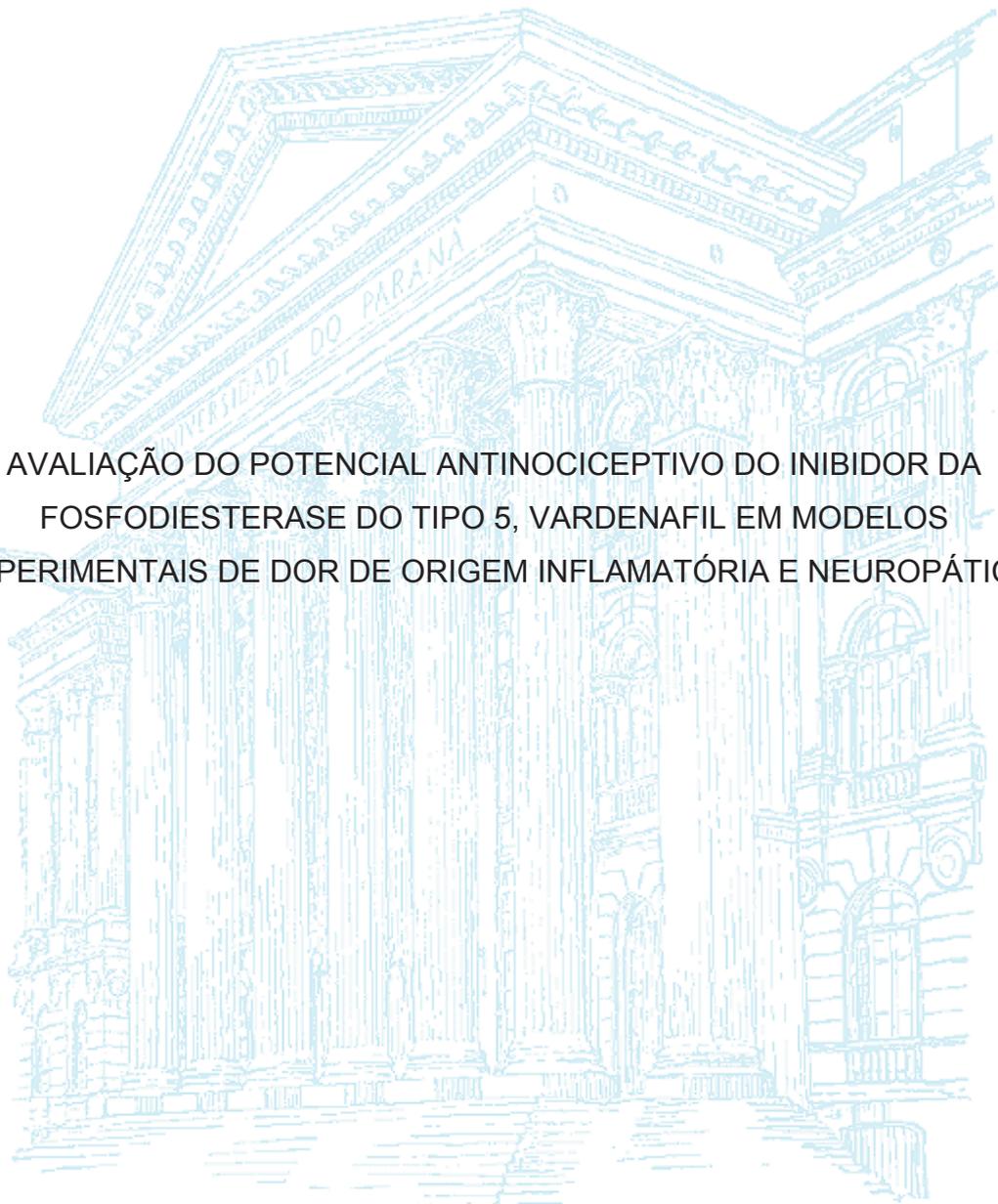


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EVELIZE STACOVIAKI ROSA



AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO DO INIBIDOR DA  
FOSFODIESTERASE DO TIPO 5, VARDENAFIL EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS DE DOR DE ORIGEM INFLAMATÓRIA E NEUROPÁTICA

CURITIBA

2020

EVELIZE STACOVIAKI ROSA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO DO INIBIDOR DA  
FOSFODIESTERASE DO TIPO 5, VARDENAFIL EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS DE DOR DE ORIGEM INFLAMATÓRIA E NEUROPÁTICA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Dor, Inflamação e Febre, departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Joice Maria da Cunha

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Rosa, Evelize Stacoviaki.

Avaliação do potencial antinociceptivo do inibidor da fosfodiesterase do Tipo 5, Vardenafil em modelos experimentais de dor de origem inflamatória e neuropática. / Evelize Stacoviaki Rosa. – Curitiba, 2020.

115 f. : il.

Orientadora: Joice Maria da Cunha.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Fosfodiesterase. 2. Anti-inflamatórios. 3. Dor neuropática. 4. Atividade antinociceptiva. I. Título. II. Cunha, Joice Maria da. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (22. ed.) 616.849



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -  
40001016038P0

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **EVELIZE STACOVIAKI ROSA** intitulada: **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO DO INIBIDOR DA FOSFODIESTERASE DO TIPO 5, VARDENAFIL EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOR DE ORIGEM INFLAMATÓRIA E NEUROPÁTICA**, sob orientação da Profa. Dra. JOICE MARIA DA CUNHA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 13 de Março de 2020.

Assinatura Eletrônica

29/04/2020 20:32:53.0

JOICE MARIA DA CUNHA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

12/05/2020 14:36:29.0

LUANA FISCHER

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

29/04/2020 20:13:01.0

DANIELE MARIA FERREIRA

Avaliador Externo (FACULDADES PEQUENO PRÍNCIPE)

Ao amor de minha vida Cleverson, aos meus pais e irmãos, que estejamos unidos  
sempre.

Dedico também a todos aqueles que correm atrás de sonhos, por mais distantes  
que pareçam.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que me iluminou por me deixar sempre cercada de pessoas repletas de amor. Obrigada por nunca soltar a minha mão e me guiar em todos os momentos. Aos meus pais, Dony e Antônio, que nunca mediram esforços para me ensinar o caminho do bem e sempre me apoiaram em todas as etapas da minha vida. Sem vocês, eu não chegaria até aqui. Muito obrigada por tudo! O amor que sinto por vocês é incondicional.

Aos meus irmãos, Denise, João e Luciana, por acreditar no meu sonho e sempre me motivar a seguir em frente. É muito bom saber que posso contar com vocês em todos os momentos. Amo vocês!

Ao meu esposo e companheiro, Cleverson, que segurou a minha mão em todos os momentos, e que fez tudo ao seu alcance para que meu sonho se realizasse. Seu apoio e compreensão foram fundamentais. Obrigada por cada dia em que você ficou conversando comigo por telefone até eu conseguir dormir. Amo você imensamente!

Ao meu sogro, Carlos Biauki, que muitas vezes deixou tudo o que estava fazendo para me levar até Curitiba, meu muito obrigada, o senhor é meu segundo pai.

Aos meus cunhados, Marcio e Leandrina Biauki, que abriram a porta de sua casa para que eu ficasse o tempo que fosse necessário.

À minha orientadora, Joice Maria, que me deu a oportunidade de fazer parte de seu laboratório de pesquisa, sem ao menos me conhecer, que confiou em mim e me ensinou sobre ciência, ética, amizade e amor. Saiba que lhe considero a minha mãe de Curitiba. Serei sempre muito grata por ter trabalhado ao seu lado.

À minha irmã de outra mãe, Alexia, que me ensinou tudo sobre os experimentos no laboratório, que esteve comigo em cada momento, que mesmo cansada nunca me deixou sozinha. Obrigada por essa amizade eterna! Amo você.

Ao meu amigo do coração, Carlos Henrique, que com sua luz iluminou muitos dos meus dias, que me ensinou sobre farmacologia, inglês e principalmente sobre amizade. Obrigada por tudo! Amo você.

As minhas amigas Bruna, Erika, Amanda e Joelle obrigada por cada sorriso, cada palavra de incentivo, cada ensinamento... Vocês são especiais!

A todos meus colegas de laboratório que de alguma forma me ajudaram e estiveram comigo, meu muito obrigada.

A todos os colaboradores do projeto, por todas as considerações importantíssimas do meu trabalho.

A todos os professores do departamento de farmacologia, em especial aos professores Juliana, Alexandra, Maria Fernanda, Janaína, Eunice, Maria Vital e Paulo, pela contribuição direta durante a minha formação acadêmica desses dois anos.

À Universidade Federal do Paraná, por me fornecer a estrutura física para os estudos e pesquisa;

À CAPES pelo apoio financeiro.

*“É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê.”*

**Los Hermanos**

## RESUMO

Fosfodiesterases (PDEs) são enzimas que catalizam a hidrólise do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e/ou monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), exercendo um papel essencial na regulação desses nucleotídeos cíclicos e sobre cascatas intracelulares ativadas por estes. São descritas 11 famílias de PDEs que podem ser divididas com base na especificidade de substrato: específicas para AMPc (PDE do tipo 4, PDE7 e PDE8); específicas para GMPc (PDE5, PDE6 e PDE9) e as não substratos específicas (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 e PDE11). Entre essas isoenzimas, a PDE5, presente nas células musculares lisas do corpo cavernoso, ganhou atenção no campo médico por ser alvo de fármacos utilizados para o tratamento da disfunção erétil, sendo o sildenafil, vardenafil e tadalafil os mais estudados, já que, pela semelhança à base guanosina do GMPc, estes fármacos bloqueiam o sítio ativo da PDE5, impedindo a hidrólise de GMPc, o qual ativa proteínas quinases dependentes de GMPc (PKG), diminuindo o influxo de cálcio intracelular. Em relação à dor, é descrito que a excitabilidade dos nociceptores pode ser controlada pelo balanço entre os níveis de AMPc e GMPc, sendo a via GMPc/PKG e subjacente modulação de correntes de potássio ATP dependentes responsável pela hiperpolarização dos nociceptores. Embora muitos estudos já tenham demonstrado uma antinocicepção induzida por sildenafil, pouco foi estudado sobre os efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos do vardenafil, um iPDE5 mais potente e específico. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial efeito anti-inflamatório e antinociceptivo do vardenafil em modelos pré-clínicos de inflamação e dor em murinos. Os dados obtidos mostraram que o tratamento sistêmico com vardenafil (apenas na dose mais alta testada; 0,1 mg/kg; via intraperitoneal, i.p.) diminuiu significativamente o edema de pata induzido por carragenina, que parece não ser dependente da inibição da migração de neutrófilos, uma vez este tratamento não alterou a atividade da mieloperoxidase induzida por carragenina. Além disso, o tratamento com vardenafil (em todas as doses testadas, 0,01, 0,03 ou 0,1 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente o número de comportamentos nociceptivos na segunda fase do teste da formalina em ratos e o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos sem alterar o desempenho locomotor no teste de campo aberto. No entanto, o tratamento com vardenafil foi incapaz de alterar a alodinia mecânica induzida por constrição crônica do nervo ciático ou carragenina ou ainda o tempo de latência nos testes da placa quente e *tail-flick*. Em conjunto, os dados do presente estudo corroboram a propriedade anti-inflamatória do vardenafil e apontam, pela primeira vez na literatura, o potencial efeito antinociceptivo do mesmo em modelos de dor evocada por formalina ou ácido acético. Mais estudos estão em desenvolvimento a fim de caracterizar os mecanismos farmacológicos envolvidos nestes efeitos.

Palavras-chave: Fosfodiesterase do tipo 5. Vardenafil. Anti-inflamatório. Antinocicepção. Dor neuropática.

## ABSTRACT

Phosphodiesterases (PDEs) are enzymes that catalyze the hydrolysis of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) or cyclic guanosine monophosphate (cGMP), playing an essential role in the regulation of these cyclic nucleotides and on intracellular cascades activated by them. 11 families of PDEs are described and that can be divided based on substrate specificity: specific for cAMP (PDE type 4, PDE7 and PDE8); specific for cGMP (PDE5, PDE6, and PDE9) and non-specific substrates (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10, and PDE11). Among these isoenzymes, PDE5, present in the smooth muscle cells of the corpus cavernous, has gained attention in the medical field because it is the target of drugs used to treat erectile dysfunction, being sildenafil, vardenafil, and tadalafil the most studied. Also, due to the similarity to the cGMP guanosine base, these drugs block the active site of PDE5, preventing the cGMP hydrolysis, which activates cGMP-dependent protein kinases (PKG), decreasing the influx of intracellular calcium. About pain, it is described that nociceptor excitability can be controlled by the balance between cAMP and cGMP levels, with the cGMP/PKG pathway and the underlying modulation of ATP dependent potassium currents responsible for nociceptor hyperpolarization. Although many studies have already demonstrated activity induced by sildenafil, little has been studied about the anti-inflammatory and antinociceptive effects of vardenafil, a more potent and specific iPDE5. Thus, the present study aimed to evaluate the potential anti-inflammatory and antinociceptive effects of vardenafil in preclinical models of inflammation and pain. The systemic treatment with vardenafil (only at the highest tested dose; 0.1 mg/kg; intraperitoneally, i.p.) significantly decreased the carrageenan-induced paw edema, which seems not to be dependent of neutrophil migration inhibition since all tested dose of vardenafil did not change the carrageenan-induced myeloperoxidase activity augment. However, vardenafil treatment (at all tested doses, 0.01, 0.03 or 0.1 mg/kg, i.p.) significantly reduced the number of flinches in the second phase of the formalin test and the number of writhing induced acetic acid in mice without altering the locomotor performance in the open field test. However, vardenafil treatment was unable to alter the carrageenan- or sciatic nerve chronic constriction injury-induced mechanical allodynia or the latencies in the hot plate or tail-flick apparatus. In our knowledge, this is the first study that characterizes the potential antinociceptive effect of vardenafil, without affecting the locomotor status. Besides, the anti-inflammatory property of vardenafil was corroborated over the carrageenan-induced paw edema, which seems not to be dependent on neutrophil migration inhibition. Further studies are needed to characterize the exact mechanisms involved in these effects.

Keywords: Phosphodiesterase 5. Vardenafil. Anti-inflammatory. Antinociception. Neuropathic pain.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESQUEMA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO, SEUS COMPONENTES E FUNÇÕES .....	23
FIGURA 2 - PROCESSO NOCICEPTIVO .....	26
FIGURA 3 - ESTRUTURA MOLECULAR DOS IPDE5. (A) SILDENAFIL, (B) VARDENAFIL E (C) TADALAFIL .....	33

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- FAMÍLIAS DE PDE RELACIONANDO-AS AO NUCLEOTÍDEO CÍCLICO EM QUE ATUAM, AOS INIBIDORES DE PDE MAIS COMUMENTE UTILIZADOS E COMO SE DÁ SUA REGULAÇÃO .....	31
--	----

## LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1 - EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM VARDENAFIL SOBRE A ALODINIA MECÂNICA E EDEMA DE PATA INDUZIDOS POR CARRAGENINA EM RATOS..... 48
- GRÁFICO 2 - EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM VARDENAFIL SOBRE ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE EM RATOS .. 49
- GRÁFICO 3 - EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM VARDENAFIL SOBRE O TESTE DA FORMALINA EM RATOS..... 51
- GRÁFICO 4 - EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM VARDENAFIL SOBRE O TESTE DA CONTORÇÃO ABDOMINAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS..... 52
- GRÁFICO 5 - EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM VARDENAFIL SOBRE OS TESTES DO TAIL-FLICK, PLACA QUENTE E CAMPO ABERTO EM RATOS ..... 54
- GRÁFICO 6 - EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM VARDENAFIL SOBRE A ALODINIA MECÂNICA INDUZIDA POR LESÃO POR CONSTRIÇÃO CRÔNICA DO NERVO CIÁTICO EM RATOS 56

## LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

5-HT - 5-hidroxitriptamina (serotonina)

AINEs - Anti-Inflamatórios Não Esteroidais

AMPA -  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico

AMPC - Monofosfato de Adenosina cíclico

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina trifosfato

AUC – Área sob a curva

B – Basal

B1 – Receptores de Bradicinina do tipo 1

B2 – Receptores de Bradicinina do tipo 2

CA – Califórnia

CAM – Calmodulina

CCI – Constrição crônica do nervo ciático

CEUA – Comissão de Ética para o Uso de Animais

Cg – Carragenina

COX – Ciclooxigenase

COX-1 – Ciclooxigenase 1

COX-2 – Ciclooxigenase 2

DO – Densidade Óptica

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EPM – Erro padrão da média

ERO – Espécies Reativas de Hidrogênio

EUA – Estados Unidos da América

g – Grama

GC – Guanilil ciclase

GMPc - Monofosfato de Guanosina cíclico

GMPc/PKG – Via monofosfato de guanosina cíclico/Proteína quinase dependente de GMPc

GRD – Gânglio da Raiz Dorsal

h – Hora

H1 – Receptores de Histamina

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de Hidrogênio

HOCl – Ácido hipocloroso

HTAB – Hexadecyltrimethylammonium Bromide

i.p. – Intraperitoneal

i.pl. – Intraplantar

IASP – Associação internacional para o estudo da dor

IL-1 $\beta$  – Interleucina-1 $\beta$

IL-6 – Interleucina-6

IL-8 – Interleucina-8

iPDE5 – Inibidor da fosfodiesterase do tipo 5

kg – Quilograma

m – mol

mg – Miligrama

mim – Minutos

ml – Mililitro

mm – milímetro

MMP9 - Metalopeptidase 9 da matriz

MPO – Mieloperoxidase

n – Número

NaCl –Cloreto de sódio

nm - nanômetro

NO – Óxido nítrico

NO-GMPc – Via óxido nítrico/monofosfato de guanosina cíclico

PDE – Fosfodiesterase

PDE5 – Fosfodiesterase do tipo 5

PDE6 – Fosfodiesterase do tipo 6

PDEs – Fosfodiesterasas

PKA – Proteína quinase A

PKB – Proteína quinase B

PKC – Proteína quinase C

s – Segundos

s.c. – Subcutânea

Sal – Salina

TMB – *3,3',5,5'-tetramethylbenzidine*

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$

TRPs - Receptores de Potencial Transitório

ug – micrograma

uL – microlitro

VEI – veículos

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1 INFLAMAÇÃO.....	20
1.1.1 Células inflamatórias.....	22
1.2 DOR E NOCICEPÇÃO .....	25
1.2.1 Dor aguda e inflamatória .....	27
1.3 DOR NEUROPÁTICA.....	28
1.4 FOSFODIESTERASES .....	30
1.4.1 Fosfodiesterases do tipo 5 e seus inibidores.. ..	32
1.4.2 iPDE5 e dor.....	34
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	37
2.1 OBJETIVO GERAL .....	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	39
3.1 ANIMAIS .....	39
3.2 DROGAS .....	39
3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS .....	40
3.3.1 Avaliação do limiar mecânico de retirada da pata.....	40
3.3.2 Alodinia mecânica e edema de pata induzido por carragenina .....	40
3.3.3 Avaliação da atividade da mieloperoxidase.....	41
3.3.4 Teste da formalina.....	42
3.3.5 Contorção abdominal induzida por ácido acético .....	43
3.3.6 Teste do <i>Tail-flick</i> .....	43

3.3.7 Teste da placa quente .....	44
3.3.8 Teste do campo aberto.....	44
3.3.9 Alodinia mecânica induzida por constrição crônica da nervo ciático .....	45
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
<b>4. RESULTADOS</b> .....	46
4.1 EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM VARDENAFIL SOBRE A ALODINIA MECÂNICA E EDEMA DE PATA INDUZIDOS POR CARRAGENINA EM RATOS ...	46
4.2 EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM VARDENAFIL SOBRE ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE EM RATOS .....	49
4.3 EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM VARDENAFIL SOBRE O TESTE DA FORMALINA EM RATOS .....	50
4.4 EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM VARDENAFIL SOBRE O TESTE DA CONTORÇÃO ABDOMINAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS .....	51
4.5 EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM VARDENAFIL SOBRE OS TESTES DO <i>TAIL-FLICK</i> , PLACA QUENTE E CAMPO ABERTO EM RATOS.....	53
4.6 EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM VARDENAFIL SOBRE A ALODINIA MECÂNICA INDUZIDA POR LESÃO POR CRONSTRIÇÃO CRÔNICA DO NERVO CIÁTICO EM RATOS.....	55
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	57
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	65
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	66
<b>ANEXO 1 – CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA</b> .....	77

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma resposta biológica do sistema imunológico que pode ser desencadeada por fatores como lesões traumáticas, patógenos, autoimunes ou compostos tóxicos (NATHAN, 2002). Durante o processo inflamatório agudo ocorrem respostas celulares e interações moleculares a fim de minimizar com eficiência lesões ou infecções iminentes e restaurar a homeostase do tecido lesado, sendo assim, a inflamação é considerada um mecanismo de defesa do nosso organismo (CHEN *et al.*, 2018).

