



UFSM

Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO E
MECANISMO DE AÇÃO DO
2-[5-TRICLOROMETIL-5-HIDROXI-3-FENIL-4,5-DIHIDRO-1H-
PIRAZOL-1-IL] 4-(4 BROMOFENIL)- 5 METILTIAZOL (B50)
EM CAMUNDONGOS**

Alessandra Hübner de Souza

PPGBT

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO E
MECANISMO DE AÇÃO DO
2-[5-TRICLOROMETIL-5-HIDROXI-3-FENIL-4,5-DIHI-DRO-1H-
PIRAZOL-1-IL] 4-(4 BROMOFENIL)- 5 METILTIAZOL (B50)
EM CAMUNDONGOS**

por

Alessandra Hübner de Souza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica.

PPGBT

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA
TOXICOLÓGICA**

A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO E
MECANISMO DE AÇÃO DO 2-[5-TRICLOROMETIL-5-
HIDROXI-3-FENIL-4,5-DI-HIDRO-1H-PIRAZOL-1-IL] 4-(4
BROMOFENIL)- 5 METILTIAZOL (B50) EM CAMUNDONGOS**

Elaborada por

Alessandra Hübner de Souza

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA

**Maribel Antonello Rubin
(Orientadora)**

Kátia Padilha Barreto

Nilo Zanatta

Santa Maria, 21 de julho de 2005

*Hipócrates na Grécia
antiga já referia que
aliviar a dor
é uma obra divina.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por reproduzir em cada um de nós sua manifestação criadora.

Aos meus Pais, pelo apoio incondicional, amor, paciência, força, otimismo.

Aos meus irmãos, pela lição de amor, e alegria diária.

Agradeço a minha orientadora, professora Maribel Antonello Rubin, e ao meu co-orientador, professor Carlos Mello, pela oportunidade que me deram para o meu crescimento profissional, mas também pessoal, fundamentais para o alcançar essa conquista.

Ao professor Juliano que me auxiliou e demonstrou boa vontade para comigo.

Aos professores da PPGBT, os ensinamentos que foram imprescindíveis à minha formação.

Aos meus amigos queridos de laboratório, que me receberam tão bem, em especial o grupo da analgesia, por valiosas discussões sobre o projeto. À Patrícia, Gabriela e Carla, obrigada pela dedicação a esse trabalho.

Às minhas bolsistas amadas de iniciação científica Carine e Camila, e hoje não mais IC, Gerusa, uma mestranda especial. Pessoas que não mediram esforços para me ajudarem em meus experimentos.

Às colegas e amigas Flávia, Lia, Valéria, Juliana às quais não tenho palavras para agradecer a amizade sincera, o companheirismo, a alegria e o convívio diário.

Aos animais utilizados nesse trabalho, meu respeito e gratidão.

“Sem a convicção de uma harmonia íntima do universo, não poderia haver ciência. Esta convicção é, e continuará a ser, a base de toda a criação científica. Em toda a extensão de nossos esforços, nas lutas dramáticas entre as velhas e as novas concepções, entrevemos a ânsia eterna de compreensão, a intuição inabalável na harmonia universal, que se robustece na própria multiplicidade de obstáculos que se oferecem ao nosso entendimento”

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELA	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
I – INTRODUÇÃO	1
1 – DOR E NOCICEPÇÃO	2
1.1– CLASSIFICAÇÃO DA DOR.....	3
1.2– MECANISMO NEURAL DA DOR.....	4
1.2.1– Transmissão de estímulos periféricos.....	4
1.2.2– Transmissão central da dor.....	5
1.3 – MEDIADORES QUÍMICOS	7
1.3.1– Neurotransmissores da dor	8
1.3.1.1– Substância P	9
1.3.1.2 – Glutamato	10
1.3.1.3 – Prostaglandinas	11
1.4 – CONTROLE INIBITÓRIO DA DOR	12
1.4.1– Neuromoduladores.....	14
1.4.1.1– Serotonina e Noradrenalina	14
1.4.1.2– Opióides endógenos.....	15
2 – TRATAMENTOS ANALGÉSICOS	16
2.1 – Derivados pirazolínicos.....	18
2.1.1 – Mecanismo de ação dos derivados pirazolínicos.....	20
II OBJETIVOS	24
OBJETIVO GERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
III ARTIGO.....	26

IV DISCUSSÃO.....	45
V CONCLUSÕES	48
VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAE – aminoácido(s) excitatório(s)
AAS – ácido acetilsalicílico
AC – adenilato ciclase
AMPA – ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
ANOVA – análise de variância
ATP – adenosina trifosfato
B50 – 2-[5-triclorometil-5-hidroxi-3-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-il]-4-(4-bromofenil)-5-metil tiazol
COX – ciclooxigenase
DAINES – drogas antiinflamatórias não esteroidais
EN – nociceptores específicos
EP – receptores das prostaglandinas
FAPs – fibras aferentes primárias
FR140423 – 3-(difluoromethyl)-1-(4-methoxyphenyl)-5-[4-methylsulfinyl]phenyl] pyrazol
GMP_c – guanosina monofosfato cíclico
GRD – gâncio da raiz dorsal
i.c.v – intracerebroventricular
i.t. – intratecal
L-NAME – N^G-monometil-L-arginina
NE – noradrenalina
NMR – núcleo magno da rafe
NO – óxido nítrico
NOS – óxido nítrico sintase
NPY – neuropeptídeo Y
NRG – núcleo reticular gigantocelular
PAG – substância cinzenta periaquedutal
PEPS – potencial excitatório pós-sináptico
PGs – prostaglandinas
PRGC – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
P2X – receptor purinérgico
PZ2 – 3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1-metil-1*H*-pirazol
PZ3 – 3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1-fenil-1*H*-pirazol

SNC – sistema nervoso central

SNP – sistema nervoso periférico

SP – substância P

WDR – neurônios que transmitem outras sensações

5-HT – serotonina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Aferências medulares dos nociceptores, mostrando sinapses das fibras, com o corno dorsal da medula espinhal..... 4

Figura 2 – Mecanismo de transmissão e percepção da dor 6

Figura 3 – Agentes algogênicos na nocicepção 8

Figura 4 – Teoria do Portão para a modulação ascendente da nocicepção 13

Figura 5 – Anel pirazolínico 18

ARTIGO

Figura 1 – Chemical structure of 2-(5-triclorometil-5-hidroxi-3-fenil-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)-4(bromofenil)-5-metil tiazol (B50) 35

Figura 2 – Effect of morphine (6.5 nmol/5 µl, i.t.) or B50 (200 nmol/5 µl, i.t.) on the number of writhes induced by acetic acid at 0, 30, 60, 120 and 240 min after treatment with B50 or morphine..... 36

Figura 3 – Effect of B50 (100, 200 or 400 nmol/5µl, i.t.) on the number of writhes induced by acetic acid at 120 min after treatment with B50. 37

Figura 4 – Effect of naloxone (8.25 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) on the antinociception induced by B50 (200 nmol/5 μl , i.t.)..... 38

Figura 5 – Effects of morphine (6.5 nmol/5 μl , i.t.), or B50 (200 nmol/5 μl , i.t.) on the latencies to hind paw lick or jumping in the constant temperature ($50 \pm 0.1^\circ\text{C}$) 40

LISTA DE TABELA

Table 1 – Effect of B50 (200 nmol/5 μ l, i.t.) and morphine (6.5 nmol/5 μ l, i.t.) on the latency for the first fall and number of falls in the rotarod and on the crossing and rearing in the open-field.....39

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO E
MECANISMO DE AÇÃO DO
2-[5-TRICLOROMETIL-5-HIDROXI-3-FENIL-4,5-DI-HIDRO-1H-
PIRAZOL-1-IL] 4-(4 BROMOFENIL)- 5 METILTIAZOL (B50)
EM CAMUNDONGOS**

Autor: Alessandra Hübner de Souza
Orientadora: Prof. Dr. Maribel Antonello Rubin
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 21 de julho de 2005.

Trabalhos realizados em nosso laboratório, demonstraram que a administração sistêmica do pirazol-tiazol 2-[5-triclorometil-5-hidroxi-3-fenil-4,5-dihidro-1h-pirazol-1-il] 4-(4 bromofenil)- 5 metiltiazol (B50) provocou antinocicepção no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8%. Porém, não se sabe se a ação antinociceptiva do B50 é central ou periférica. Nesse estudo, nós investigamos o efeito antinociceptivo da administração intratecal do composto B50 em camundongos adultos machos, usando os testes de contorções abdominais induzidos por ácido acético e o teste da placa quente a ± 50 °C. O B50 (200 nmol/5 μ l, i.t.) causou antinocicepção 120 minutos depois de sua administração no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético e 90 minutos depois de sua administração no teste da placa quente. A Naloxona (8,25 μ mol/kg, s.c.) reverteu a ação antinociceptiva do B50 (200 nmol/5 μ l, i.t.) no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, sugerindo que mecanismos opióides estão envolvidos na antinocicepção causada pelo B50. Este pirazol-tiazol não alterou a locomoção espontânea e nem a performance dos animais no cilindro giratório, indicando que o efeito antinociceptivo do B50 não é relacionado a efeitos motores inespecíficos.

ABSTRACT

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

**ANTINOCICEPTIVE EVALUATION OF 2-[5-
TRICLOROMETYL-5-HIDROXY-3-PHENYL-4,5-DIHYDRO-1H-
PYRAZOLE-1-YL]-4-(4-BROMOPHENYL)-5-METYL-
THIAZOLE(B50) AND ITS MECHANISM OF ACTION IN MICE**

Author: Alessandra Hübner de Souza
Advisors: Prof. Dr. Maribel Antonello Rubin
Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello

Place and date: Santa Maria, July 21th, 2005.

Pain is a common symptom in the clinical practice. Therefore, novel analgesic drugs, with more favorable pharmacological properties have been searched. Previous studies from our group showed that the systemic administration of the 2-[5-trichlorometyl-5-hidroxy-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-yl]-4-(4-bromophenyl)-5-metyl-thiazole(B50) causes antinociception in the acetic acid writhing test. However, it is not know whether such an antinociceptive action involves central or peripheral mechanisms. In this study we investigated the antinociceptive effect of the intrathecal administration of the new pyrazole derivative 2-[5-trichlorometyl-5-hidroxy-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-yl]-4-(4-bromophenyl)-5-metyl-thiazole (B50) in adult male mice, using the acetic acid writhing induced by acetic acid and hot-plate tests, in order to determine its putative site of action. B50 caused antinociception (200 nmol/ 5 µl, i.t.), 120 minutes after its administration, in the acetic acid writhing assay and 90 minutes after its administration in the hot plate test. Naloxone (8.25 µmol/kg, s.c.) reverted the antinociceptive action of B50 (200 nmol/ 5 µl, i.t.) in the acetic acid writhing assay, suggesting that opioid mechanisms are involved in the antinociception caused by B50. B50 had no effect on spontaneous locomotion or rotarod performance, indicating that the currently reported antinociceptive effect of B50 is not related to unspecific motor effects.

I. INTRODUÇÃO

1. DOR E NOCICEPÇÃO

Dor é uma qualidade sensorial complexa, puramente subjetiva, difícil de ser definida, descrita ou interpretada. Segundo o Comitê de Taxonomia da Associação Internacional para o Estudo da Dor, a dor pode ser conceituada como uma sensação e experiência sensorial desagradável associada a um dano tecidual atual ou potencial, ou descrita como tal dano (Merskey & Bogduk, 1994; Millan, 1999).

A dor é extensivamente influenciada por ansiedade, depressão, expectativa e outras variáveis psicológicas. É uma experiência multifacetada, um entrelaçamento das características físicas dos estímulos com as funções motivacionais, afetivas e cognitivas do indivíduo. A dor desempenha o papel de alerta, comunicando ao indivíduo que algo está errado, podendo gerar estresse acentuado e incapacidade física. É sem sombra de dúvida, a maior causa de afastamento do trabalho, gerando um enorme ônus para a nação (Bruno, 2001).

As sensações dolorosas induzem respostas urgentes de seu alívio, nos animais provocam comportamentos como massagear ou lambem a área lesada. A dor manifesta-se com intensidade diferente entre os indivíduos, variando de acordo com o sexo, idade, estado de humor e grau de escolaridade (Ganong, 1988; Agnati *et al.*, 1991; Bayer *et al.*, 1991; Faucett & Levine, 1991; Berkley, 1999; Chapman & Gavrin, 1999; Turk & Okifuji, 1999; Fillingen & Ness, 2000; Sharp, 2001).

A dor, além de uma sensação, é uma experiência. Isto é importante porque as sensações possuem vias neuroanatômicas, com receptores específicos que permitem a detecção e medida de um estímulo. Já as experiências incorporam componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais importantes (Millan, 1999). No entanto, clínica e experimentalmente se faz necessária a distinção entre a dor percebida e a resposta ao dano tecidual ou nocicepção (Kandel *et al.*, 2003).

Nocicepção é um termo aplicado aos mecanismos neurológicos que detectam o estímulo lesivo (Ferreira, 2002a). Uma vez que os animais não são capazes de verbalizar os componentes subjetivos da dor, neles não se avalia dor, mas nocicepção. Sendo assim, termos como dor e analgesia são mais adotados para humanos e nocicepção e antinocicepção para animais (Jones, 1992).

1.1 Classificação da dor

A dor pode ser considerada como um sintoma ou manifestação de uma doença ou afecção orgânica, mas também pode vir a constituir um quadro clínico mais complexo. Existem muitas maneiras de se classificar a dor. Considerando a duração da sua manifestação, ela pode ser de três tipos: dor aguda, crônica e recorrente.

Dor aguda é um sintoma biológico de estímulo nociceptivo, como dano tecidual devido à doença ou trauma. Pode ser altamente localizada ou pode se irradiar. É descrita em caráter de pontadas e persiste enquanto houver patologia tecidual, possuindo função de alerta. Como exemplo, podemos citar o contato com uma chapa quente ou a dor pós-operatória, que cessam assim que a lesão é curada (Bernard et al., 1996; Loeser & Melzack, 1999). A etiologia da dor aguda é geralmente evidente e seu diagnóstico é facilmente definido. Além disso, a dor aguda é controlada com eficiência usando-se o arsenal de drogas existentes no mercado e as diversas técnicas de controle de dor (Portenoy & Lesage, 1999).

