



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

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO DE 5-  
TRIALOMETIL-4,5-DIIDRO-1H-PIRAZOL METIL ÉSTERES  
INÉDITOS EM CAMUNDONGOS**

**TESE DE DOUTORADO**

**Julie Milano**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2008**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO DE 5-  
TRIALOMETIL-4,5-DIIDRO-1H-PIRAZOL METIL ÉSTERES  
INÉDITOS EM CAMUNDONGOS**

**por**

**Julie Milano**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da  
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito  
parcial para a obtenção do grau de  
**Doutor em Bioquímica Toxicológica**

**Orientador: Prof. Dr. Helio Gauze Bonacorso**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maribel Antonello Rubin**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2008**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO DE 5-  
TRIALOMETIL-4,5-DIIDRO-1H-PIRAZOL METIL ÉSTERES INÉDITOS  
EM CAMUNDONGOS**

elaborada por  
**Julie Milano**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Prof. Dr. Helio Gauze Bonacorso  
(Presidente/Orientador)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Dalmaz (UFRGS)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Rosa Chitolina Schetinger (UFSM)**

---

**Prof. Dr. Nilo Zanatta (UFSM)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Emanuelli (UFSM)**

Santa Maria, 11 de julho de 2008

***“Lute pelos seus IDEAIS, SONHOS e  
DESEJOS,  
pois DEUS está dentro de você e esta é a  
maior força que existe!”***

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por realmente me fazer ver que eu tinha que completar esta jornada.

Aos amigos Sara e Mateus, que me acompanharam durante todo este tempo, pela demonstração constante de amizade, incentivo e colaboração na parte experimental deste trabalho.

À Alessandra Hubner de Souza, amiga de todas as horas.

Ao professor Juliano Ferreira, pela orientação, disponibilidade, dedicação e caráter profissional, características que ficarão como exemplo que tentarei seguir em minha carreira profissional.

Aos professores Hélio Gauze Bonacorso e Maribel Antonello Rubin, pela oportunidade oferecida e pela colaboração na realização deste trabalho.

À Professora Simone Gonçalves Cardoso, minha orientadora de mestrado, que se tornou um exemplo em minha vida, hoje grande amiga, obrigada Si!

Ao doutorando Pablo Machado, pelo apoio, palavra amiga e pelas sínteses ... e sínteses ... rs!

Aos demais colegas e amigos do laboratório.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica que, de diferentes formas, contribuíram para a minha formação e desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, por me mostrarem desde cedo que objetivos somente são atingidos com muito esforço, trabalho e persistência.

Às minhas irmãs, Juliane e Francieli. Obrigada por me compreenderem nas minhas inúmeras ausências ...

Agradeço, enfim, à Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade.

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO DE 5- TRIALOMETIL- 4,5-DIIDRO-1H- PIRAZOL METIL ÉSTERES INÉDITOS EM CAMUNDONGOS**

AUTORA: JULIE MILANO  
ORIENTADOR: HÉLIO GAUZE BONACORSO  
CO-ORIENTADORA: MARIBEL ANTONELLO RUBIN  
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 11 de julho de 2008

A dor é um sintoma comum na prática clínica, por isso muitos avanços estão sendo realizados no sentido de obter moléculas analgésicas cada vez mais efetivas e com menos efeitos colaterais. Neste contexto, no presente estudo avaliou-se o potencial antinociceptivo de quatro pirazóis inéditos: 3- metil-5-hidroxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-pirazol metil éster (MPF3), 4-metil-5-hidroxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-pirazol metil éster (MPF4), 3-metil-5-hidroxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1*H*-pirazol metil éster (MPCI3) e 4-metil-5-hidroxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1*H*-pirazol metil éster (MPCI4). A administração sistêmica dos compostos foi efetiva em inibir a nocicepção em modelos de dor induzida por estímulo nocivo químico (teste da formalina, 0,03-1,0 mmol/kg, i.p.) e térmico (teste da placa-quente, 0,1-1,0 mmol/kg, i.p.). Em adição, MPF4 produziu antinocicepção em modelos de dor inflamatória causada por Adjuvante Completo de Freund (ACF) ou por incisão na pata de camundongos. O efeito antinociceptivo de MPF4 (1,0 mmol/kg, i.p.) não foi revertido pelo pré-tratamento dos animais com ioimbina (0,15 mg/kg, i.p.) ou *p*-clorofenilalanina etil éster (PCPA; 300 mg/kg, i.p.), mas sim, por naloxona (2,0 mg/kg, i.p.), tanto na nocicepção térmica quanto na nocicepção química. O tratamento dos animais durante um período de 8 dias consecutivos com MPF4 (1,0 mmol/kg, i.p), ao contrário daqueles tratados com morfina (5,0 mg/kg, i.p.), não desenvolveram tolerância antinociceptiva nem tolerância cruzada com os animais tolerantes à morfina. Porém, similar ao opióide morfina (11 mg/kg, i.p.), MPF4 (1,0 mmol/kg, i.p) inibiu o trânsito gastrointestinal de camundongos, sendo este efeito revertido por naloxona (2,5 mg/kg, i.p.). Além disso, diferente de indometacina (0,1 mmol/kg, v.o.), MPF4 (1,0 mmol/kg, v.o.) não induziu lesão gástrica em camundongos. Nenhum dos compostos testados causou alteração na atividade locomotora dos camundongos. Estes achados sugerem que os novos pirazoline metil ésteres avaliados parecem ser promissores para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas terapêuticamente relevantes.

Palavras chave: antinocicepção, pirazoline metil ésteres, dor, analgésicos.

## **ABSTRACT**

Doctoral Thesis

Postgraduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **EVALUATION OF THE ANTINOCICEPTIVE EFFECT OF NOVEL 5-TRIHALOMETHYL- 4,5- DIHYDRO- 1H PYRAZOLE METHYL ESTERES IN MICE**

AUTHOR: JULIE MILANO

ADVISOR: HELIO GAUZE BONACORSO

CO-ADVISOR: MARIBEL ANTONELLO RUBIN

Place and Date of defense: July 11<sup>th</sup>, 2008, Santa Maria

Pain is a common symptom in clinical practice and many advances have been observed in order to obtain more effective analgesic molecules with fewer side effects. The present study evaluated the antinociceptive potential of four novel pyrazoles: 3-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole methyl ester (MPF3), 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole methyl ester (MPF4), 3-methyl-5-trichloromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole methyl ester (MPCI3), and 4-methyl-5-trichloromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole methyl ester (MPCI4). The systemic administration of the compounds was effective for the inhibition of the nociception in chemical (formalin test, 0.03 -1.0 mmol/kg, i.p.) and thermal (hot-plate test, 0.1-1.0 mmol/kg, i.p.) models of pain. In addition, MPF4 also produced antinociception in models of inflammatory pain induced by Complete Freund's Adjuvant (CFA) or by incision procedure in paw of mice. The antinociceptive effect of MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p.) was not reversed by yohimbine (0.15 mg/kg, i.p.) or *p*-chlorophenylalanine ethyl ester (PCPA; 300 mg/kg, i.p.), but by naloxone (2.0 mg/kg, i.p.), in both thermal and chemical nociception. Animals given MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p.) daily for 8 days in a row, in contrast to morphine (5 mg/kg, i.p.), showed no tolerance to its antinociceptive effect or cross-tolerance with morphine. However, similarly to morphine (11 mg/kg, i.p.), MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p.) reduced gastrointestinal transit in mice and its effect was reversed by naloxone (2.5 mg/kg, i.p.). Unlike indomethacin (0.1 mmol/kg, p.o.), MPF4 (1.0 mmol/kg, p.o.) did not induce gastric lesions in mice. The tested compounds did not impair locomotion in the mice as well. Taken together, the results demonstrate that these novel pyrazoline methyl esters evaluated may be promising prototypes of additional mild analgesics, which are therapeutically relevant.

Key words: antinociception, pyrazoline methyl esteres, pain, analgesics.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 1 - Estrutura química do pirazol.....  | 27 |
| FIGURA 2 - Estrutura química da dipirona .....  | 27 |
| FIGURA 3 - Estrutura química do celecoxib .....   | 29 |
| FIGURA 4 - Estrutura química do FR140423 (3-(difluormetil)-1-(4-metoxifenil)-5-[4-metilsulfinil] fenil] pirazol .....   | 30 |
| FIGURA 5 - Estrutura química do 3-metil-5-hidroxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-pirazolcarboxiamida (MPCA) e 3-fenil-5-hidroxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -pirazolcarboxiamida (FPCA) ..... | 32 |
| FIGURA 6 - Estrutura química do 2-[5-triclorometil-5-hidroxi-3-fenil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il]-4-(4-bromofenil)-5-metil tiazol (B50) .....   | 33 |
| FIGURA 7 - Estrutura química do 3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1-metil-1 <i>H</i> -pirazol (PZ2) e 3- etoximetil-5-etoxicarbonil-1-fenil-1 <i>H</i> -pirazol (PZ3) .....  | 33 |
| FIGURA 8 - Estrutura química geral de novos 5-hidroxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1- carboxiamidapirazóis substituídos .....   | 34 |

### ARTIGO

|   |    |
|---|----|
| FIGURE 1 - Structures of the novel trihalomethylated pyrazoline methyl esters, 3-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrazol methyl ester (MPF3), 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrazol methyl ester (MPF4), 3-methyl-5-trichloromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrazol methyl ester (MPCI3) and 4-methyl-5-trichloromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro- 1 <i>H</i> -pyrazol methyl ester (MPCI4) and dipyrone..... | 37 |
| FIGURE 2 - Effect of MPF3 (A and B), MPF4 (C and D), MPCI3 (E and F) and MPCI4 (G and H) (0.03-1.0 mmol/kg, i.p.) on the time spent licking during the neurogenic (A, C, E and G) and inflammatory (B, D, F and H) phases of the formalin test in mice.....   | 38 |
| FIGURE 3 - Effect of MPF3 (A), MPF4 (B), MPCI3 (C), MPCI4 (D) (0.1-1.0 mmol/kg, i.p.) and dipyrone (A-D, 1.5 mmol/kg, i.p.) on the response latency at 15, 30 and 60 min after administration of drugs in the hot-plate test in mice.....   | 40 |



|   |    |
|---|----|
| FIGURE 4 - Effect of pre-administration of naloxone (A and B; 2 mg/kg, i.p.), yohimbine (C and D; 0.15 mg/kg,i.p.), PCPA (E and F; 300 mg/kg,i.p.) or their vehicles to mice treated with morphine (A; 5 mg/kg,i.p.), clonidine (C; 0.1 mg/kg,i.p.), dipyron (E, 1.5 mmol/kg,i.p.) or MPF4 (B, D and F; 1.0 mmol/kg,i.p.) on the response latency at 30 min after administration of drugs in the hot-plate test in mice .....   | 41 |
| FIGURE 5 - A) Effect of the combined administration of MPF4 (1.0 mmol/kg,i.p.) plus morphine (5 mg/kg,i.p.) on the response latency at 30 min after administration of drugs in the hot-plate test in mice. B-C) Effect of pre-administration of naloxone (B and C; 2 mg/kg, i.p.) or its vehicle to mice treated with MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p.) on the time spent licking during the neurogenic (B) and inflammatory (C) phases of the formalin test in mice .....   | 42 |
| FIGURE 6 - Effect of acute (first day) or chronic (eight days) treatment with morphine (A, 5 mg/kg,i.p.), MPF4 (B, 1.0 mmol/kg,i.p.), or vehicles on the response latency at 30 min after administration of drugs in the hot-plate test in mice. C) Effects of MPF4 or morphine (on the first or the eighth day) on the hot plate test at 30 min after administration of drugs in mice chronically pre-treated (from the first to the seventh day) with vehicles, MPF4 (1.0 mmol/kg/day) or morphine (5 mg/kg/day)..... | 43 |
| FIGURE 7 - A) Effect of Dipyron (1.5 mmol/kg, i.p.), MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p.), or morphine (11 mg/kg, i.p.) on gastrointestinal transit in mice. B and C) Effect of pre-administration of naloxone (2.5 mg/kg,i.p.) or vehicle to mice treated with morphine (B) or MPF4 (C) on the gastrointestinal transit in mice .....  | 44 |

## MANUSCRITO

|   |    |
|---|----|
| FIGURE 1 - Time-courses for the effect of MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p.) on mechanical allodynia (A) and absence of the effect of MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p.) in paw edema (B) induced by CFA in mice .....  | 74 |
| FIGURE 2 - Time-courses for the effect of MPF4 (0.1-1.0 mmol/kg, p.o.) (A), dipyron (1.0 mmol/kg, p.o.) and morphine (0.026 mmol/kg, p.o.) (B) on mechanical allodynia and absence of the effect of MPF4 (1.0 mmol/kg, p.o.), dipyron (1.0 mmol/kg, p.o.) and morphine (0.026 mmol/kg, p.o.) in paw edema (C) induced by CFA in mice..... | 75 |
| FIGURE 3 - Time-courses for the preemptive (A) or curative (B) effect of MPF4 (1.0 mmol/kg, p.o.), dipyron (1.0 mmol/kg, p.o.) and morphine (0.026 mmol/kg, p.o.) on mechanical allodynia caused by skin incision .....   | 76 |

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO

|  |    |
|--|----|
| TABLE 1- ID <sub>50</sub> and inhibition values of pyrazoline methyl esters on formalin test in mice .....   | 39 |
| TABLE 2- Effect of pyrazoline methyl esters and dipyrone administration on the fall latency and number of falls in rotarod test and number of crossings, rearing and immobility in open-field test in mice ..... | 44 |

### MANUSCRITO

|   |    |
|---|----|
| TABLE 1- Effect of the MPF4, dipyrone and morphine oral administration on the latency for the first fall and on the number of falls from the rotaroad ..... | 77 |
| TABLE 2- Effect of the MPF4, dipyrone and morphine oral administration on the number of crossings and rearings in open-field test in mice .....             | 77 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                 |   |
|-----------------|---|
| AAS             | Ácido acetilsalicílico  |
| ACF             | Adjuvante Completo de Freund  |
| AINEs           | Antiinflamatórios não esteroidais   |
| AINE            | Antiinflamatório não esteroideal  |
| AMPc            | Monofosfato de adenosina -cíclico   |
| ANOVA           | Análise de variância  |
| B50             | 2-[5-triclorometil-5-hidróxi-3-fenil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il]-4-(4-bromofenil)-5-metil tiazol |
| COX             | Ciclooxigenase  |
| CGRP            | Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina   |
| DAG             | Diacilglicerol  |
| FPCA            | 3-fenil-5-hidroxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -pirazolcarboxiamida                              |
| FR140423        | (3-(difluormetil)-1-(4-metoxifenil)-5-[4-metilsulfinil] fenil] pirazol                                    |
| GMPc            | Guanosina monofosfato cíclico   |
| IL-1 $\beta$    | interleucina 1 beta   |
| i.p.            | Intraperitoneal   |
| IP <sub>3</sub> | Trifosfato de inositol  |
| mg/kg           | miligrama por quilograma  |
| mmol/kg         | milimol por quilograma  |
| mM              | Milimolar   |
| MPC13           | 3-metil -5-hidroxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -pirazol- metil éster                            |
| MPC14           | 4-metil -5-hidroxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -pirazol- metil éster                            |
| MPF3            | 3-metil -5-hidroxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -pirazol- metil éster                            |
| MPF4            | 4-metil -5-hidroxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -pirazol- metil éster                            |
| NMDA            | N-metil-D-aspartato   |
| NMR             | Núcleo magno da rafe  |

|                  |   |
|------------------|---|
| PAG              | Susbtância cinzenta periaquedutal                         |
| PCPA             | <i>p</i> -clorofenilalanina etil éster                    |
| PG               | Prostaglandina  |
| PGE <sub>2</sub> | Prostaglandina E <sub>2</sub>                             |
| PGI <sub>2</sub> | Prostaglandina I <sub>2</sub>                             |
| p.o.             | por via oral  |
| PZ2              | 3- etoximetil-5-etoxicarbonil-1-metil-1 <i>H</i> -pirazol |
| PZ3              | 3- etoximetil-5-etoxicarbonil-1-fenil-1 <i>H</i> -pirazol |
| RVM              | Medula rostroventromedial                                 |
| s.c.             | Subcutânea  |
| SNC              | Sistema nervoso central                                   |
| TGI              | Trânsito gastrintestinal                                  |
| TNF- $\alpha$    | Fator de necrose tumoral $\alpha$                         |
| TRPA1            | Receptor de potencial transitório tipo anquirina 1        |

## SUMÁRIO

|  |     |
|--|-----|
| RESUMO.....  | 6   |
| ABSTRACT.....  | 7   |
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....   | 8   |
| LISTA DE TABELAS .....   | 10  |
| LISTA DE ABREVIATURAS.....   | 11  |
| APRESENTAÇÃO .....   | 14  |
| 1 INTRODUÇÃO .....   | 15  |
| 2 OBJETIVOS.....   | 17  |
| 2.1 Objetivo geral .....   | 17  |
| 2.2 Objetivos específicos.....   | 17  |
| 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....   | 18  |
| 3.1 Dor e nocicepção .....   | 18  |
| 3.2 Mecanismos envolvidos na transmissão da dor e nocicepção .....   | 20  |
| 3.3 Tratamento farmacológico da dor .....  | 23  |
| 3.4 A busca por novos pirazóis para o tratamento farmacológico da dor e nocicepção.....  | 29  |
| 4 ARTIGO E MANUSCRITO CIENTÍFICOS .....  | 35  |
| 4.1 Artigo: Antinociceptive effect of novel trihalomethyl-substituted pyrazoline methyl esters in formalin and hot-plate test in mice .....                              | 35  |
| 4.2 Manuscrito: Antinociceptive action of 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1 <i>H</i> -pyrazole methyl ester in models of inflammatory pain in mice..... | 47  |
| 5 DISCUSSÃO .....  | 78  |
| 6 CONCLUSÕES .....   | 90  |
| 7 PERSPECTIVAS.....  | 91  |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 92  |
| Anexo A.....   | 106 |

## APRESENTAÇÃO

Esta tese apresenta os resultados sob a forma de artigo e manuscrito, os quais se encontram no item **ARTIGO E MANUSCRITO CIENTÍFICOS**. As seções **Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas**, encontram-se no próprio artigo e manuscrito.

No final desta tese encontram-se os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, nos quais há interpretações e comentários gerais sobre o artigo e manuscrito científicos contidos neste estudo.

No item **PERSPECTIVAS** estão expostos os possíveis estudos para continuação do estudo do autor, referente a esse assunto.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e **DISCUSSÃO** desta tese.

