). Furthermore, the activation of inflammatory cells that infiltrated into the joint, such as macrophages, promotes the release of inflammatory mediators, cytokines, reactive nitrogen, and oxygen species that enhance this situation, starting different intracellular signaling pathways in the pathophysiology of RA (Andersen et al. 2018; Mateen et al. 2016; Phull et al. 2018).

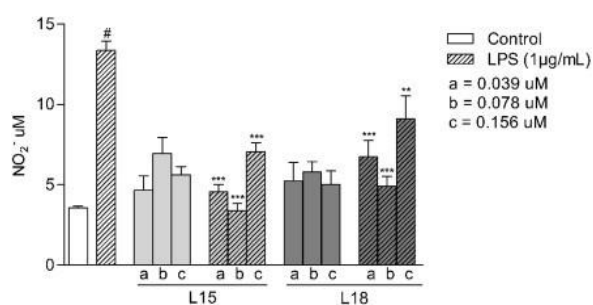
The inflammation parameters evaluated after the induction of experimental arthritis showed different occurrences over time. First, the hyperalgesia was evaluated in the peak of hyper nociception response in the 3rd and 4th hours after Zy-induced arthritis (Rocha et al. 2003).

Pre-treatment with **L15** and **L18** reduced hyperalgesia in both periods and were as effective as celecoxib in the peripheral hypoalgesic action (Krasselt and Baerwald 2019). This effect might be due to structural modification of these analogs, showed by molecular docking, increasing the lock selectivity to the active site of the cyclooxygenase-2 enzymes (COX-2) (Felipe et al. 2022) that led to an anti-hyperalgesic effect, decreasing prostaglandin biosynthesis.

During hyperalgesia, mediators such as cytokines, prostaglandins, bradykinin (Chen et al. 2013), substance P, and amines sympathomimetic (Basbaum et al. 2009; Neves et al. 2020) act synergistically on the peripheral transduction mechanism of the nociceptive stimulus (Ronchetti et al. 2017), decreasing the activation threshold of nociceptors in animal models of arthritis (Verri et al. 2006; Forouzanfar et al. 2022), mimicking the pain observed in RA (Schneider et al. 2019). In this regard, Guerrero et al. (2011) showed that the hypernociception in the joint triggered by cytokines is considered indirect, by the production of prostaglandins.

One of the predominant signs of RA is the edema of synovial joints (Smolen et al. 2018; Chen et al. 2019). Pre-treatment with **L15** and **L18** reduced joint edema in mice. Joint edema is related to pro-inflammatory mediators, such as PAF and prostaglandins, being described as one of the main contributors to the generation of edema and hyperalgesia (Conte et al. 2015; Lordan et al. 2019).

The ability of the **L15** and **L18** to inhibit COX-2 and consequently decrease the production of prostaglandins would be enough to minimize the edematogenic effect in joints. Furthermore, the scaffold of the analogs resulted from the structural modification of neolignans, which in turn shows biological activities, with PAF antagonist being one of these (Young Jung et al. 1998). The dual effect of the analogs as COX-2 inhibitors and anti-PAF agents would potentiate the reduction of the edema observed. Similar results were observed by Felipe et al. (2022), in the reduction of carrageenan-induced paw edema in an experimental model of acute inflammation.



**Fig. 9** Effect of L15 and L18 on NO production by macrophages. The cells ( $1 \times 10^5$  cells/well) were incubated with LPS in the presence or absence of L15 and L18. Control: macrophages without stimulus. Results were expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n=3$  in duplicate). ANOVA, followed by Bonferroni's test. # $p < 0.001$  (compared to the control group) \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  compared to the group LPS

The increase in the recruitment of leukocytes to the joint cavity was observed from the 6th hour, on the 7th day and the 21st day after the stimulus. Keystone et al. (1977) showed that in Zy-induced experimental arthritis, erosive synovitis, increased vascular permeability and cell migration, mainly of polymorphonuclear cells, occurs during the acute phase of inflammation and become maximal in the 6th hour (Rocha et al. 1999, 2003).