A nível tecidual, a inflamação foi caracterizada primariamente por Aulus Cornelius Celsus (25 a.C – 50 d.C) por 4 sinais, a dor, o calor, o rubor e o edema, sendo considerados os “sinais cardinais da inflamação”. No século XIX, Rudolph Virchow, também chamado de “pai da patologia moderna”, adicionou o quinto sinal, chamado de “perda de função” (KUMAR *et al.*, 2013). Outros eventos micro circulatórios como, aumento da permeabilidade vascular, recrutamento e acúmulo de leucócitos e liberação de mediadores inflamatórios também ocorrem durante o processo inflamatório (CHEN *et al.*, 2018).

De forma geral, a inflamação pode ser classificada como crônica ou aguda e depende de aspectos como os componentes celulares associados e sua duração. A inflamação aguda é caracterizada por apresentar início rápido, de curta duração que é resultante da ação de um estímulo químico ou físico (KUMAR *et al.*, 2013). No entanto, se a resposta inflamatória não for direcionada e o reparo tecidual não for adequado, a inflamação pode levar a danos persistentes nos tecidos por leucócitos ou linfócitos, tornando-se uma inflamação crônica (NATHAN, 2002; ZHOU *et al.*, 2016).

O reconhecimento inicial da infecção é mediado por macrófagos e mastócitos tecidos-residentes, que levam à produção de mediadores inflamatórios que incluem quimiocinas, citocinas, eicosanoides, aminas vasoativas e produtos

proteolíticos que provocam um exsudato inflamatório local, ou seja, aumentam a permeabilidade vascular local, permitindo a migração de leucócitos e extravasamento de proteínas plasmáticas (POBER e SESSA, 2007).

Os mediadores inflamatórios alteram a funcionalidade de muitos tecidos e órgãos e possuem efeitos em comum na vascularização e no recrutamento de leucócitos. Esses mediadores podem ser derivados de proteínas plasmáticas ou produzidos por macrófagos e mastócitos residentes ou ainda por células presentes no tecido. Mediadores como a histamina e serotonina são pré-formados e armazenados nos grânulos de basófilos, mastócitos e plaquetas. Outros mediadores, como as cininas, circulam pelo plasma e tem sua concentração aumentada durante a resposta da fase aguda e ainda existem mediadores que são produzidos diretamente em resposta à estimulação por indutores de inflamação (CHEN *et al.*, 2018; KUMAR *et al.*, 2013; MEDZHITOV, 2008).

Os mediadores inflamatórios, de acordo com suas propriedades bioquímicas, podem ser divididos em sete grupos: peptídeos vasoativos, aminas vasoativas, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas, enzimas proteolíticas e fragmentos do sistema complemento (MEDZHITOV, 2008).

Os peptídeos vasoativos são pequenas proteínas, como por exemplo, a substância P (neuropeptídeo), iniciam as respostas inflamatória, promovem a permeabilidade vascular e regulam o calibre dos vasos. Já as aminas vasoativas (por exemplo, serotonina e histamina) promovem aumento da vascularização, permeabilidade e vasodilatação, sendo normalmente estocadas em grânulos citoplasmáticos de mastócitos, basófilos e plaquetas que são liberadas durante a primeira fase da resposta inflamatória. Os mediadores lipídicos, também chamados de metabólitos do ácido araquidônico, são derivados de fosfolipídios e quando produzidos possuem funções específicas para cada metabólito como: as prostaciclina e prostaglandinas envolvidas em toda a cascata inflamatória; tromboxanos que induzem a vasoconstrição e leucotrienos responsáveis pela vasoconstrição e aumento da permeabilidade vascular (KUMAR, 2003; MANJO e JORIS, 2004; MANJO e PALADE, 1961; MEDZHITOV, 2008).

As citocinas como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas são produzidas por uma variedade de células, como os macrófagos, monócitos, mastócitos e eosinófilos e estão responsáveis por estimular síntese de prostaglandinas, ativar mensageiros intracelulares e ativação e sensibilização de nociceptores. Já as quimiocinas são responsáveis por quimiotaxia e controlar o extravasamento de leucócitos, sendo produzidas por muitos tipos de células em resposta a indutores de inflamação. Com relação as enzimas proteolíticas, desempenham papéis importantes em muitos processos, incluindo imunidade inata, migração de leucócitos e remodelamento de tecidos. Os fragmentos do sistema complemento C3a e C5a, também chamadas de anafilatoxinas atuam aumentando a permeabilidade vascular pela liberação de mediadores de mastócitos e plaquetas (CHEN *et al.*, 2018; MEDZHITOV, 2008).

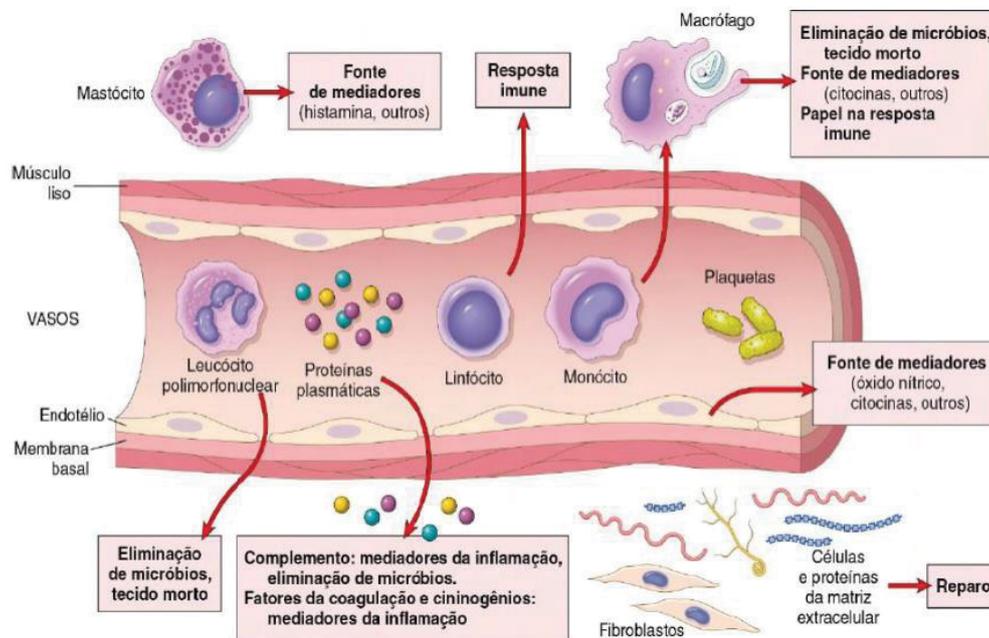
A inflamação aguda ocorre em estágios, podendo ser dividida em 3 estágios principais: o primeiro, em que ocorrem alterações vasculares (promovidas por mediadores inflamatórios) para facilitar o deslocamento de células e proteínas para o local da lesão e amplificação da resposta inflamatória; o segundo caracterizado pela passagem de células sanguíneas para o local da lesão (especialmente leucócitos e fagócitos) devido a liberação dos mediadores e a ativação do sistema do complemento; e o terceiro estágio, que está relacionado a proliferação celular e regeneração tecidual (AMULIC *et al.*, 2012; KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013; KUMAR *et al.*, 2013; SUZUKI *et al.*, 2003).

### 1.1.1 Células inflamatórias

As células envolvidas no processo inflamatório compreendem as células de defesa (leucócitos) e células residentes das paredes vasculares. Quando ocorre um estímulo pró-inflamatório, células como macrófagos, dendríticas, mastócitos dentre outras, são ativadas através de receptores, e como consequência, secretam citocinas e outros mediadores, que irão induzir a resposta inflamatória. Além disso, há a ativação de células endoteliais, que por

sua vez, promovem um aumento da adesão e migração de leucócitos, principalmente os neutrófilos. Após esse recrutamento os leucócitos, agora ativados, promovem muitas funções celulares como fagocitose de microrganismos e partículas, degranulação (exocitose de produtos granulares), produção de mediadores químicos, que amplificam a resposta inflamatória, dentre outras. Depois da eliminação do agente nocivo, as células e os mediadores inflamatórios são inativados ou degradados (FIGURA 1) (KUMAR *et al.*, 2013).

FIGURA 1 - ESQUEMA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO AGUDO, SEUS COMPONENTES E FUNÇÕES



FONTE: modificado de: KUMAR *et al.*, 2013.

Os neutrófilos, também chamados de leucócitos polimorfonucleares, são os primeiros glóbulos brancos a serem recrutados durante uma inflamação aguda, com um tempo de meia vida curto e que podem ser classificados como células fagocíticas, pois são eficientes em eliminar patógenos por múltiplos mecanismos. São produzidos continuamente na medula óssea a partir de precursores mieloides, e durante seu processo de maturação, passam por várias fases, sendo mieloblastos, promielócitos, mielócitos, metamielócitos, bastonetes e por fim polimorfonucleares ou segmentados, ricos em grânulos e vesículas (KOLACZKOWSKA e KUBES 2013; KUMAR *et al.*, 2013).

A partir do estágio de promielócito, durante a maturação do neutrófilo, os grânulos começam a ser formados. Três tipos de grânulos de neutrófilos são formados durante a maturação: 1) os grânulos azurófilos, também chamados de primários pois são os primeiros a ser formados durante maturação de neutrófilos, que contém mieloperoxidase; 2) os grânulos específicos, podendo ser chamados também de secundários que contém a glicoproteína lactoferina, e 3) os grânulos de gelatinase (terciários) e são conhecidos pela presença de gelatinase B (também chamada de MMP9). Além disso, os neutrófilos possuem vesículas secretoras que transportam e servem de reservatório para diversas moléculas necessárias para a adesão celular, permitindo a transmigração de neutrófilos (AMULIC *et al.*, 2012; KOLACZKOWSKA e KUBES 2013).

A mieloperoxidase (MPO) é uma hemoproteína catiônica lisossomal que está localizada nos grânulos primários de leucócitos polimorfonucleares, com uma maior expressão durante o estágio de promielócito, e, à medida que ocorre a diferenciação nas linhagens celulares subsequentes, há uma diminuição dessa expressão, podendo ser encontrada também nos lisossomos primários de monócitos, porém em menor quantidade. Essa enzima na presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), e íons halogênios constitui-se em potente sistema bactericida (ARATANI, 2018; PEREIRA *et al.*, 2000).

A MPO também promove a oxidação de grupamentos fenol e anilina, através da formação de hipotiocianato. Outras células também sofrem efeito da MPO, como as células endoteliais, que, com a produção de oxidantes contribuem para o aumento do dano tecidual nos processos inflamatórios. Dessa forma, a MPO vem sendo associada a diversas situações patológicas, principalmente nas que existe um processo inflamatório mediado por neutrófilos (BRITO, 2012).

A atividade da enzima MPO representa um indicativo indireto da presença de leucócitos polimorfonucleares no tecido lesado, sendo assim, a técnica de avaliação da atividade na MPO é muito utilizada para avaliar a infiltração desses leucócitos polimorfonucleares no tecido inflamado. Essa técnica relaciona de forma diretamente proporcional a quantidade total da enzima extraída do tecido, com o número de neutrófilos presentes no tecido, permitindo que seja possível

mensurar o número aproximado de neutrófilos presentes no tecido lesionado durante o processo infeccioso (BRADLEY *et al.*, 1982; DE YOUNG *et al.*, 1989)

## 1.2 DOR E NOCICEPÇÃO

A dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal dano (IASP; *International Association for the Study of Pain*). Sendo assim, a dor é percebida por cada indivíduo de maneira diferente, tornando-a uma experiência subjetiva pelo envolvimento do componente emocional e desagradável, já que representa prejuízo ao nosso organismo.

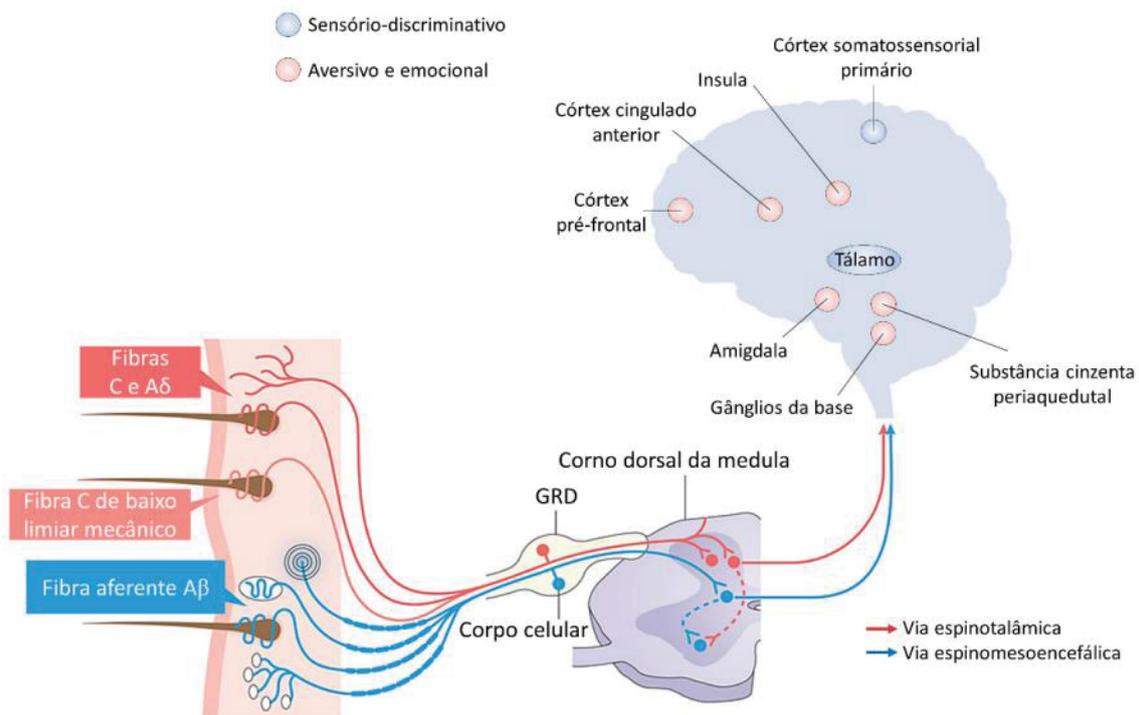
Ao estudar a dor em modelos animais, convencionalmente se utiliza o termo “nocicepção” ao invés de “dor”, que segundo a IASP é definido como o processo neural de codificação do estímulo nocivo.

A nocicepção inicia-se em terminações nervosas na periferia, em que os nociceptores conduzem a informação da dor ao sistema nervoso central. Os nociceptores são neurônios pseudounipolares, com os corpos celulares localizados no gânglio da raiz dorsal (GRD), ou do trigêmeo, os quais possuem uma ramificação periférica e outra que se direciona ao sistema nervoso central. As fibras nervosas desses nociceptores ainda possuem uma divisão em duas categorias principais: as fibras do tipo A, que são mielinizadas de médio a grande diâmetro, e as fibras do tipo C, não mielinizadas de pequeno diâmetro. A transmissão da informação da dor também pode ser dividida de acordo com sua velocidade em rápida e lenta. As fibras A $\delta$  transmitem a informação de dor rapidamente (6-30 m/seg.) sendo fibras relativamente pequenas (1-6 m) e pouco mielinizadas. Já as fibras C possuem uma velocidade de condução mais lenta (0,5-2 m/seg.) e são menores (<1,5 m). As fibras A $\beta$  conduzem essa informação em alta velocidade (30-70 m/seg.) por se tratar de fibras grandes (6-12m) e mielinizadas. (BASBAUM *et al.*, 2009; BOURNE *et al.*, 2014; KWON *et al.*, 2014).

Tanto as fibras A $\delta$  quanto fibras C podem ser chamadas de polimodais, ou seja, respondem a vários estímulos como químicos, mecânicos ou térmicos (calor e frio para fibras C e somente calor para fibras A $\delta$ ) e, além disso, apresentam um alto limiar de ativação (TRACEY, 2017).