# 1 INTRODUÇÃO

A dor é o principal sintoma clínico que leva os indivíduos a procurar serviços primários de saúde. Embora a dor seja fundamental para a manutenção da integridade física, gera conseqüências desagradáveis tais como sofrimento, estresse, prejuízos nas relações sociais e econômicas (ex: isolamento social, ausência no trabalho), portanto, deve ser rapidamente e efetivamente tratada (LOESER & MELZACK, 1999; BRENNAN et al., 2007).

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor, a dor pode ser definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada à lesão tecidual presente real ou potencial ou ainda descrita em termos que sugerem tal lesão” (MERSKEY & BOGDUK, 1994; LOESER & MELZACK, 1999). Portanto, sua percepção é complexa e não envolve apenas a transmissão de um estímulo nocivo, mas também processos emocionais e cognitivos em nosso cérebro (TRACEY & MANTYH, 2007). A dor, além de uma sensação é uma experiência. Sensações possuem vias neuroanatômicas importantes com receptores específicos que permitem a detecção e medida de um estímulo. As experiências incorporam os componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais importantes (JULIUS & BASBAUM, 2001). A sensação de dor nos alerta para uma real ou provável lesão e desencadeia respostas apropriadas para proteger o organismo, desta forma, a dor eminentemente aguda possui grande valor adaptativo relacionado com a sobrevivência. Contudo, a dor pode tornar-se crônica e debilitante em substituição a função de atuar como um sistema de defesa. Isto ocorre quando o organismo não é capaz de produzir resolução da lesão ou quando a plasticidade neuronal que ocorre durante a doença mantém a dor após a cura da lesão (BESSON, 1999; COUSINS, 2007).

Considerando que a dor é um problema universal e seu tratamento consiste em um dos principais desafios para a terapêutica médica, pesquisas têm sido extensamente realizadas a fim de esclarecer um melhor entendimento do mecanismo da dor, bem como identificar tratamentos mais efetivos (MERCADANTE, 1999).

As duas principais classes de analgésicos utilizadas na terapia atual para o tratamento da dor são os opióides e os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), que, embora eficazes, apresentam efeitos adversos que tornam o tratamento clínico limitado (NEGUS et al., 2006; WOODCOCK et al., 2007). Dentre os efeitos adversos apresentados pelos analgésicos opióides, o principal fator limitante é o aparecimento da tolerância analgésica, já entre os AINEs, o maior problema está relacionado às complicações gastrintestinais (HENRY et al., 1996; COLLETT, 1998; WHITTLE, 2003).

Apesar dos avanços significativos relacionados principalmente à síntese de novos compostos e ao aparecimento de novos derivados sintéticos, os opióides e os AINEs, mesmo com seus efeitos adversos, continuam sendo os fármacos de primeira escolha para o tratamento da dor. Assim, de acordo com os dados expostos, justifica-se a grande busca por novos agentes analgésicos cada vez mais efetivos e seguros para o tratamento da dor.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial antinociceptivo de pirazóis trialometil substituídos inéditos em camundongos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- ✓ Avaliar o possível efeito antinociceptivo dos pirazóis trialometil substituídos inéditos MPF3, MPF4, MPCl3 e MPCl4 em modelos de nocicepção aguda induzida por estímulo químico e estímulo térmico.
- ✓ Investigar uma possível alteração na atividade locomotora dos animais causada pela administração dos pirazóis trialometil substituídos inéditos MPF3, MPF4, MPCl3 e MPCl4.
- ✓ Verificar alguns dos possíveis mecanismos de ação responsáveis pela ação antinociceptiva do MPF4.
- ✓ Verificar se o MPF4 produz tolerância antinociceptiva e tolerância cruzada com a morfina em camundongos.
- ✓ Analisar se o MPF4, assim como o opióide morfina, produz inibição do trânsito gastrintestinal (TGI) em camundongos.
- ✓ Investigar se o MPF4 produz efeito antinociceptivo em modelo de nocicepção inflamatória crônica induzida por Adjuvante Completo de Freund e em modelo de nocicepção inflamatória aguda induzida por incisão na pata em camundongos.
- ✓ Verificar o potencial do MPF4 em causar lesão gástrica aguda em camundongos.

## **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1 Dor e nocicepção**

Inicialmente a sensação dolorosa era considerada uma resposta exclusivamente ligada à lesão tecidual. Entretanto, nos últimos anos, a dor tem sido considerada um fenômeno multidimensional. Aspectos subjetivos da experiência dolorosa, tais como os componentes afetivos e cognitivos, a ansiedade e a expectativa passaram a ser cada vez mais considerados (LOESER & MELZACK, 1999). Porém, os aspectos subjetivos da dor são difíceis de serem avaliados em animais, devido ao fato de que não verbalizam suas sensações (TJOLSEN & HOLE, 1997; PERL, 2007). Desta forma, os termos dor e analgesia, os quais representam uma experiência subjetiva, são mais adequadamente utilizados para o ser humano, enquanto nocicepção e antinocicepção para os animais.

A nocicepção é o componente sensorial da dor, o qual pode ser definido como uma sensação determinada pela estimulação das fibras aferentes primárias. Assim, enquanto a dor envolve a percepção de um estímulo aversivo, a nocicepção refere-se às manifestações neurofisiológicas geradas por estímulo nocivo. A nocicepção é a progenitora da dor, que por sua vez causa sofrimento e desencadeia no animal comportamentos típicos tais como lambe ou morder a área lesada, vocalização ou reflexo de retirar a parte do corpo agredida (TJOLSEN & HOLE, 1997; LE BARS et al., 2001). Neste contexto, em animais, a dor é avaliada indiretamente através da observação comportamental evidenciada. Desta maneira, modelos animais de dor são de fato modelos de nocicepção (TJOLSEN & HOLE, 1997).

Por analogia, as drogas que suprimem os comportamentos nociceptivos são denominadas antinociceptivas, enquanto aquelas que induzem estes comportamentos, característicos de nocicepção, são chamadas de pró-nociceptivas ou algogênicas. Contudo, drogas antinociceptivas não são obrigatoriamente analgésicas, visto que a supressão do comportamento nociceptivo pode ser

desencadeada por fatores inespecíficos, como prejuízo motor e sedação, os quais diferem de analgesia (TABARELLI et al., 2004).

Em termos de duração, uma sensação dolorosa pode ser classificada como transitória, aguda ou crônica. Na dor transitória, a ativação dos nociceptores (receptores responsáveis em detectar um estímulo doloroso) acontece na ausência de qualquer dano tecidual, e desempenha função protetora do organismo contra possíveis danos teciduais. Contudo, a dor aguda, é uma resposta causada por uma lesão de tecido com conseqüente ativação dos nociceptores no local da lesão, se caracteriza por ser de curta duração, desaparecendo até mesmo antes da cura do dano tecidual. Além disso, a dor aguda é geralmente de fácil identificação e tratamento, possuindo também caráter protetor (LOESER & MELZACK, 1999; BRENNAN et al., 2007). Já a dor crônica, é causada por uma lesão tecidual ou doença, e geralmente ultrapassa o tempo de recuperação do organismo, ou seja, este tipo de dor pode não desaparecer mesmo quando o trauma inicial (lesão) foi resolvido. A dor crônica se estende por meses ou anos, é de difícil identificação, sendo uma patologia que geralmente necessita de tratamento complexo (BRENNAN et al., 2007; TRACEY & MANTYH, 2007).

Durante estes quadros patológicos, o processamento sensorial é anormal (BESSON, 1999). Estímulos que normalmente são percebidos como dolorosos produzem percepção exagerada de dor, isto é, hiperalgesia. Estímulos que normalmente são inócuos, tais como leve toque ou pequenas alterações na temperatura ambiente, produzem a sensação de dor, isto é, alodínia. A dor crônica difere da dor aguda não somente em relação ao seu caráter persistente, mas está, também, associada com alterações adaptativas, tais como à neuroplasticidade em vários níveis do sistema nervoso. As alterações plásticas causadas pela dor crônica podem envolver a sensibilização das fibras aferentes primárias, sensibilização de neurônios excitatórios, dessensibilização de neurônios inibitórios, reorganização do circuito neuronal do corno dorsal da medula e alterações na facilitação e inibição descendente da dor. Tendo em vista que estes eventos são dependentes da intensidade e da duração do estímulo, quanto mais persistente for o processo doloroso, mais difícil se torna o tratamento (BESSON, 1999; WANG & WANG, 2003; HUCHO & LEVINE, 2007).

### 3.2 Mecanismos envolvidos na transmissão da dor e nocicepção

A transmissão da dor envolve uma interação complexa de estruturas periféricas e centrais, desde a pele, vísceras e outros tecidos até o córtex cerebral. Um nervo periférico consiste em axônios de três diferentes tipos de neurônios: sensoriais primários, motores e pós-ganglionares simpáticos. As terminações livres de fibras aferentes primárias sensíveis à estímulos nocivos são chamados de nociceptores (ou receptores da dor) (MILLAN, 1999).

Os estímulos nocivos tais como calor, frio, compressão intensa, substâncias químicas endógenas ou exógenas ativam fibras aferentes sensoriais delgadas do tipo C e A $\delta$ . Além destas, outro tipo de fibra que pode estar envolvida na transmissão do estímulo sensorial são as fibras do tipo A $\beta$ , que normalmente respondem a estímulos inócuos aplicados à pele, porém em condições especiais são capazes de conduzir rapidamente o estímulo doloroso (30-100 m/s). As fibras A $\beta$  são mielinizadas e de grande diâmetro. Já as fibras do tipo A $\delta$ , de condução intermediária (12 a 30 m/s), são pobremente mielinizadas, enquanto as fibras do tipo C são não mielinizadas e transmitem o estímulo nociceptivo de forma mais lenta (0,5 a 2,0m/s) (JULIUS & BASBAUM, 2001).

As fibras aferentes primárias C e A $\delta$  transmitem a informação nociceptiva da periferia até o corno dorsal da medula espinhal, e suas terminações encontram-se principalmente nas lâminas I (zona marginal) e lâmina II (substância gelatinosa). No corno dorsal da medula espinhal neurônios de primeira ordem fazem sinapse com neurônios de segunda ordem cujos axônios cruzam a medula espinhal para ascender através do trato espinotalâmico chegando ao tálamo (ALMEIDA et al., 2004). No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios ao córtex somatosensorial, onde a localização do estímulo nocivo é realizada (discriminação do estímulo) ou ainda, podem emitir axônios ao giro cingulado anterior, onde é processado o componente emocional da dor (MILLAN, 1999; HUNT & MANTYH, 2001). Além de desempenhar importante papel na interpretação da informação nociceptiva ascendente, as estruturas supra-espinhais também estão envolvidas na modulação dos circuitos descendentes que controlam a dor. As vias descendentes

originam-se no tronco cerebral e outras estruturas como hipotálamo, córtex, tálamo, núcleo magno da rafe (NMR), substância cinzenta periaquedutal (PAG) e estruturas adjacentes da medula rostroventromedial (RVM), que exercem importante papel na integração e modulação das mensagens nociceptivas no corno dorsal da medula espinhal (MILLAN, 2002; VANEGAS & SCHAIBLE, 2004). Os mecanismos descendentes modulam a resposta nociceptiva por exercer suas ações em nociceptores presentes nas fibras aferentes primárias, bem como em neurônios intrínsecos do corno dorsal, como interneurônios excitatórios, interneurônios inibitórios e neurônios de projeção (MILLAN, 2002).

Uma das descobertas mais interessantes a respeito do circuito modulatório da dor é que este pode tanto facilitar quanto inibir a transmissão nociceptiva (JULIUS & BASBAUM, 1999; PORRECA et al., 2002). Por exemplo, na RVM estão presentes dois tipos de neurônios, as chamadas células “liga” (*on*) e as células “desliga” (*off*), as quais estão envolvidas na modulação nociceptiva. É proposto que as células “liga” (*on*) medeiam a facilitação da condução de estímulos nociceptivos quando ativadas, e as células “desliga” (*off*) medeiam a inibição da transmissão nociceptiva, provocada pela estimulação da substância cinzenta periaquedutal (PAG). De maneira geral, a substância cinzenta periaquedutal deve excitar as células *off* e inibir as células *on* na medula rostroventromedial (FIELDS et al., 2006). Logo, o balanço entre a ativação dessas duas subpopulações de neurônios determina a resposta a um estímulo nociceptivo periférico. No entanto, em situações de dor persistente, alterações na neuroplasticidade podem resultar em uma estimulação facilitatória sustentada, o que ocasiona respostas persistentes e exageradas à dor (REN & DUBNER, 2002; PORRECA et al., 2002).

Além da modulação descendente da informação nociceptiva envolver uma série de estruturas cerebrais, como mencionado anteriormente, os sistemas de neurotransmissores também estão envolvidos nesta conexão. Todos os neurotransmissores envolvidos na inibição descendente (tais como opióides endógenos, serotonina, noradrenalina) parecem inibir a excitação de neurônios de segunda ordem na presença de estímulo nocivo (FURST 1999; FIELDS, 2006).

O entendimento dos mecanismos envolvidos na transmissão do sinal doloroso tem progredido muito nos últimos anos, em grande parte devido a um aprimoramento na compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiologia das fibras aferentes e no processo de neurotransmissão no corno dorsal da medula espinhal.

Diversos mediadores têm sido propostos na gênese e transmissão da dor, tais como metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), peptídeos (bradicinina, CGRP, substância P), aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato) entre outros, são responsáveis pela multiplicidade de eventos que ocorrem durante a transmissão da dor, tanto no sistema nervoso periférico quanto no sistema nervoso central (FURST, 1999; MILLAN, 1999, HILL, 2001). Alguns mediadores atuam através da interação com receptores acoplados à proteína G, desencadeando a formação de segundos mensageiros, como o monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>), diacilglicerol (DAG), aumento de cálcio intracelular e ativação de canais iônicos. Outros mediadores da nocicepção podem ativar diretamente canais iônicos, os quais são capazes de alterar a permeabilidade da membrana celular à íons (DRAY & PERKINS, 1993; WOOLF & COSTIGAM, 1999; WOOLF & SALTER, 2000).

Evidências experimentais indicam que a nocicepção persistente decorrente de lesão tecidual e/ou a observada nos casos de processos inflamatórios envolve mecanismos complexos. Nestas situações encontra-se um quadro de estimulação constante dos nociceptores, o qual é responsável por alterações plásticas não somente no tecido nervoso periférico, mas também em nível central. A sensibilização dos nociceptores diminui o limiar de ativação e aumenta a probabilidade de que estes disparem com estímulos de menor intensidade (HOLDEN & PIZZI, 2003; SCHOLZ & WOOLF, 2002).

Na dor crônica, a alodínia pode ser causada também pela reorganização anatômica das fibras A $\beta$  (fibras de baixo limiar que detectam estímulos táteis inócuos). As terminações espinhais das fibras aferentes primárias A $\beta$  de baixo limiar normalmente se localizam em lâminas profundas do corno dorsal da medula, enquanto que as terminações de nociceptores se localizam principalmente em lâminas superficiais. A lesão de fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro ocasiona um brotamento de terminais das fibras A $\beta$  para a lâmina II. Desta forma, neurônios de segunda ordem na lâmina II da medula espinhal, que fazem sinapse exclusivamente com fibras de alto limiar, passam a ser ativados por estímulos inócuos (WOOLF & COSTIGAN, 1999; HILL, 2001). Em adição, a estimulação excessiva de fibras aferentes e o conseqüente aumento na produção e liberação de mediadores excitatórios na medula espinhal levam a uma redução do mecanismo inibitório devido à perda de interneurônios inibitórios opioidérgicos e gabaérgicos,

amplificando, ainda mais, o processo doloroso (MILLAN, 1999). Estas alterações periféricas e centrais geram um estado de hiperexcitabilidade da rota nociceptiva que contribui para o fenômeno comportamental da alodínia e hiperalgesia (WOOLF & COSTIGAM, 1999; WOOLF & SALTER, 2000; HUCHO & LEVINE, 2007).

Além disso, a dor pode estar associada a um processo inflamatório dependente da resposta do tecido a uma lesão celular. Neste processo ocorre uma cascata de eventos bioquímicos e celulares, que incluem o extravasamento plasmático, a ativação enzimática, a migração celular, a liberação de mediadores e o processo de reparo. Tanto células residentes no sítio da lesão (como fibroblastos, queratinócitos e mastócitos), quanto leucócitos recrutados para a região (como neutrófilos, macrófagos e linfócitos), podem causar liberação de mediadores que provocam sensibilização das fibras sensoriais. Essa sensibilização está claramente envolvida com as dores crônicas associadas aos processos inflamatórios (como na artrite, por exemplo) (WATKINS et al., 1995; MARCHAND et al., 2005).

### **3.3 Tratamento farmacológico da dor**

A dor é um problema de saúde pública e compostos com ação analgésica possuem um papel central no seu tratamento. Uma vez que a dor associada a diferentes condições patológicas representa o sintoma que mais causa sofrimento aos pacientes, diferentes abordagens terapêuticas têm sido utilizadas com o objetivo de atenuá-la, sendo a farmacoterapia a mais utilizada (BRENNAN et al., 2007; TRACEY & MANTYH, 2007).

Os opióides são os fármacos de mais antigo relato na literatura. Já no século VII a.C., encontram-se relatos sobre o suco (ópio) da papoula (*Papaver somniferum*). Contudo, somente em torno de 1806, o farmacêutico alemão Sertürner isolou o primeiro alcalóide ativo do ópio e chamou-o de morfina. Posteriormente, estudos relacionados aos diferentes efeitos adversos da morfina, bem como, o surgimento da nalorfina como antagonista opióide, levantaram a hipótese da existência de receptores de opióides (DUARTE, 2005).

Em 1973, Pert e Snyder confirmam a existência de receptores de opióides em membranas de cérebro de animais através de ensaios de ligação específica. Os

conhecimentos adquiridos sobre os receptores opióides representaram um grande progresso e induziram à descoberta dos ligantes endógenos.

Em 1975, Hughes isolou do cérebro de animais, uma substância endógena com propriedades similares às da morfina, a encefalina. Dentre os peptídeos endógenos, os mais conhecidos são as encefalinas (met-encefalina e a leu-encefalina), as endorfinas como a  $\beta$ -endorfina e as dinorfinas (dinorfina A e dinorfina B) (GUTSTEIN & AKIL, 2006).

É bem descrito na literatura que os opióides interagem com três principais tipos de receptores, chamados receptores opióides clássicos  $\mu$  ( $m\mu$ ),  $\delta$  (delta), e  $\kappa$  (kappa), que estão ligados, em nível molecular, à proteína Gi/o. Quando estes receptores são ativados por diversos agonistas, há inibição da adenil ciclase e redução do conteúdo intracelular de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC). Além disso, a ativação de receptores opióides reduz o influxo de cálcio e aumenta o efluxo de potássio, o que reduz a excitabilidade de neurônios envolvidos na transmissão da informação nociceptiva (DICKENSON & KIEFFER, 2006).