A dor torna-se crônica quando o controle da patologia não é satisfatório (Vilela Filho & Corrêa, 1999), persistindo além do tempo necessário para a cura da lesão (Ashburn & Staats, 1999). Esse tipo de dor é resultante de processos patológicos, que agredem as estruturas somáticas ou viscerais, e de disfunções do sistema nervoso central (SNC), ou do sistema nervoso periférico (SNP). Além disso, a dor crônica gera estresse, reduz a imunidade, diminui a produção de endorfinas e causa alterações do sono, causando depressão (Carvalho, 1999).

Já a dor recorrente apresenta-se em períodos de curta duração que, no entanto, se repetem com frequência, podendo ocorrer durante toda a vida do indivíduo, mesmo sem estar associada a um processo específico. Um exemplo clássico deste tipo de dor é a enxaqueca.

1.2 Mecanismos neurais da dor

1.2.1 Transmissão de estímulos periféricos

Nociceptores são receptores localizados nos neurônios sensoriais que respondem preferencialmente a estímulos nocivos. Eles conduzem as informações nociceptivas ao sistema nervoso central, e seus corpos celulares encontram-se dentro dos gânglios das raízes dorsais, adjacente à medula espinhal (Grubb, 1999; Russo & Brose, 1998; Besson, 1999; Millan, 1999). Os nociceptores estão presentes em todo corpo e são divididos em três subtipos: mecanoreceptores, que respondem à pressão; receptores mecanotérmicos, respondem à pressão e ao calor, e receptores polimodais, que respondem à pressão, calor e estímulos químicos (Natalini, 2000).

Os nociceptores são ligados ao SNC por intermédio de fibras nervosas, de três tipos: fibras A β , A δ e C. As fibras de condução dos impulsos nociceptivos são fibras aferentes primárias (FAPs) do tipo A δ (aferentes mielinizadas de baixo calibre) e C (fibras de condução aferente não-mielinizadas) (Machado, 2000) (Figura 1). Os mecanoreceptores e os mecanotérmicos são inervados pelas fibras A δ , que apresentam uma condução rápida do estímulo doloroso. Já, os receptores polimodais são inervados pelas fibras C, e transmitem o estímulo de forma mais lenta (Natalini, 2000).

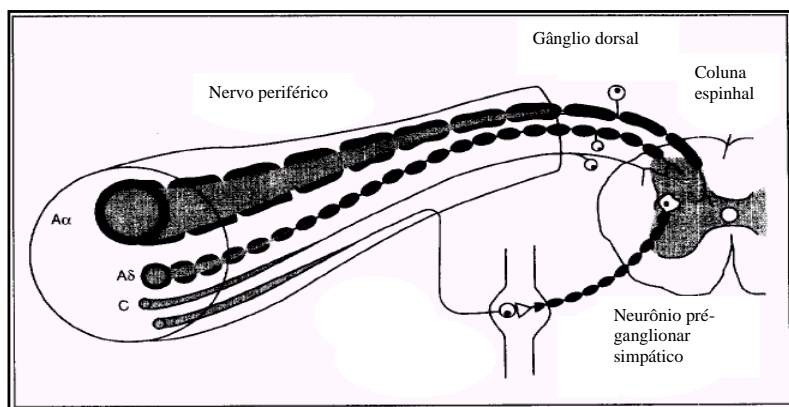


Figura 1 - Aferências medulares dos nociceptores, mostrando sinapses das fibras, com o corno dorsal da medula espinhal. Adaptado de: Markenson, 1996.

1.2.2 Transmissão central da dor

As fibras (neurônios) sensoriais primários fazem sinapse no corno dorsal da medula espinhal com neurônios de segunda ordem, predominantemente na lâmina II (substância gelatinosa) da medula espinhal. Os neurônios de segunda ordem cruzam a medula espinhal para ascender ao trato espinotalâmico, projetando seus corpos celulares ao tálamo.

No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios através da cápsula interna do córtex somatosensor, onde a somatização do estímulo nocivo ocorre, ou emitem axônios ao giro cingulado anterior, onde existe o componente emocional da dor (Russo e Brose, 1998).

O tálamo e o córtex são regiões finais da projeção das vias de nocicepção. O tálamo é um dos responsáveis por informar que existe sensação nociceptiva, e o córtex é responsável pela discriminação do tipo de sensação nociceptiva e por identificar, de forma pouco fiel, de onde provém.

A via mais importante de transmissão do estímulo doloroso é o trato espinotalâmico ascendente na medula espinhal, localizado na substância branca ventral ao local da estimulação (Guyton, 1997). A ativação destes neurônios resulta na resposta reflexa espinhal, assim como na ativação de tractos ascendentes, os quais transmitem informação nociceptiva às estruturas supraespinhais para completar a via nociceptiva (Guyton, 1997).

O trato espinotalâmico parece emitir axônios ao mesencéfalo e à ponte rostral fazendo sinapses em complexos nucleares, incluindo o núcleo reticular gigantocelular (NRG) e o núcleo magno da rafe (NMR) como observado na figura 2. Assim, o controle inibitório descendente da transmissão da dor também envolve neurotransmissores (tais como: opióides endógenos, serotonina, noradrenalina entre outros) que parecem inibir a excitação dos neurônios do corno dorsal da medula na presença do estímulo nocivo (Russo & Brose, 1998; Furst, 1998; Millan, 1999).

Percepção da Dor

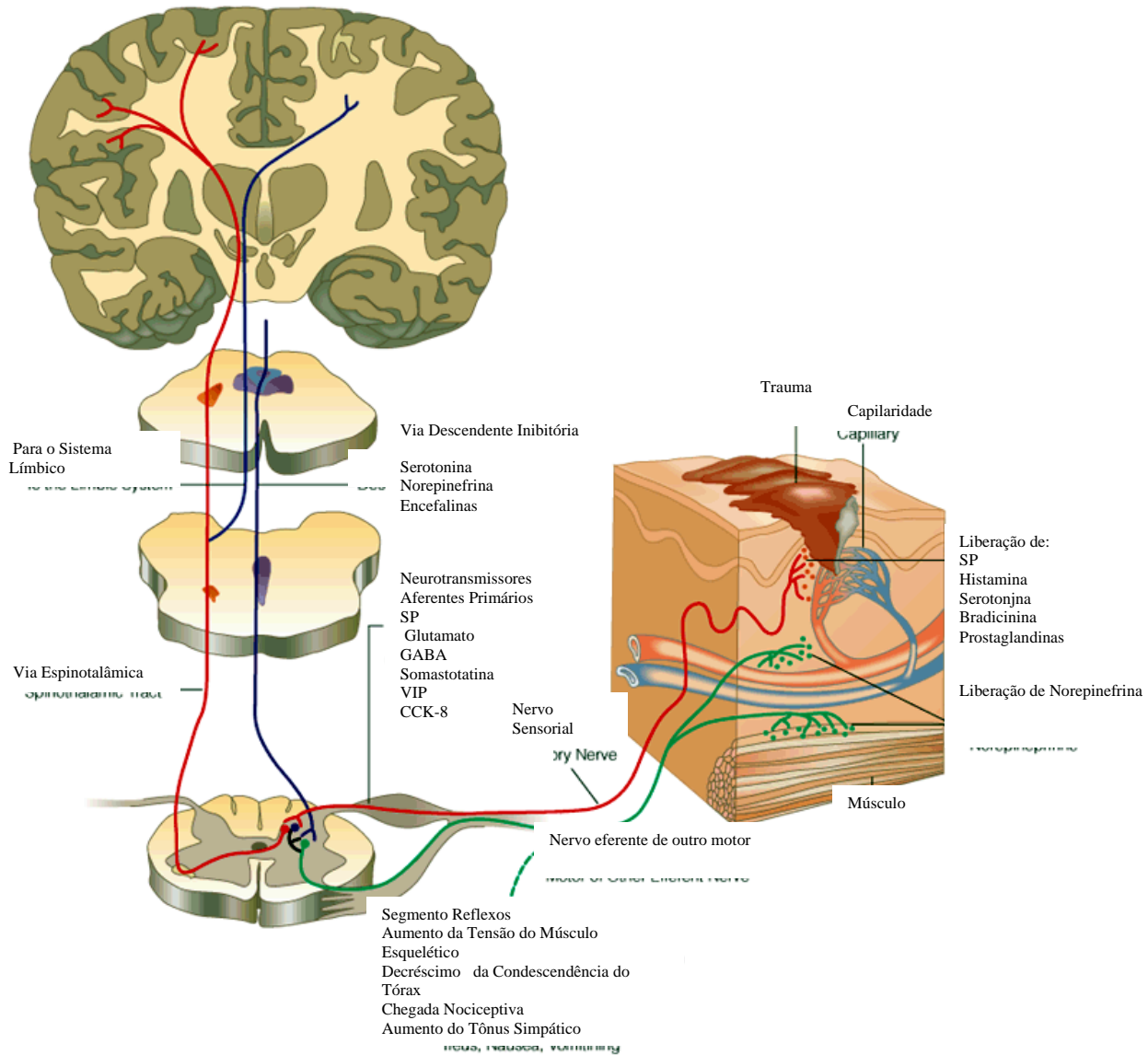


Figura 2- Mecanismo de transmissão e percepção da dor.

Fonte: <http://www.coventrypainclinic.org.uk/aboutpain-painmechanisms.htm>

1.3 Mediadores químicos na via nociceptiva

A atividade dos nociceptores é mediada pela ação de substâncias algogênicas que são liberadas e/ou sintetizadas em elevada concentração no ambiente tecidual na decorrência de processos inflamatórios (Cotran et al., 1994).

Substâncias endógenas, como ácido araquidônico, neuropeptídeos, cininas, aminoácidos excitatórios, entre outros, são produzidas e/ou liberadas pelo tecido lesionado e estimulam os receptores presentes na membrana dos neurônios. Além disso, os mediadores inflamatórios liberados facilitam a neurotransmissão e sensibilizam o nociceptor (Björkman, 1995).

Existem várias fontes importantes de mediadores químicos que participam da resposta dolorosa, entre as quais se destacam os tecidos lesionados e adjacentes, sistema vascular, células do sistema imunológico, nervos simpáticos e sensoriais, entre outros (Millan, 1999). Os mecanismos pelos quais as fibras aferentes primárias são ativadas, são apresentados na figura 3. Assim, os debris celulares resultantes de lesão tecidual são capazes de desencadear uma reação inflamatória local, atraindo eosinófilos, macrófagos e linfócitos. Essas células liberam mediadores inflamatórios como: cininas (bradicinas e calidina); produtos das células da imunidade (citocinas, como as interleucinas e o fator de necrose tumoral); aminas (serotonina, histamina); e prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina e leucotrienos).

Assim, a injúria celular e a reação inflamatória que advém de tal injúria, expõe as fibras aferentes primárias (FaPs) a um grande número de substâncias capazes de estimular nociceptor. O aferente primário transfere o impulso nociceptivo a neurônios específicos para nocicepção (EN) ou a neurônios que também transmitem outras sensações (WDR) no corno dorsal da medula (Guieu *et al.*, 1996; Millan, 1997, 1999; Calixto *et al.*, 2000, 2001).

Na figura 3 observa-se a influência de mediadores da inflamação pró-nociceptivos sobre a atividade das fibras nociceptivas polimodais C (nociceptores específicos-EN) e as fibras WDR (fibras envolvidas com outras sensações). Há uma relação facilitatória recíproca entre as FAPs (fibras aferentes primárias) e os vários

mediadores da resposta inflamatória. Podemos ver que existe retroalimentação positiva dos aminoácidos excitatórios (AAE) e a substância P (SP) nas FAPs.

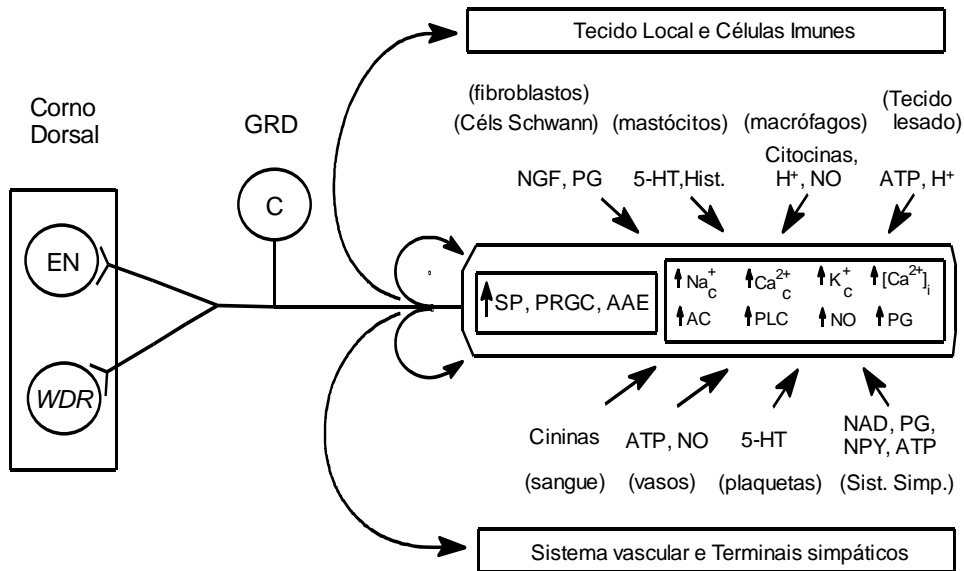


Figura 3 - Agentes algôgenicos na nocicepção. Adaptado de Millan, 1999.

1.3.1 Neurotransmissores da dor

Existem evidências do envolvimento do glutamato, aspartato e alguns peptídeos na transmissão do estímulo nociceptivo no corno dorsal da medula espinhal (Battaglia & Rustioni, 1988; Besson & Chaouch, 1987; Dray *et al.*, 1994; Headley & Grillner, 1990).

A transferência sináptica de informação, é comandada pela liberação de neurotransmissores por diferentes aferentes primários. O principal neurotransmissor que

está presente em todos os tipos de aferentes primários é o glutamato. A transmissão entre aferentes primários e os neurônios do corno dorsal da medula ocorre por meio de receptores ionotrópicos α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasole ácido propiônico (AMPA) localizados pós-sinápticamente com pequeno componente N-metil-D-aspartato (NMDA) (Yoshimura & Nishi, 1993).

Os peptídeos implicados na nocicepção consistem da família taquicinina, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (PRGC), somatostatina, polipeptídeo intestinal vasoativo, galanina, bombesina e neurotensina. Todos eles estão presentes nas fibras aferentes e são liberados depois da estimulação nociva (Dickenson, 1995).