Após o estímulo dessas fibras, seja por uma lesão tecidual ou um estímulo de naturezas diversas, ocorre a condução dessa informação de dor até a matéria cinzenta do corno dorsal da medula espinhal, ascendendo para o tálamo e córtex somatossensorial, onde ocorre a percepção da dor passando também pelo córtex anterior cingulado, pré-frontal e insular, a amígdala e o hipotálamo, onde são adicionados aspectos afetivos e emocionais (FIGURA 3) (BASBAUM *et al.*, 2009; BOURNE *et al.*, 2014; KWON *et al.*, 2014).

FIGURA 2 - PROCESSO NOCICEPTIVO



FONTE: modificado de: SCHOLZ e WOOLF, 2002.

A classificação da dor pode ser feita de acordo com sua etiologia, em nociceptiva, inflamatória e neuropática. A dor nociceptiva, possui um caráter adaptativo que resulta da ativação de neurônios nociceptivos primários através de

estímulos químicos, térmicos e mecânicos os quais possuem caráter protetivo da lesão tecidual. A dor de origem inflamatória resulta do processo inflamatório e da ação de mediadores inflamatórios, já a dor neuropática provém de uma lesão de nervos periféricos e centrais, acompanhada por dor espontânea intensa, puramente patológica, ou seja, sem caráter protetivo, geralmente de duração crônica. Tanto na dor neuropática quanto na inflamatória ocorre um estado de facilitação da condução nervosa, em que estímulos que antes não causavam dor, passam a ser interpretados como tal (alodinia) ou sensibilidade exagerada à dor (hiperalgesia), porém a dor neuropática possui manejo clínico extremamente difícil devido a este tipo de dor ser especialmente refratária a fármacos opioides que são prescritos como terceira linha de tratamento para esse tipo de dor (KLAUMANN *et al.*, 2008; KRAYCHETE *et al.*, 2006; ZEILHOFER, 2007).

### 1.2.1 Dor aguda e inflamatória

A dor é considerada também, um dos cinco sinais cardinais da inflamação já que quando ocasionada por dano tecidual, envolve um processo inflamatório com a liberação de diversos mediadores químicos como prostaglandinas, cininas, substância P, entre outras substâncias algogênicas. A partir da liberação destes mediadores, as fibras C e A $\delta$  (nociceptores) são sensibilizados, diminuindo seu limiar de ativação, promovendo a chamada “sensibilização periférica” (KLAUMANN *et al.*, 2008; RADNOVICH *et al.*, 2014).

Os nociceptores expressam diversos receptores, como: receptores de serotonina (5-HT), bradicinina (B1 e B2), histamina (H1), receptores de potencial transitório (TRPs) entre outros, que detectam estímulos nocivos e promovem a formação de segundos mensageiros. Essa cascata de eventos celulares, que culminam em ações sobre diferentes canais iônicos, reduzem o limiar de ativação, despolarizando a membrana desses neurônios para que ocorra disparo ou ativação da fibra nervosa. Além disso, células imunes, como os macrófagos, mastócitos e neutrófilos também liberam citocinas que resultam na ativação e

sensibilização dos nociceptores, causando dor. Em conjunto, esses eventos levam a dor provocada por estímulos não nocivos chamados de alodinia e hiperalgesia, como citado anteriormente (KLAUMANN *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2013; SCHOLZ e WOOLF, 2002; TRACEY, 2017).

Como tratamento da dor inflamatória, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs, exemplo: paracetamol, diclofenaco e ibuprofeno) e esteroidais, como os corticoides (exemplo: dexametasona, prednisolona e betametasona) são os mais utilizados. A ação dos AINEs ocorre através do bloqueio de duas isoformas da enzima COX (COX-1, constitutiva e COX-2, induzida durante inflamações), em que alguns deles são mais seletivos para a COX-2, impedindo a produção de prostaglandinas e tromboxano. Com relação aos anti-inflamatórios esteroidais, estes atuam sobre a transcrição gênica, por se ligar sobre o receptor glicocorticoide no citoplasma das células, o que resulta na supressão de genes inflamatórios e ativação de genes anti-inflamatórios (BARNES, 2006; DAY e GRAHAM, 2013).

### 1.3 DOR NEUROPÁTICA

A dor neuropática é uma das principais modalidades de dor crônica, com uma prevalência de 7 a 18% na população mundial (AUSTIN *et al.*, 2012). Segundo a IASP (2018), a dor neuropática é definida como uma dor causada por uma lesão ou doenças (por exemplo, diabetes, doenças autoimunes, processos infecciosos, entre outras) que afetam o sistema nervoso somatossensorial, com origem em nervos periféricos ou centrais, resultando em respostas nociceptivas anormais.

Em condições normais, a percepção da dor envolve um equilíbrio entre vias de condução nociceptivas, porém quando ocorre um dano somatossensorial há um desbalanço entre esses processos excitatórios e inibitórios. Esses danos podem promover uma hiperexcitabilidade das fibras aferentes do tipo A $\delta$  e C, as

quais promovem disparos ectópicos, pela superexpressão de diversos canais iônicos (como canais de sódio voltagem dependente) e receptores. Além disso, canais relacionados a alterações do limiar basal da membrana, hiperpolarização ou repolarização (como os canais de potássio voltagem dependentes) passam a ser menos expressos nessas fibras (BARON, 2006; COLLOCA *et al.*, 2017; FINNERUP e JENSEN, 2006; MEACHAM *et al.*, 2017). Adicionalmente a esses processos, os mediadores inflamatórios como prostaglandinas, ácido araquidônico, citocinas e bradicinina contribuem ainda mais para a sensibilização e sustentação da hiperexcitabilidade dos neurônios aferentes, promovendo então a chamada sensibilização periférica (BARON, 2006; FINNERUP e JENSEN, 2006; NICKEL *et al.*, 2012).

Essas alterações nociceptivas também podem ocorrer a nível central, em que fibras de segunda ordem; na expressão de canais iônicos; aumento da expressão de vesículas transportadores de glutamato, neurotransmissores e neuromoduladores; aumento da atividade da micróglia, glia e astrócitos e redução dos mecanismos descendentes inibitórios mediados por serotonina e noradrenalina. Além dessas alterações citadas acima, no processo de desenvolvimento da dor neuropática, ainda pode ocorrer a formação de neuromas, ou seja, o brotamento contralateral de neurônios aferentes de outras fibras não lesadas em direção às áreas próximas ao trauma e no gânglio da raiz dorsal (BARON, 2006; COLLOCA *et al.*, 2017; MEACHAM *et al.*, 2017; STILLMAN, 2006).

Tomando em conjunto, essas alterações no processamento da dor provocam manifestações clínicas em pacientes acometidos por dor espontânea em que estes relatam dor em queimação, pontadas, picadas e formigamento que ocorrem devido aos disparos ectópicos das fibras, hiperalgesia, alodinia mecânica, térmica e ao frio (FINNERUP e JENSEN, 2006; MEACHAM *et al.*, 2017).

Com essa variedade de mecanismos relacionados a instalação da dor neuropática e as diferenças entre indivíduos, a dificuldade para o tratamento dessa condição é ainda maior. Atualmente, o tratamento da dor neuropática

envolve medicamentos chamados de primeira escolha, como os inibidores da recaptação de serotonina, como a duloxetina e venlafaxina, antidepressivos tricíclicos, como a amitriptilina e imipramina e, por fim anticonvulsivantes, como a gabapentina e pregabalina; Medicamentos de segunda escolha que incluem: opioide, neste caso o tramadol, gel ou patches de capsaicina (8%, agonista TRPV1) e anestésico local, como a lidocaína; E uma terceira linha de medicamentos que são os opioides fortes (morfina, oxicodona e metadona) e neurotoxina (toxina botulínica A) que atua pelo bloqueio neuromuscular e inibição da liberação de acetilcolina (ATTAL, 2018). Entretanto, nenhum dos tratamentos tem mostrado grande eficácia e muitos deles acarretam uma variedade de efeitos colaterais, o que contribui para que a dor neuropática seja considerada um desafio clínico.

#### 1.4 FOSFODIESTERASES

Fosfodiesterases (PDEs) são enzimas que promovem a hidrólise do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), mensageiros intracelulares que medeiam respostas a hormônios e neurotransmissores (COSTA, 2011). A estrutura geral das PDEs consiste de características básicas que incluem um núcleo catalítico, região reguladora entre o terminal de aminoácidos e o núcleo catalítico e também um terminal de aminoácidos que confere especificidade e isoforma (GHOSH *et al.*, 2009).

Sua família é constituída por 11 isoenzimas distribuídas em vários órgãos (FRANCIS *et al.*, 2011; MANALLACK *et al.*, 2005), divididas com base na especificidade de substrato: 1) específicas para AMPc (PDE do tipo 4, PDE7 e PDE8); 2) específicas para GMPc (PDE5, PDE6 e PDE9) e 3) as não substratos específicas (PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 e PDE11) (FRANCIS *et al.*, 2011). Processos fisiológicos como motilidade visceral, débito cardíaco, resposta imune, visão, reprodução, inflamação e neuroplasticidade são regulados justamente por essa hidrólise de monofosfatos cíclicos que as PDEs promovem (GHOSH *et al.*,

2009). Além disso as fosfodiesterases também são consideradas segundos mensageiros em diferentes vias de sinalização (TABELA 1) (BEAVO, 1995).

TABELA 1- FAMÍLIAS DE PDE RELACIONANDO-AS AO NUCLEOTÍDEO CÍCLICO EM QUE ATUAM, AOS INIBIDORES DE PDE MAIS COMUMENTE UTILIZADOS E COMO SE DÁ SUA REGULAÇÃO

<b>Família de PDE</b>	<b>Nucleotídeo Cíclico</b>	<b>Inibidores</b>	<b>Regulação</b>
PDE1	AMPc<GMPc	Vinpocetina	(+) Ca <sup>2+</sup> /CAM, (-) PKA
PDE2	AMPc e GMPc	EHNA	(+) GMPc, PKC
PDE3	AMPc>GMPc	Cilostamida, Milrinona, Zardaverina	(+) PKA, PKB (-) GMPc
PDE4	AMPc	Rolipram, Zardaverina	(+) PKA, ERK (-) ERK, Caspases
PDE5	GMPc	Zaprinast, Sildenafil, Vardenafil, Tadalafil	(+) GMPc, PKG, PKA, (-) Caspases
PDE6	GMPc	Zaprinast, Sildenafil, Dipyridamol	(+) trasnsducina, (-)GMPc, subunidades γ e Δ
PDE7	AMPc	IBMX, Dipyridamol	(+/-) PKA
PDE8	AMPc	Dipyridamol	
PDE9	GMPc	Zaprinast	
PDE10	AMPc<GMPc	Dipyridamol	(-) AMPc
PDE11	AMPc e GMPc	Zaprinast, Dipyridamol, Tadafalil	

FONTE: modificado de: ALMEIDA, 2006.

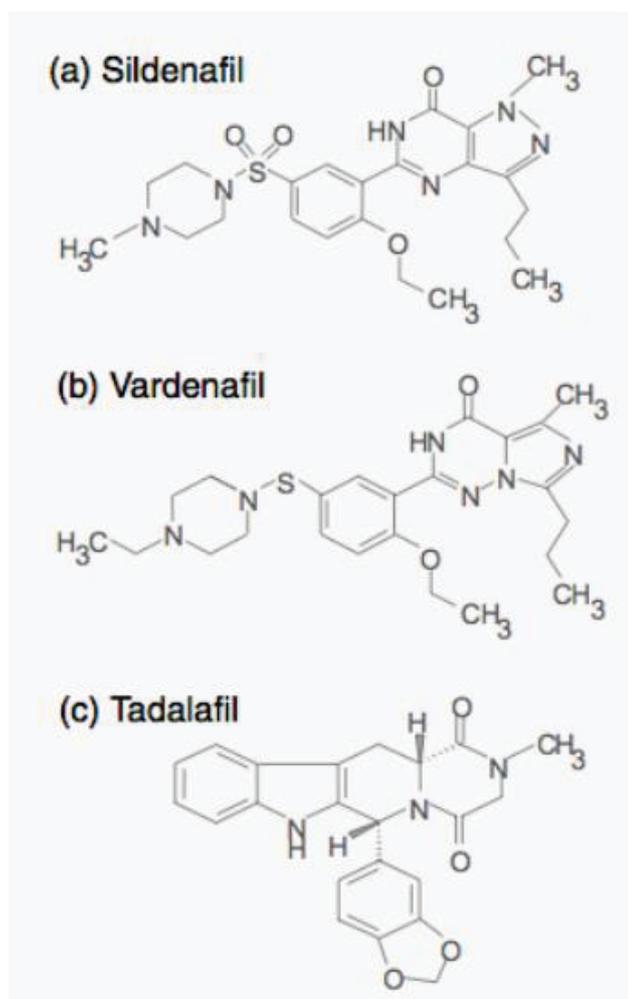
#### 1.4.1 Fosfodiesterase do tipo 5 e seus inibidores

A fosfodiesterase do tipo 5 (PDE5) que é uma das isoenzimas responsável pela regulação de GMPc intracelular, está presente em vários locais do corpo, como em células do musculo liso, corpo cavernoso peniano, células endoteliais dos vasos sanguíneos, plaquetas, pulmonar e coronariana. Até o momento, foram identificadas três variantes para PDE5, que são a PDE5A1, PDE5A2 e PDE5A3. Essas variantes permitem o controle diferencial da expressão do gene PDE5A em várias células, em que a PDE5A1 e PDE5A2 são encontradas em quase todos os tecidos, porém a PDE5A3 é limitada ao músculo liso (ANDERSSON, 2018; REFFELMANN e KLONER, 2009).

A PDE5, ganhou atenção no campo médico por ser alvo de fármacos utilizados para o tratamento da disfunção erétil, já que a inibição específica da PDE5 demonstrou induzir um aumento no GMPc que está associado a um efeito de relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso peniano e posterior ereção (COSTA, 2011; FRANCIS *et al.*, 2011).

Existem atualmente três fármacos inibidores de PDE5 que são comercializados, sendo o sildenafil, vardenafil e tadalafil que apesar do mesmo mecanismo de ação, estes fármacos possuem estruturas moleculares diferentes, e essa diferença estrutural é refletida nas propriedades farmacocinéticas e seletividade para as isoenzimas da PDE (FIGURA 4) (WRIGHT, 2006).

FIGURA 3 - ESTRUTURA MOLECULAR DOS IPDE5. (a) SILDENAFIL, (b) VARDENAFIL E (c) TADALAFIL



FONTE: COSTA, 2011.

Dentre os iPDE5, o vardenafil é mais seletivo para PDE5, em relação ao sildenafil, já que o sildenafil é um fraco inibidor da fosfodiesterase do tipo 6 (PD6), um enzima presente na retina, responsável pela transferência dos impulsos de luz no nervo, em que a inibição desta enzima pode causar distúrbios na percepção de cor (SUPURAN *et al.*, 2006; WRIGHT, 2006). Além disso, o vardenafil é o mais potente, pois a concentração da droga que produz 50% da inibição máxima da atividade da PDE5, IC<sub>50</sub>, do vardenafil é de 0,1-0,7 nanômetros (nM), enquanto o sildenafil e tadalafil de 3,5-8,5nM e 0,94-6,4nM, respectivamente (MEHROTRA *et al.*, 2007).

A PDE5 também é altamente expressa no pulmão, o que contribuiu para propor que esta fosse considerada como um novo alvo para o tratamento de hipertensão pulmonar e dificuldade respiratória. Além disso, recentemente foi demonstrado que a inibição da PDE5 no cérebro melhora a consolidação precoce da memória em formação. Adicionalmente, as PDE5 também estão sendo estudadas quanto a seu potencial efeito analgésico, já que alguns estudos demonstram que esses agentes que promovem aumento de GMPc intracelular e esse aumento está envolvido ao bloqueio da passagem de estímulos nociceptivos (MEHANNA *et al.*, 2018).

#### 1.4.2 iPDE5 e dor

Em relação ao processamento da informação nociceptiva, é descrito que os níveis de AMPc e GMPc regulam a excitabilidade neuronal, sendo o AMPc responsável pela estimulação mecânica, que ocorre na fase de transdução da dor e o GMPc promovendo a hiperpolarização e conseqüentemente a inibição do estímulo de dor (CUNHA *et al.*, 1999).

As fosfodiesterases do tipo 5, 6 e 9 são as enzimas que promovem a inativação do GMPc, ou seja, catalisam a hidrólise de GMPc para GMP, terminando assim a transdução de sinal (JAIN *et al.*, 2001). Assim, agentes que promovem aumento de GMPc intracelular, tais como inibidores de fosfodiesterase do tipo 5 (iPDE5) podem induzir efeito analgésico (MEHANNA *et al.*, 2018).

O GMPc é muito importante para a regulação funcional da nocicepção em que as concentrações de GMPc intracelular são reguladas pela ação da guanilato ciclase (IKIZ GEDIZ *et al.*, 2015). Com essa inibição há um aumento da disponibilidade de GMPc que produz uma antinocicepção periférica pela abertura de canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP (SOARES *et al.*, 2000). Muitos estudos sugerem que o sildenafil produz efeitos antinociceptivos em ratos e camundongos após administração local e periférica pelo aumento do GMPc e óxido nítrico (NO)

que podem ativar vários tipos de Canais de potássio (K<sup>+</sup>) (ARAIZA-SALDAÑA *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2000). Estudos feitos por Araiza-Saldaña e colaboradores (2005), demonstram que em animais diabéticos o sildenafil reduz a hiperalgisia química e mecânica. Em (2010), os mesmos pesquisadores estudaram os efeitos do sildenafil com trinitrato de gliceril, sendo que estes foram eficazes na alodinia tátil de ratos induzidos ao Diabetes por streptozotocina, pois restauram a via alterada do NO-GMPc. Outro estudo realizado por İköz Gediz e colaboradores (2015), utilizou o tratamento local de vardenafil nas doses de 50 µg/kg e 100 µg/kg, que mostrou efeitos antinociceptivos em hiperalgisia induzida por carragenina em ratos.