Seven days after the stimulus, progressive synovitis is observed, followed by synovial hyperplasia, characterized by the predominant accumulation of mononuclear cells and intense proliferation of fibroblasts (Penido et al. 2006; Silva Júnior and Rocha 2006) like the characteristic rheumatoid *pannus* found in patients with AR (Gegout et al. 1994; Guazelli et al. 2018). Finally, 21 days after Zy-induced arthritis, there is intense mononuclear infiltrate, fibroblast proliferation, neovascularization, loss of articular cartilage proteoglycans, and subchondral bone erosion (Rocha et al. 1999; Bezerra et al. 2004).

Pre-treatment with **L15** and **L18** reduced leukocyte recruitment in all periods evaluated. The result observed at the 6th hour corroborates with those of Felipe et al. (2022), who showed a reduction in the leukocyte infiltration, mainly polymorphonuclear cells, characteristic of acute inflammation, in a similar period.

Initially, neutrophils are recruited to the arthritis site by lipoxygenase (5-LOX)-derived chemotactic mediators like leukotriene B4 (LTB4) (Pereira-Leite et al. 2017) and cytokines, such as TNF and IL-1 and IL-8 (Elshabrawy et al. 2015; Noriega et al. 2020). Still, Arnould et al. (2001) showed that prostaglandin F2-alpha (PGF2- $\alpha$ ) potentiates neutrophil chemotaxis. Eicosanoids and PAF induce the selective expression of adhesion molecules that modulate leukocyte recruitment to the arthritic lesion (Smolen et al. 2018; Ding et al. 2023).

It is known that inhibition of polymorphonuclear influx, particularly neutrophils, is associated with improved tissue pathogenesis of experimental arthritis. Neutrophils are not directly involved in the chronic process of inflammation, but these cells may secrete toxic oxygen metabolites, proteolytic enzymes, and inflammatory mediators that lead to joint destruction and joint disability (Seixas et al. 2022). Similar findings were observed in humans, with the presence of neutrophils in the synovial fluid of patients with RA (Carvalho et al. 2019).

As reported above, the evaluation on the 7th and 21st days showed that **L15** and **L18** were also efficient in maintaining the reduction of leukocyte recruitment. However, the cell profile changed, with a predominance of mononuclear cells. The production of chemokines and the expression of their receptors in the target cells are responsible for the recruitment of different cell types to the synovial

cavity (Conte et al. 2015), with a crucial role in the joint inflammatory process (McInnes and Schett 2011).

Therefore, it is possible to infer that decreased leukocyte influx may be due to a) design of analogs by molecular hybridization of neolignans with the celecoxib, thus directly blocking 5-LOX (Maier et al. 2008); b) since the prostaglandins are the main products of the COX pathway, these results show the possibility of **L15** and **L18** inhibiting this enzyme, suggesting a dual effect over COX-2/ -LOX of the analogs; and c) the possible anti-PAF effect suggested above may contribute to the decrease of the leukocyte infiltration in the joint cavity (Krasselt and Baerwald 2019).

Additionally, a direct function of P-selectin on platelet– and leukocyte–endothelial cell interaction in mice in experimental arthritis was demonstrated. There is evidence that platelets play an important role in the development and maintenance of RA, and adherence and activation of the same in the synovial microcirculation might be in part responsible for endothelial damage and activation of leukocytes (Schmitt-Sody et al. 2007).

In this context, Felipe et al. (2022) demonstrated that **L15** and **L18** decreased the expression of P-selectin (CD62P) in vitro. Moreover, the molecular docking confirmed the interaction between the analogs and the active site of P-selectin; these findings are relevant since selectins are responsible for rolling leukocytes to the endothelium for further transmigration (Mendel Nzogang and Boris Donkeng 2020).

**L15** and **L18** are new prototypes in the literature with anti-inflammatory activity over COX-2, and downregulation on P-selectin expression may be considered a safer pathway for the treatment of inflammation with minor thromboembolic risk in long-term therapy, such as RA.

Still, the intra-articular administration of Zy in an animal model caused changes in the joints evidenced by classic histological changes observed in arthritic joints (Guazelli et al. 2018; Lima et al. 2022). Histological analysis of the knee joint region of mice confirmed the development of an inflammatory process in the joints typical of experimental arthritis (Wong et al. 2019; Forouzanfar et al. 2022). Daily treatment, with **L15** or **L18**, proved to be effective in reducing this process and these findings showed a decrease in cartilage damage during the experimental arthritis process.