Além de neurotransmissores, há também um número de substâncias que podem modular a transmissão sináptica, tais como: fator neurotrófico derivado do cérebro, prostaglandinas e ATP. Receptores glutamatérgicos NMDA, e metabotrópico, além do receptor purinérgico P2X estão também presentes pré-sinápticamente nos terminais de fibra C, onde eles podem atuar como autoreceptores (Kato *et al.*, 1994), modulando a liberação de neurotransmissores como a substância P (Gu & MacDermott, 1997; Liu *et al.*, 1997).

1.3.1.1 Substância P (SP)

A substância P pode mediar a sinapse entre as fibras aferentes primárias e o neurônio do corno dorsal da medula, que são importantes funcionalmente para a sensibilização da dor ou nocicepção (Li & Zhuo, 2001). Tal substância é um dos neuropeptídeos que são liberados no corno dorsal da medula durante a inflamação. A substância P não somente despolariza muitos neurônios na medula, aumentando a excitabilidade *in vitro* (Randié & Miletic, 1977, 1978), mas também pode aumentar seletivamente o efluxo de glutamato nas fatias da medula espinhal (Kangrga *et al.*, 1990; Kangrga & Randié, 1990).

A SP é um peptídeo pertencente à família das taquicininas, sendo um neurotransmissor envolvido na transmissão nociceptiva de aferentes de fibras C (Dickenson, 1995). A infusão intratecal de SP produz em animais o comportamento

de lamber, coçar e morder, indicando nocicepção, sugerindo portanto, que possua um papel estimulatório importante na via nociceptiva (Björkman, 1995).

1.3.1.2 Glutamato

O glutamato é um aminoácido excitatório, podendo ser encontrado consideráveis quantias dele na medula espinhal, originado de fibras aferentes primárias mielinizadas e não-mielinizadas, em adição a interneurônios intrínsecos e projeção de neurônios (Battaglia & Rustioni, 1988; Besson & Chaouch, 1987; Headley & Grillner, 1990). O glutamato e neuropeptídeos são liberados junto de terminais aferentes primários e têm ações fisiológicas distintas nos neurônios pós-sinápticos, atuando juntos coordenadamente para regular as propriedades desses neurônios. Neuropeptídeos, incluindo SP, aparece para prolongar as ações do glutamato (Kandel *et al.*, 2000).

As ações de aminoácidos excitatórios são mediadas principalmente por receptores ionotrópicos NMDA e não-NMDA. Os receptores não-NMDA consistem de dois receptores, AMPA e cainato (Dickenson, 1995). A transmissão de fibras C, depois de estímulos agudos mecânicos ou térmicos, parece envolver somente o receptor AMPA para produzir excitações curtas e constantes. Os estímulos são mantidos e/ou sua frequência é aumentada pela liberação de transmissores que contribuem para a transmissão nociceptiva quando o receptor NMDA é ativado, aumentando resposta de hiperalgesia (Dickenson, 1995). Warncke e colaboradores (1997a e b) mostraram que a administração local do bloqueador do receptor NMDA, quetamina, inibe a hiperalgesia primária e a secundária na pele, sugerindo que os receptores NMDA periféricos podem participar nos processos nociceptivos em humanos. Uma ação excitatória direta, do tipo retroalimentação positiva, do glutamato nas fibras aferentes primárias, seria consistente com a evidência que a ativação dos receptores NMDA causa a liberação de substância P por seus terminais centrais (Liu *et al.*, 1994, 1997). Essa ação do NMDA pode ser mediada pelo óxido nítrico (NO) dos terminais das fibras aferentes primárias (Sorkin, 1993), e o NO poderia também interferir nas ações periféricas mediadas pelas FAPs (Jackson *et al.*, 1995; Lawand *et al.*, 1997a).

O glutamato induz a liberação de SP das FAPs de terminais simpáticos, de tal forma que este peptídeo também pode estar envolvido na nocicepção induzida por glutamato. Da mesma forma que o glutamato, a SP pode ativar as FAPs em vários tecidos (Inoue *et al.*, 1995; Hu & Li, 1996; Carlton *et al.*, 1996; Heppelmann & Pawlak, 1997) e, conseqüentemente, causar dor (Edvinsson *et al.*, 1997; Weinreich *et al.*, 1997).

1.3.1.3 Prostaglandinas (PGs)

O ácido araquidônico é o maior precursor de PGs em mamíferos, formado de células de fosfolípidios de membrana pela ação de fosfolipases (Campbell e Halushka, 1996). Essas enzimas são ativadas por uma variedade de mediadores intra e extracelulares (Axelrod *et al.*, 1988). O ácido araquidônico é então transformado em PGs pela ação de uma enzima chamada cicloxigenase (COX). Existem, pelo menos, duas isoformas dessa enzima, denominadas constitutiva (COX-1) e induzível (COX-2) (Vanegas Schaible, 2001).

Embora todas as células possam sintetizar as PGs, em condições de inflamação tecidual e lesão nervosa, a maior parte das PGs é sintetizada pelas células do sistema imunológico e pelos terminais nervosos simpáticos que expressam a isoenzima COX-2 em maior abundância (Levine *et al.*, 1986; Taiwo & Levine, 1988).

As principais PGs envolvidas no fenômeno de hiperalgesia, PGE2 e PGI2 (prostaciclina) podem retrogradamente, aumentar a atividade da COX-2 pela ativação de receptores EP e IP, respectivamente (Appleton, 1997; Bakle & Botting, 1996; Boie *et al.*, 1997; Coleman *et al.*, 1994; Khasar *et al.*, 1995; Matsumura *et al.*, 1995; Schaible & Grubb, 1993).

1.4 Controle inibitório da dor

Vias descendentes do encéfalo exercem efeito inibitório na transmissão nociceptiva na coluna dorsal. A transmissão está sujeita a várias influências modulatórias. Vários estudos têm mostrado que múltiplas áreas dentro do encéfalo contribuem para o sistema de inibição descendente. A morfina e seus derivados podem ativar sistemas de inibição descendente, de maneira similar as encefalinas endógenas (Fries, 1995).

Admite-se que, além dos sistemas de transporte e de reconhecimento de potenciais nociceptivos, existem sistemas fisiológicos para sua modulação. Supõe-se que existam duas formas de modulação da sensibilidade nociceptiva: uma delas atua na entrada dos impulsos nociceptivos do SNC (Cao *et al.*, 1998); e a outra modula a sensibilidade nociceptiva após a chegada do impulso nos centros encefálicos, utilizando vias inibitórias descendentes (Mason, 1999). A inibição dos impulsos nociceptivos, já na sua recepção na medula, foi proposta por Melzack e Wall em 1965 e foi chamada Teoria do Portão (Figura 4). Esse portão, quando aberto, permitiria a entrada dos impulsos nociceptivos e, quando fechado, bloquearia ou limitaria a entrada deles. A forma de realizar essa seleção envolveria as fibras grossas da sensibilidade somática. A estimulação de fibras mielínicas grossas tipo A β , principalmente, que respondem a menor limiar de estímulo do que as fibras C e A δ , excitam interneurônios inibitórios situados nas lâminas superficiais da medula (lâmina II ou substância gelatinosa, principalmente) que, via secreção de encefalinas (leu- e met-encefalina) inibem pré-sinápticamente a transmissão do impulso pelos neurônios de segunda ordem das vias nociceptivas, levando à hipoalgesia ou analgesia. Isso explica como manobras simples, como esfregar a pele perto da área dolorosa, são eficazes no alívio da sensação dolorosa. A ativação das fibras nervosas tipo C e A δ abriria o portão por inibição dos interneurônios inibitórios, permitindo a ativação das vias de dor pelos aferentes primários (Melzack & Wall, 1983).

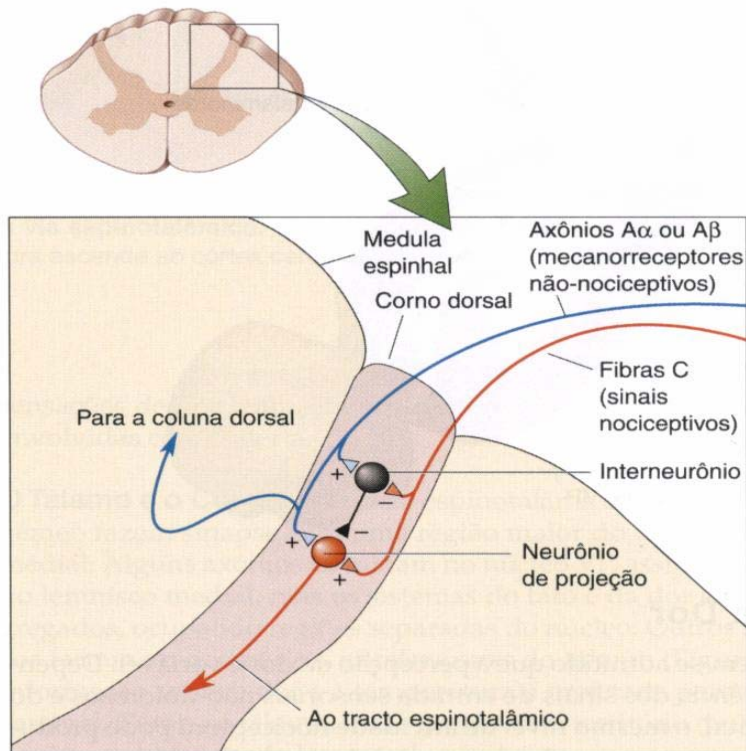


Figura 4 - Teoria do Portão para a modulação ascendente da nocicepção.

Reproduzido de Bear, 2002.

Além dessa modulação ascendente, existe uma modulação descendente da nocicepção. Sabe-se de muitos casos em que a pessoa é sujeita a ferimentos dolorosos mas que, aparentemente, não sentem dor. Várias regiões do encéfalo têm sido responsabilizadas por essa antinocicepção, entre elas a substância cinzenta periaquedutal (PAG), a substância cinzenta periventricular do hipotálamo e áreas que circundam o aqueduto de Sylvius, adjacentes ao terceiro e quarto ventrículos (Mason, 1999; Rainville, 2002; Tracey *et al.*, 2002).

A PAG recebe aferências de várias partes do encéfalo, muitas delas relacionadas com o estado emocional, e a sua estimulação elétrica provoca

analgesia profunda. Portanto, a estimulação da PAG está intimamente relacionada com antinocicepção e, inclusive, este tem sido proposto como um mecanismo de ação de alguns agentes analgésicos, como a dipirona (Carlsson & Jurna, 1987). Segundo Fürst, (1998) os neurônios do núcleo periventricular e da PAG enviam axônios descendentes para várias regiões, especialmente para os núcleos da rafe e para o núcleo paragigantocelular (localizado no bulbo) (Glazer *et al.*, 1981). Esses núcleos enviam axônios descendentes para a medula dorsal. Esses neurônios descendentes utilizam a serotonina (Eide & Hole, 1991; Liu *et al.*, 2002) e a noradrenalina como neurotransmissores (Kuraishi *et al.*, 1985; Bourgoin *et al.*, 1993).

1.4.1 Neuromoduladores

1.4.1.1 Serotonina (5-HT) e Noradrenalina (NE)

A serotonina e a noradrenalina deprimem a atividade dos neurônios nociceptivos. Assim, os sinais dolorosos podem ser suprimidos antes de chegar no cérebro.

A estimulação elétrica do Núcleo Magno da Rafe (NMR) aumenta a síntese de serotonina e facilita a antinocicepção no corno dorsal da medula espinhal (Fürst, 1998). Desse modo, a ativação dos receptores serotoninérgicos inibe a resposta ao estímulo nociceptivo nos neurônios do corno dorsal da medula (Mayer *et al.*, 1971).

A injeção intratecal de norepinefrina inibe o comportamento nociceptivo produzido pela administração intratecal de substância P, indicando que a modulação pós-sináptica contribui para a ação antinociceptiva de drogas α -adrenérgicas (Natalini, 2000). Assim, os agonistas noradrenérgicos são conhecidos por inibir a liberação de substância P *in vitro* e *in vivo*. Essa inibição é revertida pelos antagonistas α_2 adrenérgicos, como fentolamina e ioimbina (Fisher *et al.*, 1991).

A manipulação que aumenta a síntese de serotonina facilita a antinocicepção. A serotonina pode modular a transmissão nociceptiva tonicamente em relação ao estado comportamental e social. Sabe-se que níveis tônicos de serotonina podem

atenuar o aumento de atividade de sinapses glutamatérgicas no corno dorsal (Zhuo, 1998).

Vários estudos mostraram uma importante interação dos sistemas noradrenérgicos e serotoninérgicos na modulação da nocicepção na medula espinhal (Yakash 1995).

Estudos em animais e humanos mostraram que a clonidina, agonista α_2 adrenérgico, não somente produz analgesia *per se*, como potencializa analgesia produzida por opióides (Flack *et al.*, 1993).

Neurônios noradrenérgicos e serotoninérgicos descendem através de funículos lateral dorsal do cérebro para o corno dorsal da medula espinhal e contribuem significativamente para a modulação da dor, continuando um mecanismo que controla impulso na transmissão na coluna dorsal (via caminho inibitório descendente). A estimulação elétrica de lugares do cérebro como a PAG ou NMR produz analgesia via liberação local espinhal de serotonina e noradrenalina endógena. Esse fenômeno produz analgesia, a qual é revertida por antagonistas noradrenérgicos e de receptores 5-HT (fentolamina ou metisergida).

1.4.1.2 Opióides Endógenos

O sistema descendente inibitório estimula neurônios medulares a secretar opióides endógenos, que causariam a inibição pré-sináptica e pós-sináptica das fibras C e A δ (Besson, 1999). Portanto, o mecanismo pelo qual provocam essa analgesia descendente envolve a liberação de opióides na medula espinhal. Provavelmente, o mecanismo que produz essa analgesia é através do bloqueio de canais de Ca²⁺. Como o aumento dos íons Ca²⁺ intracelulares é o mecanismo de ação do neurotransmissor glutamato, o bloqueio de Ca²⁺ resultaria em inibição pré-sináptica (Kuraishi *et al.*, 1985). É provável que esse mesmo sistema de analgesia possa bloquear os impulsos em nível de núcleos reticulares do tronco encefálico e nos núcleos intralaminares do tálamo.