Além disso, muitos estudos já demonstram o potencial antinociceptivo de um dos principais representantes da classe dos iPDE5, o sildenafil, realizados em diferentes modelos de dor inflamatória (JAIN *et al.*, 2001; PATIL *et al.*, 2003). Evidências mostraram um papel da sinalização do NO/GMPc na nocicepção, já que a administração de L-Arginina em ratos com hiperalgisia induzida por carragenina mostrou efeito antinociceptivo e inibidores da guanilil ciclase (GC) reverterem o efeito antinociceptivo da L-arginina (DUARTE *et al.*, 1992). Com relação a dor de origem inflamatória um estudo feito em 2013, mostrou que o tratamento *in vitro* com tadalafil ou vardenafil em células prostáticas de miofibroblastos humanos, reduziu a secreção de interleucina-8 (IL-8), induzida por estímulos inflamatórios, provavelmente via ativação da sinalização GMPc/PKG (VIGNOZZI *et al.*, 2013). Em um estudo feito por Mixcoatl-Zecuatl e colaboradores (2000), foi observado que o efeito antinociceptivo da morfina foi potenciado pelo co-tratamento com doses inefetivas de sildenafil no teste da formalina, provavelmente pela inibição da degradação do GMP cíclico.

Embora os estudos anteriormente citados demonstrem o potencial antinociceptivo dos iPDE5, em que o sildenafil até o momento foi o mais estudado, somente um estudo explorou o possível efeito antinociceptivo do vardenafil em dores de origem inflamatória e pouco foi estudado sobre seu efeito em dores de origem neuropática. Considerando o exposto, o objetivo desse estudo foi avaliar

as atividades anti-inflamatórias e antinociceptivas do vardenafil em modelos murinos de dor inflamatória e neuropática.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo do inibidor da fosfodiesterase do tipo 5, vardenafil, em modelos não clínicos de inflamação e dor.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do vardenafil através da avaliação do efeito do mesmo sobre o modelo de alodinia mecânica e edema de pata induzidos por carragenina em ratos;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do vardenafil através da avaliação do efeito do mesmo sobre a atividade da mieloperoxidase induzida por carragenina em ratos;
- Avaliar a atividade antinociceptiva do vardenafil no modelo de nocicepção induzida por formalina em ratos;
- Avaliar a atividade antinociceptiva do vardenafil no modelo de nocicepção induzida por ácido acético em camundongos;
- Avaliar o efeito do vardenafil sobre o comportamento nociceptivo no modelo de placa quente em ratos;
- Avaliar o efeito do vardenafil sobre o comportamento nociceptivo no modelo de *tail-flick* em ratos;
- Avaliar o efeito do vardenafil sobre a atividade locomotora no teste do campo aberto em ratos;
- Avaliar a atividade antinociceptiva do vardenafil no modelo de dor

neuropática induzida por lesão por constrição crônica do nervo ciático em ratos, através do teste de von Frey eletrônico;

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos da variedade *Wistar* pesando entre 180 e 220 g e camundongos *Swiss* pesando de 18 a 35 g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná. Estes animais foram mantidos em condições de temperatura e umidade controladas, em ciclo claro-escuro de 12 horas com água e ração *ad libitum*. Foram alocados em caixas de plástico medindo 41 x 32 x 16.5cm em número máximo de cinco (ratos) ou sete (camundongos) por caixa com trocas de maravalha três vezes por semana. Antes da experimentação os animais permaneceram no biotério do Departamento de Farmacologia (ratos) ou no biotério central da UFPR (camundongos) para ambientação e, posteriormente, foram submetidos a testes de inflamação aguda e nocicepção de curta duração. Todos os protocolos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO-UFPR; #1202).

#### 3.2 DROGAS

Foram utilizados vardenafil (100% de pureza química, peso molecular 448,6 ng/nmol) que foi gentilmente doado pela Bayer AG, Wuppertal, Alemanha. O vardenafil foi dissolvido em solução salina (NaCl a 0,9%) contendo 2% de Tween 80 e administrado por via intraperitoneal (i.p.) em doses de 0,01, 0,03 ou 0,1 mg/kg, selecionadas com base em estudos anteriores (PRICKAERTS *et al.*, 2002; 2005). Doses submáximas de vardenafil foram usadas para evitar efeitos cardiovasculares. O grupo controle (veículo) recebeu solução salina (NaCl a 0,9%) contendo 2% de Tween 80, via i.p. A dexametasona (1 mg/kg, Achê, Brasil), usada

como controle positivo do efeito anti-inflamatório, foi diluída em solução salina (NaCl a 0,9%) para injeção subcutânea (s.c.).

### 3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

#### 3.3.1 Avaliação do limiar mecânico de retirada da pata

Para a avaliação do limiar mecânico de retirada, os animais foram previamente ambientados em caixas de acrílico, cujo assoalho consiste em uma rede de malha igual a 5 mm<sup>2</sup>, constituída de arame não maleável de 1 mm. O limiar mecânico de retirada foi avaliado usando um analgesímetro eletrônico (Von Frey eletrônico, IITC Life Science, California, EUA), que consiste em uma ponteira de plástico acoplada a transdutor conectado a um contador digital que registra o limiar aplicado a pata do animal em gramas (g). O estímulo mecânico é aplicado linearmente na superfície plantar dos ratos até que o animal produza uma resposta de retirada e sacudida da pata estimulada. O limiar mecânico de retirada é então quantificado pela média aritmética de três medidas em cada uma das patas traseiras do animal, com intervalos de 2 minutos entre cada medida (JESUS *et al.*, 2019). A alodinia mecânica é caracterizada pela significativa redução do limiar mecânico de retirada ao longo do experimento.

#### 3.3.2 Alodinia mecânica e edema de pata induzido por carragenina

Para avaliar o potencial efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do vardenafil, o limiar mecânico e o edema da pata foram avaliados após a injeção intraplantar (i.pl.) de carragenina (Cg; Sigma-Aldrich, EUA; 200 µg/pata em 0,1 mL de solução salina) em ratos, conforme descrito anteriormente por Hirota e colaboradores (2016). Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais

(n= 8-10/grupo): grupo controle tratado com veículo (NaCl a 0,9%; volume equivalente, i.p.); grupos tratados com vardenafil (0,01, 0,03 ou 0,1 mg/kg; i.p.); grupo controle positivo tratado com dexametasona (1 mg/kg, s.c.). Todos os tratamentos foram administrados 1 hora (h) antes da injeção i.pl. de Cg. Como controle do volume injetado, as patas contralaterais receberam i.pl. injeção de solução salina (veículo Cg; 0,1 mL).

O limiar mecânico foi avaliado antes (basal) da administração de vardenafil ou veículo e 1, 2 e 3 h após a injeção de Cg ou salina via intraplantar, utilizando o analgesímetro von Frey eletrônico. Após a medida do limiar mecânico dos animais, a espessura da pata foi mensurada com auxílio de paquímetro digital antes da administração de vardenafil, veículo ou dexametasona (medida basal) e novamente nos intervalos de 1, 2 e 3 h após injeção de Cg. A inflamação foi avaliada como o aumento na espessura da pata (edema) em cada intervalo de tempo em relação à medida basal. Os resultados foram expressos em milímetros (mm).

### 3.3.3 Avaliação da atividade da mieloperoxidase

A atividade da mieloperoxidase foi avaliada como descrito anteriormente por De Young e colaboradores (1989) com modificações. Para isso, uma hora após o tratamento com vardenafil (0,01, 0,03 ou 0,1 mg/kg; i.p.), dexametasona (1 mg/kg, s.c.) ou veículo (NaCl a 0,9%; volume equivalente) os animais receberam a injeção i.pl. com solução salina (0,1 mL) ou Cg (200 µg/pata em 0,1 mL de solução salina). Três horas após a injeção de Cg (pico de edema induzido por Cg), os animais foram sacrificados e tiveram os segmentos da região subplantar das patas traseiras direita e esquerda coletados, pesados e armazenados em eppendorfs que foram estocados a -80°C. Posteriormente, as amostras de tecido foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (80 mM, 0,5% HTAB, pH 5,4). O homogenato foi então centrifugado a 11.200xg por 20 minutos à 4°C. Em seguida, o sobrenadante foram transferidas para placas de ELISA, os quais

previamente receberam 200 uL de solução peróxido (100 uL tampão fosfato de sódio 80mM, 85 uL tampão fosfato de sódio 0,22mM, 15 uL peróxido de hidrogênio 0,017%) em triplicatas de 30 uL. A reação foi iniciada com a adição de 20 uL de solução TMB (18,4 nM dissolvidos em dimetilformamida aquosa a 8%). A placa então, foi transferida para estufa à 37°C por 3 minutos. Posteriormente, a reação colorimétrica foi interrompida com acetato de sódio (1,46 M) e através de um leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL808) a absorbância foi determinada a 620 nm. Os resultados foram expressos como densidade óptica (DO)/peso da amostra por dosagem de proteínas.

### 3.3.4 Teste da formalina

Para avaliar o potencial efeito antinociceptivo do vardenafil em modelo de nocicepção aguda, primeiramente realizou-se o teste da formalina, de acordo com Hunskaar e Hole (1987), com pequenas adaptações. Para isso, os animais foram separados em quatro grupos experimentais (n= 7-10/grupo) tratados com veículo (solução salina; volume equivalente) ou vardenafil (0,01, 0,03 ou 0,1 mg/kg). Após 50 minutos da administração dos tratamentos, os animais foram aclimatados no aparelho de teste de formalina (um funil de vidro invertido de 290 mm de largura e 410 mm de altura) por 10 minutos e, em seguida, receberam uma injeção única de formalina (2,5%; 50 uL por pata) em uma das patas traseiras. Durante os 60 minutos após a injeção de formalina, o número de comportamentos nociceptivos de chacoalhar ou lambe a pata traseira ipsilateral de ratos (chamados de “*flinches*”) foram contabilizados em intervalos de 5 minutos. Este teste é conhecido por promover três fases distintas: Fase I que compreende o período de 0 a 5 minutos após injeção de formalina, seguida pela fase quiescente (de 6 a 15 minutos) e então a fase II (de 15 a 60 minutos). Os resultados foram expressos pelo número cumulativo de *flinches* durante os 60 minutos do teste e a soma do número total de *flinches* em cada fase do teste.

### 3.3.5 Contorção abdominal induzida por ácido acético

Para avaliar o potencial efeito antinociceptivo do vardenafil em outro modelo de nocicepção aguda, foi feito o teste de contorção induzido por ácido acético, de acordo com o método descrito anteriormente (HIROTA *et al.*, 2016). Para isso, camundongos machos (n= 9-12/grupo) foram tratados com veículo (solução salina; volume equivalente; i.p.) ou vardenafil (0,017, 0,05 ou 0,17 mg/kg; i.p.) e 50 minutos depois foram colocados para aclimatação em um funil de vidro invertido (290 mm de largura e 410 mm de altura) por 10 minutos. Em seguida, cada animal recebeu uma injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%; volume de 0,1 mL/10 g). As respostas de contorções abdominais, caracterizadas por uma sequência de contrações abdominais, acompanhada por torções do tronco e extensão dos membros posteriores do animal, foram contabilizadas cumulativamente durante os 30 minutos subsequentes, divididos em períodos de 5 minutos. Para este teste as doses de vardenafil utilizadas em camundongos foram calculadas de acordo com os cálculos alométricos descritos por Freitas e Carregaro (2013), com base na taxa metabólica basal desses animais.

### 3.3.6 Teste do *tail-flick*

Para avaliar o possível efeito antinociceptivo do vardenafil, foi realizado o teste de retirada da cauda (*tail-flick*) seguindo os procedimentos descritos anteriormente por Shamsi Meymandi e colaboradores (2019). Para isso, os ratos (n= 7-8/grupo) foram divididos em quatro grupos diferentes tratados com veículo (solução salina; volume equivalente; i.p.) ou vardenafil (0,01, 0,03 ou 0,1 mg/kg; i.p.) e colocados no aparelho de *tail-flick* (Insight Brazil, São Paulo, Brasil). A intensidade da luz foi ajustada para obter uma latência basal (isto é, tempo para os animais mostrarem uma resposta de retirada da cauda) de 2 a 4 segundos. O tempo de corte usado para evitar danos aos tecidos foi de 10 segundos (s). As

respostas do movimento da cauda foram avaliadas 1, 2 e 3 horas após tratamentos com solução salina ou vardenafil.

### 3.3.7 Teste da placa quente

Para avaliar o potencial efeito antinociceptivo do vardenafil sobre um estímulo térmico agudo foi realizado o teste da placa quente seguindo os procedimentos previamente descritos por Ballou e colaboradores (2000), com modificações. Neste teste, os ratos ( $n= 7-8/\text{grupo}$ ) foram colocados individualmente em contato com uma superfície metálica aquecida a uma temperatura de  $50 \pm 1^\circ\text{C}$  do aparelho de placa quente (Ugo Basile SRL, Itália). Foi avaliado o tempo de resposta (em segundos) necessário para que o animal apresentasse uma resposta comportamental típica como saltar da superfície ou sacudir e/ou lambear as patas traseiras frente ao estímulo térmico. A latência para os animais exibirem comportamentos foi mensurado antes (basal) e 1, 2 e 3 horas após os tratamentos com veículo (solução salina; volume equivalente; i.p.) ou vardenafil (0,01, 0,03 ou 0,1 mg / kg; i.p.). Utilizou-se 30 segundos como tempo de corte, no intuito de prevenir possíveis danos teciduais.

### 3.3.8 Teste do campo aberto

Para excluir um potencial efeito sedativo do vardenafil, que poderia influenciar a análise e discussão de dados relacionados ao efeito antinociceptivo, a atividade locomotora espontânea foi avaliada pelo teste de campo aberto, conforme descrito anteriormente (MEOTTI *et al.*, 2006). O aparato de campo aberto consiste em uma arena retangular de madeira (40 cm x 50 cm x 63 cm), dividida em 9 quadrantes idênticos. Com isso, os ratos ( $n= 9/\text{grupo}$ ) foram colocados no centro do campo aberto uma hora após o tratamento com veículo (solução salina; volume equivalente; i.p.) ou vardenafil (0,01, 0,03 ou 0,1 mg/kg;

i.p.). Durante uma sessão de 5 minutos no aparelho de campo aberto o número de unidades cruzadas (todos os quatro membros) foi contabilizado como desempenho locomotor.

### 3.3.9 Alodinia mecânica induzida por constrição crônica do nervo ciático

O potencial efeito antinociceptivo do vardenafil também foi avaliado em relação à alodinia mecânica associada a um modelo de lesão nervosa periférica de dor neuropática. A neuropatia periférica foi induzida através da ligação do nervo ciático esquerdo, de acordo com método previamente descrito por Bennett e Xie (1988) com modificações na anestesia conforme descrito anteriormente por Nones e colaboradores (2017). Para isso, após a medição do limiar mecânico basal, usando o analgesímetro eletrônico os ratos foram anestesiados com uma injeção i.p. injeção de cetamina/xilazina (90/10 mg/kg, respectivamente). Posteriormente, foi feita uma incisão entre o nível do meio da coxa e o bíceps femoral, próximo à trifurcação do nervo ciático. Quatro ligaduras (crômico 4,0) foram amarradas frouxamente ao redor do nervo ciático com distância de 1 mm. As ligaduras foram amarradas de forma que não houvesse retração do nervo ciático nem impedimento aparente do fluxo sanguíneo epineural, podendo deslizar livremente ao longo do nervo ciático. No grupo controle falso-operado (Sham), o nervo ciático foi apenas exposto. Logo depois de concluída a realização da ligadura ou a simples exposição do nervo, o tecido epitelial foi suturado com fio de seda 2.0. Após a cirurgia, todos os ratos foram mantidos em uma sala aquecida para recuperação da anestesia. No sétimo e décimo quarto dia após a cirurgia, os ratos (n= 6-9/grupo) tiveram o limiar mecânico avaliado antes (basal) e novamente 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após a administração i.p. tratamento com veículo (solução salina; volume equivalente) ou vardenafil (0,01, 0,03, 0,1 ou 0,3 mg/kg).

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram representados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de 6 a 12 animais por grupo experimental. Os dados foram analisados por meio de ANOVA de uma ou duas vias, com ou sem medidas repetidas. Caso observado alguma diferença entre os grupos, o teste de *post-hoc* de Bonferroni foi realizado para comparações entre os grupos experimentais. Em todas as análises o nível de significância foi de  $p \leq 0,05$ . Todos os testes foram conduzidos utilizando o software GraphPad Prism (versão 7, San Diego, CA, EUA).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM VARDENAFIL SOBRE A ALODINIA MECÂNICA E EDEMA DE PATA INDUZIDOS POR CARRAGENINA EM RATOS

A figura 5 mostra o efeito do vardenafil (nas doses de 0,01, 0,03 ou 0,1 mg/kg; i.p.) ou veículo (solução salina; volume equivalente; i.p.) sobre os testes da alodinia mecânica e edema induzidos por Cg em ratos. Analisando o aumento no limiar mecânico durante o decurso temporal do teste sobre a alodinia mecânica (painel A), ANOVA de duas vias não demonstrou efeito significativo nos grupos experimentais [ $F(5, 54) = 8,035$ ;  $p > 0,05$ ], tempo [ $F(3, 162) = 79,17$ ;  $p > 0,05$ ] e também na interação entre esses dois fatores [ $F(15, 162) = 4,07$ ;  $p > 0,05$ ]. O teste de *post-hoc* de Bonferroni demonstrou uma diminuição significativa do limiar mecânico entre todos os grupos que receberam Cg quando comparado ao grupo tratado com veículo/salina ( $p < 0,05$ ), indicando o desenvolvimento da alodinia mecânica induzida por Cg em ratos com pico de alodinia mecânica três h após a injeção de Cg. No entanto, nenhuma das doses de vardenafil foi efetiva em alterar

o limiar mecânico em comparação com o grupo tratado com veículo/Cg ( $p > 0,05$ ). O painel B demonstra a AUC da alodinia mecânica durante o período de 3 h após o tratamento com Cg, ANOVA de uma via mostrou uma diferença significativa entre todos os grupos que receberam Cg quando comparados ao grupo tratado com veículo/salina ( $p < 0,05$ ), também demonstrando a diminuição do limiar mecânico induzida por Cg. No entanto, o tratamento com vardenafil (0,01, 0,03 ou 0,1 mg/kg; i.p.) não apresentou efeito sobre o limiar mecânico na alodinia mecânica induzida por Cg em ratos quando comparado ao grupo veículo/Cg ( $p > 0,05$ ).