Evidence indicates that oxidative stress initiated by the activation of inflammatory cells is a considerable factor in the pathogenesis of RA. Stress, trauma, diet, degenerative diseases, and immune and hormonal unbalance are the main factors responsible for changes in the oxidant–antioxidant balance (Cofta et al. 2009).

Complementary studies herein showed the effect of analogs on macrophages functions, relevant cells in the chronic process of arthritis (Firestein and McInnes 2017). Cytotoxicity assay was performed using the MTT, which is based



on the ability of cells to reduce a tetrazolium salt (MTT) in formazan crystals by the action of the enzyme succinate dehydrogenase (Mosmann 1983). **L15** and **L18** were non-cytotoxic. This result indicated the safety of the analogs and allowed us to proceed with the assays at the estimated concentrations.

In chronic inflammation, macrophages were found spread in the RA synovial tissue (Tardito et al. 2019). Macrophage spreading represents the switch from a rounded morphology without pseudopodia to an elongated morphology, with the emission of pseudopodia, which allows this cell to reach the site of injury or pathogen (Boniakowski et al. 2017). Thus, it is indicative of the early stages of cell activation. **L15** and **L18** reduced LPS-induced spreading (Rabinovitch and Destefano 1973). Stimuli such as LPS are recognized by pattern recognition receptors (PRRs) and lead to the activation of macrophages, increasing the spreading of phagocytosis and the production of inflammatory mediators (Bou Ghosn et al. 2010). The inhibition of spreading by the analogs might be related to the blockade of these receptors.

In arthritis, phagocytosis is important, activated macrophages are found in considerable quantity at the site of injury (Laskin et al. 2011) and are involved in the resolution of the process through oxidative stress, which, if not modulated, can potentiate tissue damage (Mateen et al. 2016; Phull et al. 2018). The phagocytosis process is facilitated by the spreading of macrophages, increasing the contact area of these cells with the injurious agent (Binker et al. 2007; Jain et al. 2019).

It is known that different receptors may be involved in this process, including the complement receptor that recognizes pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) associated with Zy, where the direct contact of this stimulus in the catalytic site of the receptor is essential and, once linked to the receptor, induces NF- $\kappa$ B activation (Underhill 2003).

Only **L15** reduced Zy-induced phagocytosis. This effect may probably be explained by the difference in the chemical structure of the analogs since the sulfonamide radical ( $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ ), present in celecoxib, is maintained in **L15**, but not in **L18**, where the substituent group present is a bio-isoster, carboxylic acid ( $-\text{COOH}$ ). These data suggest that the structural difference between the analogs may not have allowed the interaction of **L18** with complement receptors. This finding demonstrates that the catalytic region of the receptors is fundamental for this event (Zuliani et al. 2005).

During phagocytosis, an oxidative burst occurs, triggering the formation of the reactive oxygen species such as  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Mateen et al. 2016), which activates NF- $\kappa$ B, increasing gene expression of pro-inflammatory cytokines and adhesion molecules (Liu et al. 2017). A relevant association between ROS and RA severity was found in experimental models and RA patients (Quinonez-Flores et al. 2016), a lead to bone reabsorption and cartilage damage,

contributing to injury in the affected joints (Mateen et al. 2016; Phull et al. 2018). Furthermore, these cells stimulate the proliferation of fibroblasts, which increases collagen synthesis (Firestein and McInnes 2017; Radu and Bungau 2021).

In this study, **L15** and **L18** inhibited  $\text{H}_2\text{O}_2$  production by macrophages. Liu et al. (2017) asserted that reactive oxygen species induce NF- $\kappa$ B activation, triggering changes such as the expression of pro-inflammatory cytokines and NO that promote inflammation and joint erosion (Radu and Bungau 2021). Given this information, a possible mechanism of action for the triazole neolignan–celecoxib hybrid analogs would be inhibiting NF- $\kappa$ B activation, which could be suitable for treating degenerative processes.

More, the effect of **L15** and **L18** on NO production by macrophages was also evaluated, in which both analogs reduced this effect. The binding of LPS to the Toll-Like 4 receptor (TLR-4) also triggers the NF- $\kappa$ B signaling pathway, promoting transcription of pro-inflammatory genes and enzymes, such as iNOS (Jain et al. 2019) increasing NO synthesis. Previous studies identified the NO as a relevant inflammatory mediator in RA, based on the detection of elevated concentrations of nitrites in the serum and synovial fluid of RA patients (Farrell and Blake 1996; William et al. 1996). Furthermore, increased iNOS activity and NO production were observed in the peripheral blood leukocytes from RA patients and correlated with cell counts obtained from the respective patients (Bauerova 1999; Mateen et al. 2016).