Os opióides endógenos foram identificados em 1975, os quais têm a mesma ação da morfina no encéfalo, sendo por isso denominados encefalinas: a leucina e a metionina encefalina, e a β - endorfina. A dinorfina foi identificada mais tarde. Todos

esses opióides endógenos recebem o nome genérico de endorfinas, pela contração dos termos morfina e endógena (Serrano *et al.*, 2002).

As três maiores classes de opióides endógenos que interagem com receptores opióides são: encefalinas, β -endorfinas e dinorfinas. As encefalinas são ativas em os receptores opióides μ e δ , e a dinorfina é um agonista seletivo dos receptores κ . A administração desses opióides produz analgesia profunda.

Há três tipos clássicos de receptores opióides: os receptores μ , δ e κ (Tyers, 1980). O receptor para a orfanina ou nociceptina é chamado receptor ORL-1 ou órfão. Agonistas opióides μ e δ inibem a liberação de SP *in vivo* o que faz supor que os opióides inibem a ação de neurotransmissores nos aferentes primários envolvidos com a transmissão da nocicepção (Fürst, 1998). O mecanismo de transdução do sinal nos receptores μ e δ está ligado às proteínas Gi, inibindo, assim, a atividade da adenilato ciclase (AC), o que resulta em diminuição do AMPc, aumento da concentração de potássio dentro da célula e assim, hiperpolarização das células. Os receptores do tipo κ também estão ligados à proteína Gi, mas o efeito da ativação desses receptores está relacionados com os canais de Ca^{2+} (Fries, 1995).

Opióides como a morfina e peptídeos opióides regulam a transmissão nociceptiva com duas ações inibitórias: uma inibição pós-sináptica, produzida parcialmente aumentando a condutância de K^+ , e inibição pré-sináptica da liberação de glutamato, substância P e outros transmissores dos terminais de neurônios sensoriais (Kandel *et al.*, 2000).

2 TRATAMENTOS ANALGÉSICOS

O arsenal farmacológico para o tratamento da dor é composto, basicamente, por dois grandes grupos de drogas analgésicas: os opióides, que abolem diretamente a transmissão nociceptiva no sistema nervoso central pela ligação em receptores opióides (Hoskin & Hanks, 1991; Zadina, 1997), e drogas

antiinflamatórias não-esteroidais (DAINES) que previnem a sensibilização de receptores periféricos e centrais da dor inibindo a cicloxigenase (Cashman, 1996).

Analgésicos opióides como a morfina, papaverina e codeína são indicadas no tratamento de dores agudas, moderadas ou intensas, que não respondem a analgésicos menos potentes. Embora os opióides sejam muito efetivos, sua utilização é limitada pelo fato dessas drogas apresentarem muitos efeitos indesejados, como: constipação, náuseas, vômitos, broncoconstrição, hipotensão, bradicardia e depressão respiratória (McQueen, 1983; Hoskin & Hanks, 1991).

As DAINES de primeira geração bloqueiam tanto a COX-1 (constitutiva) quanto a COX-2 (induzível) do endotélio e do macrófago, enquanto que as DAINES mais novos (coxibs) bloqueiam seletivamente a COX-2. Recentemente, foi descrita uma nova isoforma da cicloxigenase, a COX-3, aparentemente alvo da ação do paracetamol e da dipirona.

Trabalhos recentes demonstraram que as DAINES atuam no sistema nervoso central, inibindo a hipersensibilidade espinhal e ativando mecanismos inibitórios descendentes da nocicepção, por mecanismo dependente de prostaglandinas (COX-2 dependentes) (Oliveira, 2003).

Em virtude do mecanismo de ação comum, as DAINES têm perfil farmacodinâmico, terapêutico e toxicológico semelhantes. Todos, exceto o paracetamol, podem levar à lesão da mucosa duodenal e sangramento digestivo (os inibidores da COX-2, o fazem com menor frequência e intensidade), à lesão renal, leucopenia, confusão mental, insuficiência hepática, e prurido (Oliveira, 2003). Não só os inibidores seletivos da COX-1, mas também os inibidores seletivos da COX-2 têm causado muitos efeitos indesejáveis à saúde. Estudos realizados pela FDA, órgão responsável pela aprovação de remédios nos Estados Unidos, os quais revelam que o Vioxx[®] pode ter acarretado até 140 mil casos de doenças coronarianas nos Estados Unidos desde 1999, determinaram a retirada deste e de outros antiinflamatórios do mercado.

Vários estudos farmacológicos têm sugerido que pelo menos um dos efeitos dos DAINES sobre a coluna espinhal é a inibição da síntese de prostaglandinas (Vanegas & Schaible, 2001). Existem vários trabalhos sugerindo que os DAINE's

apresentam um mecanismo analgésico central (Carlsson *et al*, 1986; Lorenzetti & Ferreira, 1985). Como exemplo podemos citar a dipirona, analgésico pirazolínico clássico, que pode exercer uma ação antinociceptiva central uma vez que a administração via intratecal (i.t) de dipirona diminui o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético (Akman, 1996).

2.1 Derivados Pirazolínicos

Dentre os DAINES encontramos os derivados pirazolínicos, os quais são drogas de origem sintética que possuem em sua estrutura um anel pirazolínico que é constituído de um heterociclo com três átomos de carbono e dois átomos de nitrogênio (figura 5) (Korolkovas, 1998). As propriedades antiinflamatórias dos pirazolínicos estão associadas com a presença de carbonilas na posição 3 e/ ou 5 do anel pirazol (Borne , 1995). Quando as carbonilas não estão presentes, estes compostos possuem pouca ação antiinflamatória, mas possuem um grande efeito antinociceptivo (Kuo *et al*, 1984; Beirith *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 2001).

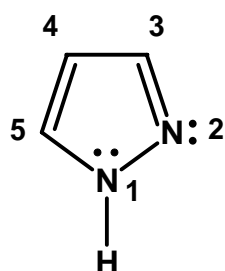


Figura 5 - Anel pirazolínico

A descoberta dos derivados pirazolínicos, data de aproximadamente 1884, quando o químico alemão Ludwig Knorr tentava sintetizar derivados quinolínicos e

obteve acidentalmente a antipirina, que é um analgésico com atividade antipirética e antireumática, mas muito tóxico (BORNE, 1995).

Mais tarde foi sintetizado um derivado 3-metilamino da antipirina, a aminopirina, um análogo mais potente que foi amplamente utilizado como analgésico e antipirético nos Estados Unidos e Europa, até que fossem relatados casos de agranulocitose fatal associado ao uso desse composto (Borne, 1995). Em consequência desse efeito indejável, o interesse pelos pirazolínicos diminuiu, até o aparecimento (na década de 1940) de uma série de derivados pirazolínicos (como a fenilbutazona) mais seguros, com boa atividade antiinflamatória. Esses compostos, ainda se mostraram tóxicos, o que levou à sua retirada do mercado.

Em 1921, o laboratório Hoechst obteve a dipirona, um outro derivado pirazolínico, pela substituição de uma das metilas do grupo amino da 5-pirazolona por metileno-sulfoxilato de sódio. Estudos em animais e humanos revelaram que a dipirona é um antipirético potente, tem boa atividade analgésica e fraca atividade antiinflamatória (Lecannelier, 1976). Esse produto foi introduzido no comércio com o nome de Novalgina[®], sendo também denominado genericamente de metamizol (Mardones, 1976). A dipirona ganhou popularidade nos países em desenvolvimento e em alguns países da Europa, especialmente devido ao seu baixo custo e alta eficácia (Arellano & Sacristan, 1990). Porém, o uso clínico da dipirona foi proibido nos Estados Unidos, onde seu uso foi relacionado a casos de agranulocitose (Insel, 1996). Entretanto, estudos mostram que a incidência de agranulocitose em usuários de dipirona é muito baixa (3-19 casos por milhão), cerca de duas vezes maior que a incidência na população em geral (The international agranulocytosis and aplastic anemia study, 1986; Laporte & Carné, 1987). Além disso, outros analgésicos que gozam de popularidade no meio médico e acadêmico, como paracetamol e ácido acetilsalicílico (AAS), também causam efeitos indesejados graves, como necrose hepática (Rumack *et al.*, 1982; Dickenson, 1997) e Síndrome de Reye (Benedetti & Butler, 1990), em uma proporção muito maior do que a dipirona está associada a agranulocitose.

Apesar de existir, ainda, muita controvérsia em relação à segurança do uso clínico da dipirona, esse é um derivado pirazolínico muito utilizado no tratamento

farmacológico da dor. Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de elucidar completamente o mecanismo de ação da dipirona.

A seguir serão mostrados os mecanismos de ação descritos para os pirazolínicos, principalmente dipirona, que é o composto mais estudado dessa classe de drogas.

2.1.1 Mecanismo de ação dos derivados pirazolínicos

Embora seja bem conhecido que a dipirona inibe a atividade da COX-2 (Campos *et al.*, 1999), evidências da literatura sugerem que esta pirazolona e, provavelmente, outros derivados pirazolínicos exercem seu efeito antinociceptivo por mecanismos diversos, centrais e periféricos.

Estudos têm demonstrado que a administração de DAINES pirazolínicas no sistema nervoso central (particularmente na medula espinhal), produz antinocicepção (Yaksh & Hammond, 1982; Taiwo & Levine, 1988; Björkman, 1995; Tortorici *et al.*, 1996; Ochi & Goto, 2001; Hernandez & Vanegas, 2001). Em 1986, Carlsson *et al.*, na tentativa de demonstrar que o mecanismo de ação da dipirona poderia envolver o SNC, mostraram que a administração de dipirona intratecal, intraperitoneal ou diretamente na PAG diminui a excitabilidade das fibras C, e prolonga a latência para a retirada da cauda de um estímulo térmico aversivo. Estes autores demonstraram, no mesmo estudo, que a dipirona, administrada endovenosamente, aumenta a atividade dos neurônios da PAG. Mais tarde, Carlsson & Jurna (1987) verificaram que o aumento da latência de retirada da cauda de um banho térmico, provocado pela dipirona é reduzido pela administração de procaína na PAG, sugerindo que o efeito da dipirona envolve a ativação de vias inibitórias descendentes. Posteriormente, foi demonstrado que a dipirona (e.v.) aumenta a atividade de neurônios da PAG e altera a excitabilidade das células *on-off* da medula ventro medial rostral (Tortorici & Vanegas, 1994), constituindo evidência experimental adicional de que a dipirona ativa as vias descendentes inibitórias.

Outro importante mecanismo sugerido para a antinocicepção provocada pela dipirona é a via L-arginina-óxido nítrico-GMP, já que o N^G-monometil-L-arginina (L-NAME), inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS), e o azul de metileno, inibidor

da guanilato ciclase, previnem o efeito antinociceptivo da dipirona (Duarte *et al.*, 1992). Em 1999, Aguirre-Bañuelos & Granados-Soto verificaram que a dipirona potencializa o efeito da morfina. Essa potencialização foi antagonizada pela naloxona e por inibidores da NOS, sugerindo a participação da via do NO-GMP_c na ação conjunta das duas drogas.

Apesar desses estudos citados, e de inúmeros outros, o mecanismo de ação da dipirona ainda não está totalmente elucidado. As evidências sobre o mecanismo pelo qual a dipirona produz analgesia resumem-se, até o presente momento, em:

- Diminuição da estimulação das fibras C e A δ (Neugebauer *et al.*, 1994; Beirith *et al.*, 1998).
- Inibição da síntese de prostaglandinas no sistema nervoso central e periférico por inibição da COX (Lorenzetti & Ferreira, 1996; Campos *et al.*, 1998; Campos *et al.*, 1999).
- Estimulação da via óxido nítrico-GMPc (Duarte *et al.*, 1992; Aguirre-Bañuelos & Granados Soto, 1999).
- Aumento da liberação de endorfinas (Akman *et al.*, 1996; Tortorici *et al.*, 1996; Vasquez & Vanegas, 2000).
- Inibição de respostas em áreas do encéfalo, como o NMR (Jones, 1996) e a PAG (Carlsson & Jurna, 1987; Tortorici & Vanegas, 1994; Tortorici *et al.*, 1996; Vasquez & Vanegas, 2000; Hernandez & Vanegas, 2001).

Desde o surgimento da dipirona, muitos outros compostos, contendo o anel pirazol, têm sido estudados. Dentre os demais pirazolínicos relatados na literatura, destacamos o 3-(difluormetil)-1-(4-metoxifenil)-5-[4-(metilsulfinil)fenil] pirazol (FR140423), já que esse composto possui estrutura química bastante similar a dos compostos que foram estudados em nosso laboratório.

O FR140423, sintetizado em 1997 por um grupo de pesquisadores japoneses, é um derivado pirazolínico descoberto durante a triagem de novos compostos com potencial antiinflamatório (Tsuji *et al.*, 1997). Esse composto apresenta ação antinociceptiva e antiinflamatória, inibindo seletivamente a COX-2 (Ochi *et al.*, 1999a). Além disso, o FR140423 tem efeito antinociceptivo em um modelo de dor induzida por estímulo térmico ("tail-flick"), um teste geralmente usado para avaliar a

ação de drogas que agem no SNC, e esse efeito é antagonizado por naloxona, um antagonista do receptor opióide (Ochi *et al.*, 1999b). Os autores consideram que o FR140423 é uma droga que tem ação por dois mecanismos distintos, ou seja, inibição da COX-2 em tecidos inflamados e interação com o sistema opióide (Ochi *et al.*, 1999c).

A administração por via oral ou intratecal, mas não intracerebroventricular, do FR140423 também induz antinocicepção em um modelo de dor provocada por estímulo mecânico (“tail-pinch”), sendo essa ação mediada por receptores opióides do subtipo δ , mas não pelos receptores μ e κ . O fato de a administração i.t., mas não i.c.v., de FR140423 causar antinocicepção indica que o sítio de ação desse composto é espinhal e não supra-espinhal (Ochi *et al.*, 1999b). Em estudos de ligação, realizados com membranas preparadas a partir da medula espinhal de camundongos, o FR140423 inibiu muito pouco a ligação de [3 H] DPDPE ao receptor opióide do subtipo δ , indicando que o FR140423 não se liga com grande especificidade a esse receptor. Sendo assim, é provável que o efeito antinociceptivo do FR140423 não resulte de sua interação direta com os receptores δ -opióides, mas de mecanismos indiretos. (Ochi *et al.*, 1999b). A ação desse composto envolve, além do sistema opióide, os sistemas noradrenérgico e serotoninérgico descendentes, uma vez que o efeito antinociceptivo do FR140423, injetado intratecalmente, é antagonizado pela fentolamina (antagonista adrenérgico) e pela metisergida (antagonista serotoninérgico) (Takehiro & Goto, 2000a, 2000b). A ação antinociceptiva do FR140423 é revertida pela administração intratecal, mas não intracerebroventricular, de um antagonista do receptor para kiotorfina, sugerindo o envolvimento desses receptores, a nível espinhal, na antinocicepção causada pelo FR140423 (Takehiro *et al.*, 2000).