Com relação ao edema de pata induzido por CG, o painel C demonstra o aumento na espessura da pata durante o decurso temporal do teste (painel A), ANOVA de duas vias mostrou um efeito significativo nos grupos experimentais [ $F_{(5, 50)} = 6,46$ ;  $p < 0,05$ ], no tempo [ $F_{(3, 150)} = 98,64$ ;  $p < 0,05$ ] e interação entre esses dois fatores [ $F_{(15, 150)} = 5,313$ ;  $p < 0,05$ ]. O teste de *post-hoc* de Bonferroni demonstrou que houve uma diferença significativa entre todos os grupos que receberam a injeção de Cg, em relação ao grupo tratado com solução salina/veículo ( $p < 0,05$ ), demonstrando que a injeção i.pl. de Cg (200 µg/pata) promove um significativo aumento no edema de pata em relação a injeção de solução salina. Além disso, o teste de *post-hoc* de Bonferroni também demonstrou que o tratamento com a dose mais alta de vardenafil (0,1 mg/kg) atenuou significativamente a formação do edema da pata 2 e 3h após a injeção de Cg ( $p < 0,05$ ). O grupo controle positivo, tratado com dexametasona/Cg, reduziu significativamente o edema de pata, quando comparado com o grupo veículo/Cg, 2 e 3h após a injeção de Cg ( $p < 0,05$ ).

Analisando o edema de pata total durante as 3 h do teste, por meio da área sob a curva (AUC; Painel C), a ANOVA de uma via demonstrou um efeito significativo nos grupos experimentais [ $F_{(5, 50)} = 6,996$ ;  $p < 0,05$ ]. O teste de *post-hoc* de Bonferroni mostrou que todos os grupos experimentais tratados com Cg foram significativamente diferentes quando comparados ao grupo tratado com solução salina ( $p < 0,05$ ). Além disso, essa análise mostrou que os grupos experimentais tratados com vardenafil (dose de 0,1 mg/kg) ou dexametasona

foram estatisticamente diferentes do grupo tratado com veículo/Cg ( $p < 0,05$ ), mas não foram diferentes entre si ( $p > 0,05$ ).

GRÁFICO 1 - EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM VARDENAFIL SOBRE A ALODINIA MECÂNICA E EDEMA DE PATA INDUZIDOS POR CARRAGENINA EM RATOS

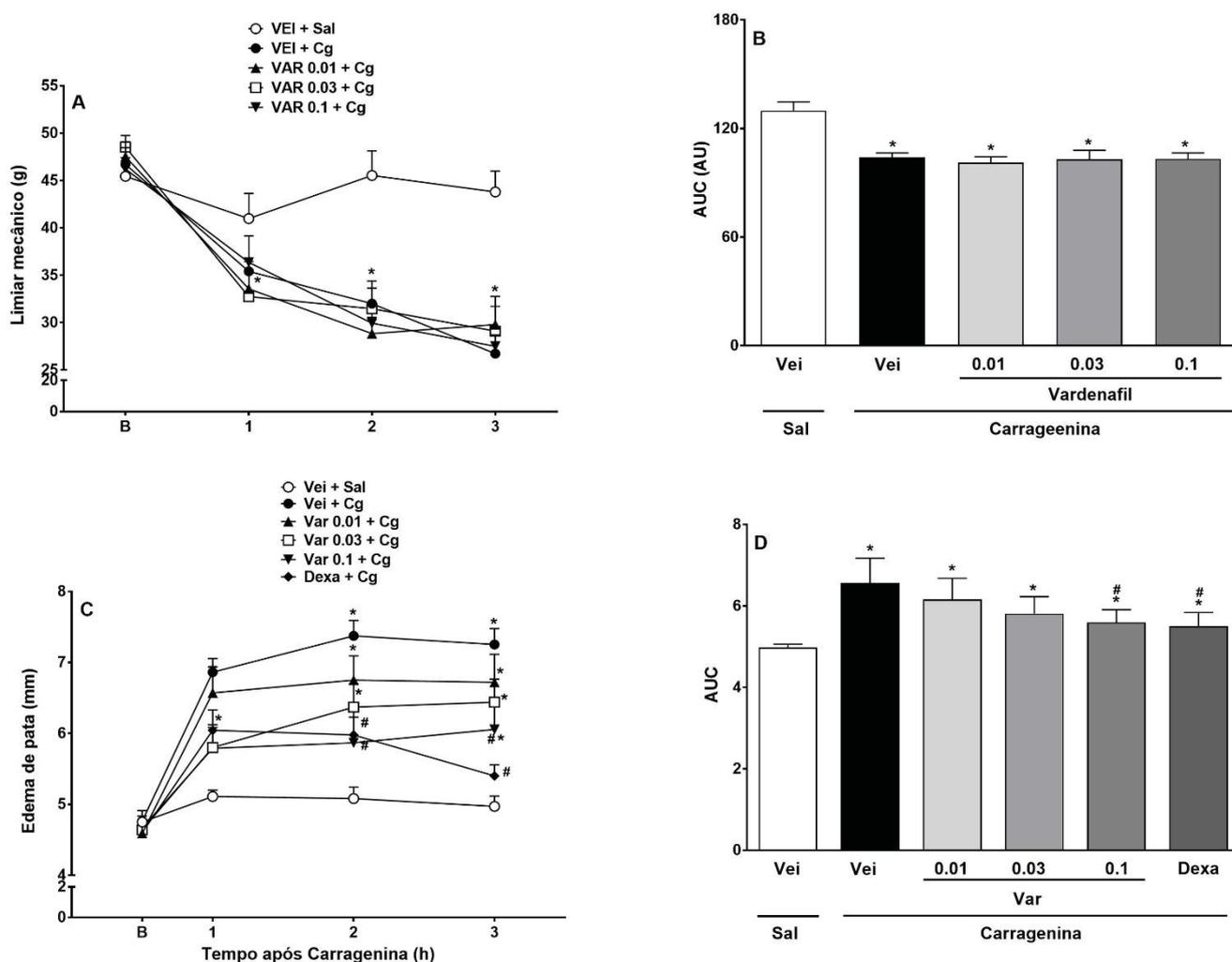


GRÁFICO 1 – Efeito do tratamento sistêmico com vardenafil sobre a alodinia mecânica e edema de pata induzidos por carragenina em ratos. Painel A mostra a diminuição do limiar mecânico (g) mensurado antes B (basal) e 1, 2 e 3 horas após injeção de carragenina (Cg) ou de solução salina (Sal). Painel B mostra a área sob a curva (AUC, em unidades arbitrárias – AU) do limiar mecânico total durante as 3 horas, após os tratamentos. Painel C mostra o aumento no edema de pata (em mm) mensurado antes B (basal) e 1, 2 e 3 horas após injeção de carragenina (Cg) ou de solução salina (Sal). Painel D mostra a área sob a curva (AUC, em unidades arbitrárias – AU) do edema total durante as 3 horas, após os tratamentos. Dados são expressos como a média  $\pm$  EPM de 8-10 animais/grupo experimental. (\*) indica  $p < 0,05$  em comparação com o grupo tratado com solução salina/veículo. (#) indica  $p < 0,05$  em comparação com o grupo tratado com carragenina/veículo. ANOVA de duas vias com medidas repetidas (Painel A e C) ou ANOVA de uma via (Painel B e D) seguido pelo teste de post-hoc de Bonferroni.

#### 4.2 EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM VARDENAFIL SOBRE ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE EM RATOS

Como pode ser observado na figura 6, a injeção i.pl de Cg induziu um aumento significativo da atividade da enzima MPO no tecido da pata traseira quando comparado ao grupo tratado com solução salina. O teste de *post-hoc* de Bonferroni mostrou uma diferença significativa entre todos os grupos que receberam injeção de Cg em comparação ao grupo tratado com veículo/salina ( $p < 0,05$ ). Além disso, o pré-tratamento com dexametasona foi capaz de reduzir significativamente a atividade da MPO quando comparado grupo veículo/Cg ( $p < 0,05$ ). No entanto, o tratamento com vardenafil (em todas as doses testadas) não foi capaz de alterar significativamente a atividade da MPO induzida pela injeção de Cg ( $p > 0,05$ ).

GRÁFICO 2 - EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM VARDENAFIL SOBRE ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE EM RATOS

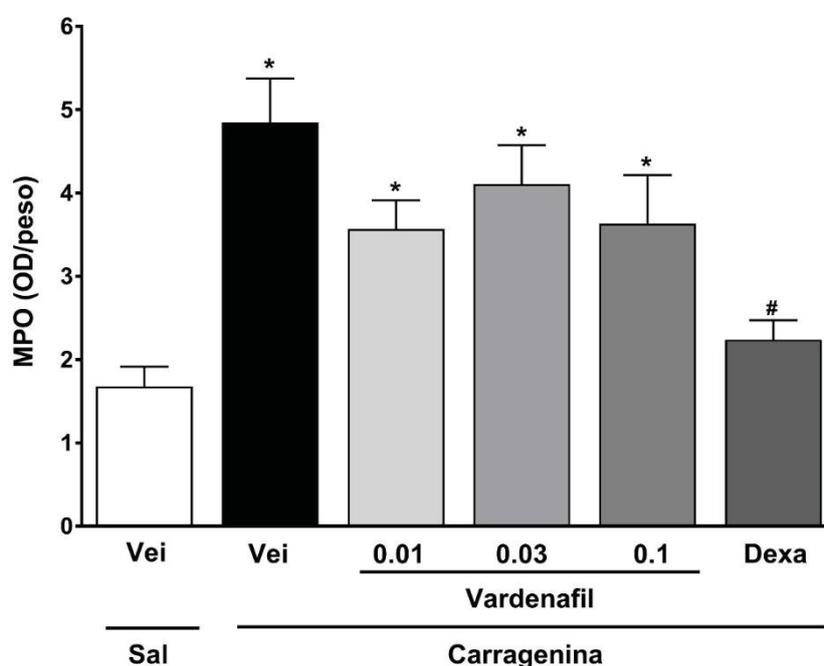


GRÁFICO 2 – Efeito do tratamento sistêmico com vardenafil sobre atividade da mieloperoxidase em ratos. A atividade da mieloperoxidase foi avaliada 3 após o tratamento com Cg. Todos os tratamentos foram administrados uma hora antes da aplicação de carragenina ou solução salina

(Sal). Dados são expressos como a média  $\pm$  EPM de 6-9 animais/grupo experimental. (\*) indica  $p < 0,05$  em comparação com o grupo tratado com solução salina/veículo. (#) indica  $p < 0,05$  em comparação com o grupo tratado com carragenina/veículo. ANOVA de uma via seguido pelo teste de post-hoc de Bonferroni. Resultados expressos como densidade óptica (DO)/peso da amostra por dosagem de proteínas.

#### 4.3 EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM VARDENAFIL SOBRE O TESTE DA FORMALINA EM RATOS

Na figura 7 (painel A), podemos observar o decurso temporal do número de *flinches* realizados durante 60 minutos subsequentes a injeção i.pl. de formalina, tratados com vardenafil (nas doses de 0,01, 0,03 ou 0,1 mg/kg; i.p.) ou veículo (solução salina; volume equivalente; i.p.). ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo nos grupos experimentais [ $F_{(3, 30)} = 13,97$ ;  $p < 0,05$ ], no tempo [ $F_{(11, 330)} = 726,8$ ;  $p < 0,05$ ] e também na interação entre esses dois fatores [ $F_{(33, 330)} = 15,42$ ;  $p < 0,05$ ]. O teste de *post-hoc* de Bonferroni demonstrou uma diferença significativa entre o grupo tratado com veículo e os grupos tratados com vardenafil (de 55 a 60 minutos nos grupos vardenafil tratados com doses de 0,01 ou 0,03 mg/kg e de 25 a 60 minutos no grupo vardenafil tratado com a dose de 0,1 mg/kg;  $p < 0,05$ ).

Analisando o número de *flinches* total, durante a primeira e a segunda fase do teste (painel B), ANOVA de uma via demonstrou um efeito significativo nos grupos experimentais durante a fase II [ $F_{(3, 28)} = 30,51$ ;  $p < 0,05$ ] mas não durante a fase I [ $F_{(3, 28)} = 1,431$ ;  $p > 0,05$ ] e interfase quiescente [ $F_{(3, 28)} = 1,027$ ;  $p > 0,05$ ]. O teste de *post-hoc* de Bonferroni demonstrou que o tratamento com vardenafil (nas doses de 0,01, 0,03 ou 0,1 mg/kg; ip) apresentou uma diminuição significativa no número de *flinches* induzidos pela formalina durante a fase II do teste da formalina, mas não durante a fase I ou a interfase quiescente, quando comparados ao grupo tratado com veículo (solução salina; volume equivalente; ip) ( $p < 0,05$ ).

GRÁFICO 3 - EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM VARDENAFIL SOBRE O TESTE DA FORMALINA EM RATOS

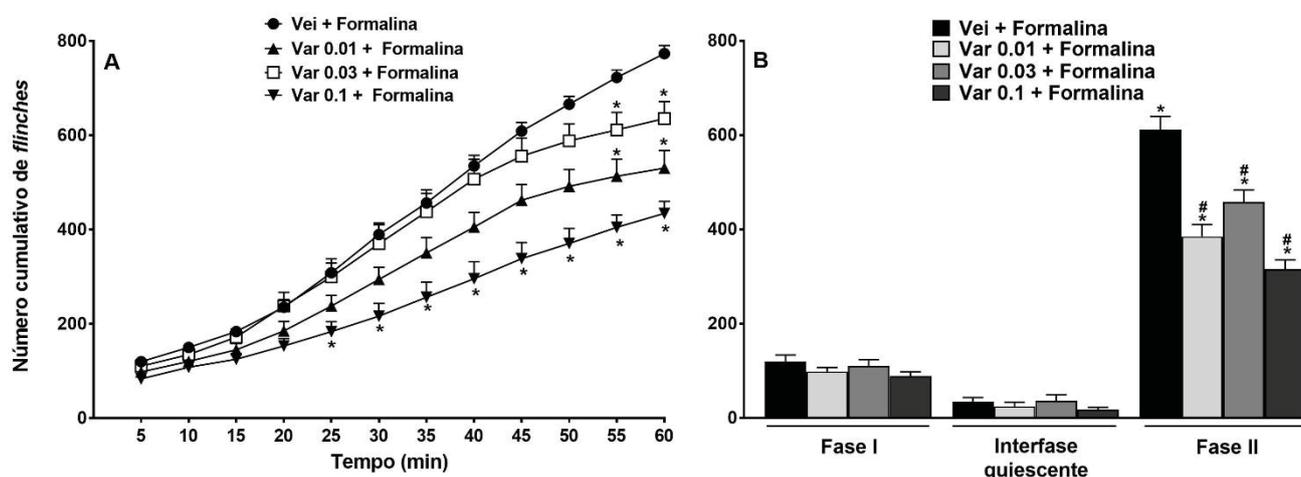


GRÁFICO 3 – Efeito do tratamento sistêmico com vardenafil sobre o teste da formalina em ratos. Painel A apresenta a evolução temporal do número de *flinches* induzidas por formalina durante 60 minutos, divididos em períodos de 5 minutos. Painel B mostra o número total de *flinches* realizados durante os 60 minutos, divididos em fase I (0-5 min), interfase quiescente (6-15 min) e fase II (15-60 min) fase. Dados são expressos como a média  $\pm$  EPM de 7-10 animais/grupo experimental. (\*) indica  $p < 0,05$  em comparação com o grupo tratado com veículo. (#) indica  $p < 0,05$  em comparação entre as doses dos grupos tratado com vardenafil. ANOVA de duas vias com medidas repetidas (Painel A) ou ANOVA de uma via (Painel B) seguido pelo post- hoc de Bonferroni.

#### 4.4 EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM VARDENAFIL SOBRE O TESTE DA CONTORÇÃO ABDOMINAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS

A Figura 8 demonstra o efeito do tratamento com veículo (solução salina; volume equivalente; i.p.) ou vardenafil (nas doses de 0,017, 0,05 e 0,17 mg/kg; i.p.) no número de contorções abdominais durante 30 minutos subsequentes a injeção de ácido acético em camundongos. Analisando a frequência de contorções abdominais no decurso temporal do teste (Painel A), ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo nos grupos experimentais [ $F_{(3, 40)} = 16,61$ ;  $p < 0,05$ ], no tempo [ $F_{(5, 200)} = 227,8$ ;  $p < 0,05$ ] e interação entre esses dois fatores [ $F_{(15, 200)} = 18,05$ ;  $p < 0,05$ ]. O teste de *post-hoc* de Bonferroni demonstrou uma diferença significativa entre o grupo tratado com veículo e o grupo tratado com

vardenafil (nas doses de 0,01, 0,03 ou 0,1 mg/kg) em 15, 20, 25 e 30 minutos após a injeção do ácido acético ( $p < 0,05$ ).

Analisando o número total de contorções abdominais realizadas durante o tempo total do teste (Painel B), ANOVA de uma via demonstrou um efeito significativo nos grupos experimentais [ $F_{(3, 40)} = 25,42$ ;  $p < 0,05$ ]. O teste de *post-hoc* de Bonferroni mostrou que todas as doses de vardenafil reduziram significativamente o número de contorções induzidas por ácido acético quando comparadas ao grupo tratado com veículo ( $p < 0,05$ ).