Whereas the pathways of oxidative and nitrosative stress are also triggered by PAF stimuli to produce oxygen and nitrogen reactive species, the anti-PAF effect, demonstrated by analogs, could be also explain the inhibition observed.

## Conclusion

In summary, **L15** and **L18** reduced hyperalgesia, edema, leukocyte recruitment, and joint cartilage damage. The effect observed was non-dose dependent and were as effective as celecoxib in assays performed. Still, the analogs inhibited NO,  $\text{H}_2\text{O}_2$  production, spreading, and phagocytosis by macrophages and were non-cytotoxic.

Our results contribute to the anti-inflammatory activity of triazole neolignan–celecoxib hybrid analogs in chronic inflammation. Moreover, it is the first study demonstrating the anti-inflammatory activity of the triazole neolignan–celecoxib hybrids in an arthritis experimental model. Therefore, the triazole neolignan–celecoxib hybrid s analogs are promising drug prototypes to minimize inflammation and hyperalgesia in the RA acute and chronic processes, with gastric and cardiovascular safety as a differential.

**Acknowledgements** The authors thank the Laboratory of Synthesis and Medicinal Chemistry (LASQUIM) for the synthesis of the analogs and the Laboratory of Histology/INBIO for the histological analysis of the experiments, both from the Federal University of Mato Grosso Do Sul (UFMS).

**Author contributions** Data collection and statistical analysis: J.L. Felipe, P.K.M.B. Lossavaro, J.S. Lencina, I.S.B. Moslaves, G.I.S. Ferreira and L. Candeloro. Design and synthesis of novel neolignan–celecoxib hybrid analogs: D. B. Carvalho and A.C.M. Baroni. Responsibility for animal care: M.L.L. Souza. Experimental techniques and manuscript review: S.E. Silva-Filho. Interpretation of data, design of manuscript: J.L. Felipe. Manuscript and English review: A. R. Neves. Interpretation of data and critical revision of the manuscript: M. C. Toffoli-Kadri.

**Funding** This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

**Data availability** The datasets generated during and/or analysed during the current study are not publicly available due to the fact that they are part of the doctoral research of the author Felipe, J.L., but are available from the corresponding author on request.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## References