Tendo em vista o bom perfil analgésico e antipirético da dipirona, muitos pesquisadores têm investido na síntese e avaliação da atividade biológica de novos derivados pirazolínicos, que aliem boa ação farmacológica e baixo índice de efeitos indesejáveis (Goel & Madan, 1995; Bonacorso *et al.*, 1999).

Desde que dor e febre são os sintomas mais comuns na prática clínica e um arsenal de efetivos analgésicos e antipiréticos são relativamente pequenos, nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo um trabalho em conjunto com o Núcleo de Química de Heterocíclicos (NUQUINHE) da UFSM, investigando os efeitos

antinociceptivos e o potencial antipirético de novos derivados pirazolínicos (Souza *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2002; Godoy *et al.*, 2004; Tabarelli *et al.*, 2004). Nós temos descrito que o derivado pirazol, 3-methyl-5-hydroxy-5-triclorometil-1*H*-1-pirazolcarboxiamida, induz antinocicepção nas fases neurogênica e inflamatória no teste da formalina, e que tal efeito não envolve o sistema opióide (Souza *et al.*, 2001). O composto pirazolínico e seus derivados 3-fenil substituídos também causaram antinocicepção no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos, e está envolvido a ativação de receptores espinhais α_2 -adrenérgicos e serotoninérgicos (Godoy *et al.*, 2004). Outros derivados pirazóis: 3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1-metil-1*H*-pirazol (Pz 2) e 3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1-fenil-1*H*-pirazol (Pz 3) causam antinocicepção, em testes térmicos em camundongos. Interessantemente, naloxona preveniu a antinocicepção causada por Pz 3- mas não a antinocicepção induzida por Pz 2 sugerindo o mecanismo opióide no efeito antinociceptivo do Pz 3 (Tabarelli *et al.*, 2004).

Recentemente o nosso grupo estudou a ação antinociceptiva do derivado pirazolínico 2-[5-triclorometil-5-hidróxi-3-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-il]-4-(4-bromofenil)-5-metiltiazol (B50) administrado por via sistêmica. O B50 apresenta ação antinociceptiva de maneira dose dependente (0,08; 0,23; 0,8 mmol/kg, s.c.) no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, mas, não apresenta efeito no teste da imersão da cauda em água a 55°C. O efeito antinociceptivo do B50 foi prevenido pela administração de naloxona (1 mg/kg, s.c.), um antagonista não seletivo dos receptores opióides, mas não por nor-binaltorfimina (1 e 3 mg/kg, s.c.), antagonista do receptor κ -opióide. Estes resultados sugerem que os receptores do subtipo κ -opióide não estão envolvidos no mecanismo de ação do B50, embora exista uma participação do sistema opióide (Prokopp, 2004).

Porém, até o momento, não se sabe se o B50 possui atividade antinociceptiva através de mecanismos centrais ou periféricos. Portanto, no presente estudo, testaremos o efeito do B50 administrado por via intratecal sobre a nocicepção, a fim de investigar o sítio de ação deste composto.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Investigar a ação antinociceptiva central do B50, pela administração intratecal (i.t) em camundongos, utilizando modelos de dor fásica e tônica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar o efeito da administração intratecal de B50 sobre a nocicepção, usando modelos de nocicepção química (contorções abdominais induzidas por ácido acético) e térmica (teste da placa quente).
- 2) Investigar se a administração i.t. de B50 causa sedação ou relaxamento muscular.
- 3) Avaliar o efeito da administração i.t. do B50 sobre o comportamento exploratório e a atividade locomotora .
- 4) Pesquisar o envolvimento de mecanismo opióide na possível ação antinociceptiva do B50.

III – ARTIGO

**Intrathecal administration of a novel pyrazolyl-thiazole derivative induces
delayed antinociception in mice**

A. H. de Souza¹, C.F. Mello^{1,2}, P. D. Sauzem¹, V. D. G. Sinhoin¹, G. S. Sant'Anna¹,
G. D. Dalmolin¹, M. N. Muniz³, R. V. Lourega³, H. G. Bonacorso³, N. Zanatta³, M. A.
P. Martins³,
M. A. Rubin¹

¹Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia,
Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas,

²Departamento de Fisiologia, Centro de Ciências da Saúde, ³Núcleo de Química de
Heterociclos (NUQUIMHE),

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas
Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

Excluído: ¶

Acknowledgments

This study was supported by PRONEX/MCT C.F.M., H.G.B., N.Z., M.A.P.M.,
and M.A.R. are the recipients of CNPq fellowships, grant numbers 500120/2003-0,
303636/2002-5, 301474/2003-6, 303116/2002-0 and 500096/2003-1 respectively.

Correspondence

M.A. Rubin

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade
Federal de Santa Maria, Santa Maria 97105-900 RS, Brasil

Tel.: +55-55-2208053. Fax: +55-55-220-8978.

E-mail: marubin@smail.ufsm.br

Running title: Novel pyrazolyl-thiazole derivative induced antinociception

Key words

Intrathecal; antinociception; thiazole derivative; writhing test; hot-plate test; nonsteroidal anti-inflammatory drugs.

Abstract

In this study we investigated whether the intrathecal administration of the novel pyrazolyl-thiazole derivative 2-[5-trichloromethyl-5-hydroxy-3-phenyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol-1-yl]-4-(4-bromophenyl)-5-methylthiazole (B50) caused antinociception in adult male mice, using the hot plate and acetic acid writhing assays. B50 (200 nmol/ 5 μ l, i.t.) caused antinociception 90-120 minutes after its administration. Naloxone (8.25 μ mol/ kg, s.c.) reverted the antinociceptive action of B50 (200 nmol/ 5 μ l, i.t.), in the acetic acid writhing assay, suggesting that opioid mechanisms are involved in the antinociception caused by B50. B50 had no effect on spontaneous locomotion or rotarod performance, indicating that the currently reported antinociceptive effect of B50 is not related to unspecific motor effects.

Introduction

In pain therapy, there are two main classes of analgesic drugs (1), namely opiates, which directly abolish the nociceptive transmission in the central nervous system (CNS) by binding to opioid receptors (2-3), and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), which prevent the sensitization of pain receptors in peripheral sites by inhibiting cyclooxygenase (4).

Since pain and fever are the most common complaints in clinical practice and the arsenal of effective analgesics and antipyretics is relatively small, we have been investigating the antinociceptive effects and antipyretic potential of new pyrazole derivatives (5-8). We have described that the pyrazole derivative, 3-methyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-1*H*-1-pyrazolcarboxamide, induces antinociception in the neurogenic and inflammatory phases of the formalin test, and that such an effect does not involve opioid receptors (5). This compound and its 3-phenyl substituted derivative also cause antinociception in the acetic acid writhing test in mice, which seems to involve the activation of spinal α_2 -adrenoceptors and 5-HT receptors (7), since their analgesic effects are prevented by the spinal administration of nonspecific serotonergic and α_2 -adrenoceptor antagonists. Other pyrazole derivatives investigated by our group proved to cause antinociception, such as 3-ethoxymethyl-5-ethoxycarbonyl-1*H*-1-methylpyrazole (Pz 2) and 3-ethoxymethyl-5-ethoxycarbonyl-1-phenyl-1*H*-pyrazole (Pz 3) in thermal tests in mice. Interestingly, naloxone prevented Pz 3- but not Pz 2-induced antinociception suggesting the involvement of opioid mechanisms in the antinociceptive effect of Pz 3 (8).

In the present study we extend our investigations on the antinociceptive action of pyrazole derivatives to a pyrazolyl-thiazole compound. Therefore, the antinociceptive effect of 2-[5-trichloromethyl-5-hydroxy-3-phenyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol-1-yl]-4-(4-bromophenyl)-5-methylthiazole (B50), centrally administered, and the involvement of the opioid mechanisms in such an effect were investigated in adult

male mice. The effects of this compound on spontaneous and forced locomotion (rotarod test) were also evaluated.

Material and methods

The present study was conducted in accordance with the ethical guidelines established for investigations of experimental pain in conscious animals (9) and it was carried out under licenses issued by Ethics Committee for the Use of Animals in Research of the Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

Animals

Three month-old male albino Swiss mice (30-40 g) bred in our animal house were used. The animals were housed in groups of 20 to a cage at controlled temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) with a 12-h light/ dark cycle and with standard lab chow and tap water ad libitum. Each animal was used only once. The experiments were approved by the Committee on the Use and Care of Laboratory Animals of our University.

Drugs

Naloxone, morphine sulfate, and Tween 80 were purchased from Sigma (St. Louis, MO). The 2-[5-trichloromethyl-5-hydroxy-3-phenyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol-1-yl]-4-(4-bromophenyl)-5-methylthiazole (B50, Figure 1), was synthesized as reported elsewhere (10) and was suspended in 2.5% Tween 80 in 0.9% sodium chloride (vehicle). All other reagents were of analytical grade and were purchased from local suppliers.

Intrathecal administration of B50

I.t. injections were made in anaesthetized mice at the L5, L6 intervertebral space as described by Hylden and Wilcox (11). Briefly, a volume of 5 microL was administered i.t. with a 28-gauge needle connected to a 10-microL Hamilton micro syringe, while the animal was lightly restrained to maintain the position of the needle. Puncture of the dura was indicated behaviourally by a slight flick of the tail.

Writhing test

Animals were injected with 5 microL (i.t.) of vehicle, morphine (6.5 nmol/ 5 microL) or B50 (200 nmol/ 5 microL) 0, 30, 60, 120 or 240 minutes before of acetic acid injection (0.8% in distilled water - 10 ml/kg body weight, i.p.) (12), and 5 min later were transferred to an open field (28x18x12 cm) with a floor divided into 15 equal areas. The number of writhes was counted over a period of 10 min by an observer who was not aware of the animals' treatment. In order to determine a dose-response curve, the animals were injected with 5 microL (i.t.) of vehicle or B50 (100, 200 or 400 nmol/ 5 microL) 120 minutes before of acetic acid and were observed as described above. In those experiments designed to evaluate the participation of spinal opioid mechanisms in the antinociceptive effect of this pyrazoline, the animals were injected with vehicle or B50 (200 nmol/ 5 microL, i.t.) (pretreatment) 90 min before saline or naloxone (8.25 microL/ kg, s.c.). Thirty minutes thereafter the animals were injected with acetic acid and were observed as described above.

Rotarod

Twenty-four hours before the experiments, all animals were trained in the rotarod (3.7 cm in diameter, 8 rpm) until they could remain in the apparatus for 60 s without falling. On the day of the experiment, the animals were injected with 5 microL (i.t.) of vehicle or B50 (200 nmol/ 5 microL, i.t.) and subjected to the rotarod 120 minutes thereafter. The latency to fall from the apparatus was recorded with a stopwatch up to 240 s (13).

Hot-plate test

In the hot-plate test, an animal was placed on a metal plate maintained at $50 \pm 0.1^\circ\text{C}$. The latency to show nociceptive responses, such as hindpaw licking or jumping, was measured according to the method described by Hunskaar et al. (14), and expressed as the hot-plate latency. To minimize tissue damage, a cut-off time of 90 sec was established. Animals were administered with 5 microL (i.t.) vehicle, B50 (200 nmol/ 5 microL) or morphine (6.5 nmol/ 5 microL), 90, 120 or 150 minutes before the hot-plate test.

Open field

Immediately after the 90 minutes hot plate test measure, the mice were transferred to an open field (28x18x12 cm) with a floor divided into 15 equal areas. The number of rearing responses and areas crossed with the four paws was counted over a period of 5 minutes by an observer who was not aware of the animals' treatment.

Statistical analysis

The number of writhes and ambulation scores were analyzed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student-Newman-Keuls test. Data from the experiment that aimed to evaluate the role of spinal opiate receptors in B50-induced antinociception were analyzed by a two-way ANOVA, followed by the Student-Newman-Keuls test. Hot-plate test data were analyzed by a two-way ANOVA, followed by the Student-Newman-Keuls test. All data were expressed as mean \pm S.E.M. The level of significance was set as $P < 0.05$ and F values are presented in the text only when $P < 0.05$.

Results

Figure 2 shows the effect of morphine (6.5 nmol, i.t.) or B50 (200 nmol, i.t.) on the number of writhes induced by acetic acid 0, 30, 60, 120 and 240 min after administration of B50 or morphine. Statistical analysis (one-way ANOVA followed by SNK test) revealed that B50 (120 min after its administration) and morphine (0-60 min after its administration) decreased the number of abdominal writhes [$F(2,24) = 8.6$; $P < 0.05$].

Figure 3 shows the effect of increasing doses of B50 (100; 200; 400 nmol/ 5 microL, i.t.) on the number of writhes induced by acetic acid. Statistical analysis revealed a significant effect of treatment [$F(3,42) = 7.1$; $P < 0.05$]. *Post hoc* comparison showed that only the dose of 200 nmol of B50 decreased the number of writhes, as compared to the vehicle-treated group. This dose of B50 did not alter rotarod performance or exploratory activity in an open field, suggesting that B50 does not cause motor impairment, which might be misinterpreted as antinociception (Table 1).

Figure 4 shows the effect of naloxone (8.25 micromol/kg, s.c.), a nonselective opioid antagonist, on the antinociception induced by B50 (200 nmol, i.t.) in the acetic acid writhing test. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a significant pretreatment (vehicle or B50) by treatment (saline or naloxone) interaction [$F(1,45) = 7.2$; $P < 0.05$], indicating that naloxone reverted B50-induced antinociception.

Figure 5 shows the effect of morphine (6.5 nmol, i.t.) or B50 (200 nmol, i.t.) on paw withdrawal or licking latencies in the hot plate test. Statistical analysis (two-way ANOVA, followed by SNK test) revealed that B50 (90 min after its administration) significantly prolonged hot plate latencies, compared to the vehicle-treated group [$F(4,88) = 2.54$ $P < 0.05$].