GRÁFICO 4 - EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM VARDENAFIL SOBRE O TESTE DA CONTORÇÃO ABDOMINAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS

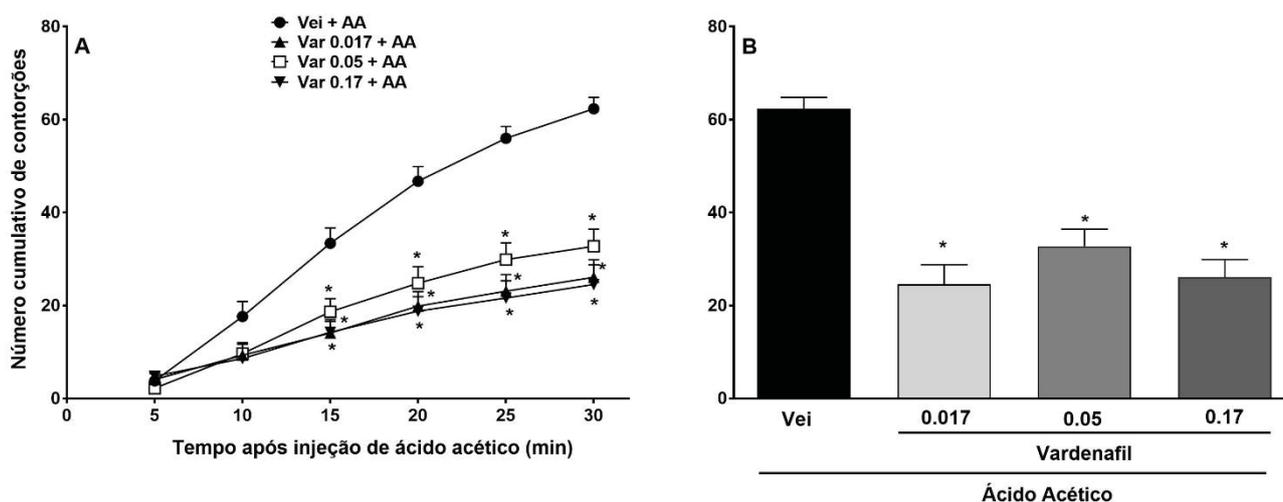


GRÁFICO 4 – Efeito do tratamento sistêmico com vardenafil sobre o teste da contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos. Painel A apresenta a evolução temporal do número de contorções induzidas por ácido acético (AA) durante 30 minutos, divididos em períodos de 5 minutos. Painel B mostra o número total de contorções durante os 30 minutos. Dados são expressos como a média  $\pm$  EPM de 9-12 animais/grupo experimental. (\*) indica  $p < 0,05$  em comparação com o grupo tratado com veículo. ANOVA de duas vias com medidas repetidas (Painel A) ou ANOVA de uma via (Painel B) seguido pelo *post-hoc* de Bonferroni.

#### 4.5 EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM VARDENAFIL SOBRE OS TESTES DO *TAIL-FLICK*, PLACA QUENTE E CAMPO ABERTO EM RATOS

O próximo experimento foi realizado para avaliar o tempo de latência no aparato de *tail-flick* uma hora após o tratamento com vardenafil ou veículo (Figura 9, painel A). ANOVA de uma via não mostrou efeito significativo nos grupos experimentais [ $F_{(3, 26)} = 2,171$ ;  $p > 0,05$ ], assim demonstrando que o tratamento com vardenafil (nas doses de 0,01, 0,03 ou 0,1 mg/kg; i.p.) não alterou significativamente o tempo de latência no aparato de *tail-flick* quando comparado ao grupo controle tratado com veículo (solução salina; volume equivalente; i.p.). Os mesmos resultados (isto é, ausência de efeito vardenafil) foram obtidos 2 e 3 horas após o tratamento (dados não mostrados).

O tratamento com vardenafil (nas doses de 0,01, 0,03 ou 0,1 mg/kg; i.p.) também não induziu um efeito estatisticamente significativo no tempo de latência no aparelho de placa quente (Figura 9, painel B). [ $F_{(3, 25)} = 1,612$ ;  $p > 0,05$ ], ANOVA de uma via) 1h (Figura 9, painel B), 2 e 3h após o tratamento (dados não mostrados). Conforme mostrado na Figura 9 (painel C), o tratamento com vardenafil (nas doses de 0,01, 0,03 ou 0,1 mg/kg; i.p.) não alterou significativamente o número de cruzamentos no aparato do campo aberto quando comparado ao veículo (solução salina; equivalente volume; ip; [ $F_{(3, 32)} = 0,7023$ ;  $p > 0,05$ ]; ANOVA de uma via).

GRÁFICO 5 - EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM VARDENAFIL SOBRE OS TESTES DO TAIL-FLICK, PLACA QUENTE E CAMPO ABERTO EM RATOS

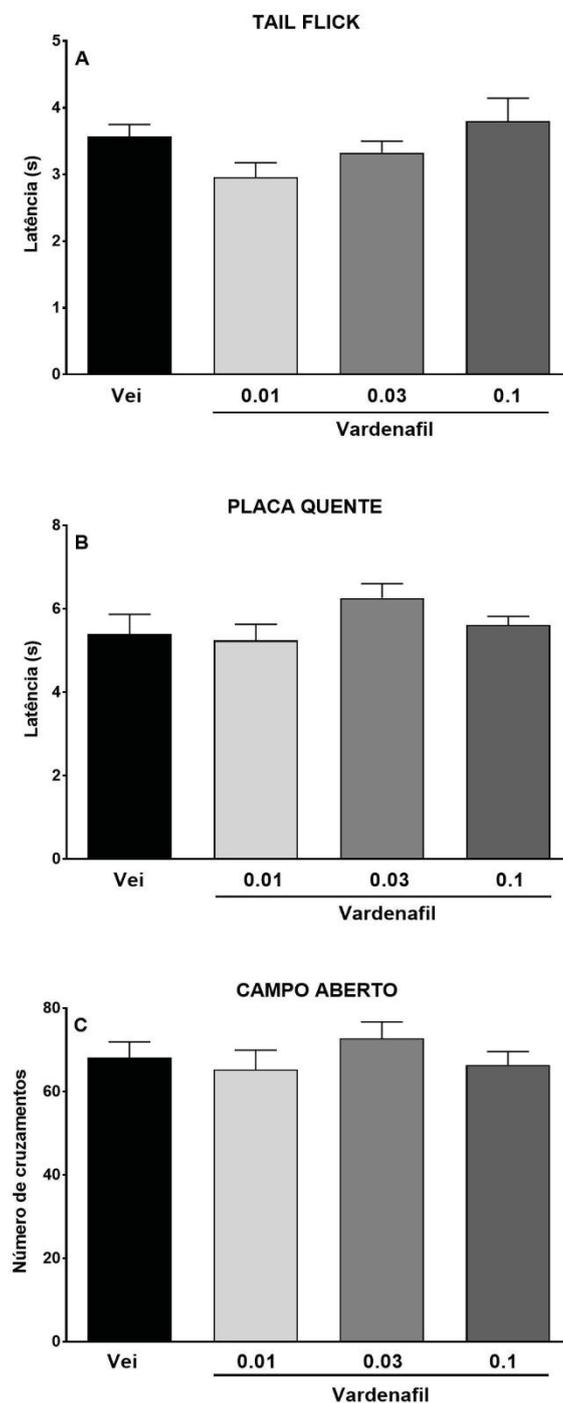


GRÁFICO 5 – Efeito do tratamento sistêmico com vardenafil sobre os testes do *tail-flick*, placa quente e campo aberto em ratos. O tempo de latência total foi mensurado uma hora após o tratamento com vardenafil (0,01, 0,03 ou 0,1 mg/Kg) ou veículo no aparelho de *tail-flick* (Painel A) e placa quente (Painel B). Painel C mostra o número total de cruzamentos realizados durante 5

minutos mensurado uma hora após o tratamento com vardenafil (0,01, 0,03 ou 0,1 mg/Kg) ou veículo no aparato de campo aberto. Dados são expressos como a média  $\pm$  EPM de 7-8 (Painel A e B) e 9 (Painel C) animais/grupo experimental. ANOVA de uma via seguido pelo post- hoc de Bonferroni.

#### 4.6 EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM VARDENAFIL SOBRE A ALODINIA MECÂNICA INDUZIDA POR LESÃO POR CONSTRIÇÃO CRÔNICA DO NERVO CIÁTICO EM RATOS

A figura 10 demonstra que o tratamento com vardenafil (nas doses de 0,01, 0,03, 0,1 ou 0,3 mg/kg; i.p.) não induziu efeito significativo na alodinia mecânica associada à dor neuropática induzida por lesão por constrição crônica do nervo ciático (CCI) no sétimo (painel A) ou no décimo quarto dia (painel B) após a cirurgia. Especificamente neste experimento, testamos uma dose adicional mais alta de 0,3 mg/kg de vardenafil (dados não mostrados). ANOVA de uma via mostrou efeito significativo nos grupos experimentais [ $F(5, 36) = 201,2; p < 0,05$ ] e [ $F(5, 36) = 237,1; p < 0,05$ ], respectivamente. O teste de *post-hoc* de Bonferroni demonstrou uma redução significativa do limiar mecânico nas patas ipsilaterais ao grupo CCI tratado com veículo em comparação com o grupo SHAM tratado com veículo 7 ou 14 dias após a cirurgia (Figura 7, painéis A e B; respectivamente;  $p < 0,05$ ), mas não nas patas contralaterais (dados não mostrados).

GRÁFICO 6 - EFEITO DO TRATAMENTO SISTÊMICO COM VARDENAFIL SOBRE A ALODINIA MECÂNICA INDUZIDA POR LESÃO POR CONSTRIÇÃO CRÔNICA DO NERVO CIÁTICO EM RATOS

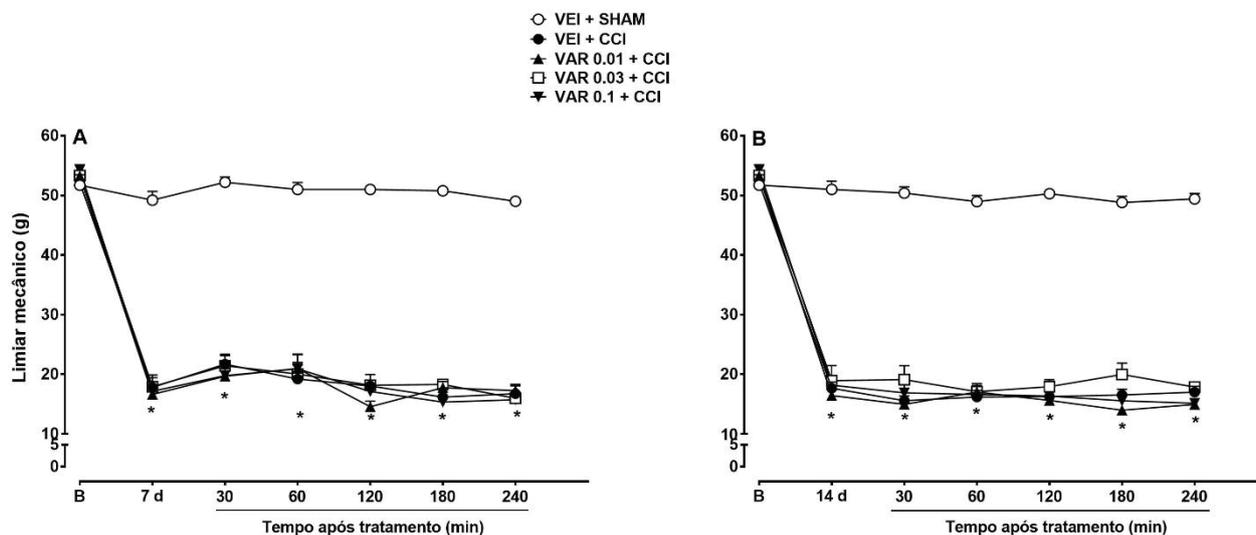


GRÁFICO 6 – Efeito do tratamento sistêmico com vardenafil sobre a alodinia mecânica induzida por lesão por constrição crônica do nervo ciático em ratos. O painel A mostra o limiar mecânico (g) mensurado antes (B) e 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após a injeção de vardenafil (0,01, 0,03 ou 0,1 mg/Kg) no sétimo dia após a cirurgia. O painel B mostra o limiar mecânico (em g) medido antes (B) e 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após a injeção de vardenafil (0,01, 0,03 ou 0,1 mg/Kg) no décimo quarto dia após a cirurgia. Dados são expressos como a média  $\pm$  EPM de 6-9 animais/grupo experimental. (\*) indica  $p < 0,05$  em comparação com o grupo tratado com solução salina/veículo. ANOVA de uma via com medidas repetidas seguido pelo teste de post- hoc de Bonferroni.

## 5 DISCUSSÃO

Embora estudos anteriores já tenham demonstrado o potencial anti-inflamatório de iPDE5 como sildenafil e tadalafil utilizando modelos pré-clínicos de inflamação aguda, até o momento, somente um estudo explorou o possível efeito do vardenafil nesses modelos. O presente estudo caracterizou o potencial efeito anti-inflamatório e antinociceptivo do vardenafil. Nossos resultados, pela primeira vez na literatura, mostraram que o vardenafil possui um efeito anti-edematogênico, capaz de reduzir o desenvolvimento de edema de pata induzido por carragenina em ratos o que não parece estar relacionado redução da infiltração de neutrófilos no tecido lesionado. Além disso, foi observado que o tratamento agudo com vardenafil possui propriedade antinociceptiva usando modelos químicos de dor evocada em ratos e camundongos. Este efeito não parece ser acompanhado por déficit locomotor, uma vez que o tratamento com vardenafil não alterou o desempenho locomotor no teste de campo aberto. No entanto, o vardenafil não foi capaz de alterar o limiar da dor em modelos de dor nociceptiva induzida por estímulos térmicos de calor na pata ou na cauda nem na alodinia mecânica associada a modelos de dor inflamatória ou neuropática.

Como mencionado, estudos anteriores mostraram que o sildenafil atenua a resposta inflamatória induzida por diversos modelos inflamatórios (GARCIA *et al.*, 2014; LUBAMBA *et al.*, 2012; NOEL *et al.*, 2017; RAPOSO *et al.*, 2013; VENNARI *et al.*, 2015; VIGNOZZI *et al.*, 2013). Em nosso estudo, o tratamento i.p. com vardenafil (na dose de 0,1 mg/kg) promoveu uma redução significativa no edema da pata na segunda e terceira h após a administração de Cg. A Cg induz uma resposta inflamatória na qual há um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-6 (IL-6) (CARDIA *et al.*, 2018). Embora não tenha sido investigado em nosso estudo, trabalhos anteriores mostraram que o tratamento crônico com iPDE5 atenua a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$  (LUBAMBA *et al.*, 2012), IL-8 (VIGNOZZI *et al.*, 2013) e TNF- $\alpha$  (NOEL *et al.*, 2017) *in vivo* e *in vitro*. Além disso, foi demonstrado que o tratamento diário com sildenafil em ratos

com diabetes induzido por estreptozotocina promoveu uma alteração no padrão de expressão de macrófagos, predominando ao final do experimento, aqueles com atividade anti-inflamatória (VENNERI *et al.*, 2015). Adicionalmente, um estudo já demonstrou que o sildenafil possui um efeito anti-inflamatório parcial devido a sua capacidade de inibição da isoforma induzível da óxido nítrico sintase (iNOS; RAPOSO *et al.*, 2013). Observa-se também que a resposta inflamatória induzida por Cg é caracterizada por duas fases, sendo a primeira fase de 0 a 60 minutos após a administração de Cg e depende da liberação de substâncias como histamina, serotonina e uma segunda fase (de 1 a 3h) que é caracterizada por um aumento de prostaglandinas, NO e espécies reativas de oxigênio de neutrófilos migratórios (CARDIA *et al.*, 2018; DI ROSA *et al.*, 1971). Considerando esse fato, nosso próximo experimento teve como objetivo investigar a atividade da mieloperoxidase, um marcador indireto da infiltração de neutrófilos, no modelo de inflamação induzida por Cg. Observou-se em nosso estudo, que a administração aguda de vardenafil não alterou significativamente a atividade da mieloperoxidase em amostras de pele inflamadas por Cg, sugerindo que seu efeito não parece estar relacionado à infiltração de neutrófilos no tecido lesado. Garcia e colaboradores (2014) observaram que o tratamento diário com sildenafil (20 mg/kg/rato) por 7 dias parece interferir em várias etapas de recrutamento e migração de leucócitos, pois observaram uma redução na expressão de MPO após lesão bilateral do nervo cavernoso, o que vai contra aos nossos resultados. Esse fato pode ser explicado pela diferença na duração do tratamento, em que em nosso estudo o tratamento foi agudo, dosagem, já que nossos estudos utilizaram uma baixa dosagem a fim de evitar efeitos colaterais e nos modelos de indução da inflamação.

Considerando esse possível efeito anti-inflamatório do vardenafil e que a dor é um dos 5 principais sinais de inflamação (CARDIA *et al.*, 2018), nossos próximos experimentos foram realizados para caracterizar seu potencial antinociceptivo. Para isso, o primeiro teste foi realizado para avaliar o efeito antinociceptivo do vardenafil em respostas induzidas por formalina. A nocicepção induzida por formalina consiste em dois estados nociceptivos distintos de resposta

comportamental (TJØLSEN *et al.*, 1992). A primeira fase do teste começa logo após a injeção de formalina (0-5 minutos) que ocorre devido à estimulação química dos nociceptores, também chamada de fase neurogênica (DUBUISSON e DENNIS, 1977). Depois, há um período quiescente (6 a 15 minutos) e, em seguida, inicia a segunda fase (15 a 60 minutos), que se refere à fase inflamatória do teste, caracterizada pelo envolvimento de mediadores inflamatórios periféricos (HUNSKAAR e HOLE, 1987). Em nosso estudo, o tratamento com vardenafil (em todas as doses testadas) promoveu uma diminuição significativa no número de *flinches* induzidos por formalina durante a fase II do teste de formalina, mas não durante a fase I e a fase quiescente. Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores que mostraram que a PDE5 é expressa em vários tecidos (BEAVO, 1995) e, portanto, o sildenafil é capaz de produzir antinocicepção periférica e também aumenta a antinocicepção de morfina (MIXCOATL-ZECUATL *et al.*, 2000), diclofenaco (ASOMOZA-ESPINOSA *et al.*, 2001) e ácido elágico (MANSOURI *et al.*, 2014) no teste de formalina. Além disso, alguns estudos discutem que esse efeito antinociceptivo periférico do sildenafil parece estar associado ao aumento do GMPc intracelular (AMBRIZ-TUTUTI *et al.*, 2005) e relacionam o envolvimento da via NO-GMPc na analgesia induzida por iPDE5 (CUNHA *et al.*, 2005). Embora nossos resultados sejam consistentes com estudos com sildenafil, Mehanna e colaboradores (2018) demonstraram que o tadalafil, outro iPDE5, na dose de 1,5 mg/kg, via i.p., promoveu uma diminuição significativa no comportamento nociceptivo induzido pela formalina nas duas fases do teste, porém se tratam de drogas com farmacocinéticas diferentes e além disso a dosagem utilizada neste estudo foi maior, além disso os autores não citam possíveis efeitos colaterais relacionados a dosagem.