- Andersen NS, Peiró Cadahía J, Previtali V et al (2018) Methotrexate prodrugs sensitive to reactive oxygen species for the improved treatment of rheumatoid arthritis. *Eur J Med Chem* 156:738–746. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.045>
- Arnould T, Thibaut-Verucruyssen R, Bouaziz N et al (2001) PGF $2\alpha$ , a prostanoid released by endothelial cells activated by hypoxia, is a chemoattractant candidate for neutrophil recruitment. *Am J Pathol* 159(1):345–357. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61701-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61701-4)
- Asquith DL, Miller AM, McInnes IB et al (2009) Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. <https://doi.org/10.1002/eji.200939578>
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G et al (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>
- Bauerova K, Bezek A (1999) Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Gen Physiol Biophys* 18:15–20
- Bezerra MM, Brain SD, Greenacre S et al (2004) Reactive nitrogen species scavenging, rather than nitric oxide inhibition, protects from articular cartilage damage in rat zymosan-induced arthritis. *Br J Pharmacol* 141(1):172–182. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705600>
- Binker MG, Zhao DY, Pang SJY et al (2007) Cytoplasmic linker protein-170 enhances spreading and phagocytosis in activated macrophages by stabilizing microtubules. *J Immunol* 179(6):3780–3791. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.3780>
- Boniakowski AE, Kimball AS, Jacobs BN et al (2017) Macrophage-mediated inflammation in normal and diabetic wound healing. *J Immunol* 199(1):17–24. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700223>
- Bou Ghosn EE, Cassado AA, Govoni GR et al (2010) Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(6):2568–2573. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915000107>
- Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN (2014) Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.02.009>
- Carvalho AMS, Heimfarth L, Santos KA et al (2019) Terpenes as possible drugs for the mitigation of arthritic symptoms – a systematic review. *Phytomedicine*. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.10.028>
- Cassamale TB, Costa EC, Carvalho DB et al (2016) Synthesis and antitrypanosomastid activity of 1,4-diaryl-1,2,3-triazole analogues of neolignans veraguensin, grandisin and Machilin G. *J Brazil Chem Soc* 27(7):1217–1228. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20160017>
- Chen L, Yang G, Grosser T (2013) Prostanoids and inflammatory pain. *Prostaglandin Lipid Mediat* 104–105:58–66. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2012.08.006>
- Chen Z, Bozec A, Ramming A et al (2019) Anti-inflammatory and immune-regulatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. <https://doi.org/10.1038/s41584-018-0109-2>
- Cofta S, Wysocka E, Piorunek T et al (2009) Oxidative stress markers in the blood of persons with different stages of obstructive sleep apnea syndrome. *J Physiol Pharmacol* 59(Suppl 6):183–190
- Conte FP, Ferraris FK, Costa TEMM et al (2015) Effect of gedunin on acute articular inflammation and hypernociception in mice. *Molecules* 20(2):636–2657. <https://doi.org/10.3390/molecules20022636>
- Costa Rosa LFBP, Safi DA, Curi R (1994) Effect of thioglycollate and BCG stimuli on glucose and glutamine metabolism in rat macrophages. *J Leukoc Biol* 56(1):10–14. <https://doi.org/10.1002/jlb.56.1.10>
- Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ (1988) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141(7):2407–2412. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.141.7.2407>
- Ding Q, Hu W, Wang R et al (2023) Signaling pathways in rheumatoid arthritis: implications for targeted therapy. *Signal Transduct Target Ther*. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01331-9>
- Elshabrawy HA, Chen Z, Volin MV et al (2015) The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Angiogenesis*. <https://doi.org/10.1007/s10456-015-9477-2>
- Farrell AJ, Blake DR (1996) Nitric oxide. *Annals of the rheumatic diseases*. Available at: <http://ard.bmj.com/>
- Felipe JL, Cassamale TB, Lourenço LD et al (2022) Anti-inflammatory, ulcerogenic and platelet activation evaluation of novel 1,4-diaryl-1,2,3-triazole neolignan–celecoxib hybrids. *Bioorg Chem*. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105485>
- Firestein GS, McInnes IB (2017) Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.006>
- Forouzanfar F, Pourbagher-Shahri AM, Ghazavi H (2022) Evaluation of antiarthritic and antinociceptive effects of cedrol in a rat model of arthritis. *Oxid Med Cell Longev*. <https://doi.org/10.1155/2022/4943965>
- Gegout P, Gillet P, Chevrier D et al (1994) Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: Effects on joint inflammation and cartilage metabolism. *Life Sci* 55:321–326. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(94\)00771-3](https://doi.org/10.1016/0024-3205(94)00771-3)
- Guazelli CFS, Staurengo-Ferrari L, Zarpelon AC et al (2018) Quercetin attenuates zymosan-induced arthritis in mice. *Biomed Pharmacother* 102:175–184. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.057>
- Guerrero ATG, Cunha TM, Verri WA et al (2011) Toll-like receptor 2/MyD88 signaling mediates zymosan-induced joint hypernociception in mice: participation of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CXCL1/KC.