Até a atualidade, em relação às pesquisas realizadas com fármacos analgésicos de outros grupos farmacológicos, os opióides continuam sendo os mais potentes. Embora os opióides sejam importantes ferramentas para o alívio da dor, pois a morfina continua até os dias de hoje sendo o fármaco mais utilizado para o tratamento da dor intensa, possuem efeitos adversos que tornam seu uso clínico limitado (MERCADANTE, 1999). Dentre os efeitos adversos apresentados pelos analgésicos opióides, encontram-se a sedação, a depressão respiratória, a náusea, a constipação e, com o uso contínuo, o desenvolvimento da tolerância analgésica (COLLETT, 1998; JAGE, 2005).

Outra classe de analgésicos amplamente utilizados na clínica são os AINEs (BRUNE; HINZ, 2004; BRUNE, 2007). Os AINEs formam um grupo de diferentes fármacos, que freqüentemente não possuem semelhança química entre si, mas compartilham ações terapêuticas tais como ação analgésica, antiinflamatória e antipirética. O ácido acetilsalicílico (AAS) é o fármaco protótipo dos AINEs. A primeira síntese do AAS foi realizada por Gerhardt, em 1853, que obteve o AAS a partir do ácido salicílico, mas como não obteve inicialmente os resultados desejados, abandonou o projeto. Somente em 1899, Hoffmann retomou os trabalhos prévios de Gerhardt e desenvolveu estudos em animais, em um contexto industrial e,



posteriormente, em seres humanos, levando à comercialização do AAS sob o nome registrado de aspirina® (BRUNE & HINZ, 2004; GUTSTEIN & AKIL, 2006).

No entanto, o mecanismo de ação dos AINEs permaneceu incerto por muitos anos. Apesar do grande uso do AAS, só em 1971, quando Vane obteve a primeira evidência de que as propriedades analgésicas do AAS resultavam da inibição da síntese de importantes mediadores inflamatórios, as prostaglandinas (PGs), o mecanismo de ação dos AINEs tornou-se mais esclarecido.

Os AINEs inibem a enzima ciclooxigenase (COX) que catalisa a síntese de PGs a partir do ácido araquidônico. O ácido araquidônico é formado a partir de fosfolípídeos de membrana, pela ação da fosfolipase A2, e pode ser transformado em PGs, principalmente por duas isoformas de ciclooxigenases, a ciclooxigenase do tipo 1 (COX-1) e a ciclooxigenase do tipo 2 (COX-2). A COX-1 é expressa constitutivamente, enquanto que a COX-2 é a isoforma induzida da enzima em condições patogênicas, porém, é expressa constitutivamente em alguns tecidos (CORUZZI et al., 2007). Mais recentemente, foi relatado que outra variante da COX-1, a COX-3, está envolvida na transmissão da dor e da analgesia. Assim como a COX-1 e a COX-2, a COX-3 sintetiza prostaglandinas e desempenha um papel importante na dor e febre, mas parece não ter participação na gênese da dor inflamatória. A COX-3 é sensível aos AINEs que têm pouca ou nenhuma atividade sobre a COX-1 e a COX-2, como, por exemplo, o paracetamol (acetaminofeno) e dipirona (metamizol) (CHANDRASEKHARAN et al., 2002).

Entre os AINEs existem os inibidores não-seletivos da COX (inibem simultaneamente a COX-1 e COX-2, chamados de AINEs tradicionais), como diclofenaco, indometacina e ibuprofeno, e os inibidores seletivos da COX-2, como celecoxib e etoricoxib (SHI & KLOTZ, 2008).

O uso dos AINEs é limitado pela possibilidade de ocorrência de várias reações adversas. Muitas dessas reações estão relacionadas à inibição da síntese de PGs que também possuem importantes funções fisiológicas (BANKS, 1995; BOELSTERLI, 2003; WHITTLE, 2003). A inibição da síntese de PGE<sub>2</sub> e da PGI<sub>2</sub> pode resultar em lesão das mucosas gástrica e intestinal. Estas PGs induzem citoproteção gastrointestinal, pois reduzem a secreção ácida gástrica e aumentam a secreção de muco citoprotetor (CORUZZI et al., 2007).

Inicialmente foi sugerido que os inibidores seletivos da COX-2 não induzem as mesmas reações adversas, observadas durante o tratamento com os inibidores não

seletivos da COX, uma vez que a isoforma 2 da enzima seria induzida pelo processo inflamatório e não possuiria funções fisiológicas importantes (SEIBERT et al., 1994). Entretanto, foi demonstrada a expressão constitutiva do gene da COX-2 em alguns tecidos, como no cérebro e mucosa estomacal, onde a síntese de PGs medeia importantes funções fisiológicas (ZIMMERMANN et al., 1998; BRUNE, 2007). Como foi demonstrado em estudos clínicos, que o uso prolongado de inibidores seletivos da COX-2 pode aumentar o risco de ocorrência de doenças tromboembólicas, os medicamentos Vioxx® (rofecoxib) e Bextra® (valdecoxib) foram retirados do mercado em 2004 e 2005, respectivamente, pelas indústrias farmacêuticas que os produziam (MUKHERJEE et al., 2001; FITZGERALD, 2003; SHI & KLOTZ, 2008).

Os AINEs dividem-se ainda, em outra subclasse, os chamados AINEs atípicos, representados pelo paracetamol e pela dipirona. Os AINEs atípicos, embora produzam ação analgésica e antipirética similar aos demais AINEs, possuem baixa atividade antiinflamatória (TATSUO et al., 1994; CAMU & VANLERSBERGHE, 2002; MCQUAY & MOORE, 2006). Além disso, os AINEs atípicos não compartilham igualmente dos efeitos adversos dos AINEs tradicionais. De fato, o potencial ulcerogênico da dipirona em ratos e humanos é menor que o relacionado a outros AINEs tradicionais, tais com o AAS e o diclofenaco (ANDRADE et al., 1998; SANCHEZ et al., 2002).

A dipirona é um AINE atípico, pertencente à classe dos pirazóis (WILLIAMS et al., 1999; GÜRSOY et al., 2000). Os pirazóis são drogas de origem sintética, que possuem em sua estrutura química o anel pirazólico, caracterizado por um heterociclo com dois átomos de nitrogênio e três átomos de carbono, o qual possui papel vital na sua efetividade biológica (WILLETTE, 1977; WILLIAMS et al., 1999) (Figura 1).

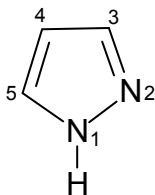


Figura 1 – Estrutura química do pirazol

Os pirazóis foram descobertos em 1882, pelo químico alemão Ludwig Knorr, que obteve a antipirina (fenazona), o primeiro derivado pirazol utilizado no tratamento da dor e inflamação. Entretanto, somente em 1921, com a obtenção da dipirona (Figura 2), os compostos pirazóis ganharam credibilidade (WILLETTE, 1977).

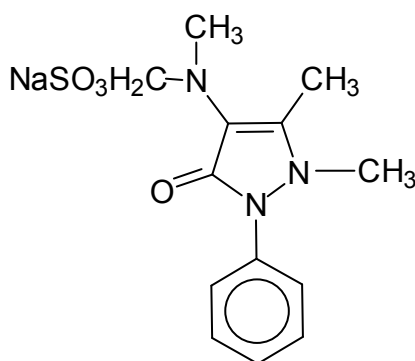


Figura 2 - Estrutura química da dipirona

A dipirona foi introduzida na prática clínica em 1922, e até os dias de hoje é utilizada em vários países, como Espanha, Rússia, México e Brasil, devido a seu baixo custo e boa atividade analgésica e antipirética (BRUNE & HINZ, 2004; MCQUAY & MOORE, 2006). Contudo, o uso de dipirona foi proibido nos EUA devido a relatos que associam seu uso com a incidência de agranulocitose. Entretanto, estudos epidemiológicos sugerem que a incidência de agranulocitose com o uso de dipirona é rara (um caso por milhão de tratamentos) e o risco de mortalidade relacionado ao uso da dipirona é comparável ao do analgésico paracetamol, e bem menor, quando comparado com os analgésicos AAS e diclofenaco (ANDRADE et al., 1998; IBANEZ et al., 2005).

Embora seja amplamente confirmada a eficácia analgésica da dipirona, o seu mecanismo de ação ainda não está bem estabelecido. Estudos demonstram que esta pirazolona se difere dos demais AINEs, podendo exercer seu efeito antinociceptivo por diferentes mecanismos centrais e periféricos. Enquanto alguns autores sugerem que a ação antinociceptiva da dipirona pode estar relacionada à inibição de ciclooxigenases (SHIMADA et al., 1994; CAMPOS et al., 1999; CHANDRASEKHARAN et al., 2002; PIERRE et al., 2007), outros diferentes mecanismos, relacionados à modulação da via do óxido nítrico/guanosina monofosfato cíclica (GMPc) (DUARTE et al., 1992), canais de potássio (ALVES & DUARTE, 2002), sistema opióide ou receptores glutamatérgicos também são sugeridos (AKMAN et al., 1996; BEIRITHI et al., 1998; VASQUEZ et al., 2005).

Em adição, estudos eletrofisiológicos demonstram que a administração de metamizol na PAG ativa o sistema descendente inibitório e diminui a excitabilidade de fibras C, produzindo antinocicepção no teste da retirada de cauda (CARLSSON et al., 1986; HERNÁNDEZ & VANEGAS, 2001). Além disso, Tortorici, Vasquez e Vanegas (1996) verificaram o envolvimento de células *on-off* (liga-desliga) na antinocicepção da dipirona, baseados na concordância temporal entre ativação e inibição destas células com a ocorrência de analgesia. Os autores verificaram que a microinjeção de dipirona na PAG causa inibição de células *on* e ativação de células *off* com concomitante aumento do tempo de latência para a retirada de cauda, sendo este efeito inibido pela microinjeção de naloxona.

Outro exemplo de AINE, amplamente utilizado, é o pirazol trifluor substituído celecoxib (Figura 3).

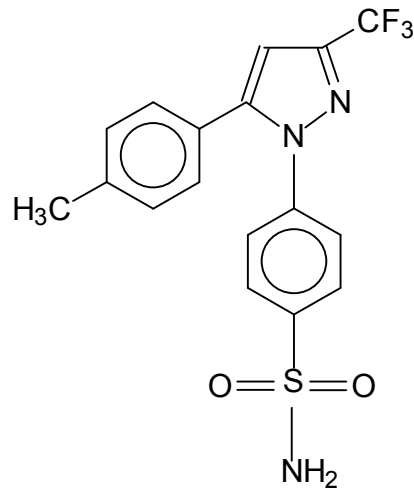


Figura 3 - Estrutura química do celecoxib

O celecoxib foi aprovado pelo US *Food and Drug Administration* (FDA), em 31 de dezembro de 1998, e também possui efeito antiinflamatório, analgésico e antipirético. O celecoxib foi o primeiro inibidor seletivo da COX-2 aprovado para tratar a artrite reumatóide, sendo melhor tolerado pelo trato gastrointestinal que outros AINEs (BLOBAUM & MARNETT, 2007).

Mais recentemente, uma terceira classe de fármacos tem sido utilizada, alternativamente, como analgésicos, os chamados adjuvantes analgésicos. Nesta classe encontram-se os antidepressivos e os anticonvulsivantes, os quais são utilizados quando os pacientes não respondem satisfatoriamente ao tratamento com analgésicos convencionais (KESKINBORA et al., 2007).

### 3.4 A busca por novos pirazóis para o tratamento farmacológico da dor e nocicepção

A busca por novas moléculas analgésicas estruturalmente simples, que aliem alta eficácia e menos efeitos colaterais, é o principal objetivo da pesquisa no campo da dor e analgesia (COCCO et al., 2003).

Novos compostos contendo o núcleo pirazólico têm sido sintetizados e avaliados biologicamente. Na literatura verifica-se uma grande variedade de

diferentes efeitos biológicos apresentados por pirazóis inéditos, tais como, atividade antipirética, antimicrobiana, antidepressiva, anticonvulsivante, antinociceptiva e antiinflamatória (DE SOUZA et al., 2002; BEKHIT & ABDEL, 2004; BONACORSO et al., 2007; OZDEMIR et al., 2007; AMIR et al., 2008; RAMANA-REDDY et al., 2008).

Estudos realizados em modelos animais demonstram que compostos contendo o núcleo pirazólico apresentam atividade antinociceptiva em modelos de nocicepção induzida por estímulo químico (MATHEUS et al., 1991; GÜRSOY et al., 2000; DE SOUZA et al., 2001; GODOY et al., 2004), térmico (OCHI et al., 1999a; TABARELLI et al., 2004) e mecânico (OCHI & GOTO, 2000a, b).

Dentre a ampla variedade de novos pirazóis encontrados na literatura, um dos mais estudados e avaliados pré-clinicamente em relação a sua atividade antinociceptiva e antiinflamatória é o FR140423 (3-(difluormetil)-1-(4-metoxifenil)-5-[4-metilsulfinil] fenil] pirazol (Figura 4).

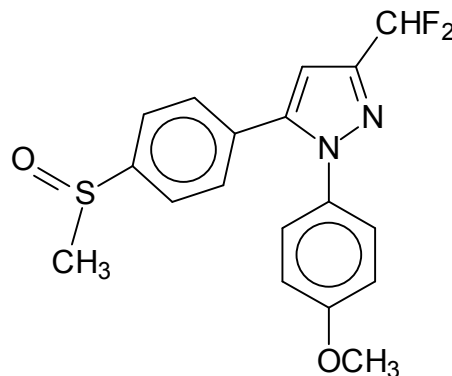


Figura 4 - Estrutura química do FR140423 (3-(difluormetil)-1-(4-metoxifenil)-5-[4-metilsulfinil] fenil] pirazol

O FR140423 é cerca de 150 vezes mais potente em inibir a COX-2 do que a COX-1. Além disso, a administração oral de FR140423 diminui o edema induzido por carragenina e adjuvante de artrite, sendo duas vezes mais potente do que a indometacina, porém, diferente desta, não induz lesão gástrica após tratamento agudo em ratos. No mesmo estudo, similarmente a morfina, FR140423 teve atividade antinociceptiva em modelo de dor induzida por estímulo térmico, o qual foi revertido pelo pré-tratamento dos animais com naloxona (antagonista não seletivo de receptor opióide) (OCHI et al., 1999 a).

O FR140423 induz antinocicepção em modelo de dor induzida por estímulo mecânico, sendo este efeito revertido por naltrindol (antagonista de receptor  $\delta$ ), mas não

por naloxonazina (antagonista de receptor  $\mu$ ) e norbinaltorfimina (antagonista de receptor  $\kappa$ ). Entretanto, em ensaio de ligação específica, realizado com membranas de medula espinhal de camundongos, FR140423 não se liga a nenhum receptor opióide (OCHI et al., 1999b).

Posteriormente, Ochi et al. (2000) verificaram que a ação antinociceptiva do FR140423 é revertida pela administração intratecal de um antagonista do receptor para a quiotorfina (um dipeptídeo endógeno liberador de Met-encefalina), sugerindo que a antinocicepção mediada por FR140423 é realizada de maneira indireta, pela liberação de Met-encefalinas. Em adição, o efeito antinociceptivo do FR 140423 parece envolver a participação de receptores espinhais noradrenérgicos  $\alpha_2$  e receptores serotoninérgicos  $5HT_3$  e  $5HT_{2A}$  (OCHI & GOTO, 2000a,b).

O FR140423 administrado por via oral, possui atividade antiinflamatória em modelo de inflamação crônica em ratos com artrite. De fato, FR140423 diminuiu os níveis de  $PGE_2$  na pata inflamada e na pata contralateral de animais injetados com Adjuvante Completo de Freund (ACF), após tratamento crônico (OCHI & GOTO, 2000). Além disso, FR140423 possui efeito antinociceptivo na hiperalgesia mecânica induzida em modelo de dor pós-operatória em ratos, o qual é revertido por naltrindol, mas não por naloxonazina e norbinaltorfimina (OCHI et al., 2003).

Tendo em vista a necessidade de obtenção de novos compostos analgésicos, e considerando os vários estudos que confirmam a efetividade biológica dos pirazóis, evidencia-se que a busca por novas moléculas contendo o núcleo pirazólico é promissora.

Neste sentido, o laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia (LABNEURO), em parceria com o Núcleo de Química de Heterocíclis (NUQUIMHE) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), vem buscando obter novos compostos com atividade biológica. Várias moléculas já foram investigadas pelo grupo, dentre elas, alguns compostos destacaram-se pelo seu potencial antinociceptivo e antiinflamatório em modelos animais.

De Souza et al. (2001) verificaram que a administração subcutânea do 3-metil-5-hidroxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazolcarboxiamida (MPCA) (Figura 5) induziu antinocicepção na fase neurogênica e inflamatória do teste da formalina em camundongos. Porém, MPCA não apresentou efeito antinociceptivo no teste da imersão da cauda em água, nem atividade antiedematogênica no teste de edema de pata induzido por carragenina.

No teste das contorções abdominais MPCA e seu análogo 3-fenil-5-hidroxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1H-pirazolcarboxiamida (FPCA) apresentaram efeito antinociceptivo, o qual foi revertido pela administração intratecal de metisergida e ioimbina, sugerindo que receptores serotoninérgicos e adrenérgicos  $\alpha_2$  espinhais estão envolvidos na sua antinocicepção (GODOY et al., 2004) (Figura 5).

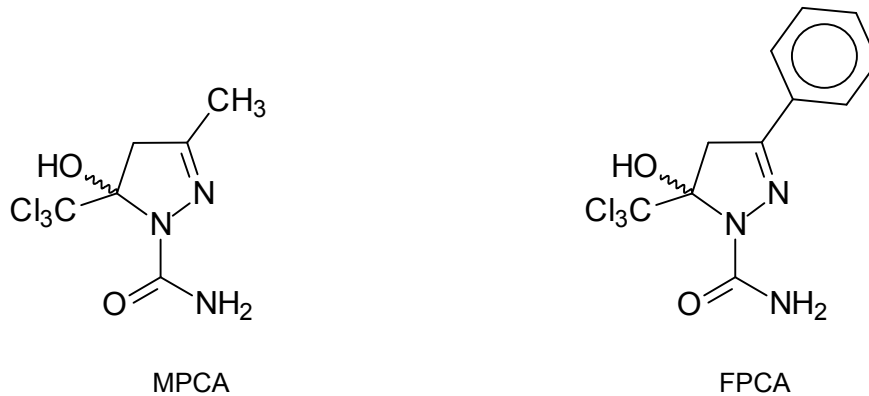


Figura 5 - Estrutura química do 3-metil-5-hidroxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1H-1-pirazolcarboxiamida (MPCA) e 3-fenil-5-hidroxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1H-pirazolcarboxiamida (FPCA)

Em concordância com MPCA, o pirazol inédito 2-[5-triclorometil-5-hidroxi-3-fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-il]-4-(4-bromofenil)-5-metil tiazol (B50) (Figura 6), não apresentou efeito antinociceptivo no teste da imersão da cauda em água, porém apresentou ação antinociceptiva no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, o qual foi revertido por naloxona (PROKOPP et al., 2006).