Também avaliamos o efeito anti-nociceptivo do vardenafil em outro modelo animal, utilizando o teste de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos. Já está bem estabelecido na literatura que a administração i.p. de ácido acético promove uma inflamação periférica aguda manifestada por hiperalgesia, promovendo a liberação de substâncias endógenas, como prostaglandinas, citocinas, bradicininas e substância P, que ativam as

terminações nervosas dos nociceptores (BERKENKOPF e Weichman, 1988; RIBEIRO *et al.*, 2000). Estudos demonstraram que o sildenafil possui atividade antinociceptiva (JAIN *et al.*, 2001) e também aumenta a antinocicepção da morfina (MIXCOATL-ZECUATL *et al.*, 2000), nimesulida (PATIL *et al.*, 2003), diclofenaco (ASOMOZA-ESPINOSA *et al.*, 2001; PATIL *et al.*, 2003) e agentes adrenérgicos (PATEL *et al.*, 2009) no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético. Além disso, um estudo usando tadalafil também mostrou uma diminuição significativa no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético (MEHANNA *et al.*, 2018). Esses estudos reforçam os resultados obtidos, nos quais o vardenafil (nas doses 0,01, 0,03 e 0,1 mg/kg) promoveu uma diminuição significativa no número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Além disso, Jain e colaboradores (2001) concluíram que essa inibição da PDE5 e, portanto, o aumento do GMPc pode estar relacionado a antinocicepção periférica.

Tendo em vista os estudos anteriores realizados por Otari e Upasani (2015), que mostraram que o tadalafil produz efeito antinociceptivo sobre a hiperalgesia induzida por carragenina e diabetes em ratos utilizando o teste de placa quente, avaliamos o efeito antinociceptivo do vardenafil frente a respostas nociceptivas induzidas por estímulos térmicos usando os testes do *tail-flick* e placa quente. Segundo a literatura, respostas comportamentais induzidas pelo *tail-flick* envolvem predominantemente processamentos em nível da medula espinhal, enquanto as respostas comportamentais observadas no teste da placa quente refletem uma mediação supraespinhal (KURASHI *et al.*, 1983; LANGERMAN *et al.*, 1995). Em nosso estudo, o vardenafil não foi capaz de aumentar significativamente o tempo de latência nos aparatos de *tail-flick* e placa quente. Esses dados corroboram com a literatura existente, que descreveu que a administração sistêmica aguda de sildenafil não alterou o limiar nociceptivo de ratos nos testes do *tail-flick* e placa quente (JAIN *et al.*, 2001). Por outro lado, Mehanna e colaboradores (2018) demonstraram que o tadalafil, nas doses de 1,0, 1,4, 1,8 e 2,0 mg/kg, via i.p., exerceu um efeito antinociceptivo nos testes do *tail-flick* e placa quente, concluindo que o tadalafil atua à nível periférico e central.

Essa divergência de resultados pode ser explicada pelo fato de que as drogas possuem estrutura química e farmacocinética diferentes, apesar da mesma classe farmacológica. Além disso, o tadalafil tem uma especificidade maior para a PDE5 em comparação com o vardenafil, embora o vardenafil seja o mais potente deles (Beavo, 1995).

Com relação a nocicepção induzida por estímulos mecânicos, o vardenafil foi avaliado em um modelo de dor inflamatória induzida por Cg. Nesse modelo de inflamação aguda e local, as alterações bioquímicas e fisiológicas ocorrem em um curto período, limitado ao único membro afetado, resultando em edema, dor e hiperalgesia (İKIZ GEDIZ *et al.*, 2015). Estudos anteriores mostraram que a administração local de sildenafil é capaz de produzir antinocicepção no teste de hiperalgesia induzida por Cg (JAIN *et al.*, 2001; 2003; PATIL *et al.*, 2003). Sobre o vardenafil, existe apenas um estudo na literatura que demonstrou que sua administração local (via i.pl.), nas doses de 50, 100 µg/kg produz um efeito antinociceptivo no modelo de hiperalgesia induzida por Cg (0,1 mL, via i.pl.) e esse efeito é mediado principalmente pela via de sinalização NO-GMPc e mecanismos adicionais relacionados ao  $Ca^{+2}$  (İKIZ GEDIZ *et al.*, 2015). Quanto ao sildenafil, um estudo demonstrou que sua administração local (50–100 µg/pata, i.pl.) aumentou o limiar mecânico dos animais que receberam a injeção i.pl. de Cg (Patil *et al.* (2003), além disso, outros estudos com administração local nas doses de 50, 100 and 200 µg/pata via i.pl., mostraram que esse aumento no limiar mecânico dos animais foi dose-dependente (JAIN *et al.*, 2001; JAIN *et al.*, 2003). Em nosso estudo, a administração sistêmica de vardenafil (via i.p.) não foi capaz de alterar o limiar mecânico dos animais nesse modelo. Esses dados aparentemente divergentes podem estar relacionados à via de administração da droga, uma vez que nesses estudos citados acima, apenas a administração local de sildenafil e vardenafil promoveram efeito antinociceptivo.

Com relação ao modelo de dor neuropática, o potencial efeito antinociceptivo do vardenafil foi avaliado frente a dor neuropática induzida por CCI. Lesões induzidas pela constrição crônica do nervo ciático levam à desmielinização das fibras mielinizadas Aβ e Aδ e à degeneração das fibras C,

que resultaram em alterações nociceptivas, provavelmente relacionadas a neuropeptídeos e inflamação (PATIL *et al.*, 2006). Além disso, Bennett e Xie (1988) caracterizaram esse modelo pela manifestação de alodinia mecânica e dor espontânea que foi detectada no segundo dia após a cirurgia e mantém-se por até 2 meses após a indução de neuropatia. Esses achados são consistentes com nossos resultados, nos quais os animais submetidos à cirurgia para indução de dor neuropática apresentaram alodinia mecânica evidenciada pelo teste de Von Frey eletrônico no sétimo e décimo quarto dia de pós-operatório. Adicionalmente, estudos utilizando o modelo CCI em ratos também encontraram uma redução no limiar mecânico desses animais, indicando o desenvolvimento de alodinia mecânica (AUSTIN *et al.*, 2012; DI *et al.*, 2014; FU *et al.*, 2017; PATIL *et al.*, 2006). O potencial antinociceptivo de iPDE5 já vem sendo estudado em dores de origem neuropática. Um estudo de 2017, já demonstrou que o uso crônico de sildenafil associado a curcumina parece diminuir a hiperalgesia mecânica na neuropatia induzida pelo álcool, um efeito antinociceptivo do sildenafil (KAUR *et al.*, 2017). Na dor neuropática diabética, alguns estudos não clínicos demonstraram que a administração crônica de sildenafil ou tadalafil foram capazes de diminuir a hiperalgesia mecânica (PATIL *et al.*, 2004) e alodinia tátil (ARAIZA-SALDAÑA *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011) de ratos com neuropatia diabética induzida por STZ. Araiza-Saldaña e colaboradores (2005, 2010), sugerem que o mecanismo através do qual os iPDE5 promovem antinocicepção se dá através do aumento de GMPc, refletindo, por sua vez, na ativação da proteína quinase G (PKG), que então fosforila canais de potássio, resultando na hiperpolarização do neurônio aferente primário, com efeito antinociceptivo. Adicionalmente, estudos clínicos também já demonstraram que a administração de doadores de NO, pode estar relacionada a esse efeito, uma vez que o NO age intracelularmente, aumentando os níveis de GMPc (YOSHIOKA *et al.*, 2004; YUEN *et al.*, 2002). Com relação a dor neuropática induzida por CCI, um estudo utilizando sildenafil nas doses de 100 e 200 µg, via intratecal, com uma única injeção no décimo quarto dia após a constrição do nervo ciático, demonstrou induzir hiperalgesia no teste randall selitto, por diminuir ainda mais o limiar mecânico dos animais testados, sugerindo uma ativação da via NO-GMPc, em que altas doses induz hiperalgesia devido

ativação da PKG, enquanto que em doses baixas induz analgesia mediada por mecanismo independente de PKG. Entretanto, Korkmaz e colaboradores (2016), utilizaram o tratamento oral de sildenafil, em dose única diária, que demonstrou desempenhar um papel importante no tratamento de danos no nervo ciático e na cicatrização óssea, pode ser usado como tratamento clínico de suporte em danos de nervos. Em nosso estudo, observamos que a administração aguda de vardenafil não alterou o limiar mecânico de animais com CCI e essa discrepância pode ser explicada pelo fato de se tratarem de diferentes modelos de dor neuropática e pela diferença na duração do tratamento.

Novos estudos estão sendo conduzidos em nosso laboratório a fim de avaliar o efeito agudo e crônico do vardenafil na dor neuropática diabética, tendo em vista os estudos já encontrados na literatura, identificando também o possível envolvimento da via PKG/canais de potássio ATP dependentes em seu efeito antinociceptivo, através da administração de inibidores de proteína quinase G e bloqueadores de canais de potássio ATP dependentes (glibenclamida) e o possível desenvolvimento de tolerância do uso desse fármaco a longo prazo. Além disso, iPDE5, como o sildenafil, vardenafil e tadalafil, já são utilizados na clínica por sua ação na disfunção erétil, outra complicação que acomete cerca de 57,7% dos pacientes diabéticos (KOUIDRAT *et al.*, 2017), assim podem ser considerados fortes candidatos ao reposicionamento de fármacos.

O reposicionamento de fármacos refere-se à identificação de novas indicações para fármacos já existentes, que tem agregado valor ao portfólio de produtos da indústria farmacêutica, bem como o aumento da capacidade de entidades acadêmicas e governamentais em trazer novas e acessíveis opções de tratamento para doenças de difícil manejo clínico (O'CONNOR e ROTH, 2005). Esta estratégia oferece vantagens sobre o desenvolvimento de um novo medicamento para uma determinada indicação, já que os compostos candidatos ao estudo já apresentam estudos de farmacocinética, efeitos adversos e contraindicações bem descritos, além da otimização química, melhor forma de administração do fármaco, toxicologia e conhecimentos dos custos e forma de produção já analisados (ASHBURN e THOR, 2004).

Na literatura já existem alguns exemplos bem sucedidos de reposicionamento de fármaco, como é o próprio caso do iPDE5, sildenafil, que originalmente foi desenvolvido como um medicamento anti-hipertensivo, mas quando redirecionado pela Pfizer para o tratamento de disfunção erétil obteve bons resultados e totalizou US\$ 2,05 bilhões em vendas no ano de 2012 (PUSHPAKOM *et al.*, 2018). Assim, podemos estar diante de um novo reposicionamento para o uso de iPDE5 como terapia adjuvante, no tratamento de dor de diversas origens.

## 6 CONCLUSÃO

Em resumo, nossos dados mostraram o potencial efeito do vardenafil em diferentes modelos de dor. O pré-tratamento sistêmico com vardenafil demonstrou ter um efeito anti-edematogênico na inflamação aguda induzida por Cg, que parece não ser dependente da inibição da migração de neutrófilos. O efeito anti-inflamatório do vardenafil foi observado pelo teste de formalina e pelo teste de contorção abdominal induzido por ácido acético. Além disso, esse efeito não parece estar relacionado à sedação, pois o tratamento com vardenafil não alterou o número de cruzamentos no teste de campo aberto. No entanto, quanto ao limiar de dor frente ao estímulo térmico aplicado nas patas ou à cauda (teste da placa quente e tail-flick, respectivamente) ou a alodinia mecânica associada a modelos de dor inflamatória induzida por Cg ou a modelos de dor neuropática induzida por CCI, o vardenafil não mostrou propriedades antinociceptivas, demonstrando que o vardenafil apresentou efeitos antinociceptivos apenas em modelos de dor evocada por estímulos flogogênicos como a formalina ou ácido acético. Sendo assim, nossos dados permitem concluir que o vardenafil pode ser uma alternativa terapêutica adjunta, mas não substitutiva, no tratamento da dor, representando a abordagem do reposicionamento de fármacos, uma estratégia promissora no processo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos. Contudo, novos experimentos estão sendo conduzidos a fim de caracterizar o possível mecanismo de ação do vardenafil, levando em consideração estudos anteriores que demonstraram a participação da via de sinalização do NO-GMPc e a supressão da liberação de citocinas pró-inflamatórias.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. B. D. E. **Caracterização das fosfodiesterases (PDE) de GMPc nas células de linhagem eritróide e efeitos de drogas inibidoras de PDE na produção de hemoglobina fetal**. 2006. 113 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) Área de concentração ciências Básicas. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006. Disponível em: [http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/311506/1/Almeida\\_CamilaBononide\\_M.pdf](http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/311506/1/Almeida_CamilaBononide_M.pdf). Acesso em 19 dez. 2019.
- AMBRIZ-TUTUTI, M.; VELÁZQUEZ-ZAMORA, D. A.; URQUIZA-MARÍN, H.; GRANADOS-SOTO, V. Analysis of the mechanism underlying the peripheral antinociceptive action of sildenafil in the formalin test. **European Journal of Pharmacology**, v. 512, n. 2–3, p. 121–127, 2005.
- AMULIC, B.; CAZALET, C.; HAYES, G. L.; METZLER, K. D.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. **Annual Review of Immunology**, v. 30, n. 1, p. 459–489, 2012.
- ANDERSSON, K. E. PDE5 inhibitors – pharmacology and clinical applications 20 years after sildenafil discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 13, p. 2554–2565, 2018.
- ARAIZA-SALDAÑA, C. I.; REYES-GARCÍA, G.; BERMÚDEZ-OCAÑA, D. Y.; PÉREZ-SEVERIANO, F.; GRANADOS-SOTO, V. Effect of diabetes on the mechanisms of intrathecal antinociception of sildenafil in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 527, n. 1–3, p. 60–70, 2005.
- ARAIZA-SALDAÑA, C. I.; ROCHA-GONZÁLEZ, H. I.; AMBRIZ-TUTUTI, M.; et al. Sildenafil and glyceryl trinitrate reduce tactile allodynia in streptozotocin-injected rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 631, n. 1–3, p. 17–23, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.01.001>>. Acesso em: 20 dez. 2019.
- ARATANI, Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 640, n. November 2017, p. 47–52, 2018.
- ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p. 673–683, 2004.
- ASOMOZA-ESPINOSA, R.; ALONSO-LÓPEZ, R.; MIXCOATL-ZECUATL, T.; et al. Sildenafil increases diclofenac antinociception in the formalin test. **European**

**Journal of Pharmacology**, v. 418, n. 3, p. 195–200, 2001.

ATTAL, N. Pharmacological treatments of neuropathic pain: The latest recommendations. **Revue Neurologique**, v. 175, n. 1–2, p. 46–50, 2019. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.08.005>>. Acesso em: 18 dez. 2019.

AUSTIN, P. J.; WU, A.; MOALEM-TAYLOR, G. Chronic constriction of the sciatic nerve and pain hypersensitivity testing in rats. **Journal of visualized experiments : JoVE**, , n. 61, p. 1–6, 2012.

BALLOU, L. R.; BOTTING, R. M.; GOORHA, S.; ZHANG, J.; VANE, J. R. Nociception in cyclooxygenase isozyme-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 18, p. 10272–10276, 2000.

BANNON, A. W.; MALMBERG, A. B. Models of Nociception: Hot-Plate, Tail-Flick, and Formalin Tests in Rodents. **Current Protocols in Neuroscience**, , n. October, p. 1–16, 2007.

BARNES, P. J. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, n. 3, p. 245–254, 2006.

BARON, R. Mechanisms of disease: Neuropathic pain - A clinical perspective. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 2, n. 2, p. 95–106, 2006.

BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. **Physiological Reviews**, v. 75, n. 4, p. 725–748, 1995.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces d... [Pain. 1988] - PubMed result. **Pain**, v. 33, p. 87–107, 1988. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90209-6](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(88)90209-6)>. .

BERKENKOPF, J. W.; WEICHMAN, B. M. Production of prostacyclin in mice following intraperitoneal injection of acetic acid, phenylbenzoquinone and zymosan: Its role in the writhing response. **Prostaglandins**, v. 36, n. 5, p. 693–709, 1988.

BOURNE, S.; MACHADO, A. G.; NAGEL, S. J. Basic anatomy and physiology of pain pathways. **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 25, n. 4, p. 629–638, 2014.

BRADLEY, P. P., PRIEBAT, D.A., CHRISTENSEN, R. D., ROTHSTEIN, G. Measurement of Cutaneous Inflammation: Estimation of Neutrophil Content with na Enzyme Marker. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-09, 1982.

BRITO, P. S. **Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica do composto Pellec1 isolado da *Combretum Leprosom***. 2012. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2012. Disponível em: <https://tede2.uepg.br/jspui/handle/prefix/104>. Acesso em 15 de dez. 2019.

CARDIA, G. F. E.; SILVA-FILHO, S. E.; SILVA, E. L.; et al. Effect of Lavender (*Lavandula angustifolia*) Essential Oil on Acute Inflammatory Response . **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. 1–10, 2018.

CHEN, L.; DENG, H.; CUI, H.; et al. Oncotarget 7204 [www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget) Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204–7218, 2018. Disponível em: [www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/). Acesso em: 16 dez. 2019.

COLLOCA, L.; LUDMAN, T.; BOUHASSIRA, D.; et al. Neuropathic pain. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 1–20, 2017. Macmillan Publishers Limited. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.2>. Acesso em: 29 dez. 2019.

CRUZ, W. A. S. **Atividade de Mieloperoxidase e Produção de Oxigênio Singlete em Neutrófilos e Células Monocíticas**. 60 f. 2011. Tese (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CUNHA, F. Q.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, S. H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems - cyclic AMP and cyclic GMP - on inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, n. 3, p. 671–678, 1999.

CUNHA, F. Q.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, S. H. Peripheral and central activation of nitric oxide-cyclic GMP pathway by sildenafil. **Inflammopharmacology**, v. 13, n. 5–6, p. 467–478, 2005.

DALLAZEN, J. L. **Avaliação do efeito da administração local de alquilamidas em diferentes modelos de dor em camundongos**. 2019. 140 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba (PR), 2019. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/60387>. Acesso em: 20 nov. 2019.

DALLAZEN, J. L.; MARIA-FERREIRA, D.; DA LUZ, B. B.; et al. Pharmacological potential of alkylamides from *Acmella oleracea* flowers and synthetic isobutylalkyl amide to treat inflammatory pain. **Inflammopharmacology**, 2019. Springer International Publishing. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10787-019->

00601-9>. Acesso em: 20 nov. 2019.

DAY, R. O.; GRAHAM, G. G. Therapeutics: Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). **BMJ (Online)**, v. 347, n. 7917, p. 1–7, 2013.

DI, Y. X.; HONG, C.; JUN, L.; RENSHAN, G.; QINQUAN, L. Curcumin Attenuates Mechanical and Thermal Hyperalgesia in Chronic Constrictive Injury Model of Neuropathic Pain. **Pain and Therapy**, v. 3, n. 1, p. 59–69, 2014.