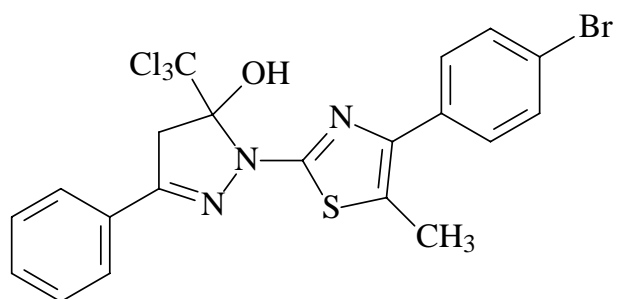


Figure 1. Chemical structure of 2-[5-trichloromethyl-5-hydroxy-3-phenyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol-1-yl]-4-(4-bromophenyl)-5-methylthiazole (B50).

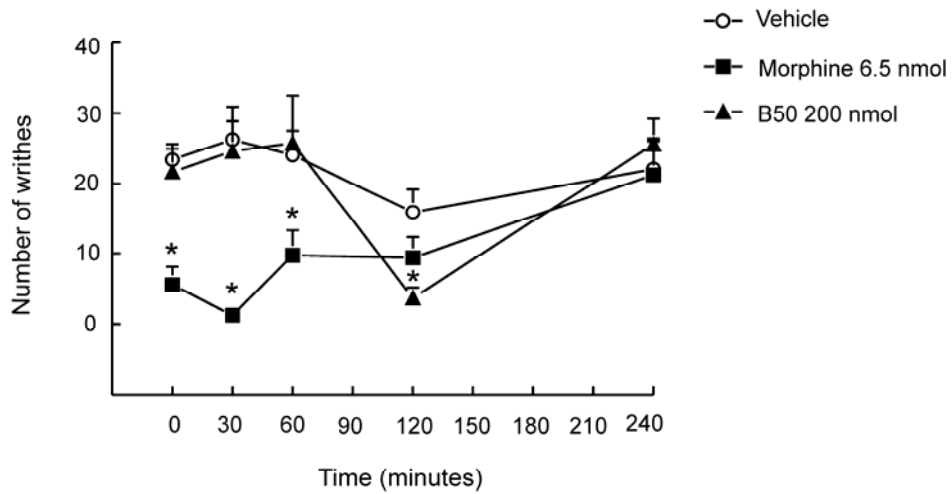


Figure 2. Effect of morphine (6.5 nmol/5 μ l, i.t.) or B50 (200 nmol/5 μ l, i.t.) on the number of writhes induced by acetic acid at 0, 30, 60, 120 and 240 min after treatment with B50 or morphine. Data are reported as mean \pm S.E.M., n=8-15 per group. * P <0.05 compared with vehicle (2.5% Tween 80 in 0,9% sodium chloride).

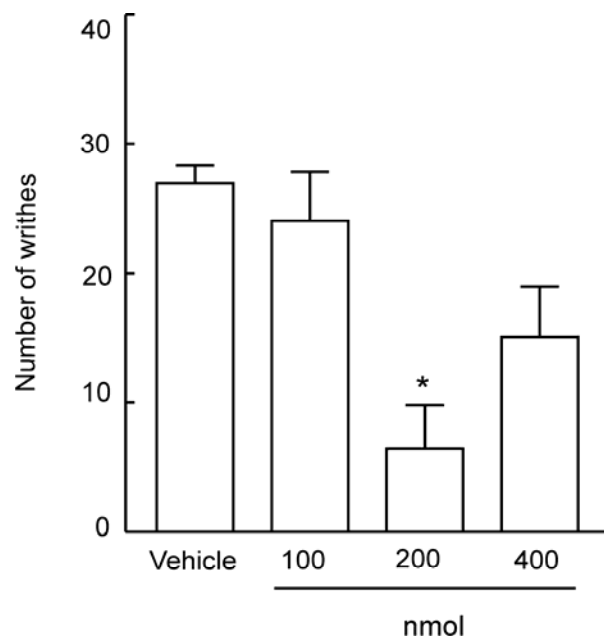


Figure 3. Effect of B50 (100, 200 or 400 nmol/5µl, i.t.) on the number of writhes induced by acetic acid at 120 min after treatment with B50. Data are reported as mean ± S.E.M., n = 10-12 per group. * $P < 0.05$ compared with vehicle (2.5% Tween 80 in 0,9% sodium chloride).

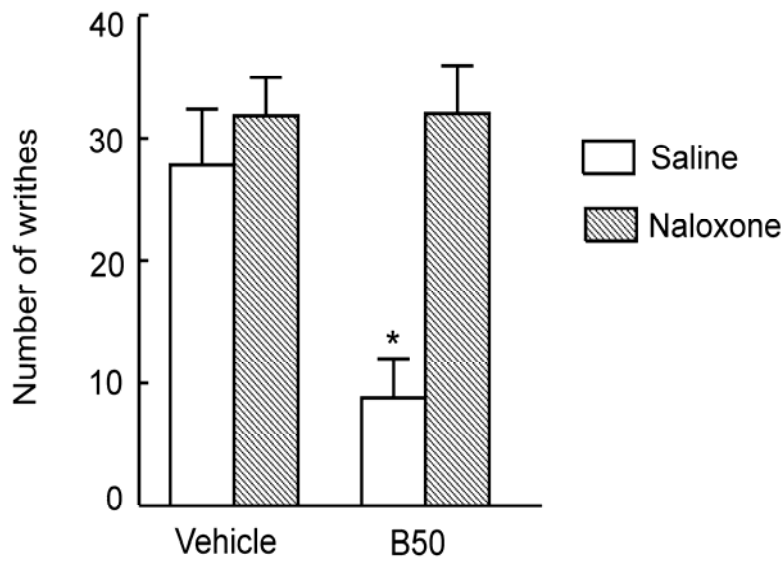


Figure 4. Effect of naloxone (8.25 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) on the antinociception induced by B50 (200 nmol/5 μl , i.t.). Data are reported as mean \pm S.E.M., n =10-14 per group. * $P < 0.05$ compared with vehicle (2.5% Tween 80 in 0,9% sodium chloride).

Table 1 – Effect of B50 (200 nmol/5 μ l, i.t.) and morphine (6.5 nmol/5 μ l, i.t.) on the latency for the first fall and number of falls in the rotarod and on the crossing and rearing in the open-field.

	Vehicle	B50	Morphine
Latency for the			
first fall	79.74 \pm 22.15	102.27 \pm 27.34	-----
Number of falls	1.12 \pm 0.31	1.74 \pm 0.46	-----
Crossing	58.28 \pm 4.50	59.86 \pm 7.11	68.56 \pm 4.11
Rearing	17.86 \pm 2.50	19.06 \pm 2.69	18.00 \pm 2.23

Table1. Data are expressed as mean \pm SEM for n=10-14 animals in each group. Vehicle (2,5% Tween 80 plus saline/5 μ l i.t.), B50 (200nmol/5 μ l) and morphine(6.5 nmol/i.t.).

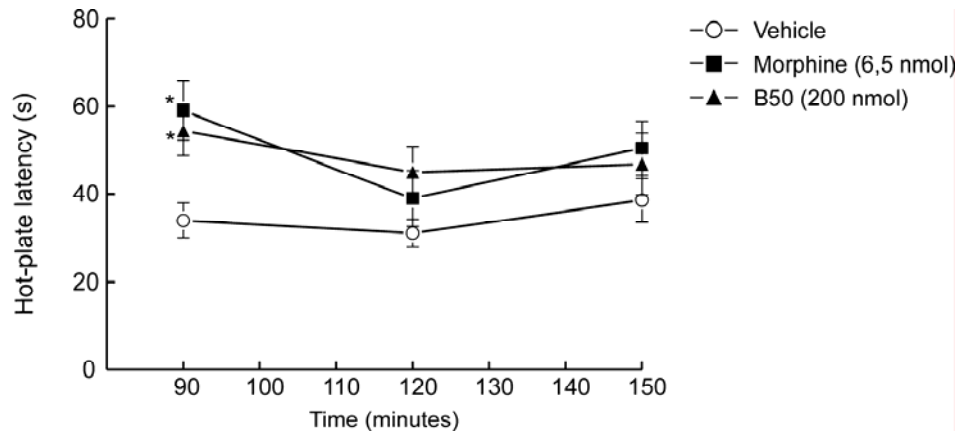


Figure 5. Effects of morphine (6,5 nmol/5 μ l, i.t.), or B50 (200 nmol/5 μ l, i.t.) on the latencies to hind paw lick or jumping in the constant temperature ($50 \pm 0.1^\circ\text{C}$). Data are reported as mean \pm S.E.M., $n = 14-16$ per group. $*P < 0.05$ compared with vehicle (2.5% Tween 80 in 0,9% sodium chloride).

Discussion

In the current study we show that the pyrazole-thiazole derivative B50, at the dose of 200 nmol (i.t.), causes antinociception in the acetic acid abdominal writhing assay and in the hot plate test, 120 and 90 minutes after its administration, respectively.

It is interesting that the dose-response curve for B50 was biphasic, with the larger dose (400 nmol) showing less response, and that the antinociceptive effect of this pyrazole derivative appeared only 90 minutes after its administration. The currently reported biphasic dose-effect curve is, to some extent, similar to those reported elsewhere (15-17). In those studies, the authors propose that drug doses larger than the effective dose might allow the interaction with other binding sites, which could counteract the antinociceptive effect caused by small doses of the compound. In this respect, are particularly remarkable the studies that have demonstrated that ultralow doses of nonselective opioid antagonists (by systemic and i.t. route) induce antinociception and augment systemic morphine analgesia (15,18,19). It has been suggested that ultra-low doses (picomolar to nanomolar) of an agonist activate a G_s -coupled mode of the opioid receptor to activate adenylate cyclase (AC) and increase neuronal excitability. These effects produce behavioral hyperalgesia, and are prevented by ultra-low doses of opioid receptor antagonists (15,18,19). On the other hand, opioids at doses within the micromolar range activate a G_i/G_o -coupled mode of the receptor to inhibit AC activity and reduce neuronal excitability, effects that produce antinociception and are reverted by higher doses of antagonists. Therefore, considering its biphasic antinociceptive effect, B50 seems to be akin to opioid antagonists or, like nalbuphine, produces agonist effects at one receptor subpopulation and antagonist effects at other (20). In fact, the finding that naloxone reverts the antinociceptive effect of B50 suggests that it activates opioid mechanisms, and agrees with this view. It is worth noting, however, that specific studies are necessary to elucidate whether B50 interacts with opioid receptors.

An interesting finding of the present study was that the i.t. injection of B50 caused antinociception only after a 90-120 minutes lag in both antinociceptive tests. These results suggest that B50 is a prodrug, which has to be metabolized to cause antinociception.

A major concern in experiments designed to assess the antinociceptive action of novel compounds is whether pharmacological treatment causes other behavioral alterations, such as motor or coordination impairment and sedation. In the present study we showed that B50 does not alter rotarod performance or open field exploratory activity measures. Therefore, the possibility that the currently reported B50-induced antinociception is due to motor effects or sedation sounds unlikely.

In summary, in this study we described that the intrathecal injection of the novel pyrazolyl-thiazole derivative B50 causes delayed antinociception in chemically and in thermally motivated tests. B50-induced antinociception was reverted by the nonselective opioid antagonist naloxone, suggesting that opioid mechanisms are involved in such an effect.

References

1. Rang HP & Urban L (1995). New molecules in analgesia. *British Journal of Anaesthesia*, 75: 145-156.
2. Hoskin PJ & Hanks G W (1991). Opioid agonist-antagonist drugs in acute and chronic pain states. *Drugs*, 41: 326-344.
3. Zadina JE, Hackler L, Ge L & Dastin AJ (1997). A potent and selective endogenous agonist for the μ -opiate receptor. *Nature*, 386: 499-502.
4. Cashman JN (1996). The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia. *Drugs*, 52: 13-23.
5. de Souza FR, Figuera M R, Lima TTF, Bastiani J, Barcellos IB, Almeida CE, Oliveira MR de, Bonacorso HG, Flores AE & Mello CF (2001). 3-Methyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-1-H-1-pyrazolcarboxamide induces antinociception. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 68: 525-530.
6. de Souza FR, Souza VT, Ratzalaff V, Borges LP, Oliveira MR, Bonacorso HG, Zanatta N, Martins MAP & Mello CF (2002). Hypothermic and antipyretic effects of 3-methyl- and 3-phenyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-carboxamides. *European Journal of Pharmacology*, 451: 141-147.
7. Godoy MCM, Figuera MR, Souza FR, Flores AE, Rubin MA, Oliveira MR, Zanatta N, Martins MAP, Bonacorso HG & Mello CF (2004). α_2 -Adrenoceptors and 5-HT receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazolines, but not of dipyrrone. *European Journal of Pharmacology*, 496: 93-97.
8. Tabarelli Z, Rubin MA, Berlese DB et al. (2004). Antinociceptive effect of novel pyrazolines in mice. *Brazilian Journal of Medical And Biological Research*, 37: 1531-1540.
9. Zimmermann M (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16: 109-110.
10. Bonacorso HG, Muniz MN, Wastowski AD, Zanatta N & Martins MAP (2003). Efficient synthesis and dehydration reaction of trichloromethylated 2-(3-Phenyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)-4-aryl-5-alkylthiazoles. *Heteroatom Chemistry*, 14: 132-137.
11. Hylden J L K & Wilcox G L (1980). Intrathecal morphine in mice: a new technique. *European Journal of Pharmacology*, 67: 313-316.

12. Hayaschi G & Takemori AE (1971). The type of analgesic-receptor interaction involved in certain analgesic assays. *European Journal of Pharmacology*, 16: 63-66.
13. Tsuda M, Suzuki T, Misawa M & Nagase H (1996). Involvement of the opioid system in the anxiolytic effect of diazepam in mice. *European Journal of Pharmacology*, 307: 7-14.
14. Hunskaar S, Berge O & Hole K (1986). A modified hot-plane test sensitive to mild analgesics. *Behavior Brain Research*, 21: 101-108.
15. Powell JK, Abul-Husn NS, Jhamandas A, Olmstead MC, Beninger RJ & Jhamandas K (2002). Paradoxical effects of the opioid antagonist naltrexone on morphine analgesia, tolerance, and reward in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 300: 588-596.
16. Schreiber S, Rigai T, Katz Y & Pick CG (2002). The antinociceptive effect of mirtazapine in mice is mediated through serotonergic, noradrenergic and opioid mechanisms. *Brain Research Bulletin*, 58: 601-605.
17. Kolesnicov YA, Cristea M & Pasternak GW(2003). Analgesic Synergy Between Topical morphine and Butamben in mice. *Anesthesia & Analgesia*, 97: 1103-1107.
18. Crain SM & Shen KF (1995). Ultra-low concentrations of naloxone selectively antagonize excitatory effects of morphine on sensory neurons, thereby increasing its antinociceptive potency and attenuating tolerance/dependence during chronic cotreatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 10540-10544.
19. Crain SM & Shen KF (1998). Modulation of opioid analgesia, tolerance and dependence by G_s-coupled, GM1 ganglioside-regulated opioid receptor functions. *Trends in Pharmacological Sciences*, 19: 358-365.
20. De Souza EB, Schmidt WK & Kuhar MJ (1998). Nalbuphine: an autoradiographic opioid receptor binding profile in the central nervous system of an agonist/antagonist analgesic. *Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 244: 391-402.