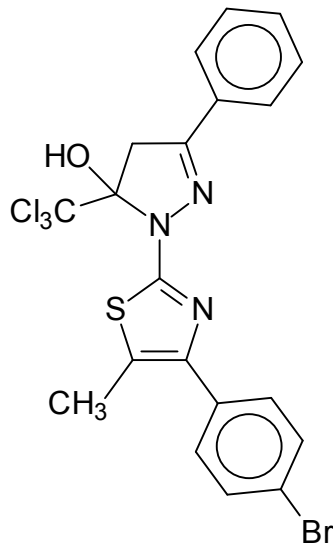


Figura 6 - Estrutura química do 2-[5-triclorometil-5-hidroxi-3-fenil-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-il]-4-(4-bromofenil)-5-metil tiazol (B50)

Ao contrário de MPCA e FPCA, o pirazol inédito 3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1-metil-1*H*-pirazol (PZ2) e seu análogo 3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1-fenil-1*H*-pirazol (PZ3) (Figura 7) causaram antinocicepção no teste da imersão da cauda, sendo o efeito de PZ3 revertido por naloxona (TABARELLI et al., 2004).

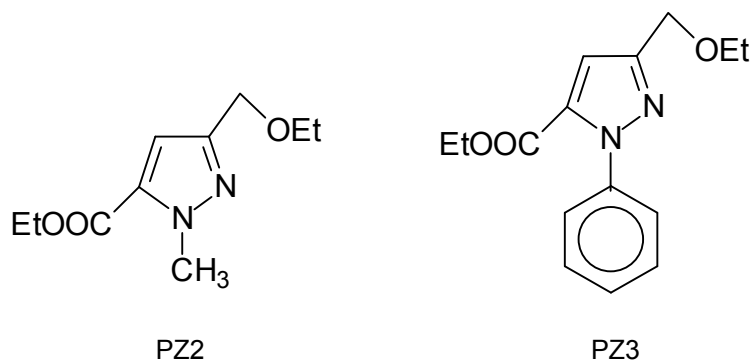


Figura 7 - Estrutura química do 3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1-metil-1*H*-pirazol (PZ2) e 3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1-fenil-1*H*-pirazol (PZ3)

Recentemente a ação antinociceptiva e antiinflamatória de uma série de novos 5-hidroxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-carboxiamidapirazóis substituídos têm sido avaliadas (SAUZEM et al., 2007). Neste estudo, os autores verificaram que os compostos inéditos avaliados foram efetivos em inibir a nocicepção neurogênica e inflamatória no teste da formalina em camundongos. Além disso, os compostos que apresentaram maior ação antinociceptiva no teste da formalina (Figura 8), também apresentaram ação antiedematogênica no teste de edema de pata induzido por carragenina. Porém, nenhum dos compostos avaliados apresentou ação antinociceptiva no teste da placa-quente.

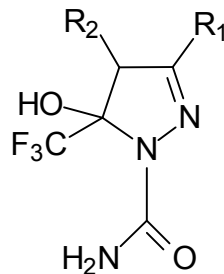


Figura 8 - Estrutura química geral de novos 5-hidroxi-5-trifluormetil-4,5- diidro-1*H*-1- carboxiamidapirazóis substituídos (R1/R2 = Et/H e H/Me)

## **4 ARTIGO E MANUSCRITO CIENTÍFICOS**

Os resultados inseridos nesta tese apresentam-se sob a forma de artigo e manuscrito científicos, os quais se encontram aqui estruturados. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no artigo e no manuscrito. O artigo está disposto na mesma forma que foi publicado na edição da revista científica. No caso do manuscrito, está disposto da mesma maneira que foi submetido à revista Life Sciences, na primeira versão original.

### **4.1 Artigo: Antinociceptive effect of novel trihalomethyl-substituted pyrazoline methyl esters in formalin and hot-plate tests in mice**

Julie Milano, Sara Marchesan de Oliveira, Mateus F. Rossato, Patricia Dutra Sauzem, Pablo Machado, Paulo Beck, Nilo Zanatta, Marcos A.P. Martins, Carlos F. Mello, Maribel A. Rubin, Juliano Ferreira\*, Helio G. Bonacorso

European Journal of Pharmacology, 581, 86-96, 2008

# Antinociceptive effect of novel trihalomethyl-substituted pyrazoline methyl esters in formalin and hot-plate tests in mice

Julie Milano<sup>a</sup>, Sara M. Oliveira<sup>a</sup>, Mateus F. Rossato<sup>a</sup>, Patricia D. Sauzem<sup>a</sup>, Pablo Machado<sup>b</sup>, Paulo Beck<sup>b</sup>, Nilo Zanatta<sup>b</sup>, Marcos A.P. Martins<sup>b</sup>, Carlos F. Mello<sup>c</sup>, Maribel A. Rubin<sup>a</sup>, Juliano Ferreira<sup>a,\*</sup>, Helio G. Bonacorso<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia, Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Brazil

<sup>b</sup> Núcleo de Química de Heterociclos (NUQUIMHE), Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

Received 5 May 2007; received in revised form 10 November 2007; accepted 21 November 2007

Available online 10 January 2008

## Abstract

The aim of the present study was to evaluate the antinociceptive potential of four novel pyrazoline methyl ester compounds on chemical and thermal models of pain in mice. The following 5-trihalomethylated-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole methyl ester compounds were tested: 3-methyl-5-trifluoromethyl-(MPF3), 4-methyl-5-trifluoromethyl-(MPF4), 3-methyl-5-trichloromethyl-(MPC13) and 4-methyl-5-trichloromethyl-(MPC14). MPF3, MPF4, MPC13 and MPC14 (0.03–1.0 mmol/kg) given intraperitoneally decreased neurogenic and inflammatory phases of nociception in the formalin test. Moreover, MPF3, MPF4, MPC13, MPC14 (0.1–1.0 mmol/kg) and dipyrone (1.5 mmol/kg) also produced a dose-dependent antinociceptive effect in the hot-plate test. However, MPF3, MPF4, MPC13 and MPC14 did not impair motor coordination in the rotarod test or spontaneous locomotion in the open field test. The antinociceptive effect of MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p.) was reversed by the opioid receptor antagonist naloxone (2 mg/kg, i.p.), but not by the  $\alpha_2$ -adrenergic receptor antagonist yohimbine (0.15 mg/kg, i.p.) or by *p*-chlorophenylalanine ethyl ester (PCPA, 300 mg/kg, i.p.) treatment. In contrast to morphine (5 mg/kg, i.p.), MPF4 given daily for up to 8 days did not generate a tolerance to its antinociceptive effect. However, similar to morphine (11 mg/kg, i.p.), MPF4 reduced gastrointestinal transit in mice. Taken together these results demonstrate that these novel pyrazoline methyl esters tested may be promising prototypes of additional mild analgesics.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Antinociception; Pyrazoline methyl ester derivatives; Hot-plate; Formalin test

## 1. Introduction

Pain is one of the most prevalent conditions that limits productivity and diminishes quality of life. Although there is an arsenal of effective and widely used analgesics, there is some concern regarding their safety and side-effects, making their clinical use problematic (Jage, 2005; Whittle, 2003).

Compounds incorporating the pyrazole ring, a heterocycle containing two contiguous nitrogen and three carbon atoms in moiety, have attracted a great deal of research interest, because of their therapeutic utility as molecular scaffolds for drugs (Gürsöy et al., 2000). Some compounds bearing the pharmacophoric pyrazole group have been reported to possess several biological

activities, including antimicrobial (Bekhit and Abdel-Azien, 2004), antineoplastic (Cheng et al., 1986) anti-inflammatory (Ochi et al., 1999a) and antinociceptive activities (Matheus et al., 1991; Ochi et al., 1999a,b).

Dipyrone (metamizol) is a drug that belongs to the pyrazole-derived family. Reports in the literature have shown that dipyrone, although generally considered as belonging to the nonsteroidal anti-inflammatory drug family, seems to not present the typical side effects of this drug class (Camu and Vanlersberghe, 2002). It is widely used in clinical therapy in some European, African and Latin American countries due to its low cost and effectiveness as an analgesic and antipyretic (Edwards et al., 2001; McQuay and Moore, 2005).

Indeed, our group has been investigating the possible pharmacological potential of new molecules that contain a pyrazole scaffold (De Souza et al., 2001; Godoy et al., 2004; Souza et al.,

\* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8053; fax: +55 55 3220 8756.

E-mail address: [ferreira99@gmail.com](mailto:ferreira99@gmail.com) (J. Ferreira).

2002; Tabarelli et al., 2004). The lead-like compound 3-methyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-4, 5-dihydro-1*H*-1-carboxamide-pyrazole (MPCA) causes antinociceptive and antipyretic activity without altering locomotor performance in mice (De Souza et al., 2001; Souza et al., 2002). Godoy et al. (2004) have reported that spinal noradrenergic and serotonergic systems are involved in the antinociception induced by MPCA. Based on our previous findings, we believe that the biological evaluation of new bioactive molecules that contain a pyrazole nucleus is important for the creation of promising new analgesics. Therefore, the aim of the present study was to investigate the antinociceptive effect of four novel pyrazoline methyl esters, assessed by chemical (formalin test) and thermal (hot-plate) models of nociception in mice.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Drugs

The novel trihalomethylated pyrazoline methyl esters, 3-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoline methyl ester (MPF3), 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoline methyl ester (MPF4), 3-methyl-5-trichloromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoline methyl ester (MPCl3) and 4-methyl-5-trichloromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoline methyl ester (MPCl4) (Fig. 1) were synthesized according to Martins et al. (2006). Analysis of <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with the assigned structure. Compounds MPF3, MPF4, MPCl3 and MPCl4 were suspended in rice oil and dipyrone (Hoechst, São Paulo, Brazil) was diluted in saline (0.9% NaCl). The maximum dose of the pyrazoline methyl ester derivative achievable in a homogeneous suspension was 1.0 mmol/kg. Clonidine hydrochloride and morphine sulphate (Cristália, São Paulo, Brazil) were dissolved in saline (0.9% NaCl), while yohimbine hydrochloride and naloxone hydrochloride were dissolved in 0.1% ethanol plus saline and *p*-chlorophenylalanine ethyl ester hydrochloride (purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) was dissolved in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4). Active dry charcoal and arabic gum were suspended in saline solution. All other reagents were of analytical grade and were purchased from local suppliers.

### 2.2. Animals

Three-month-old male albino Swiss mice (30–40 g) bred in our animal house were used. Animals were housed at controlled temperature (22±2 °C) with a 12 h-light/dark cycle and with standard lab chow and tap water *ad libitum*. The animals were habituated to the experimental room for at least 2 h before the experiments. Each animal was used only once. The experiments reported in this study were carried out in accordance with current ethical guidelines for the investigation of experimental pain in conscious animals (Zimmermann, 1983). The numbers of animals and intensities of noxious stimuli used were the

minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the drug treatments.

### 2.3. Formalin test

The formalin test was carried out as previously described (De Souza et al., 2001). Twenty microliters of a 1.5% formalin solution (v/v) in distilled water were subcutaneously injected into the dorsal surface of the right hindpaw of the mice. Immediately after the formalin injection, the animals were individually placed in an observation chamber made of glass with a transparent floor. Beneath the floor a mirror was mounted at a 45 °C angle to allow clear observation of the paws of the animals. The time (in seconds) that the animal spent licking the injected paw was recorded for 30 min in 5-min intervals. Two distinct phases of intensive licking activity have been identified. The early phase (first 5 min) seems to be caused predominantly by C-fibre activation due to the peripheral stimulus caused by formalin (Tjolsen et al., 1992). A second burst of licking behaviour occurs after 15 to 30 min and seems to be related to the inflammatory response elicited by formalin. This phase is termed inflammatory (Hunnskaar and Hole, 1987). Vehicle or pyrazoline methyl esters MPF3, MPF4, MPCl3, MPCl4 (at doses of 0.03; 0.1; 0.3 and 1.0 mmol/kg) were intraperitoneally injected 15 min before the formalin injection into the paw. The doses of 0.03, 0.1, 0.3 and 1.0 mmol/kg of MPF3 or MPF4 are equivalent to 6.8, 22.6, 68 and 226 mg/kg, respectively. The doses of 0.03, 0.1, 0.3 and 1.0 mmol/kg of MPCl3 or MPCl4 are equivalent to 8.2, 27.2, 82 and 274 mg/kg, respectively.

### 2.4. Hot-plate test

The hot-plate test was carried out according to the method previously described (Ferreira et al., 2002). In these

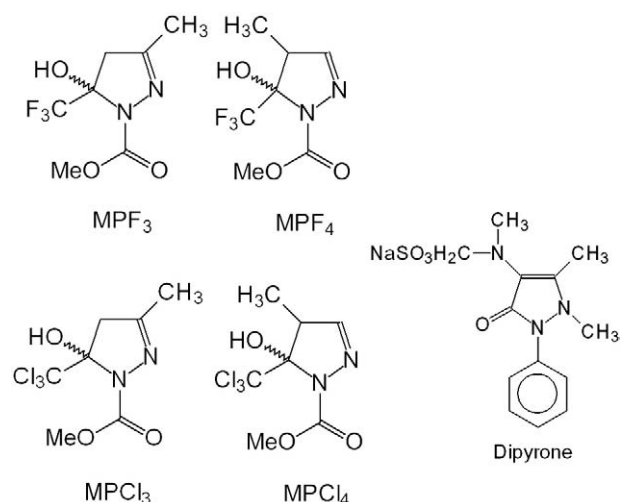


Fig. 1. Structures of the novel trihalomethylated pyrazoline methyl esters, 3-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoline methyl ester (MPF3), 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoline methyl ester (MPF4), 3-methyl-5-trichloromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoline methyl ester (MPCl3) and 4-methyl-5-trichloromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoline methyl ester (MPCl4) and dipyrone.

experiments, the hot-plate (Socrel, model-DS 37) apparatus was maintained at  $50 \pm 0.1$  °C. Animals were placed into an acrylic cylinder (20 cm in diameter) on the heated surface, and the time (in seconds) between placement and licking of their hindpaws or jumping (whichever occurred first), was recorded as the response latency. A 90-s cut-off was used to prevent tissue damage. Twenty-four hours before the experiment, all mice were habituated to the experimental procedure (intraperitoneal

injection of vehicle and measurement of latency) in order to minimize novelty-induced antinociception (Siegfried et al., 1987). Animals presenting training latencies higher than 30 s were excluded. On the day of the experiment, the animals were intraperitoneally (i.p.) injected with vehicle (rice oil or saline, 10 ml/kg), dipyrone (1.5 mmol/kg, which was included in all experiments as an internal standard) or pyrazoline methyl ester MPF3, MPF4, MPC13 or MPC14 (0.1–1.0 mmol/kg) and

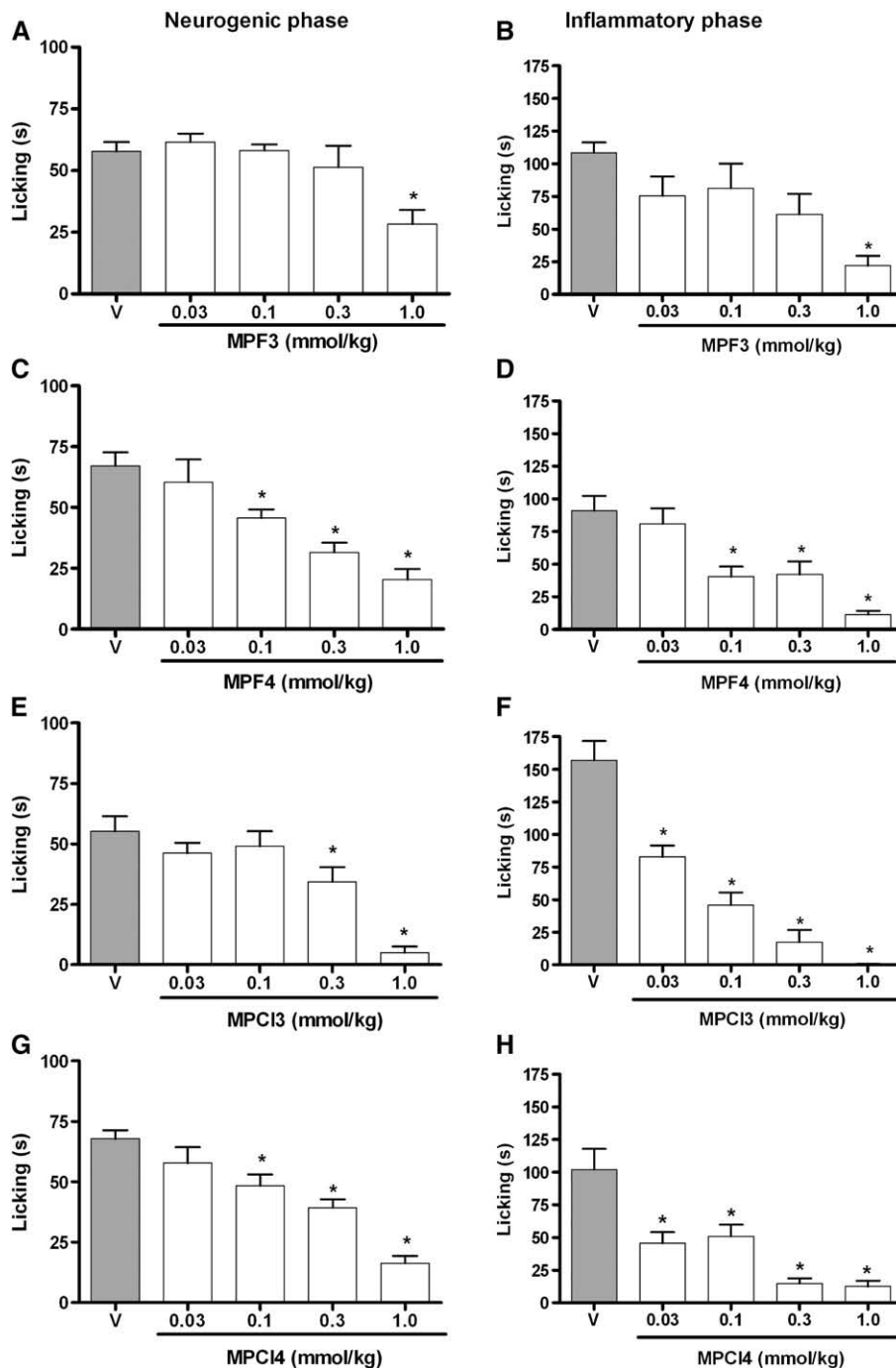


Fig. 2. Effect of MPF3 (A and B), MPF4 (C and D), MPC13 (E and F) and MPC14 (G and H) (0.03–1.0 mmol/kg, i.p.) on the time spent licking during the neurogenic (A, C, E and G) and inflammatory (B, D, F and H) phases of the formalin test in mice. Data are reported as mean  $\pm$  SEM for  $n=7-15$  per group. \* $P < 0.05$ , compared to vehicle group (V) (SNK test).

subjected to the hot-plate test 15, 30 and 60 min thereafter. The dose of dipyron was selected in pilot experiments.