DUARTE, I. D. G.; DOS SANTOS, I. R.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 217, n. 2–3, p. 225–227, 1992.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, n. C, p. 161–174, 1977.

EM, P. D. E. P.; ANIMAL, C.; NAIDA, O.; BORGES, C. Inibidores Da Fosfodiesterase Tipo V : Aspectos Clínicos E Farmacológicos Ana Paula Araujo Costa Inibidores Da Fosfodiesterase Tipo V : Aspectos. , 2011.

FINNERUP, N. B.; JENSEN, T. S. Mechanisms of disease: Mechanism-based classification of neuropathic pain - A critical analysis. **Nature Clinical Practice Neurology**, v. 2, n. 2, p. 107–115, 2006.

FOSTER, B. Y. D.; HERRING, L. Architecture of Strategic Talent Management. **Cell**, v. 2, n. October, p. 31–43, 2010.

FRANCIS, S. H.; BLOUNT, M. A.; CORBIN, J. D. Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: Molecular mechanisms and physiological functions. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 2, p. 651–690, 2011.

FREITAS, G. C.; CARREGARO, A. B. Aplicabilidade da extrapolação alométrica em protocolos terapêuticos para animais selvagens. **Ciência Rural**, v. 43, n. 2, p. 297–304, 2013.

FU, H.; LI, F.; THOMAS, S.; YANG, Z. Hyperbaric oxygenation alleviates chronic constriction injury (CCI)-induced neuropathic pain and inhibits GABAergic neuron apoptosis in the spinal cord. **Scandinavian Journal of Pain**, v. 17, p. 330–338, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sjpain.2017.08.014>>. Acesso em: 23 nov. 2019.

GARCIA, L. A.; HLAING, S. M.; GUTIERREZ, R. A.; et al. Sildenafil attenuates inflammation and oxidative stress in pelvic ganglia neurons after bilateral cavernosal nerve damage. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15,

n. 10, p. 17204–17220, 2014.

GHOSH, R.; SAWANT, O.; GANPATHY, P.; PITRE, S.; KADAM, V. J. Phosphodiesterase inhibitors: Their role and implications. **International Journal of PharmTech Research**, v. 1, n. 4, p. 1148–1160, 2009.

HIROTA, B. C. K.; PAULA, C. D. S.; DE OLIVEIRA, V. B.; et al. Phytochemical and antinociceptive, anti-inflammatory, and antioxidant studies of smilax larvata (Smilacaceae). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

HUDSPITH, M. J. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 20, n. 8, p. 419–425, 2019.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103–114, 1987.

İKİZ GEDİZ, E.; NACITARHAN, C.; MINARECI, E.; SADAN, G. Antinociceptive effect of vardenafil on carrageenan-induced hyperalgesia in rat: Involvement of nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate/ calcium channels pathway. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 4, p. 1137–1143, 2015.

JAIN, N. K.; PATIL, C. S.; SINGH, A.; KULKARNI, S. K. Sildenafil-induced peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. **Brain Research**, v. 909, n. 1–2, p. 170–178, 2001.

JAIN, N. K.; PATIL, C. S.; SINGH, A.; KULKARNI, S. K. Sildenafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, enhances the antinociceptive effect of morphine. **Pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 150–156, 2003.

JESUS, C. H. A.; REDIVO, D. D. B.; GASPARIN, A. T.; et al. Cannabidiol attenuates mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats via serotonergic system activation through 5-HT<sub>1A</sub> receptors. **Brain Research**, v. 1715, p. 156–164, 2019. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.03.014>>. Acesso em: 22 dez. 2019.

INTERNATIONAL ASSOCIATION OF PAIN (IASP). Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698#Pain>>. Acesso em: 22 dez. 2019.

KAUR, M.; SINGH, A.; KUMAR, B.; et al. Protective effect of co-administration of curcumin and sildenafil in alcohol induced neuropathy in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 805, n. March, p. 58–66, 2017. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.03.012>>. Acesso em: 26 nov. 2019.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives**

of **Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2008.

KLEBANOFF, S. J.; KETTLE, A. J.; ROSEN, H.; WINTERBOURN, C. C.; NAUSEEF, W. M. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, n. 2, p. 185–198, 2013.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–175, 2013. Nature Publishing Group.

KORKMAZ, M. F.; PARLAKPINAR, H.; CEYLAN, M. F.; et al. The effect of sildenafil on recuperation from sciatic nerve injury in rats. **Balkan Medical Journal**, v. 33, n. 2, p. 204–211, 2016.

KOUIDRAT, Y.; PIZZOL, D.; COSCO, T.; et al. High prevalence of erectile dysfunction in diabetes: a systematic review and meta-analysis of 145 studies. **Diabetic Medicine**, v. 34, n. 9, p. 1185–1192, 2017.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. D. A.; VALENTE, C. M. L. Pro-inflammatory cytokines and pain. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, n. 3, p. 199–206, 2006.

KUMAR V., ABBAS A. K., ASTER J. C. Patologia básica. 9ª edição. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2013.

KUMAR, V.; COTRAN, R. S.; ROBBINS, S. L. Robbins Basic Pathology. **Saunders**, 2003.

KURAIISHI, Y.; HARADA, Y.; ARATANI, S.; SATOH, M.; TAKAGI, H. Separate involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algesic tests. **Brain Research**, v. 273, n. 2, p. 245–252, 1983.

KWON, M.; ALTIN, M.; DUENAS, H.; ALEV, L. The role of descending inhibitory pathways on chronic pain modulation and clinical implications. **Pain Practice**, v. 14, n. 7, p. 656–667, 2014.

LANGERMAN, L.; ZAKOWSKI, M. I.; PISKOUN, B.; GRANT, J. Hot Plate Versus Tail Flick : Evaluation of Acute Tolerance to Continuous Morphine Infusion in the Rat Model. , v. 8719, n. 94, 1995.

LUBAMBA, B.; HUAUX, F.; LEBACQ, J.; et al. Immunomodulatory activity of vardenafil on induced lung inflammation in cystic fibrosis mice. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 11, n. 4, p. 266–273, 2012. European Cystic Fibrosis Society. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2012.03.003>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

MAJNO, G.; JORIS, I. Cells, Tissues and Disease. Oxford University: **Press**, 2004.

MAJNO, G.; PALADE, G. E. Studies on inflammation. 1. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. **The Journal of biophysical and biochemical cytology**, v. 11, n. 2, p. 571–605, 1961.

MANALLACK, D. T.; HUGHES, R. A.; THOMPSON, P. E. The next generation of phosphodiesterase inhibitors: Structural clues to ligand and substrate selectivity of phosphodiesterases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 10, p. 3449–3462, 2005.

MANSOURI, M.; NAGHIZADEH, B.; GHORBANZADEH, B. Sildenafil enhances the peripheral antinociceptive effect of ellagic acid in the rat formalin test. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 46, n. 4, p. 404–408, 2014.

MEACHAM, K.; SHEPHERD, A.; MOHAPATRA, D. P.; HAROUTOUNIAN, S. Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. **Current Pain and Headache Reports**, v. 21, n. 6, 2017.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008.

MEHANNA, M. M.; DOMIATI, S.; NAKKASH CHMAISSE, H.; EL MALLAH, A. Antinociceptive effect of tadalafil in various pain models: Involvement of opioid receptors and nitric oxide cyclic GMP pathway. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 352, n. 2017, p. 170–175, 2018. Elsevier Inc. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.05.013>>. Acesso em: 26 nov. 2019.

MEHROTRA, N.; GUPTA, M.; KOVAR, A.; MEIBOHM, B. The role of pharmacokinetics and pharmacodynamics in phosphodiesterase-5 inhibitor therapy. **International Journal of Impotence Research**, v. 19, n. 3, p. 253–264, 2007.

MEOTTI, F. C.; LUIZ, A. P.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S. Analysis of the Antinociceptive Effect of the Flavonoid Myricitrin: Evidence for a Role of the. , v. 316, n. 2, p. 789–796, 2006.

MIXCOATL-ZECUATL, T.; AGUIRRE-BAÑUELOS, P.; GRANADOS-SOTO, V. Sildenafil produces antinociception and increases morphine antinociception in the formalin test. **European Journal of Pharmacology**, v. 400, n. 1, p. 81–87, 2000.

MORAES, B. M.; DO AMARAL, B. C.; MORIMOTO, M. S. S.; et al. Anti-inflammatory and analgesic actions of etoricoxib (an NSAID) combined with misoprostol. **Inflammopharmacology**, v. 15, n. 4, p. 175–178, 2007.

NATHAN, C. Review: Points of Control in Inflammation. **Nature**, v. 420, p. 846-

852, 2002.

NICKEL, F. T.; SEIFERT, F.; LANZ, S.; MAIHÖFNER, C. Mechanisms of neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 81–91, 2012. Elsevier B.V. and ECNP. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.euroneuro.2011.05.005>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

NOEL, S.; PANIN, N.; BEKA, M.; et al. Vardenafil reduces macrophage pro-inflammatory overresponses in cystic fibrosis through PDE5- and CFTR-dependent mechanisms. **Clinical Science**, v. 131, n. 11, p. 1107–1121, 2017.

NONES, C. F. M.; CLAUDINO, R. F.; FERREIRA, L. E. N.; et al. Descending facilitatory pain pathways mediate ongoing pain and tactile hypersensitivity in a rat model of trigeminal neuropathic pain. **Neuroscience Letters**, v. 644, p. 18–23, 2017. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2017.02.047>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

O'CONNOR, K. A.; ROTH, B. L. Finding new tricks for old drugs: An efficient route for public-sector drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 12, p. 1005–1014, 2005.

OTARI, K. V.; UPASANI, C. D. Involvement of NO–cGMP pathway in anti-hyperalgesic effect of PDE5 inhibitor tadalafil in experimental hyperalgesia. **Inflammopharmacology**, v. 23, n. 4, p. 187–194, 2015.

PATEL, S. B.; SHAH, J.; MISTRY, K.; et al. Antinociceptive activity of tadalafil and adrenergic agents agents in the writhing test in mice. **Pharmacologyonline**, v. 1, p. 533–539, 2009.

PATIL, C. S.; JAIN, N. K.; SINGH, A.; KULKARNI, S. K. Modulatory effect of cyclooxygenase inhibitors on sildenafil-induced antinociception. **Pharmacology**, v. 69, n. 4, p. 183–189, 2003.

PATIL, C. S.; PADI, S. V.; SINGH, V. P.; KULKARNI, S. K. Sildenafil induces hyperalgesia via activation of the NO–cGMP pathway in the rat neuropathic pain model. **Inflammopharmacology**, v. 14, n. 1–2, p. 22–27, 2006.

PATIL, C. S.; SINGH, V. P.; SINGH, S.; KULKARNI, S. K. Modulatory effect of the PDE-5 inhibitor sildenafil in diabetic neuropathy. **Pharmacology**, v. 72, n. 3, p. 190–195, 2004.

PEREIRA, C. C.; FONSECA, L. F. L. DA; SANTOS, M. V. DOS; RODRIGUES, P. H. M.; BORELLI, P. Avaliação da atividade da mieloperoxidase neutrofílica em bovinos da raça Holandesa e sua correlação com níveis plasmáticos de ácido ascórbico. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, n. 3, p. 148–152, 2000.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 10, p. 803–815, 2007.

PRICKAERTS, J.; ŞIK, A.; VAN DER STAAY, F. J.; DE VENDE, J.; BLOKLAND, A. Dissociable effects of acetylcholinesterase inhibitors and phosphodiesterase type 5 inhibitors on object recognition memory: Acquisition versus consolidation. **Psychopharmacology**, v. 177, n. 4, p. 381–390, 2005.

PRICKAERTS, J.; VAN STAVEREN, W. C. G.; IK, A.; et al. Effects of two selective phosphodiesterase type 5 inhibitors, sildenafil and vardenafil, on object recognition memory and hippocampal cyclic GMP levels in the rat. **Neuroscience**, v. 113, n. 2, p. 351–361, 2002.

PUSHPAKOM, S.; IORIO, F.; EYERS, P. A.; et al. Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 1, p. 41–58, 2018.

RADNOVICH, R.; CHAPMAN, C. R.; GUDIN, J. A.; et al. Acute pain: Effective management requires comprehensive assessment. **Postgraduate Medicine**, v. 126, n. 4, p. 59–72, 2014.

RAPOSO, C.; NUNES, A. K. D. S.; LUNA, R. L. D. A.; et al. Sildenafil (Viagra) protective effects on neuroinflammation: The role of iNOS/NO system in an inflammatory demyelination model. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, 2013.

REFFELMANN, T.; KLONER, R. A. Phosphodiesterase 5 inhibitors: are they cardioprotective? **Cardiovascular Research**, v. 83, n. 2, p. 204–212, 2009.

RIBEIRO, R. A.; ML, V.; S M, T.; et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European journal of pharmacology**, v. 387, n. 1, p. 111–8, 2000.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **The Journal of Pathology**, v. 104, n. 1, p. 15–29, 1971.

SAŁAT, K.; FURGAŁA, A.; SAŁAT, R. Evaluation of cebranopadol, a dually acting nociceptin/orphanin FQ and opioid receptor agonist in mouse models of acute, tonic, and chemotherapy-induced neuropathic pain. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 2, p. 361–374, 2018.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 11s, p. 1062–1067, 2002.

SHAMSI MEYMANDI, M.; SEPEHRI, G.; IZADI, G.; ZAMIRI, Z. Evidence for antinociceptive effects of combined administration of vitamin E and celecoxib in

tail-flick and formalin test in male rats. **Pharmacological Reports**, v. 71, n. 3, p. 457–464, 2019. Institute of Pharmacology, Polish Academy of Sciences. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pharep.2019.02.005>>. Acesso em: 23 dez. 2019.

SILVA W. D., MOTA I. **Imunologia básica e aplicada**. 5ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

SOARES, A. C.; LEITE, R.; TATSUO, M. A. K. F.; DUARTE, I. D. G. Activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: Mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. **European Journal of Pharmacology**, v. 400, n. 1, p. 67–71, 2000.

STILLMAN, M. Clinical approach to patients with neuropathic pain. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 73, n. 8, p. 726–739, 2006.

SUPURAN, C.; MASTROLORENZO, A.; BARBARO, G.; SCOZZAFAVA, A. Phosphodiesterase 5 Inhibitors - Drug Design and Differentiation Based on Selectivity, Pharmacokinetic and Efficacy Profiles. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 27, p. 3459–3465, 2006.

SUZUKI, Y.; RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; et al. Inflammation and angiotensin II. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 35, n. 6, p. 881–900, 2003.

TANNENBAUM, J.; BENNETT, B. T. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS**, v. 54, n. 2, p. 120–32, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25836957>%0A<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4382615>>. Acesso em: 24 dez. 2019.

TJØLSEN, A.; OG, B.; S, H.; JH, R.; K, H. Review Article The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5–17, 1992.

TRACEY, W. D. Nociception. **Current Biology**, v. 27, n. 4, p. R129–R133, 2017.

VENNERI, M. A.; GIANNETTA, E.; PANIO, G.; et al. Chronic inhibition of PDE5 limits pro-inflammatory monocyte-macrophage polarization in streptozotocin-induced diabetic mice. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–17, 2015.

VIGNOZZI, L.; GACCI, M.; CELLAI, I.; et al. PDE5 inhibitors blunt inflammation in human BPH: A potential mechanism of action for PDE5 inhibitors in LUTS. **Prostate**, v. 73, n. 13, p. 1391–1402, 2013.

WANG, L.; CHOPP, M.; SZALAD, A.; et al. Phosphodiesterase-5 is a therapeutic

target for peripheral neuropathy in diabetic mice. **Neuroscience**, v. 193, p. 399–410, 2011.

WANG, L.; CHOPP, M.; SZALAD, A.; et al. Tadalafil promotes the recovery of peripheral neuropathy in type II diabetic mice. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–13, 2016.

WRIGHT, P. J. Comparison of phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors. **International Journal of Clinical Practice**, v. 60, n. 8, p. 967–975, 2006.

YOSHIOKA, K.; YOSHIDA, T.; UMEKAWA, T.; et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism is not related to diabetic nephropathy in Japanese Type 2 diabetic patients [1]. **Diabetic Medicine**, v. 21, n. 9, p. 1051–1052, 2004.

DE YOUNG, L. M.; KHEIFETS, J. B.; BALLARON, S. J.; YOUNG, J. M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents and Actions**, v. 26, n. 3–4, p. 335–341, 1989.

YUEN, K. C. J.; BAKER, N. R.; RAYMAN, G. Treatment of chronic painful diabetic neuropathy with isosorbide dinitrate spray: A double-blind placebo-controlled cross-over study. **Diabetes Care**, v. 25, n. 10, p. 1699–1703, 2002.

ZEILHOFER, H. U. Prostanoids in nociception and pain. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, n. 2, p. 165–174, 2007.

ZHOU, Y.; HONG, Y.; HUANG, H. Triptolide Attenuates Inflammatory Response in Membranous Glomerulo-Nephritis Rat via Downregulation of NF-κB Signaling Pathway. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 41, n. 6, p. 901–910, 2016.

## ANEXO 1 – CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA

SEI/UFPR - 2235030 - CEUA/BIO: Certificado

29/04/2020 20:35



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Nº 1202 B

### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

### STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22<sup>nd</sup> 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

**PROCESSO/PROCESS:** 23075.030025/2018-05

**APROVADO/APPROVAL:** 18/06/2019 – R.O. 05/2019

**TÍTULO:** Avaliação do potencial antinociceptivo de inibidores de fosfodiesterase do tipo 5 nas dores de origem inflamatória e neuropática.

**TITLE:** Evaluation of the potential antinociceptive effect of type 5 phosphodiesterase inhibitors on inflammatory and neuropathic pain.

**AUTORES/AUTHORS:** Joice Maria da Cunha, Alexia Thamara Gasparin, Carlos Henrique Alves de Jesus, Daiany Darlly Bello Redivo, Evelize Stacoviaki Rosa, Alberto Memari Pavanelli, Fernanda Ayumi Shiroma.

**DEPARTAMENTO/DEPARTMENT:** Farmacologia

Profa. Dra. Katya Naliwaiko  
Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI, MEDICO VETERINARIO**, em 21/10/2019, às 20:16, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **2235030** e o código CRC **FB9BC9B3**.