- Eur J Pharmacol 674(1):51–57. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.10.023>
- Jain N, Moeller J, Vogel V (2019) Mechanobiology of macrophages: how physical factors coregulate macrophage plasticity and phagocytosis. *Annu Rev Biomed Eng* 21:267–297. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-062117>
- Keystone EC, Schorlemmer HU, Pope C et al (1977) Zymosan—induced arthritis. *Arthr Rheum* 20(7):1396–1401. <https://doi.org/10.1002/art.1780200714>
- Krasselt M, Baerwald C (2019) Celecoxib for the treatment of musculoskeletal arthritis. *Expert Opin Pharmacother* 20(14):1689–1702. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1645123>
- Kuraoka-Oliveira AM, Radai JAS, Leitão MM et al (2020) Anti-inflammatory and anti-arthritic activity in extract from the leaves of *Eriobotrya japonica*. *J Ethnopharmacol*. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112418>
- Laskin DL, Sunil VR, Gardner CR et al (2011) Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 51:267–288. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105812>
- Lima R, Pedersen M, Bomfim F et al (2022) Effects of different physical training protocols on inflammatory markers in Zymosan-induced rheumatoid arthritis in Wistar rats. *Cell Biochem Funct*. <https://doi.org/10.1002/cbf.3697>
- Liu T, Zhang L, Joo D et al (2017) NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal TransductTarget Ther*. <https://doi.org/10.1038/sigtr.ans.2017.23>
- Lordan R, Tsoupras A, Zabetakis I et al (2019) Forty years since the structural elucidation of platelet-activating factor (PAF): Historical, current, and future research perspectives. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules24234414>
- Maier TJ, Tausch L, Hoernig M et al (2008) Celecoxib inhibits 5-lipoxygenase. *Biochem Pharmacol* 76(7):862–872. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.07.009>
- Mateen S, Moïn S, Khan AQ et al (2016) Increased reactive oxygen species formation and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152925>
- McInnes IB, Schett G (2011) The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 365(23):2205–2219
- Möller KÅ, Johansson B, Berge O-G (1998) Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. *J Neurosci Methods* 84(1–2):41–47
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63
- Nailwal NP, Doshi GM (2021) Role of intracellular signaling pathways and their inhibitors in the treatment of inflammation. *Inflammopharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s10787-021-00813-y>
- Neves AF, Farias FH, de Magalhães SF et al (2020) Peripheral inflammatory hyperalgesia depends on P2X7 receptors in satellite glial cells. *Front Physiol*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00473>
- Noriega V, Miranda HF, Prieto JC et al (2020) Involvement of NO in antinociception of NSAIDs in murine formalin hind paw assay. *Drug Res* 70(04):145–150
- Nzogang PM, Donkeng MB (2020) Neuroprotection: The way of anti-inflammatory agents. *Neuroprotect New Approaches Prospects*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90509>
- Penido C, Conte FP, Chagas MSS et al (2006) Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. *Inflamm Res* 55(11):457–464. <https://doi.org/10.1007/s00011-006-5161-8>
- Pereira-Leite C, Nunes C, Jamal SK et al (2017) Nonsteroidal anti-inflammatory therapy: a journey toward safety. *Med Res Rev*. <https://doi.org/10.1002/med.21424>
- Phull AR, Nasir B, Haq I, ul, et al (2018) Oxidative stress, consequences and ROS mediated cellular signaling in rheumatoid arthritis. *Chem-Biol Interactions*. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.12.024>
- Pick E, Keisari Y (1980) A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods*. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(80\)90340-3](https://doi.org/10.1016/0022-1759(80)90340-3)
- Pick E, Mizel D (1981) Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods*. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(81\)90138-1](https://doi.org/10.1016/0022-1759(81)90138-1)
- Pritzker KPH, Gay S, Jimenez SA et al (2006) Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthr Cartil* 14(1):13–29. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.07.014>
- Quinonez-Flores CM, Gonzalez-Chavez SA, Del Rio ND et al (2016) Oxidative stress relevance in the pathogenesis of the rheumatoid arthritis: a systematic review. *BioMed Res Int*. <https://doi.org/10.1155/2016/6097417>
- Rabinovitch M, Destefano MJ (1973) Macrophage spreading *In Vitro* I. Inducers of Spreading. *Experim Cell Res*. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(73\)90584-3](https://doi.org/10.1016/0014-4827(73)90584-3)
- Radu AF, Bungau SG (2021) Management of rheumatoid arthritis: an overview. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells10112857>
- Rocha F, Aragão A, Oliveira R et al (1999) Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. *Inflammat Res* 48:485–490. <https://doi.org/10.1007/s000110050491>
- Rocha F, Rocha J, Peixoto M et al (2003) Effect of nitric oxide synthase in articular inflammatory pain and cellular influx of zymosan-induced arthritis in rats. *Rev Bras Reumatol* 43:206–217. <https://doi.org/10.1590/S0482-50042003000400002>
- Ronchetti S, Migliorati G, Delfino DV (2017) Association of inflammatory mediators with pain perception. *Biomed Pharmacother*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.001>
- Russo M, Teixeira HC, Marcondes MC et al (1989) Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. *Braz J Med Biol Res* 22:1271–1273
- Schmitt-Sody M, Metz P, Gottschalk O et al (2007) Platelet P-selectin is significantly involved in leukocyte-endothelial cell interaction in murine antigen-induced arthritis. *Platelets* 18(5):365–372. <https://doi.org/10.1080/09537100701191315>
- Schneider AH, Kanashiro A, Dutra SGV et al (2019) Estradiol replacement therapy regulates innate immune response in ovariectomized arthritic mice. *Int Immunopharmacol* 72:504–510. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.04.048>
- Seixas D, Farinha F, da Fonte MP, et al (2022) Pain and wrist joint in rheumatoid arthritis The impact on functional capacity. *Revista de Enfermagem Referência* <https://doi.org/10.12707/RV21074>
- Silva Júnior Fs and Rocha FAC (2006) Artrite induzida por Zymosan em ratos—Mecanismos envolvidos na hipernocicepção e finalise da cartilagem articular. *Acta Reum Port* 31:143–149
- Smolen JS, Aletaha D, Barton A et al (2018) Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Prim*. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.1>
- Tang M, Zeng Y, Peng W et al (2022) Pharmacological Aspects of Natural Quercetin in Rheumatoid Arthritis. *Drug Design, Development, Design Delopm Ther*. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S364759>
- Tardito S, Martinelli G, Soldano S et al (2019) Macrophage M1/M2 polarization and rheumatoid arthritis: A systematic review. *Autoimmun Rev*. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102397>
- Underhill DM (2003) Macrophage recognition of zymosan particles. *J Endotoxin Res* 9(3):176–180. <https://doi.org/10.1179/096805103125001586>
- Verri WA, Cunha TM, Parada CA et al (2006) Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther*. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.04.001>