### 2.5. Assessment of some mechanisms involved in antinociceptive activity

In order to investigate the participation of the opioid system in the antinociceptive effect of pyrazoline methyl ester MPF4, mice were pre-treated with naloxone (2 mg/kg, i.p., an opioid receptor antagonist) or its vehicle (10 ml/kg, i.p., 0.1% ethanol plus saline). After 15 min, the animals received an injection of morphine (5 mg/kg, i.p., an opioid receptor agonist), MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p.) or their vehicles (10 ml/kg, i.p., saline or rice oil) and were subjected to the hot-plate test, as described above, after 30 min. Another group of animals received a combination of MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p.) and morphine (5 mg/kg, i.p.).

To examine the possible participation of the  $\alpha_2$ -adrenergic mechanism in the antinociception effect of pyrazoline methyl esters, the animals were pre-treated with yohimbine (0.15 mg/kg, i.p., an  $\alpha_2$ -adrenoreceptor antagonist) or its vehicle (10 ml/kg, i.p., 0.1% ethanol plus saline). After 15 min, the animals received clonidine (0.1 mg/kg, i.p., an  $\alpha_2$ -adrenoreceptor agonist), pyrazoline methyl ester MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p.) or their vehicles (10 ml/kg, i.p., saline or rice oil) and 30 min later were subjected to the hot plate test, as described above. To investigate the possible role of endogenous serotonin in the antinociceptive effect of MPF4, the animals were pre-treated with *p*-chlorophenylalanine ethyl ester (PCPA, 300 mg/kg, i.p., an inhibitor of serotonin synthesis) or with vehicle (10 ml/kg, i.p., PBS buffer), once a day, for 3 consecutive days. On the 4th day, the animals received an injection of dipyron (1.5 mmol/kg, i.p.), MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p.) or their vehicles (10 ml/kg, i.p., saline or rice oil), and 30 min later were subjected to the hot-plate test.

The choice of the dose of agonists, antagonists or inhibitors and their treatment times were based on previous data described in the literature (Dailly et al., 2006; Miranda et al., 2003; Otuki et al., 2005; Tabarelli et al., 2004;) or on preliminary experiments carried out in our laboratory (data not shown).

### 2.6. Induction of tolerance and cross tolerance

The possible development of tolerance to the antinociceptive effect of MPF4 was evaluated by treating animals that received morphine (5 mg/kg, i.p.), MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p.) or their vehicles (10 ml/kg, i.p., saline or rice oil) with a repetitive administration over an 8-day period before the hot-plate test. The animals received one injection per day at 11:00 AM for 8 consecutive days. The hot-plate test was performed 30 min after the first and eighth injection. Control groups receiving saline or rice oil were also tested.

To evaluate the possible development of cross-tolerance between morphine and MPF4, morphine (5 mg/kg, i.p.) or MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p.) were administered to animals pre-treated with morphine, MPF4 or vehicles (10 ml/kg, i.p., saline or rice oil) and the antinociceptive effects were evaluated 30 min later in the hot-plate test, as described previously (Ferreira et al., 2000).

### 2.7. Gastrointestinal transit

To test the possible effect of MPF4 on the gastrointestinal transit, the mice fasted for 18 h, after which the gastrointestinal transit was analysed, as described previously (Santos et al., 1999). The animals were treated with MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p.), dipyron (1.5 mmol/kg, i.p.), morphine (11 mg/kg, i.p.) or vehicles (10 ml/kg, i.p., rice oil or saline). Thirty minutes later, a standard charcoal meal (0.3 ml) was given to the mice by gavage. Twenty minutes after administration of the charcoal meal, the animals were euthanized and their stomachs and small intestines were removed to measure the length of the intestine (from the pyloric sphincter to the ileo-caecal junctions) and the distance travelled by the charcoal meal. Propulsive activity of the gut was determined by calculating the percentage of gastrointestinal transit, i.e., the distance travelled by the charcoal meal divided by the total length of the small intestine, multiplied by 100. In addition, naloxone (2.5 mg/kg, i.p.) was administered 15 min before morphine or MPF4 to study its influence on gastrointestinal transit.

### 2.8. Rotarod test

The effect of the compounds on locomotor performance was tested on the rotarod apparatus as described previously (Godoy et al., 2004). 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, five minutes after the second measurement of latency on the hot plate (35 min after i.p. injection of vehicle, dipyron or pyrazoline methyl esters) each mouse was tested in the rotarod. The latency to fall and the number of falls from the apparatus were recorded with a stopwatch for up to 240 s.

### 2.9. Open-field test

The effect of the compounds on spontaneous locomotor activity and exploratory behaviour was assessed by the open-field test, as previously reported by Tabarelli et al. (2004). The apparatus was a round arena (34 cm in diameter) with the floor divided into 21 equal areas. Immediately after the rotarod evaluation (40 min after i.p. injection of vehicle or dipyron or the pyrazoline methyl esters), each animal was transferred to the apparatus and observed for 5 min. The number of areas crossed

Table 1  
ID<sub>50</sub> and inhibition values of pyrazoline methyl esters on formalin test in mice

| Treatment | Neurogenic phase                        |                             | Inflammatory phase                      |                             |
|-----------|---|-----------------------------|---|-----------------------------|
|           | ID <sub>50</sub> (mmol/kg) <sup>a</sup> | Inhibition (%) <sup>b</sup> | ID <sub>50</sub> (mmol/kg) <sup>a</sup> | Inhibition (%) <sup>b</sup> |
| MPF3      | ≈ 1                                     | 51.0±10.0                   | 0.33 (0.16–0.70)                        | 79.8±6.9                    |
| MPF4      | 0.29 (0.10–0.89)                        | 69.7±6.4                    | 0.15 (0.09–0.24)                        | 87.3±3.2                    |
| MPC13     | 0.36 (0.21–0.61)                        | 90.9±4.5                    | 0.04 (0.03–0.05)                        | 99.7±0.2                    |
| MPC14     | 0.34 (0.24–0.48)                        | 75.8±4.3                    | 0.08 (0.06–0.13)                        | 87.7±4.1                    |

<sup>a</sup> Data are expressed as mean followed by the 95% confidence intervals.

<sup>b</sup> Inhibition of the nociceptive effect obtained with 1.0 mmol/kg. Data are expressed as mean±SEM.



with all paws, number of rearing responses and total time spent immobilized (immobility) were recorded.

### 2.10. Statistical analyses

The results were expressed as mean  $\pm$  SEM. ID<sub>50</sub> values (i.e. the dose of compounds that reduces nociceptive responses to the order of 50% relative to the control value) were reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. Data were analysed by one or two way analysis of variance (ANOVA) when appropriate. Dose-response curves in the hot-plate test were analysed by two-way ANOVA with time treated as a within-subject factor. Post hoc tests (Student-Newman-Keuls test-SNK) were carried out when appropriate. The level of significance was set at  $P < 0.05$  and  $F$  values are presented in the text only when  $P < 0.05$ . To verify whether the antinociceptive effect of the tested compounds was dose-dependent, we partitioned the sum of squares into trend components (linear, quadratic or cubic). We considered effects as dose-dependent only when analysis revealed a significant linear trend ( $P < 0.05$ ). For reversion data in antinociceptive and gastrointestinal transit mechanisms,  $F$  values presented in the text are demonstrated by pre-treatment versus treatment interaction.

The percent of antinociception (i.e. % increased latency time to licking their hind paws or jumping from hot-plate test) was determined for each experimental group using the following

formula: (%) antinociception =  $100 \times [(\text{experiment} - \text{control}) / \text{control}]$ . The percent of maximal inhibition in the formalin test was determined for each experimental group using the following formula: (%) inhibition =  $100 \times [(\text{control} - \text{experiment}) / \text{control}]$ . The ID<sub>50</sub> values were determined by non-linear regression analysis using a sigmoidal dose-response equation of individual experiments using GraphPad Software 4.0 (GraphPad, USA).

## 3. Results

### 3.1. Evaluation of the antinociceptive effect in the formalin test

The systemic administration of MPF3 (1.0 mmol/kg) produced antinociception in both the neurogenic [ $F(4,37) = 6.13, P < 0.001$ ] and inflammatory [ $F(4,37) = 6.99, P < 0.001$ ] phases of the formalin test (Fig. 2A and B). The ID<sub>50</sub> and maximal inhibition values obtained are shown in Table 1.

Intraperitoneal treatment with MPF4 (0.1, 0.3 and 1.0 mmol/kg) was also effective in producing antinociception both in the neurogenic [ $F(4,40) = 11.54, P < 0.001$ ] and inflammatory [ $F(4,40) = 10.14, P < 0.001$ ] phases of the formalin test. This effect was dose-dependent in both phases (neurogenic [ $F(1,40) = 30.29, P < 0.001$ ] and inflammatory [ $F(1,40) = 24.44, P < 0.001$ ]; Fig. 2 C and D).

Fig. 2 (E and F) shows that MPC13 administered at doses of 0.3 and 1.0 mmol/kg inhibited nociception in the neurogenic phase [ $F(4,45) = 7.95, P < 0.001$ ], while in the inflammatory phase all

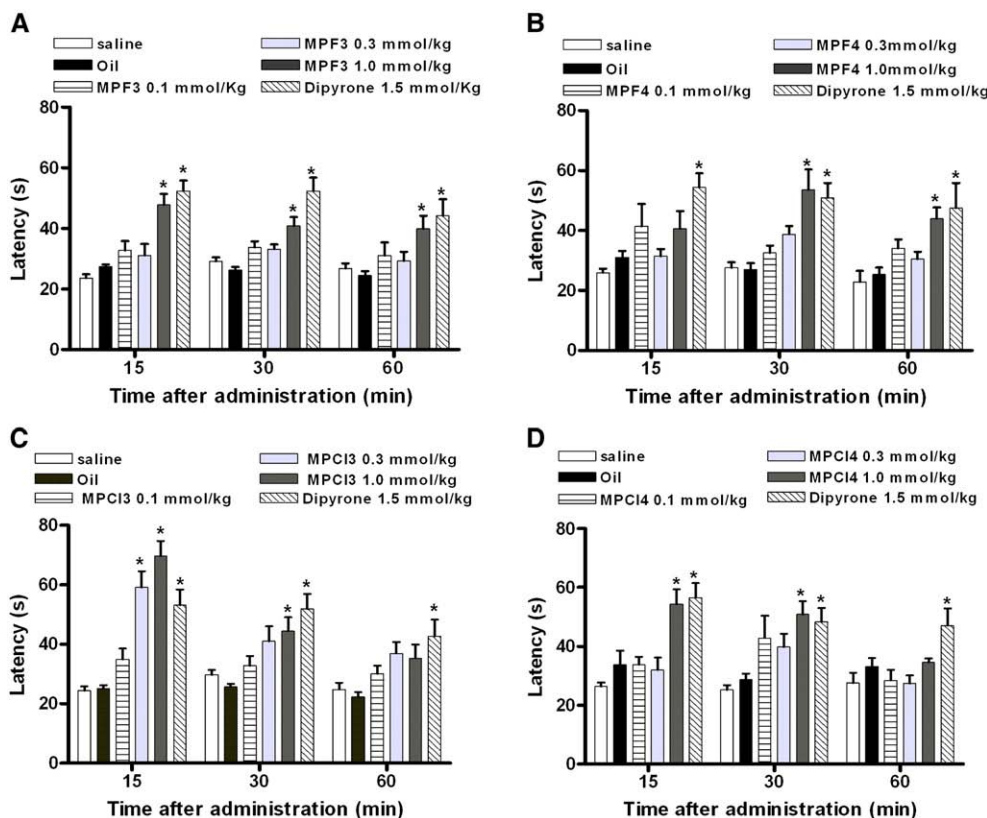


Fig. 3. Effect of MPF3 (A), MPF4 (B), MPC13 (C), MPC14 (D) (0.1–1.0 mmol/kg, i.p.) and dipyron (A–D, 1.5 mmol/kg, i.p.) on the response latency at 15, 30 and 60 min after administration of drugs in the hot-plate test in mice. Data are reported as mean  $\pm$  SEM for  $n = 8$ –16 per group. \* $P < 0.05$ , compared to Oil group (for pyrazoline methyl esters) or to saline (for dipyron) (SNK test).



doses evaluated [ $F(4,45)=41.22$ ,  $P<0.001$ ] were effective when compared with the vehicle-treated group. The antinociceptive effect produced by MPC13 was dose-dependent both in the neurogenic [ $F(1,45)=55.04$ ,  $P<0.001$ ] and inflammatory phases [ $F(1,45)=84.40$ ,  $P<0.001$ ].

Finally, treatment with MPC14, the 4-methyl analogue of MPC13, reduced pain in the neurogenic phase at doses of 0.1, 0.3 and 1.0 mmol/kg [ $F(4,46)=20.7$ ,  $P<0.001$ ], while all doses evaluated were effective in the inflammatory phase [ $F(4,46)=11.15$ ,  $P<0.001$ ] of the formalin test (Fig. 2 G and H). The antinociceptive effect produced by MPC14 was dose-dependent both in the neurogenic [ $F(1,46)=63.68$ ,  $P<0.001$ ] and inflammatory phases [ $F(1,46)=14.55$ ,  $P<0.001$ ]. The  $ID_{50}$  and maximal inhibition values obtained for all compounds are shown in Table 1.

### 3.2. Evaluation of antinociceptive effect in the hot-plate test

The systemic administration of MPF3 (1.0 mmol/kg) significantly increased latency in the hot-plate test at 15 [ $F(5,108)=$

17.657,  $P<0.001$ ], 30 [ $F(5,108)=14.39$ ,  $P<0.001$ ] and 60 [ $F(5,108)=4.8$ ,  $P<0.001$ ] min after administration (Fig. 3A). The maximum antinociception was  $75.1\pm 13.1\%$  observed 15 min after its administration. Comparatively, dipyron (1.5 mmol/kg) increased hot-plate latency by  $124.1\pm 14.6\%$  at that time period.

MPF4 (1.0 mmol/kg) was also effective in inducing antinociception in the hot-plate test at 30 [ $F(5,48)=8.34$ ,  $P<0.001$ ] and 60 [ $F(5,48)=5.10$ ,  $P<0.001$ ] minutes after its administration (Fig. 3B). The maximum antinociception was  $98.7\pm 24.9\%$  30 min after its administration.

Fig. 3C shows that MPC13 significantly increased the latency in the hot-plate test at 15 min [ $F(5,82)=20.30$ ,  $P<0.001$ ] at doses of 0.3 and 1.0 mmol/kg and at 30 min [ $F(5,82)=6.17$ ,  $P<0.001$ ] at the highest dose, MPC13 (1.0 mmol/kg). The maximum antinociception observed at the highest dose was  $178.7\pm 20.3\%$  at 15 min after administration.

As can be seen in Fig. 3D, MPC14 (1.0 mmol/kg) significantly increased the latency in the hot plate test at 15 [ $F(5,50)=8.46$ ,  $P<0.001$ ] and 30 [ $F(5,50)=5.15$ ,  $P<0.001$ ] min after its

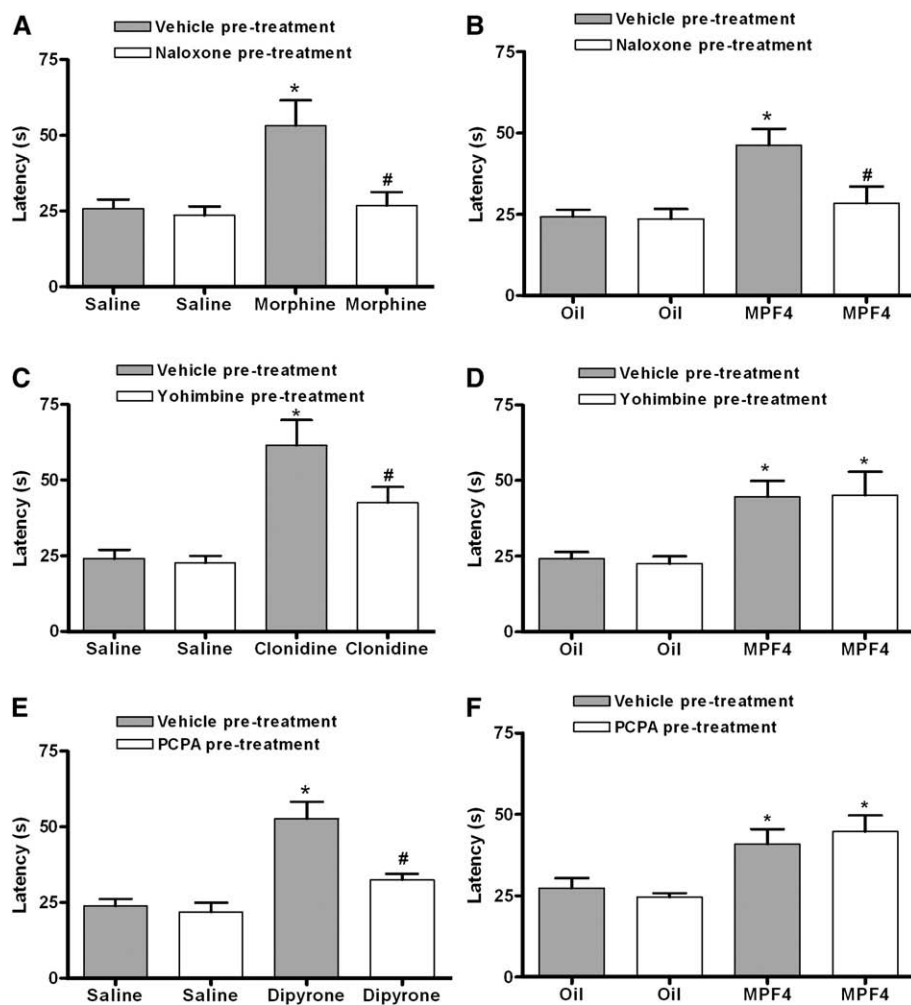


Fig. 4. Effect of pre-administration of naloxone (A and B; 2 mg/kg, i.p.), yohimbine (C and D; 0.15 mg/kg, i.p.), PCPA (E and F; 300 mg/kg, i.p.) or their vehicles to mice treated with morphine (A; 5 mg/kg, i.p.), clonidine (C; 0.1 mg/kg, i.p.), dipyron (E, 1.5 mmol/kg, i.p.) or MPF4 (B, D and F; 1.0 mmol/kg, i.p.) on the response latency at 30 min after administration of drugs in the hot-plate test in mice. Data are reported as mean  $\pm$  S.E.M. for  $n=7-17$  per group. \* $P<0.05$ , compared saline group (for morphine, clonidine and dipyron) or Oil (for MPF4); # $P<0.05$ , compared to vehicle pre-treated animals (SNK test).

administration. The maximum antinociception of MPC14 was  $77.1 \pm 15.7\%$  at 30 min.