IV. DISCUSSÃO

Neste estudo, nós demonstramos que o derivado pirazol-tiazol (B50), na dose de 200 nmol (i.t.), causa antinocicepção no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético e no teste da placa quente, 120 e 90 minutos após a sua administração, respectivamente.

É interessante que a curva dose-resposta para o B50 foi bifásica, com a maior dose (400 nmol) apresentando uma menor resposta, e que o efeito antinociceptivo deste derivado pirazol apareceu somente 90 minutos após sua administração. A curva dose-efeito bifásica relatada é similar àquelas relatadas por outros autores (Powell *et al.*, 2002; Kolesnicov *et al.*, 2003). Nesses estudos, eles propõem que doses das drogas maiores do que a dose efetiva, poderiam permitir a interação com outros sítios de ligação, que poderiam opor o efeito antinociceptivo causado por doses baixas do composto. Com respeito a isso, é de se ressaltar que doses muito baixas de antagonistas opióides não seletivos induzem antinocicepção e o aumento da analgesia da morfina quando administrados pela via sistêmica e i.t. (Powell *et al.*, 2002; Crain & Shen, 1995, 1998). Foi sugerido que doses muito baixas (faixa picomolar a nanomolar) de um agonista ativa a proteína Gs acoplada ao do receptor opióide ativando a adenilato ciclase (AC) e aumentando a excitabilidade neuronal. Estes efeitos produzem o comportamento de hiperalgisia e são prevenidos por doses muito baixas de antagonistas de receptor opióide (Powell *et al.*, 2002; Crain & Shen, 1995, 1998).

Por outro lado, os agonistas opióides em doses micromolares ativam a proteína Gi/Go, inibindo a atividade da AC e reduzindo a excitabilidade neuronal, produzindo esta antinocicepção que é revertida por doses maiores de antagonistas opióides. Portanto, considerando seu efeito antinociceptivo bifásico, o B50 parece ser semelhante a antagonistas opióides ou, como a nalbufina (antagonista opióide), produz efeitos agonistas em um subtipo de receptor e efeitos antagonistas em outro (De Souza *et al.*, 1998). De fato, a descoberta de que a naloxona reverteu o efeito antinociceptivo de B50 sugere que ele ative os mecanismos opióides, o que concorda com esta idéia. Entretanto, estudos específicos são necessários para esclarecer se o B50 interage com receptores opióides.

Uma descoberta interessante do presente estudo, foi que a administração i.t. de B50 causou antinocicepção apenas após 90-120 minutos. Estes resultados

sugerem que o B50 seja uma pró- droga, que deve ser metabolizada para causar antinocicepção.

Uma grande preocupação nos experimentos designados para avaliar atividade antinociceptiva dos novos compostos é se o tratamento farmacológico causa outras alterações no comportamento, tais como, prejuízo motor ou sedação, o que poderia mascarar o efeito antinociceptivo do B50. No presente estudo, nós demonstramos que o B50 não alterou as medidas de performance da locomoção forçada em cilindro giratório ou atividade exploratória no campo aberto. Portanto, o efeito antinociceptivo do B50 não é devido a efeitos motores ou ataxia.

Em resumo, neste estudo nós descrevemos que a injeção intratecal do novo derivado pirazol-tiazol (B50) causou antinocicepção, com início tardio, em testes nociceptivos químico e térmico. A antinocicepção induzida por B50, foi revertida por naloxona, um antagonista não seletivo dos receptores opióides, sugerindo que mecanismos opióides estejam envolvidos em tal efeito.

V. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- 1) A administração i.t. de B50 apresenta efeito antinociceptivo no modelo de nocicepção química (teste das contorções abdominais) e também no modelo de nocicepção térmica (placa quente).
- 2) O B50 não causou ataxia nos camundongos submetidos ao teste de locomoção forçada em cilindro giratório.
- 3) A atividade locomotora e exploratória de camundongos no campo aberto não foi alterada pela administração de B50.
- 4) O efeito antinociceptivo do B50 envolve mecanismos opióides.

VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNATI, L. F.; TIENGO, M., FERRAGUTI, F. et al. Pain, analgesia and stress: an integrated view. **Clinical Journal Pain**, **7(Suppl)**: S 23-S 37, 1991.
- AGUIRRE-BAÑUELOS, P.; GRANADOS-SOTO, V. Evidence for a peripheral mechanism of action for the potentiation of the antinociceptive effect of morphine by dipyron. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, **42**:70–85, 1999.
- AKMAN, H.; AKSU, F.; GULTEKIN, I. et al. A possible central antinociceptive effect of dypirone in mice. **Pharmacology**, **53**:71–78, 1996.
- APPLETON, I. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and pain. **In the Pharmacology of Pain**. Besson: Springer-Verlag, 130: 43-60, 1997.
- ARELLANO, R.; SACRISTAN, S. A. Metamizole: reassessment of its therapeutic role. **European Journal of Clinical Pharmacology**, **38**:617–619, 1990.
- ASHBURN, M. A.; STAATS, P. S. Management of chronic pain. **Lancet**, **353**: 1865-1869, 1999.
- AXELROD, J.; BURCH, R. M.; JELSEMA, C. L. Receptor-mediated activation of phospholipase A2 via GTP-binding proteins: arachidonic acid and its metabolites as second messengers. **Trends in Neuroscience**, **11**: 117-123, 1988.
- BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenase-2 and its regulation in inflammation. **Mediators of Inflammation**, **5**: 305-323, 1996.
- BATTAGLIA, G.; RUSTIONI, A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion cells of the rat and monkey. **Journal of Comparative Neurology**, **277**: 302-312, 1988.

- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurosciências** – Desvendando o Sistema Nervoso. 2ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 422-434.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; RODRIGUES, A. L. S. et al. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyron in formalin, capsaicin and glutamate tests. **European Journal of Pharmacology** **345 (3)**:223–245, 1998.
- BENEDETTI, C.; BUTLER, S. H. Systemic analgesics. In: BONICA, K.; LOESER, J. D.; CHAPMAN, C. R.; FORDYCE, W. E. **The Management of Pain** 2nd ed. Philadelphia-London: Lea & Febiger, 1990.
- BERKLEY, K. J. Sex differences in pain. **Behavioral Brain Science**, **20**: 371-380,1999.
- BERNARD, J. F.; BESTER, H.; BESSON, J. M. Involvement of the spinobarabrachio-amygdaloid and hypothalamic pathways in the autonomic and effective emotional aspects of pain. **Progress in Brain Research**, **107**: 243-255, 1996.
- BESSON, J. M.; RANG, H.P.; DALE, M.; RITTER, M. **Farmacologia**. 4a ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
- BESSON, J. M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiology Reviews**, **67**: 67-186, 1987.
- BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, **353**: 1610-1615, 1999.
- BJÖRKMAN, R. Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, **39**: suppl 103: 1-44, 1995.
- BOIE, Y.; STOCCO, R.; SAWYER, N. et al. Molecular cloning and characterization of

- the four rat prostaglandin E₂ prostanoid receptor subtypes. **European Journal of Pharmacology**, **340**: 227-241, 1997.
- BONACORSO, H.; OLIVEIRA, M. R.; WENTZ, A. P. et al. Haloacetylated enol ethers: 12 [18]. Region specific synthesis and structural determination of stable 5-hydroxy-1H-pyrazolynes. **Tetrahedron** **55**:345–352, 1999.
- BORNE, R. F. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: FOYE, W O; LEMKE, T L; WILLIAMS, D A. **Medicinal Chemistry**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995.
- BOURGOIN, S.; POHL, M.; MAUBORGNE, A.; et al. Monoaminergic control of the release of calcitonin gene-related peptide and substance P-like material from rat spinal cord slices. **Neuropharmacology**, **32**: 633-640, 1993.
- BRUNO, A. A. Abordagem clínica na dor crônica. **Revista Brasileira de Medicina**, **58**: 1-10, 2001.
- CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M. Kinins in pain and inflammation. **Pain** **87**: 1–5, 2000.
- CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A.; FERREIRA, J. et al. Inflammatory pain: kinins and antagonists. **Current Opinion in Anesthesiology** **14**: 519–526. 2001.
- CAMPOS, C.; GREGÓRIO, R.; GARCIA NIETO, R. et al. Regulation of cyclooxygenase activity by metamizol. **European Journal of Pharmacology**, **378**: 339–3 47, 1999.
- CAMPOS, D. I.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. A new mechanism of action of dipyrone: blockade of the release of a nociceptive factor from macrophages. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **21**: 565–568, 1998.
- CAO, Y. Q.; MANTYH, P. W., CARLSON, E. J. et al. Primary afferent tatykinins are

- required to experience moderate to intense pain. **Nature**, **392**: 390-394, 1998.
- CARLSSON, K H & JURNA, I. The role of descending inhibition in the and antinociceptive effects of the pyrazolone derivatives, metamizol (dypirone) aminophenazone ("Pyramidon"). Naunyn-Schmiedeberg's. **Archives of Pharmacology**, **335**:154–159, 1987.
- CARLSSON, K. H.; HELMREICH, J.; JURNA, I. Activation of inhibition from the periaqueductal grey matter mediates central analgesic effect of metamizol (dypirone). **Pain** **27(3)**: 373–390, 1986.
- CARLTON, S. M.; ZHOU, S.; COGESHALL, R. E. Localization and activation of substance P receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. **Brain Research**, **734**: 103-108, 1996.
- CARVALHO, M. M. J. **Dor, um estudo multidisciplinar**. São Paulo: Summus Editorial, 1999.
- CASHMAN, J. N. The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia. **Drugs**, **52**: 13-23, 1996.
- CHAPMAN C. R.; GAVRIN, J. Suffering: the contributions of persistent pain. **Lancet**, **353**: 2233-2237, 1999.
- COLEMAN, R. A.; SMITH, W. L.; NARUMIYA, S. VIII International Union of pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacology Review** (**46**): 205-229, 1994.
- COTRAN, C.; KUMAR, T.; ROBBINS, A. **Patología estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1994. p. 35-71.

- CRAIN, S. M.; SHEN, K. F. Modulation of opioid analgesia, tolerance and dependence by G_s-coupled, GM1 ganglioside-regulated opioid receptor functions. **Trends in Pharmacological Sciences**, **19**: 358-365, 1998.
- CRAIN, S. M.; SHEN, K. F. Ultra-low concentrations of naloxone selectively antagonize excitatory effects of morphine on sensory neurons, thereby increasing its antinociceptive potency and attenuating tolerance/dependence during chronic cotreatment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **92**: 10540-10544, 1995.
- DE SOUZA, E.B.; SCHMIDT, W.K.; KUHAR, M.J. Nalbuphine: an autoradiographic opioid receptor binding profile in the central nervous system of an agonist/antagonist analgesic. **Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **244**: 391-402, 1998.
- DICKENSON, A. H. Central acute pain mechanisms. **Annals of Medicine**, **27**: 223-227, 1995.
- DICKENSON, A. H. Mechanisms of central hypersensitivity: excitatory amino acid mechanisms and their control. In: DICKENSON, A.; BESSON, J.-M. **The Pharmacology of Pain**. Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin: Springer-verlag, 1997.
- DRAY, A.; URBAN, L.; DECKENSON, A. H. Pharmacology of chronic pain. **Trends in Pharmacological Sciences**, **15**: 190-197, 1994.
- DUARTE, I. D.; SANTOS, I. R.; LORENZETTI, B. B. et al. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **European Journal of Pharmacology**, **217(2)**:225–227, 1992.
- EDVINSSON, L., CANTERA, L.; JANSEN-OLENSEN, I. et al. Expression of calcitonin gene-related peptide, receptor mRNA in human trigeminal ganglia and cerebral

- arteries. **Neuroscience Letters**, **229**: 209-211, 1997.
- EIDE, P. K.; HOLE, K. Different role of 5HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in spinal cord in the control of nociceptive responsiveness. **Neuropharmacology**, **30**: 727-731, 1991.
- FAUCETT, J. A.; LEVINE, J. D. The contributions of interpersonal conflict to chronic pain in the presence or absence of organic pathology. **Pain**, **44**: 35-43, 1991.
- FERREIRA, S. H. Entre a compreensão e a confusão: alodínia e hiperalgesia. **Dor on line** (www.dol.inf.br/HTML/editorial.HTML), 2002a.
- FILLINGEN, R. B.; NESS, T. J. Sex-related hormonal influences on pain and analgesic responses. **Neuroscience Behavioral Review**, **26**: 485-501, 2000.
- FISHER, B.; ZORNOW, M. H.; YAKSH, T. L. et al. Antinociceptive properties of intrathecal dexmedetomidine om rats. **European Journal of Pharmacology**, **192**: 221-225, 1991.
- FLACK, J. W.; FLACK, W. E. The use of α -adrenergic agonists during general anaesthesia. **Anaesthetic Pharmacology Reviews**, **1**: 268-287, 1993.
- FRIES, D. S. Analgesics. In: FOYE, W. O.; LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A., Eds. **Medicinal Chemistry**. Baltimore: Wiliams & Wilkins, 1995. p. 247-269.
- FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**, **48**: 129-141, 1998.
- GANONG, W. The stress response: a dynamic overview. **Hospital Practice**, **23(6)**: 155-190, 1988.
- GODOY, M. C. M.; FIGHERA, M. R.; SOUZA, F. R. et al. α_2 -Adrenoceptors and 5-HT

- receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazolines, but not of dipyrone. **European Journal of Pharmacology**, **496**: 93-97, 2004.
- GOEL, A.; MADAN, A K. Structure-activity study on antiinflammatory pyrazole carboxylic acid hydrazide analogs using molecular connectivity indices. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, **35(3)**:510–524, 1995.
- GRUBB, B. D. Peripheral and central mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, **81**: 8-11, 1999.
- GU, J. G.; MACDERMOTT, A. B. Activation of ATP P2X receptors elicits glutamate release from sensory neuron synapses. **Nature**, **389**: 749-753, 1997.
- GUIEU, R.; PERAGUT, J. C.; ROUSSEL, P. et al. Adenosine and neuropathic pain. **Pain**, **68**: 271–274, 1996.
- GUYTON, E. H. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1997.
- HEADLEY, P. M., GRILLNER, S. Excitatory amino-acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. **Trends in Pharmacological Sciences**, **11**: 205-211, 1990.
- HEPPELMANN, B.; PAWLAK, M. Sensitization of articular afferents in normal and inflamed knee joints by substance P in the rat. **Neuroscience Letters**, **223**: 97-100, 1997.
- HERNANDEZ, N.; VANEGAS, H. Antinociception induced by PAG- microinjected dipyrone (metamizol) in rats: involvement of spinal endogenous opioids. **Brain Research**, **896**:175–178, 2001.
- HOSKIN, P J; HANKS, G W. Opioid agonist-antagonist drugs in acute and chronic

- pain states. **Drugs**, **41**:326–344, 1991.
- HU, H. Z.; LI, Z. W. Substance P potentiates ATP-activated currents in rat primary sensory neurons. **Brain Research**, **739**: 163-168, 1996.
- INOEU, K.; NAKASAWA, K.; INUOEU, K. et al. Nonselective cation channels coupled with tachykinin receptors in rat sensory neurons. **Journal of Neurophysiology**, (**73**): 736-742, 1995.
- INSEL, P. A. Analgesic – antipyretic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W. **Pharmacological Basis of Therapeutics**. Atampa: Mc Graw Hill Interamericana, 1996.
- JACKSON, D. L., GRAFF, C. B., RICHARDSON, J. D. et al. Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats. **European Journal of Pharmacology**, **284**: 321-325, 1995.
- JONES, S. L. Anatomy of pain. In: SINATRA, R. S.; HORD, A. H.; GINSBERG, B.; PREBLE, L. **Acute Pain: Mechanisms & Management**. St. Louis: Mosby–Year Book, 1992.
- JONES, S. L. Dypirone into the núcleo raphe magnus inhibits the rat nociceptive tail-flick reflex. **European Journal of Pharmacology**, **318**: 37-40, 1996
- KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Princípios da Neurociência**. São Paulo: Manole, 2003. p. 73-491.
- KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Principles of Neural Science**. New York: McGraw-Hill, 2000. p. 472-491.
- KANGRGA, I. L.; LAREW, J. S. A.; RANDIÉ, M. The effects of substance P and

- calcitonin gene-related peptide on the efflux of endogenous glutamate and aspartate from the rat spinal dorsal horn *in vitro*. **Neuroscience Letters**, **108**: 155-160, 1990.
- KANGRGA, I. L.; RANDIÉ, M. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide enhance release of endogenous glutamate and aspartate from the rat spinal dorsal horn slice. **The Journal of Neuroscience**, **10**: 2026-2038, 1990.
- KHASAR, S. G.; OUSEPH, A. K.; CHOUB, B. et al Is there more than one prostaglandin E receptor subtype mediating hyperalgesia in the rat windpaw? **Neuroscience**, **64**: 1161-1165, 1995.
- KOLESNICOV, Y. A.; CRISTEA, M.; PASTERNAK, G. W. Analgesic Synergy Between Topical morphine and Butamben in mice. **Anesthesia & Analgesia**, **97**: 1103-1107, 1995.
- KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 1998. p. 92-96.
- KUO, S.; HUANG, L-J.; NAKAMURA, H. Studies on heterocyclic compounds. ⁶¹Synthesis and analgesic and anti-inflammatory activities of 3,4-dimethylpyrano[2,3-c]pyrazol-6-one derivatives. **Journal Medical Chemistry**, **27**:539-544, 1984.
- KURASHI, Y.; HIROTA, N.; SOTA, Y.; et al. Noradrenergic inhibition of the release of substance P from the primary afferents in the rabbit spinal dorsal horn. **Brain Research**, **359**: 177-182, 1985.
- LAPORTE, J R.; CARNÉ, X. Blood dyscrasias and the relative safety of non-narcotic analgesics. **Lancet**, **329**:809, 1987.
- LAWAND, N. B. WILLIS, W. D. WESTLUND, K. N. Blockade of joint inflammation

and secondary hyperalgesia by L-Name, a nitric oxide synthase inhibitor. **Neuro report**, **8**: 895-899, 1997.

LECANNELIER, S. Antiinflamatorios no esteroideos. In: MARCONDES, J. **Farmacología**. Buenos Aires: Intermédica, 1976.

LEVINE, J. D.; TAIWO, Y. O.; COLLINS, S. D. et al. Noradrenaline hyperalgesia is mediated through interaction with sympathetic postganglionic neurone terminals rather than activation of primary afferent nociceptors. **Nature**, **323**:158–160, 1986.

LI, P.; ZHUO, M. Silent glutamatergic synapses and nociception in mammalian spinal cord. **Nature**, **393**: 695-698, 1998.

LI, P.; ZHUO, M. Substance P and neurokinin A mediate sensory synaptic transmission in young rat dorsal horn neurons. **Brain Research Bulletin**, **55**: 521-531, 2001.

LIU, H., WANG, H., SHENG, M. et al. Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsal horn. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, **91**: 8383-8387, 1994.

LIU, H.; MANTYH, P. W.; BASBAUM, A. I. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. **Nature**, **386**: 721-724, 1997.

LIU, Z. Y.; LUNDERBERG, T.; YU, L. C. Involvement of 5-hydroxytryptamine 1A receptors in the descending anti-nociceptive pathway from periaqueductal gray to the spinal dorsal horn in intact rats, rats with nerve injury and rats with inflammation. **Neuroscience**, 2002.

LOESER, J.; MELZACK, R. Pain, an overview. **Lancet**, **353**: 1607-1609, 1999.

- LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Mode of analgesic action of dipyron: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. **European Journal of Pharmacology**, **114**: 375–381, 1985.
- LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Activation of the arginine-nitric pathway in primary sensory neurons contributes to dipyron-induced spinal and peripheral analgesia. **Inflammation Research**, **45**: 308–311, 1996.
- MACHADO, A. **Neuroanatomia Funcional**. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 101-130.
- MARDONES, J. **Farmacologia**. Buenos Aires: Interamericana, 1976.
- MARKENSON, J. A. Mechanisms of chronic pain. **The American Journal of Medicine**, **101**: S6-S18, 1996.
- MASON, P. Central mechanisms of pain modulation. **Neurobiology**, **9**: 436-441, 1999.
- MATSUMURA, K.; WATANABE, Y.; ONOE, H. et al. Prostacyclin receptors in the brain and central terminals of primary sensory neurons: an autoradiographic study using a stable prostacyclin analogue [³H]- iloprost. **Neuroscience**, **65**: 493-503, 1995.
- MAYER, D. J.; WOLFE, T. L., AKIL, H. et al. Analgesia from electrical stimulation in the brainstem of the rat. **Science (Wash DC)****174**: 1351-1354, 1971 [[Medline](#)].
- MCQUEEN, D. S. Opioid peptide interactions with respiratory and circulatory systems. **British Medical Bulletin**, **39**:77–82, 1983.
- MELZACK, R.; WALL, P. D. **The challenge of Pain**. New York : Peguin Books, 1983.

- MERSKEY, H.; BOGDUK, N. **Classification of chronic pain**: description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Seattle: IASP Press, 1994.
- MILLAN, M J. The role of descending noradrenergic and serotonergic pathways in the modulation of nociception: focus on receptor multiplicity. In: DICKENSON, A.; BESSON, J-M. **The Pharmacology of Pain**. Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin: Springer Verlag, 1997.
- NATALINI, C. C. **Comparative evaluation of the effects of epidural morphine, alfentanil, buprenorphine, tramadol and U-50488H in horses**. Tese (doutorado) University of Minnesota, 2000.
- NEUGEBAUER, V.; SCHAIBLE, H. G.; HE, X. et al. Electrophysiological evidence for a spinal antinociceptive action of dipyrone. **Agents Actions**, **41**:62–70, 1994.
- OCHI, T.; JOBO-MAGARI, K.; YONEZAWA, A. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of a novel pyrazole derivative, FR140423. **European Journal of Pharmacology**, **365**: 259–266, 1999a.
- OCHI, T.; FUJII, T.; MOTOYAMA, Y. et al. Antinociceptive properties of FR140423 mediated through spinal δ -, but not μ - and κ -, opioid receptors. **European Journal of Pharmacology**, **380**:73–79, 1999b.
- OCHI, T.; FUJII, T.; MOTOYAMA, Y. et al. The profile of FR140423, a novel anti-inflammatory compound, in yeast-induced rat hyperalgesia. **Japanese Journal of Pharmacology**, **81(1)**:94–98, 1999c.
- OCHI, T.; GOTO, T. The spinal antinociceptive effect of FR 140423 in mice. Involvement of the descending noradrenergic and serotonergic systems. **Life Science**, **69**: 2257–2264, 2001.
- OLIVEIRA, L. F. In: CAVALCANTE, I. L.; MADDALENA, M. L. **Dor**. Rio de Janeiro:

FARJ, 2003. p. 37-38.

POTERNOY, R. K.; LESAGE, P. Management of cancer pain. **Lancet**, **353**: 1695-1700, 1999.

POWELL, J. K.; ABUL-HUSN, N. S.; JHAMANDAS, A. et al.. Paradoxical effects of the opioid antagonist naltrexone on morphine analgesia, tolerance, and reward in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **300**: 588-596, 2002.

PROKOPP, C R. **2-[5-triclorometil-5-hidroxi-3-fenil-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il]-4-(4-bromofenil)-5-metiltiazol (B50) provoca antinocicepção em camundongos.** Dissertação de mestrado apresentado ao PPGBT/CCNE/UFSM, 2004.

RAINVILLE, P. Brain mechanisms of pain affect and pain modulation. **Current Opinion in Neurobiology**, **12**: 195-204, 2002.

RANDIÉ, M.; MILETIÉ, V. Depressant actions of methionine-enkephalin and somatostatin in cat dorsal horn neurons activated by noxious stimuli. **Brain Research**, **152**: 196-202, 1978.

RANDIÉ, M.; MILETIÉ, V. Effects of substance P in cat dorsal horn neurons activated by noxious stimuli. **Brain Research**, **128**: 164-169, 1977.

RUMACK, B. H.; PETERSON, R. C.; KOCH, G. G. Acetaminophen over-dose 662 cases with evaluation of oral acetylcysteine treatment. **Archives Internal Medicine**, **141**:380–385, 1982.

RUSSO , C. M.; BROSE, W. G. Chronic pain. **Annual Review of Medicine**, **49**: 123-133, 1998.

- SCHAIBLE, H-G.; GRUBB, B. D. Afferent and spin al mechanism of joint pain. **Pain**, **55**: 5-54,1993.
- SERRANO, A. Modulación descendene de la información nociceptiva. **Revisión Sociedad Español Dolor**, **9**: 382-390, 2002.
- SHARP, T. J. Chronic pain: a reformulation of the cognitive-behavioral model. **Behavioral Research Therapeutics**, **39**: 787-800, 2001.
- SORKIN, L. S., MCADOO, D. J., WILLIS, W. D. Raphe magnus stimulation-induced antinociception in the cat is associated with release of amino acids as well as serotonin in the lumbar dorsal horn. **Brain Research**, **618**: 95-108, 1993.
- SOUZA, F. R.; FIGHERA, M. R.; LIMA, T. T. F. et al. 3-Methyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-1H-1-pyrazolcarboxamide induces antinociception. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, **68**: 525–530, 2001.
- SOUZA, F. R.; SOUZA, V. T.; RATZLAFF, V. et al. Hypothermic and antipyretic effects of 3-methyl and 3-phenyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-4,5-dihydro-1H-1-pyrazolcarboxamide induces antinociception. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, **451**:141–147, 2002.
- TABARELLI, Z.; RUBIN, M. A.; BERLESE, D. B. et al. Antinociceptive, effect of novel pyrazolines in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **37**: 1531-1540, 2004.
- TAIWO, Y.; LEVINE, J. D. Characterization of the arachidonic acid metabolites mediating bradikinin and noradrenaline hyperalgesia. **Brain Research**, **458**:402–406, 1988.
- TAKEHIRO, O.; GOTO, T. The antinociceptive effect of FR140423 in mice: involvement of spinal α_2 -adrenoceptors. **European Journal of Pharmacology**,

400:199–203, 2000 a.

TAKEHIRO, O.; GOTO, T. The antinociceptive effect induced by FR140423 is mediated through spinal 5-HT_{2A} and 5-HT₃ receptors. **European Journal of Pharmacology**, **409**:167–172, 2000 b.

The international agranulocytosis and aplastic anemia study. Risks of agranulocytosis and aplastic anemia. A first report of their relation to drug use with special reference to analgesics. **Journal of the American Medical Association**, **256**: 1749-1757, 1986.

TORTORICI, V.; VANEGAS, H. Putative role of medullary off-and on- cells in the antinociception produced by dipyrone (metamizol) administered systematically or microinjected into PAG. **Pain**, **57**:197–205, 1994.

TORTORICI, V.; VASQUEZ, E.; VANEGAS, H. Naloxone partial reversal of the antinociception produced by dipyrone microinjected into the periaqueductal grey of rats. Possible involvement of medullary off- and on- cells. **Brain Research**, **726**:106–111, 1996.

TRACEY, I., PLOGHAUS, A.; GATI, J. et al. Imaging attentional modulation of pain in the periaqueductal gray in humans. **The Journal of Neuroscience**, **22**: 2748-2752, 2002.

TSUJI, K.; KONISHI, N.; SPEARS, G. W. et al. Studies on anti-inflammatory agents. V. Synthesis and pharmacological properties of 3-(difluoromethyl)-1-(4-methoxyphenyl)-5-[4-(methylsulfinyl)-phenyl] pyrazole and relates compounds. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, **45**: 1475–1481, 1997.

TURK, D.C.; OKIFUJI, A. Assessment of patients' reporting of pain: an integrated perspective. **Lancet**, **353**: 1784-1788, 1999.

TYERS, M. B. A classification of the opiate receptors that mediate antinociception in animals. **British Journal**, **68**: 503-512, 1999.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE H-G. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. **Progress in Neurobiology**, **64**: 327-363, 2001.