- Wang S, Zhou Y, Huang J et al (2023) Advances in experimental models of rheumatoid arthritis. *Eur J*. <https://doi.org/10.1002/eji.202249962>
- William E, Clair S, Wilkinson WE et al (1996) Brief Definitive report increased expression of blood mononuclear cell nitric oxide synthase Type 2 in Rheumatoid Arthritis patients. *Patients* 20:1173–1178
- Wong VKW, Qiu C, Xu SW et al (2019) Ca<sup>2+</sup> signalling plays a role in celastrol-mediated suppression of synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis patients and experimental arthritis in rats. *British J Pharmacol* 176(16):2922–2944. <https://doi.org/10.1111/bph.14718>
- Yamada AN, Grespan R, Yamada ÁT et al (2013) Anti-inflammatory activity of *Ocimum americanum* L. essential oil in experimental model of zymosan-induced arthritis. *Am J Chinese Med* 41(4):913–926. <https://doi.org/10.1142/S0192415X13500614>
- Jung KY, Kim DS, Oh SR, et al (1998) Magnone A and B, novel anti-PAF tetrahydrofuran lignans from the flower buds of *Magnolia fargesii*. Available at: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Zhang Y, Mao X, Li W et al (2021) *Tripterygium wilfordii*: an inspiring resource for rheumatoid arthritis treatment. *Med Res Rev*. <https://doi.org/10.1002/med.21762>
- Zuliani JP, Gutiérrez JM, Casais LL, Sampaio SC et al (2005) Activation of cellular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and Lys-49 phospholipases A2. *Toxicon* 46(5):523–532. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.06.017>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

## 6 ANEXOS

### 6.1 Aprovação do Protocolo Experimental pelo CEUA

04/06/2019

SEI/UFMS - 1256496 - Certificado



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Análogos triazólicos derivados de Veraguensina e Grandisina hibridizados com celecoxibe, associados ao grupamento ácido carboxílico ou sulfonamida e seus efeitos sobre a artrite reumatoide – estudos *in vivo* e *in vitro*”, registrada com o nº 1.049/2019, sob a responsabilidade de **Mônica Cristina Toffoli Kadri** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 4ª reunião ordinária do dia 22/05/2019.

FINALIDADE	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	11/03/2019 a 10/02/2022
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Mus musculus</i> / Swiss
Nº de animais	385 Machos + 16 Fêmeas = 401
Peso/Idade	18 - 25g / 4 - 6 semanas
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	UT-Biotério/UFMS

Fábio José Carvalho Faria

Coordenador da CEUA/UFMS

Campo Grande, 24 de maio de 2019.

Documento assinado eletronicamente por **Fabio Jose Carvalho Faria**,  
Professor do Magisterio Superior, em 27/05/2019, às 18:40, conforme