### 3.3. Assessment of some mechanisms involved in the antinociceptive activity

We also investigated some mechanisms related to pyrazoline methyl ester induced antinociception. Since the trifluoromethyl-substituted pyrazoline methyl esters had a more prolonged antinociceptive effect in the hot-plate test and MPF4 was more efficacious than MPF3 in the formalin test, we selected MPF4 to carry out the mechanism of action studies. Pre-treatment with the opioid receptor antagonist, naloxone (2 mg/kg, i.p.), reversed the antinociceptive effect of both morphine (5 mg/kg, i.p.) [ $F(1,30)=4.41$ ,  $P<0.05$ ] and MPF4 (1.0 mmol/kg) [ $F(1,35)=5.06$ ,  $P<0.05$ ] in the hot-plate test (Fig. 4 A and B). Moreover, the combined treatment of MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p.) plus morphine (5 mg/kg, i.p.) produced additive antinociceptive action [ $F(3,37)=25.72$ ,  $P<0.05$ ] in the hot plate test (Fig. 5A).

On the other hand, the pre-treatment of mice with the  $\alpha_2$  adrenoceptor antagonist yohimbine (0.15 mg/kg, i.p.) significantly reversed the antinociception caused by clonidine (0.1 mg/kg, i.p.) [ $F(1,36)=4.25$ ,  $P<0.05$ ], but did not alter the antinociception caused by MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p.) (Fig. 4 C and D). Finally, the pre-treatment of animals with PCPA (300 mg/kg, i.p. for 3 consecutive days) produced a significant inhibition of the antinociception caused by dipyrone (1.5 mmol/kg, i.p.) in the hot-plate test [ $F(1,46)=7.30$ ,  $P<0.05$ ]. In contrast, the same treatment with PCPA did not significantly change the antinociceptive effect of MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p.) (Fig. 4 E and F).

The data obtained in the hot plate test demonstrated that naloxone (2 mg/kg, i.p.) also reversed the antinociceptive effect of MPF4 (1.0 mmol/kg) in the inflammatory phase ([ $F(1,31)=35.90$ ,  $P<0.01$ ]) of the formalin test. In the neurogenic phase, naloxone tended to reverse MPF4 antinociception but this effect was not statistically significant ( $F(1,31)=2.45$ ,  $P=0.12$ ) (Fig. 5 B and C).

As only naloxone reversed the antinociceptive effect of MPF4, we also assessed whether or not MPF4 produced other opioid-like effects in mice.

### 3.4. Induction of tolerance or cross-tolerance

The results presented in Fig. 6A demonstrate that pre-treatment of animals with morphine (5 mg/kg, i.p. once a day for 8 consecutive days) produced a significant and complete tolerance to its antinociceptive effect, when compared with the first day treatment [ $F(1,22)=18.78$ ,  $P<0.001$ ]. However, the treatment of animals with MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p. once a day for 8 consecutive days) did not produce any significant alteration in its antinociceptive action, when compared with the first day treatment (Fig. 6B). Moreover, animals tolerant to morphine did not demonstrate a significant alteration in the antinociceptive effect of MPF4 (Fig. 6C). Similarly, repeated treatment with MPF4 did not modify the antinociceptive effect

of morphine (Fig. 6C). Thus, MPF4 did not induce tolerance or cross-tolerance with morphine.

### 3.5. Effects on gastrointestinal transit

We then investigated the effect of MPF4 on the intestinal transit of a charcoal meal. Administration of rice oil or dipyrone did not modify gastrointestinal transit when compared with saline-treated animals (Fig. 7A). In contrast, MPF4 and, to a greater extent, morphine inhibited gastrointestinal transit by  $36.1 \pm 6.1\%$  and  $63.5 \pm 7.9\%$ , respectively [ $F(4,39)=9.17$ ,  $P<0.05$ ]. Pre-treatment with the opioid receptor antagonist naloxone (2.5 mg/kg, i.p.) reversed the reduction of gastrointestinal transit induced either by morphine (11.0 mg/kg, i.p.) [ $F(1,24)=5.98$ ,  $P<0.05$ ] or by MPF4 (1.0 mmol/kg) [ $F(1,26)=4.3$ ,  $P<0.05$ ] (Fig. 7B and C).

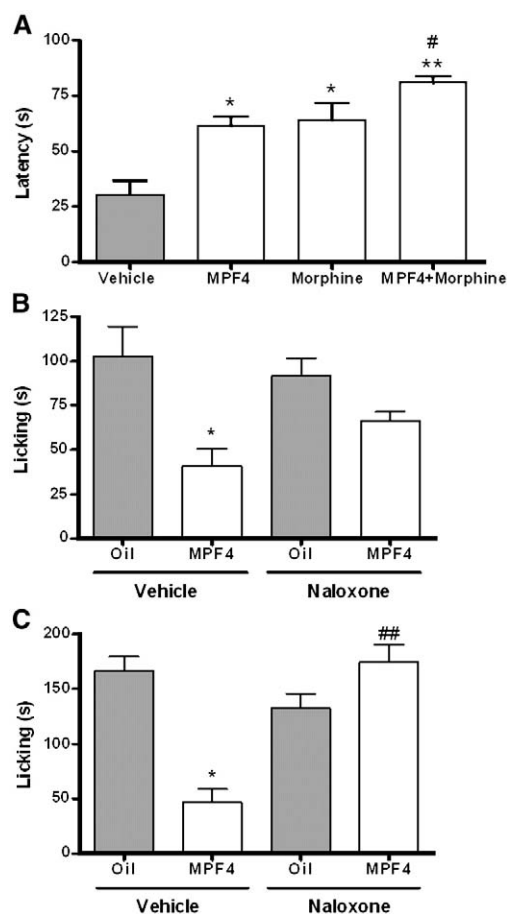


Fig. 5. A) Effect of the combined administration of MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p.) plus morphine (5 mg/kg, i.p.) on response latency at 30 min after administration of drugs in the hot-plate test in mice. Data are reported as mean  $\pm$  SEM. for  $n=10-11$  per group. \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ , compared to vehicle group; # $P<0.05$ , compared to MPF4 or morphine group (SNK test). B–C) Effect of pre-administration of naloxone (B and C; 2 mg/kg, i.p.) or its vehicle to mice treated with MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p.) on the time spent licking during the neurogenic (B) and inflammatory (C) phases of the formalin test in mice. Data are reported as mean  $\pm$  SEM for  $n=8-9$  per group. \* $P<0.05$ , compared to oil group;  $P<0.01$ , compared to MPF4+vehicle group (SNK test).

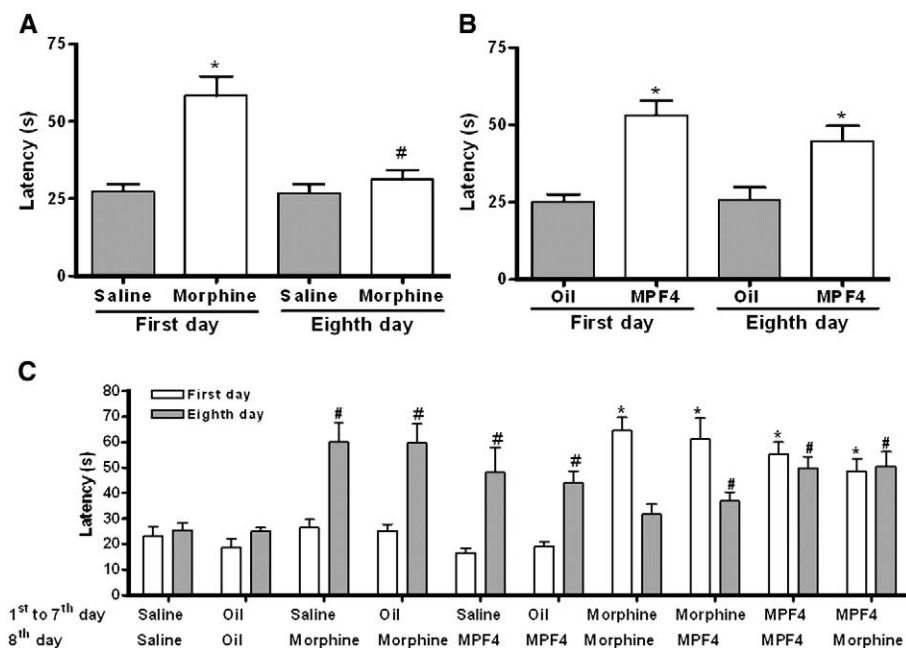


Fig. 6. Effect of acute (first day) or chronic (eight days) treatment with morphine (A, 5 mg/kg, i.p.), MPF4 (B, 1.0 mmol/kg, i.p.), or vehicles on the response latency at 30 min after administration of drugs in the hot-plate test in mice ( $n=8-12$ ). C) Effects of MPF4 or morphine (on the first or the eighth day) on the hot plate test at 30 min after administration of drugs in mice chronically pre-treated (from the first to the seventh day) with vehicles, MPF4 (1.0 mmol/kg/day) or morphine (5 mg/kg/day). Data are reported as mean  $\pm$  SEM for  $n=6-9$  per group. \* $P<0.05$ , compared to first day treatment with oil (for MPF4) or saline (for morphine); # $P<0.05$ , compared to eighth day treatment with oil (for MPF4) or saline (for morphine) (SNK test).

### 3.6. Rotarod and open-field tests

Table 2 shows the effects of the substituted pyrazoline methyl esters and of dipyrone on the rotarod and open-field performance of mice. The tested compounds did not alter the fall latency or number of falls in the rotarod test when compared with the vehicle group (rice oil or saline). Furthermore, Table 2 demonstrates the effects of pyrazoline methyl esters and dipyrone on the open field test. Neither compound altered the number of crossings, rearing responses or immobility in the open field when compared with the vehicle group. To confirm these data, we carried out a time course experiment comparing the effect of vehicle and MPF4 in naïve animals. Again, MPF4 treatment was not able to alter the locomotor activity in either the rotarod or the open-field tests from 15 to 60 min after administration (results not shown).

## 4. Discussion

It is well known that pharmaceutical companies around the world are interested in developing safer and more effective drugs to treat pain. In the present study, we evaluated the antinociceptive effect of four novel pyrazoline methyl esters, MPF3, MPF4, MPC13 and MPC14, against hot-plate and formalin tests of nociception. Moreover, we investigated some mechanisms related with their antinociceptive actions and some possible side effects induced by these compounds.

In the formalin test, the subcutaneous administration of formalin induced a pain-related behaviour of licking and biting of the injected paw in two distinct phases (Hunskar and Hole,

1987; Shibata et al., 1989). The action of analgesic drugs is different in the neurogenic and inflammatory phases. Opiates, which act centrally for the most part, inhibit both phases similarly (Hunskar and Hole, 1987; Shibata et al., 1989). However, non-opiate analgesics, including dipyrone, which have a central and peripheral site of action, produce an antinociceptive effect in both phases of the formalin test, but particularly in the second phase, where pain is inhibited by lower doses than those necessary to inhibit pain in the first phase (Shibata et al., 1989). Similar to non-opiate analgesics, we have found that some novel pyrazoline methyl esters decreased pain in both phases of the formalin test, with a greater potency in the inflammatory phase. For the 5-trifluoromethylated pyrazolines, positioning the methyl group at position 3 of the pyrazole ring reduced the potency of the neurogenic nociception caused by formalin. On the other hand, for the 5-trichloromethylated pyrazolines, moving the methyl group to position 3, increased efficacy during both phases of formalin nociception. Thus, the methyl group at position 3 could produce a conformational effect that would make it difficult for the molecule to interact with its putative molecular target for the substituted 5-trifluoromethyl.

We also investigated the effect of new pyrazoline methyl esters in the hot-plate test. Similar to other studies carried out with rodent thermal tests (Beirith et al., 1998; Carlsson et al., 1986; Hernández-Delgado et al., 2003), it was clearly demonstrated in the present study that dipyrone induced antinociception in the hot-plate test. Moreover, we have found that MPF3 and MPF4, which present a trifluoromethyl group at position five of the pyrazole ring, caused significant

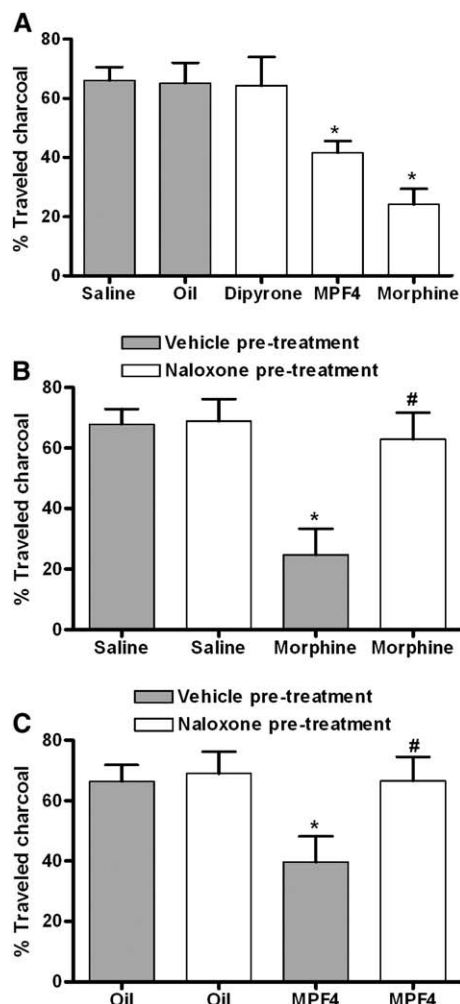


Fig. 7. A) Effect of Dipyrone (1.5 mmol/kg, i.p.), MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p.), or morphine (11 mg/kg, i.p.) on gastrointestinal transit in mice. B and C) Effect of pre-administration of naloxone (2.5 mg/kg, i.p.) or vehicle to mice treated with morphine (B) or MPF4 (C) on the gastrointestinal transit in mice. Data are reported as mean  $\pm$  SEM for  $n=8-9$  per group. \* $P<0.05$ , compared to oil group (for MPF4) or to saline group (for morphine); # $P<0.05$ , compared to vehicle pre-treated animals (SNK test).

antinociception in the hot plate test for up to 60 min. On the other hand, the antinociceptive effect of MPC13 and MPC14, which present a trichloromethyl group at position five of the pyrazoline ring, had completely subsided 60 min after their administration. These results are in agreement with the idea that the carbon-fluorine bond is more stable than the carbon-chlorine bond, probably resulting in more metabolically stable compounds (Karthikeyan et al., 2007; Parck et al., 2001). Of note, fluorine substitution at the site of metabolic attack makes the molecule much more resistant to direct chemical attack by cytochrome P450 (Parck et al., 2001). However, further studies must be carried out to elucidate the pharmacokinetics of the novel 5-trichloromethylated pyrazolines.

Furthermore, we have assessed some possible mechanisms involved in the antinociception induced by MPF4. We selected MPF4 to carry out the mechanism of action studies since the trifluoromethyl-substituted pyrazoline methyl esters had a more prolonged antinociceptive effect in the hot-plate test and MPF4

was more effective than MPF3 in the formalin test. The exact mechanism responsible for the antinociceptive effect of analgesic pyrazole compounds, such as dipyrone, 3-difluoromethyl-1-(4-methoxyphenyl)-5-[4-(methylsulfinyl)phenyl]pyrazole (FR140423) and 3-methyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-4,5-dihydro-1*H*-1-pyrazole-1-carboxamide (MPCA) remains uncertain, but it has been suggested that it is linked to the noradrenergic, serotonergic and opioidergic systems (Godoy et al., 2004; Ochi and Goto, 2000a,b; Ochi et al., 1999b, 2002; Vlaskovska et al., 1989). In the present study, the antinociception generated by MPF4 seems to function regardless of the activation of endogenous serotonergic systems. In fact, the treatment of the animals with PCPA, at a dose known to inhibit serotonin synthesis (Dailly et al., 2006), failed to interfere with MPF4 induced antinociception in the hot-plate test. In addition, the same treatment of animals with PCPA antagonized dipyrone antinociception, as previously demonstrated (Miranda et al., 2003). Furthermore,  $\alpha_2$ -adrenoceptors seem unlikely to be involved in the antinociception of MPF4 as the pre-treatment of the animals with the  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist yohimbine failed to block antinociception induced by MPF4. Finally, the mechanism underlying the antinociceptive action of MPF4 seems to be related to an action on the opioidergic system, since the antinociceptive effect of this compound was antagonized by the opioid receptor antagonist naloxone (2 mg/kg, i.p.) in the hot-plate test and in the inflammatory phase of the formalin test. In the neurogenic phase of the formalin test, the antinociceptive effect of MPF4 was not significantly reversed by naloxone, indicating that MPF4 might induce antinociception by a

Table 2

Effect of pyrazoline methyl esters and dipyrone administration on the fall latency and number of falls in rotarod test and number of crossings, rearing and immobility in open-field test in mice

| Treatment (mmol/kg) | Fall latency     | Number of falls | Crossing        | Rearing        | Immobility      | N  |
|---------------------|------------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|----|
| Saline              | 183.0 $\pm$ 17.4 | 1.8 $\pm$ 0.7   | 35.7 $\pm$ 6.3  | 10.4 $\pm$ 2.1 | 25.4 $\pm$ 5.5  | 20 |
| Rice Oil            | 132.3 $\pm$ 20.4 | 1.1 $\pm$ 0.2   | 28.3 $\pm$ 3.2  | 8.6 $\pm$ 1.0  | 17.6 $\pm$ 4.8  | 20 |
| MPF3 (1.0)          | 122.2 $\pm$ 17.9 | 2.5 $\pm$ 0.6   | 31.2 $\pm$ 1.8  | 8.8 $\pm$ 1.0  | 25.2 $\pm$ 6.2  | 20 |
| Dipyrone (1.5)      | 123.2 $\pm$ 18.3 | 1.85 $\pm$ 0.4  | 24.2 $\pm$ 2.3  | 4.9 $\pm$ 0.5  | 28.0 $\pm$ 4.34 | 20 |
| Saline              | 95.1 $\pm$ 17.1  | 1.5 $\pm$ 0.5   | 19.1 $\pm$ 6.6  | 5.0 $\pm$ 2.5  | 18.1 $\pm$ 8.8  | 8  |
| Rice Oil            | 62.6 $\pm$ 18.1  | 2.8 $\pm$ 0.8   | 24.2 $\pm$ 1.8  | 3.6 $\pm$ 0.75 | 10.2 $\pm$ 3.9  | 10 |
| MPF4 (1.0)          | 139.3 $\pm$ 24.2 | 2.2 $\pm$ 1.0   | 29.4 $\pm$ 4.1  | 4.2 $\pm$ 1.3  | 17.7 $\pm$ 5.2  | 10 |
| Dipyrone (1.5)      | 108.5 $\pm$ 31.1 | 2.3 $\pm$ 0.6   | 24.1 $\pm$ 3.6  | 5.6 $\pm$ 1.0  | 21.8 $\pm$ 4.3  | 9  |
| Saline              | 165.3 $\pm$ 25.1 | 2.1 $\pm$ 1.0   | 35.1 $\pm$ 7.9  | 9.3 $\pm$ 2.5  | 17.1 $\pm$ 8.9  | 14 |
| Rice Oil            | 109.6 $\pm$ 19.8 | 2.0 $\pm$ 0.6   | 22.3 $\pm$ 3.0  | 5.9 $\pm$ 1.1  | 27.9 $\pm$ 10.6 | 14 |
| MPC13 (1.0)         | 124.0 $\pm$ 25.9 | 2.5 $\pm$ 0.8   | 33.4 $\pm$ 12.8 | 9.1 $\pm$ 5.2  | 38.5 $\pm$ 8.3  | 16 |
| Dipyrone (1.5)      | 145.9 $\pm$ 23.9 | 1.1 $\pm$ 0.4   | 26.2 $\pm$ 4.4  | 5.2 $\pm$ 1.2  | 35.0 $\pm$ 5.8  | 14 |
| Saline              | 101.5 $\pm$ 18.6 | 1.7 $\pm$ 0.6   | 27.1 $\pm$ 76.9 | 5.7 $\pm$ 2.8  | 12.1 $\pm$ 3.1  | 9  |
| Rice Oil            | 84.7 $\pm$ 25.0  | 3.2 $\pm$ 0.9   | 34.2 $\pm$ 5.4  | 9.1 $\pm$ 1.7  | 9.8 $\pm$ 1.9   | 8  |
| MPC14 (1.0)         | 203.5 $\pm$ 19.7 | 0.7 $\pm$ 0.4   | 44.3 $\pm$ 3.3  | 8.3 $\pm$ 1.3  | 9.2 $\pm$ 3.0   | 12 |
| Dipyrone (1.5)      | 121.8 $\pm$ 26.5 | 2.3 $\pm$ 0.6   | 28.2 $\pm$ 2.9  | 6.8 $\pm$ 0.8  | 20.3 $\pm$ 4.4  | 12 |

Data are means  $\pm$  SEM  $N$ =number of animals in each group.



mechanism from some system other than the opioid system. Moreover, the combined treatment of MPF4 and morphine produced an antinociceptive effect that was greater than that produced by each drug administered alone. As opioids do not present a ceiling effect and the antinociception of the combined treatment was similar to the sum of the effects of morphine or MPF4 alone, our data suggest that both drugs might act by the same mechanism. Despite the clear involvement of the opioid system in the effect of MPF4, we cannot extrapolate that the same mechanism would be involved in the other trihalomethyl-substituted pyrazoline methyl esters tested. Next, we assessed whether MPF4 produced other opioid-like effects, including gastrointestinal transit reduction and the development of tolerance.

Constipation is a undesired side effect that commonly accompanies the acute or chronic administration of opioid-analgesics (Puig and Pol, 1997). Initially, we confirmed previous studies that showed that dipyrone did not alter gastrointestinal transit in rodents (Hernández-Delgado et al., 2002). On the other hand, our data demonstrated that MPF4, similar to morphine, produced an inhibition of the gastrointestinal transit after a single administration. Similar to the result observed in the nociception test, naloxone reversed the inhibition of transit produced by MPF4 or morphine.

Tolerance is a particularly well-researched adaptive response to opioids, and is almost exclusively associated with analgesia (Kieffer and Evans, 2002). The development of tolerance to the antinociceptive effects of morphine after repeated administration is a side effect that limits its chronic use (Mercadante, 1999). In the present study, after repeated administration, once a day during eight days, a tolerance was developed to the antinociceptive effects of morphine, but not to those of compound MPF4. Thus, MPF4 seems to produce some morphine-like effects, including antinociception and constipation, whereas it does not produce others, such as the development of tolerance. Studies on animals repeatedly injected with opioids by various routes have shown that tolerance is time- and dose-dependent and receptor specific (Collett, 1998; Pasternak, 2001). Repeated injections of morphine may confer not only tolerance to morphine itself but also to other drugs in the same mechanistic category, an effect known as cross-tolerance. We did not detect cross-tolerance between the antinociceptive action of morphine and MPF4. This finding suggests that MPF4 acts through a receptor or some mechanism that is different from that of morphine. Of note, it has been demonstrated that pyrazole derivatives, such as dipyrone and FR140423, do not directly bind to the opioid receptor (Ochi et al., 1999b; Popova and Staneva-Stoycheva, 1989). However, the antinociceptive effect of both dipyrone and FR140423 is related with endogenous opioid release (Ochi et al., 2000; Vlaskovska et al., 1989). Thus, further studies should be carried out to elucidate whether the antinociceptive effect of MPF4 is related to a direct binding onto a specific opioid receptor or to an indirect release of endogenous opioids.

A major concern in experiments designed to evaluate the analgesic action of new agents is whether pharmacological treatment causes other behavioural alterations, such as altering

motor coordination and causing sedation, which could be misinterpreted as analgesia (Tabarelli et al., 2004). An important issue regarding the behavioural effects of the compounds evaluated in this study is the fact that none of the novel pyrazoline methyl esters tested, nor dipyrone or the vehicles, caused motor impairment as evaluated by either forced or spontaneous locomotor. On the other hand, it has been well demonstrated that opioids produces locomotor alterations in rodents (Hayes and Tyers, 1983). This result reinforces the idea that MPF4 possesses a pharmacological profile different from morphine and similar to other pyrazole compounds such as FR 140423 (Ochi et al., 1999b).

In conclusion, the novel pyrazoline methyl esters MPF3, MPF4, MPC13 and MPC14 presented an antinociceptive effect in chemical and thermal models of pain. Further investigations are necessary to elucidate the exact mechanism of action of these compounds. Nevertheless, the results of the present study suggest that these new bioactive pyrazolines are an interesting prototype of mild analgesic drugs.

## Acknowledgments

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), by Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), by Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX) and by Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (Brazil). The fellowships from CNPq, CAPES and FAPERGS are also acknowledged.

## References

- Beirith, A., Santos, A.R.S., Rodrigues, A.L.S., Creczynski-Pasa, T.B., Calixto, J.B., 1998. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.* 345, 233–245.
- Bekhit, A., Abdel-Aziz, T., 2004. Design, synthesis and biological evaluation of some pyrazole derivatives as anti-inflammatory–antimicrobial agents. *Bioorg. Med. Chem.* 12, 1935–1945.
- Camu, F., Vanlersberghe, C., 2002. Pharmacology of systemic analgesics. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* 16, 475–488.
- Carlsson, K.H., Helmreich, J., Jurna, I., 1986. Activation of inhibition from the periaqueductal grey matter mediates central analgesic effect of metamizol (dipyrone). *Pain* 27, 373–390.
- Cheng, C.C., Elslager, E.F., Werbel, L.M., Priebe, S.R., Leopold, W.R., 1986. Pyrazole derivatives. Synthesis and antineoplastic activity of 3-(2-chloroethyl)-3,4-dihydro-4-oxopyrazolo{5,1-d}-1,2,3,5-tetrazine-8-carboxamide and related compounds. *J. Med. Chem.* 29, 1544–1547.
- Collett, B.J., 1998. Opioid tolerance: the clinical perspective. *Br. J. Anaesth.* 81, 58–68.
- Dailly, E., Chenu, F., Petit-Demoulière, B., Bourin, M., 2006. Specificity and efficacy of noradrenaline, serotonin depletion in discrete brain areas of Swiss mice by neurotoxins. *J. Neurosci. Methods* 150, 111–115.
- De Souza, F.R., Figuera, M.R., Lima, T.T.F., Bastiani, J., Barcellos, I.B., Almeida, C.E., Oliveira, M.R., Bonacorso, H.G., Flores, A.E., Mello, C.F., 2001. 3-Methyl 5-hydroxy-5-trichloromethyl -1*H*-1-pyrazolcarboxamide (MPCA) induces antinociception. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 68, 525–530.
- Edwards, J.E., Meseguer, F., Faura, C.C., Moore, R.A., McQuay, H.J., 2001. Single-dose dipyrone for acute postoperative pain. *Cochrane Database Syst. Rev.* 3, CD003227.
- Ferreira, J., Floriani, A.E., Filho, V.C., Delle Monache, F., Yunes, R.A., Calixto, J.B., Santos, A.R.S., 2000. Antinociceptive properties of the methanolic

- extract and two triterpenes isolated from *Epidendrum mosenii* stems (Orchidaceae). *Life Sci.* 66, 791–802.
- Ferreira, J., Campos, M.M., Araújo, R., Bader, M., Pesquero, J.B., Calixto, J.B., 2002. The use of B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. *Neuropharmacology* 43, 1188–1197.
- Godoy, M.C.M., Figuera, M.R., Flores, A.E., Rubin, M.A., Oliveira, M.R., Zanatta, N., Martins, M.A.P., Bonacorso, H.G., Mello, C.F., 2004.  $\alpha_2$ -Adrenoceptors and 5-HT receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazoles, but not of dipyrone. *Eur. J. Pharmacol.* 496, 93–97.
- Gürsoy, A., Demirayak, S., Capan, G., Erol, K., Vural, K., 2000. Synthesis and preliminary evaluation of new 5-pyrazolinone derivatives as analgesic agents. *Eur. J. Med. Chem.* 35, 359–364.
- Hayes, A.G., Tyers, M.B., 1983. Determination of receptors that mediate opiate side effects in the mouse. *Br. J. Pharmacol.* 79, 731–736.
- Hernández-Delgado, G.P., Martínez, R.V., Reval, M.I.D., Ramírez, A.M.D., López-Munoz, F.J., 2002. Metamizol potentiates morphine antinociception but not constipation after chronic treatment. *Eur. J. Pharmacol.* 441, 177–183.
- Hernández-Delgado, G.P., López-Munoz, F.J., Salazar, L.A., Cruz, S.L., 2003. Morphine and dipyrone co-administration delays tolerance development and potentiates antinociception. *Eur. J. Pharmacol.* 469, 71–79.
- Hunskar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30 (1), 103–114.
- Jage, J., 2005. Opioid tolerance and dependence. Do they matter? *Eur. J. Pain* 9, 157–162.
- Karthikeyan, S.M., Holla, B.S., Kumari, N.S., 2007. Synthesis and antimicrobial studies on novel chloro-fluorine containing hydroxyl pyrazolines. *Eur. J. Med. Chem.* 42, 30–36.
- Kieffer, B.L., Evans, C.J., 2002. Opioid tolerance-in search of the holy grail. *Cell* 108, 587–590.
- Martins, M.A.P., Beck, P., Machado, P., Brondani, S., Moura, S., Zanatta, N., Bonacorso, H.G., Flores, A.F.C., 2006. Microwave-assisted synthesis of novel 5-trichloromethyl-4,5-dihydro-1*H*-1-pyrazole methyl esters under solvent free conditions. *J. Braz. Chem. Soc.* 17, 408–411.
- Matheus, M.E., Oliveira, F.L., Freitas, C.C., 1991. Antinociceptive property of new 4-acyl-arylhydrazone pyrazole compounds. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 24, 1219–1222.
- McQuay, H.J., Moore, R.A., 2005. NSAIDs and coxibs: clinical use. In: McMahon, S., Koltzenburg, M. (Eds.), *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 471–480.
- Mercadante, S., 1999. Problems of long-term spinal opioid treatment in advanced cancer patients. *Pain* 79, 1–13.
- Miranda, H.F., Lemus, I., Pinardi, G., 2003. Effect of the inhibition of serotonin biosynthesis on the antinociception induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Brain Res. Bull.* 61, 417–425.
- Ochi, T., Goto, T., 2000a. The antinociceptive effect of FR 140423 in mice: involvement of spinal  $\alpha_2$ -adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 400, 199–203.
- Ochi, T., Goto, T., 2000b. The antinociceptive effect induced by FR 140423 is mediated through spinal 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 409, 167–172.
- Ochi, T., Jobo-Magari, K., Yonezawa, A., Matsumori, K., Fujii, T., 1999a. Anti-inflammatory and analgesic effects of a pyrazole derivative FR140423. *Eur. J. Pharmacol.* 365, 259–266.
- Ochi, T., Fujii, T., Motoyama, Y., Goto, T., 1999b. Antinociceptive properties of FR140423 mediated through spinal  $\delta$ -, but not  $\mu$ - and  $\kappa$ -, opioid receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 380, 73–79.
- Ochi, T., Motoyama, Y., Goto, T., 2000. The spinal antinociceptive effect of FR140423 is mediated through kyotorphin receptors. *Life Sci.* 66, 2239–2245.
- Ochi, T., Ohkubo, Y., Mutoh, S., 2002. FR 143166 attenuates spinal pain transmission through activation of the serotonergic system. *Eur. J. Pharmacol.* 452, 319–324.
- Otuki, M.F., Ferreira, J., Lima, F.V., Meyre-Silva, C., Malheiros, A., Muller, L.A., Cani, G.S., Santos, A.R., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2005. Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313, 310–318.
- Parck, K.B., Kitteringham, N.R., O'Neill, P.M., 2001. Metabolism of fluorine-containing drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 443–470.
- Pasternak, G.W., 2001. Incomplete cross tolerance and multiple mu opioid peptide receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 67–70.
- Popova, Y., Staneva-Stoycheva, D., 1989. Lack of direct interaction of metamizole with the brain opiate receptors of rats. *Acta Physiol. Pharmacol. Bulg.* 15, 55–58.
- Puig, M.M., Pol, O., 1997. Reversal of tolerance to the antinociceptive effects of morphine during acute intestinal inflammation in mice. *Br. J. Pharmacol.* 122, 1216–1222.
- Santos, A.R., Miguel, O.G., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 1999. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-*N*-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 417–426.
- Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R., 1989. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 38, 347–352.
- Siegfried, B., Netto, C., Izquierdo, I., 1987. Exposure to novelty induces naltrexone-reversible analgesia in rats. *Behav. Neurosci.* 101, 436–438.
- Souza, F.R., Souza, V.T., Ratzlaff, V., Borges, L.P., Oliveira, M.R., Bonacorso, H.G., Zanatta, N., Martins, M.A.P., Mello, C.F., 2002. Hypothermic and antipyretic effects of 3-methyl and 3-phenyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole-1-carboxyamides. *Eur. J. Pharmacol.* 451, 141–147.
- Tabarelli, Z., Berlese, D.B., Sauzem, P.D., Rubin, M.A., Missio, T.P., Teixeira, M.V., Sinhorin, A.P., Martins, M.A.P., Zanatta, N., Bonacorso, H.G., Mello, C.F., 2004. Antinociceptive effect of novel pyrazolines in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37, 1531–1540.
- Tjolsen, A., Berge, O., Hunskar, S., Rosland, J.H., Hole, K., 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 51, 5–17.
- Vlaskovska, M., Surcheva, S., Ovcharov, R., 1989. Importance of endogenous opioids and prostaglandins in the action of analgin (metamizole) and verapamil. *Farmakol. Toksikol.* 52, 25–29.
- Whittle, B.J.T., 2003. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 17, 301–313.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.

**4.2 Manuscrito: Antinociceptive action of 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4, 5-dihydro-1*H*-pyrazole methyl ester in models of inflammatory pain in mice**

Julie Milano, Mateus F. Rossato, Sara M. Oliveira, Carine Drewes, Pablo Machado, Paulo Beck, Nilo Zanatta, Marcos A.P. Martins, Carlos F. Mello, Maribel A. Rubin, Juliano Ferreira\*, Helio G. Bonacorso\*

Enviado para a revista Life Sciences. Correções e experimentos adicionais estão sendo realizados de acordo com a carta resposta dos revisores (ver comprovante Anexo A, pg 106).

**Antinociceptive action of 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4, 5-dihydro-1H-pyrazole methyl ester in models of inflammatory pain in mice**

Julie Milano<sup>a</sup>, Mateus F. Rossato<sup>a</sup>, Sara M. Oliveira<sup>a</sup>, Carine Drewes<sup>a</sup>, Pablo Machado<sup>b</sup>, Paulo Beck<sup>b</sup>, Nilo Zanatta<sup>b</sup>, Marcos A.P. Martins<sup>b</sup>, Carlos F. Mello<sup>c</sup>, Maribel A. Rubin<sup>a</sup>, Juliano Ferreira<sup>a</sup>, Helio G. Bonacorso<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia and <sup>b</sup>Núcleo de Química de Heterociclos (NUQUIMHE), Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil; <sup>c</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

\*Corresponding authors: Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Departamento de Química, Cidade Universitária, Avenida Roraima, 1000, Camobi, Santa Maria, RS, Brazil, 97105 900. Tel: +55 55 3220 8053; Fax: +55 55 3220 8756

E-mail address: ferreiraj99@gmail.com or heliogb@base.ufsm.br



**Abstract**

The aim of the present study was to evaluate the antinociceptive effect of the novel 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4, 5-dihydro-1*H*-pyrazole methyl ester (MPF4) in two models of pain: arthritic pain caused by Complete Freund's Adjuvant (CFA) and postoperative pain caused by surgical incision in mice. MPF4 given intraperitoneally (1.0 mmol/kg, i.p.) or orally (0.1-1.0 mmol/kg, p.o.) produced marked antinociception in inflammatory pain caused by CFA. Oral administration of MPF4 (1.0 mmol/kg, p.o.), dipyrone (1.0 mmol/kg, p.o.) and morphine (0.026 mmol/kg, p.o.) produced an anti-allodynic effect with maximal inhibition of 100 %, 93±9 % and 100 %, respectively. However, neither of the compounds evaluated reversed the paw edema produced by CFA. Moreover, MPF4, dipyrone and morphine also produced an anti-allodynic effect in the surgical incisional pain model. The maximal inhibitions obtained with preemptive drug treatment were 66±7 %, 73±9 % and 88±8 % for MPF4 (1.0 mmol/kg, p.o.), dipyrone (1.0 mmol/kg, p.o.) and morphine (0.026 mmol/kg, p.o.), respectively. The maximal inhibitions obtained with curative drug treatment were 53±9 %, 83±7% and 84±7 %, for MPF4 (1.0 mmol/kg, p.o.), dipyrone (1.0 mmol/kg, p.o.) and morphine (0.026 mmol/kg, p.o.), respectively. Unlike indomethacin, MPF4 did not induce gastric lesions at the dose that caused the highest antinociception (1.0 mmol/kg, p.o.). The anti-allodynic action of MPF4, dipyrone and morphine was not associated with impairment of motor activity. The results of the present study suggest that MPF4 represents a potential target for the development of new drugs to treat persistent inflammatory pain.

**Keywords:** allodynia, inflammatory pain, pyrazoline methyl ester

## Introduction

The sensation of pain alerts us to real or impending injury and triggers appropriate protective responses. Unfortunately, the pain that often works as a benefit to the survival, acting as a warning system, may become chronic instead (Julius and Basbaum, 2001). While physiological pain requires intense but not damaging stimuli and is typically transient and well localized, pathological pain causes alterations in the somatosensory system, amplifying responses and increasing sensitivity to peripheral stimuli so that pain can be activated by normally innocuous stimuli (allodynia) (Woolf and Costigan, 1999). It is now well recognized that persistent pain resulting from peripheral inflammation associated with tissue damage causes the release of multiple nociceptive mediators, resulting in increased long-lasting discharge of primary sensory fibres (Besson, 1999; Julius and Basbaum, 2001).

One important and prevalent cause of pain is related with joint inflammation. In arthritis, joint nerves become sensitised, producing chronic or episodic pain. Current therapies to help alleviate joint pain have limited effectiveness and certain drugs produce unwanted negative side effects, thereby precluding their long-term use (McDougall, 2006). Another common cause of inflammatory pain is postoperative pain, which is a unique form of acute pain (Brennan et al., 1996; Zahn et al., 2005). Efficacious postoperative analgesia improves patient satisfaction, may facilitate patient recovery and, thus, may decrease morbidity and mortality following surgery (Kehlet et al. 2006). However, a meta-analysis concluded that 41% of all surgical patients still experience moderate to severe acute postoperative pain and that 24% experience inadequate pain relief (Dolin et al., 2002). Unfortunately, acute postoperative pain control seems not to have substantially improved over the last

decade (Apfelbaum et al., 2003). In this context, in addition to opioids, the nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are probably the most widely used drugs in clinics for pain treatment (Scholz and Woolf, 2002). In spite of their proved efficacy, both types of drugs produce unwanted side effects that limit their use (Kromer, 1998; Mercadante, 1999). Among NSAIDs, the pyrazole-derived drug dipyrene is a good alternative due to its high efficacy, low cost and good gastric tolerability (Camu and Vanlersberghe, 2002). Pyrazole compounds have attracted a great deal of research interest due to their wide range of pharmacological properties (Cheng et al., 1986; Bekhit and Abdel, 2004), mainly antinociceptive activities (Matheus et al., 1991; Ochi et al., 1999 a,b; Gürsoy et al., 2000). 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4, 5-dihydro-1*H*-pyrazole methyl ester (MPF4) is a novel pyrazole derivative discovered by screening compounds that contain a pyrazole scaffold to find new antinociceptive drugs (De Souza et al., 2001; Godoy et al., 2004; Tabarelli et al., 2004; Prokopp et al.; 2006, Sauzem et al., 2007). Recently, it was reported that MPF4 presented antinociceptive effects in formalin and hot-plate tests (Milano et al., 2008). The antinociceptive effect of MPF4 was reversed by the opioid receptor antagonist, naloxone, but not by the  $\alpha_2$ -adrenergic receptor antagonist, yohimbine, or by *p*-chlorophenylalanine ethyl ester (PCPA) pre-treatment. In contrast to morphine, MPF4 given daily for up to 8 days did not generate a tolerance to its antinociceptive effect or cross-tolerance with morphine. Therefore, the present study was designed to investigate whether MPF4 exhibits anti-allodynic effects in two models of pain, arthritic pain caused by Complete Freund's Adjuvant (CFA) and postoperative pain caused by surgical incision in mice. Furthermore, we have compared the antinociceptive effect of MPF4 with that produced by dipyrene or morphine and assessed the effects of the compounds on motor function.

## Material and methods

### Animals

Three-month-old male albino Swiss mice (30-40 g) bred in our animal house were used. The animals were housed at controlled temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) with a 12 h light/dark cycle and with standard lab chow and tap water ad libitum. The animals were habituated to the experimental room for at least 2 h before the experiments. The experiments reported in this study were carried out in accordance with current ethical guidelines for the investigation of experimental pain in conscious animals (Zimmermann, 1983). The numbers of animals and intensities of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the drug treatments.

### Drugs

The novel trifluoromethylated pyrazoline methyl ester 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole methyl ester (MPF4) was synthesized according to Martins et al. (2006). Analysis of  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with the assigned structure. The maximum dose of MPF4 achievable in a homogeneous suspension was 1.0 mmol/kg. MPF4 was dissolved in rice oil or 20% polyethyleneglicol (PEG, Sigma, São Paulo, Brazil) plus saline (0.9% NaCl). Dipyrone (Hoeschst, São Paulo, Brazil) or morphine sulphate (Cristália, São Paulo, Brazil) were dissolved in 20% PEG plus saline. Complete Freund's Adjuvant (1 mg/ml of heat killed *Mycobacterium tuberculosis* in 85% paraffin oil and 15% mannide monoleate) was obtained from Sigma (St. Louis,

USA.). All other reagents were of analytical grade and were purchased from local suppliers.

#### *Mechanical allodynia measurement*

Mechanical allodynia was measured as described previously (Bortalanza et al., 2002), as a marked increase in withdrawal response frequency to 10 applications of von Frey filament as compared with baseline values. Preliminary studies carried out in our laboratory showed that 0.09 g of von Frey filament produces a mean withdrawal response frequency of about 10%, which was considered an innocuous stimulus. Therefore, only 0.09 g of von Frey filament was used in our experiment. Mice were placed individually in clear Plexiglas boxes (9 X 7 X 11 cm) on elevated wire mesh platforms to allow access to the ventral surface of the hind paws. The frequency of mechanical withdrawal was determined before (baseline) and after injection of CFA or the incision procedure.

#### *CFA- induced mechanical allodynia and edema*

To produce a chronic inflammatory response, mice were lightly anaesthetized with 2% halothane via a nose cone and received 0.02 ml of CFA subcutaneously in the plantar surface (intraplantar, i.pl.) of the right hind paw (Ferreira et al., 2001). Forty-eight hours after CFA administration, mechanical allodynia was measured as described above (time 0). Immediately after allodynia measurement, mice were treated with MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p or 0.1-1.0 mmol/kg, p.o), dipyron (1.0 mmol/kg, p.o), morphine (0.026 mmol/kg, p.o) or vehicle (10 ml/kg, rice oil for i.p or 20% PEG plus saline for p.o route). Mechanical allodynia was measured from 0.5 up to 6 hours after administration. In addition, we evaluated the development of the paw edema 48

hours after CFA administration (time 0). The edema of the hind paw was considered an increased paw thickness measured by calliper (Mytutoio, Japan) 48 h after CFA injection as compared with baseline values (before CFA injection) (Cao et al., 1998). The effect of the drugs on the paw edema produced by CFA was assessed 3 h after administration.

#### *Surgical incision- induced mechanical allodynia*

The incisional pain model was carried out according to the procedure described in rats (Brennan et al., 1996) and adapted to mice (Pogatzki et al., 2003). Mice were anesthetized with 2% halothane via a nose cone. After antiseptic preparation of the right hind paw with 10% povidone-iodine solution (PVPI), a 5-mm longitudinal incision was made with a number 11 blade through the skin and fascia of the plantar foot. The incision was started 2 mm from the proximal edge of the heel and extended towards the toes. The underlying muscle was elevated with a curved forceps, leaving the muscle origin and insertion intact. The skin was apposed with a single mattress suture of 6.0 nylon. Mechanical allodynia was measured as described above. The preemptive effects of the orally administered drugs was evaluated in mice, which received MPF4 (1.0 mmol/kg, p.o), dipyrone (1.0 mmol/kg, p.o), morphine (0.026 mmol/kg, p.o) or vehicle (20% PEG plus saline, p.o) 0.5 h before the incisional procedure. In this case, mechanical allodynia was recorded 2, 4 and 6 hours after administration (equivalent to 1.5, 3.5 and 5.5 hours after incision). To evaluate the curative effect of the drugs, the animals received MPF4 (1.0 mmol/kg, p.o), dipyrone (1.0 mmol/kg, p.o), morphine (0.026 mmol/kg, p.o) or vehicle (20% PEG plus saline, p.o) 1 h after the incisional procedure. Mechanical allodynia was recorded 2, 4 and 6

hours after treatment administration (equivalent to 3, 5 and 7 hours after the incision procedure).

#### *Gastric lesion assessment*

To evaluate the gastric tolerability of animals after oral administration of MPF4, mice were fasted for 18 h prior to drug exposure. The animals were treated with MPF4 (1.0 mmol/kg, p.o), indomethacin (0.1 mmol/kg, p.o, used as a positive control) or vehicle (20% PEG plus saline, 10 ml/kg, p.o). Four hours later, animals were euthanized with CO<sub>2</sub>. The stomachs were opened by cutting along the greater curvature, washed with saline at 4°C and immediately the lesion index was assessed with support of a magnifying glass. The quantification of gastric mucosal lesions was carried out by assigning a score according to the number and size of lesions on a scale from 0 up to 6 points (Magistretti et al., 1988).

#### *Rotarod test*

The effect of compounds on locomotor performance was tested on the rotarod apparatus as described previously (Godoy et al., 2004). Twenty-four hours before the experiments, all animals were trained in the rotarod (3.7 cm in diameter, 8 r.p.m) until they could remain in the apparatus for 60 s without falling. On the day of the experiment, mice were treated with MPF4 (1.0 mmol/kg, p.o), dipyrone (1.0 mmol/kg, p.o), morphine (0.026 mmol/kg, p.o), vehicle (20 % PEG in saline, 10 ml/kg, p.o) or saline (10 ml/kg, p.o) and tested in the rotarod from 0.5 up to 4 hours after their administration. The latency to fall and the number of falls from the apparatus were recorded with a stopwatch up to 240 s.

### *Open-field test*

The effect of the compounds on spontaneous locomotor activity and exploratory behavior was assessed by the open-field test, as previously reported by Tabarelli et al. (2004). The apparatus was a round arena (34 cm in diameter) with the floor divided into 21 equal areas. Mice were treated orally with MPF4 (1.0 mmol/kg, p.o), dipyrone (1.0 mmol/kg, p.o), morphine (0.026 mmol/kg, p.o), vehicle (20 % PEG in saline, 10 ml/kg, p.o) or saline (10 ml/kg, p.o) and observed for a period of 5 min from 0.5 up to 4 hours after drug administration. The number of areas crossed with all paws and the number of rearing responses were recorded.

### *Statistical analysis*

The results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M, except the ID<sub>50</sub> value (i.e. the dose of compounds that reduces nociceptive responses to the order of 50% relative to the control value) which is reported as geometric means accompanied by respective 95% confidence limits and gastric lesion score which is reported as median followed by 25-75% quartiles. The ID<sub>50</sub> value was determined by non-linear regression analysis with a sigmoid dose-response equation using GraphPad Software 4.0 (Graph Pad, USA). The percentages of inhibition obtained for each individual experiment were in relation to the control values. Time-response data were analyzed by two-way repeated measures (RM) and analysis of variance (ANOVA) followed, where appropriate, by post hoc Student-Newman-Keuls test. The level of significance was set at  $P < 0.05$  and F values demonstrated by treatment versus time interactions and are presented in the text only when  $P < 0.05$ . Data of the gastric lesions were analyzed using Wilcoxon-Mann-Whitney test for group comparisons.



## **Results**

### *Effects of MPF4 on mechanical allodynia and paw edema induced by CFA injection*

CFA produced marked mechanical allodynia [ $F(3,38)=61.64$ ,  $P<0.001$ ] and paw edema [ $F(2,38)=33.34$ ,  $P<0.001$ ] in the injected paw 48 hours after i.pl. injection. The intraperitoneal administration of MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p) reduced mechanical allodynia induced by CFA for up to 4 hours after its administration [ $F(5,95)=8.94$ ,  $P<0.001$ ] (Figure 1A). The maximal effect was observed 1 h after administration with an inhibition of  $94\pm7\%$ . However, MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p) failed to reduce paw edema produced by CFA, when measured 3 h after its administration (Figure 1B). The oral administration of MPF4 also produced an anti-allodynic effect in the CFA model up to 4 hours after its administration [ $F(18,156)=4.84$ ,  $P<0.001$ ] (Figure 2A). Similar to MPF4, dipyrone (1.0 mmol/kg, p.o) was effective up to 4 hours after its administration. Moreover, morphine (0.026 mmol/kg, p.o) produced an anti-allodynic effect that was maintained for up to 6 hours [ $F(12,108)=7.46$ ,  $P<0.001$ ] (Figure 2B). The most pronounced effect of MPF4 (1.0 mmol/kg, p.o) was observed at 2 hours after its oral administration, when the  $ID_{50}$  obtained was 0.12 (0.06-0.20) mmol/kg and the maximal inhibition was 100%. Comparatively, dipyrone (1.0 mmol/kg, p.o.) and morphine (0.026 mmol/kg, p.o.) inhibited  $93\pm9\%$  and 100%, at the same time point of 2 h, respectively. However, the increase in paw diameter 48 h after CFA administration was not reversed by orally administered MPF4 (1.0 mmol/kg, p.o), dipyrone (1.0 mmol/kg, po) or morphine (0.026 mmol/kg p.o) (Figure 2C). Because MPF4 showed similar efficacy either intraperitoneally or orally in the CFA model, only oral treatment was used in further experiments.

### *Effects of MPF4 on mechanical allodynia induced by surgical incision*

Next, we evaluated the preemptive and curative anti-allodynic effect of MPF4 in the postoperative pain model. The plantar incision produced a marked mechanical allodynia in the injured paw [ $F(3,78)=72.48$ ,  $P<0.001$ ]. Preemptive treatment with MPF4 (1.0 mmol/kg, p.o.), dipyrene (1.0 mmol/kg, p.o.) or morphine (0.026 mmol/kg, p.o.) significantly decreased mechanical allodynia from 2 to 4 hours. However, only dipyrene and morphine were effective 6 hours after treatment [ $F(9,78)=11.50$ ,  $P<0.001$ ] (Figure 3 A). At 2 hours, the inhibition obtained was  $66\pm7\%$ ,  $73\pm9\%$  and  $88\pm8\%$ , for MPF4 (1.0 mmol/kg, p.o.), dipyrene (1.0 mmol/kg, p.o.) and morphine (0.026 mmol/kg, p.o.), respectively.

The curative treatment with drugs also reduced mechanical allodynia. Treatment with MPF4 (1.0 mmol/kg, p.o.), dipyrene (1.0 mmol/kg, p.o.) and morphine (0.026 mmol/kg, p.o.) significantly decreased mechanical allodynia at 2 and 4 h after treatment. However, only dipyrene and morphine were effective at 6 hours after treatment [ $F(12,104)=6.99$ ,  $P<0.001$ ] (Figure 3B). The inhibition obtained 2 hours after drug administration was  $53\pm9\%$ ,  $83\pm7\%$  and  $84\pm7\%$ , for MPF4 (1.0 mmol/kg, p.o.), dipyrene (1.0 mmol/kg, p.o.) and morphine (0.026 mmol/kg, p.o.), respectively.

### *Gastric lesion assessment*

A single oral administration of MPF4 did not induce significant mucosal lesion 4 hours after its administration. MPF4 (1.0 mmol/kg, p.o.) presented scores similar to those for the vehicle (20% PEG plus saline, 10 ml/kg, p.o.), corresponding to  $0.36\pm0.15$  and  $0.18\pm0.12$  lesion scores/stomach, respectively. In contrast, indomethacin (0.1 mmol/kg, p.o, which served as a positive control) induced higher score values at  $3.96\pm1.05$  lesion scores/stomach at 4 hours after its administration.

### *Rotarod and open-field tests*

Table 1 shows the effects of MPF4 (1.0 mmol/kg; p.o.), dipyrone (1.0 mmol/kg; p.o.) and morphine (0.026 mmol/kg, p.o) on the rotarod test from 0.5 to 4 hours. The compounds tested did not alter the fall latency or number of falls in the rotarod test when compared with the saline group. Table 2 demonstrates the effects of MPF4 (1.0 mmol/kg; p.o.), dipyrone (1.0 mmol/kg; p.o.) or morphine (0.026 mmol/kg, p.o) in the open-field test from 0.5 to 4 hours. None of the compounds altered the number of crossings or rearings responses when compared with the vehicle group.

## **Discussion**

We have previously demonstrated that MPF4 given intraperitoneally decreases neurogenic and inflammatory phases of nociception in the formalin test and also produces a dose-dependent antinociception in the hot-plate test without causing motor impairment (Milano et al., 2008). In addition, the antinociceptive effect of MPF4 was reversed by the opioid receptor antagonist, naloxone, but not by the  $\alpha_2$ -adrenergic receptor antagonist, yohimbine, or by PCPA treatment. Moreover, MPF4 given daily did not generate a tolerance to its antinociceptive effect or cross-tolerance with morphine. However, similar to morphine, MPF4 reduced gastrointestinal transit in mice. Thus, MPF4 seems to be an analgesic that acts through a receptor or a mechanism that is different from that with which morphine acts. Taking this into account, the purpose of the present study was to investigate the effects of MPF4 in models of arthritic and incisional pain.

Pathological pain is an unrelenting and debilitating condition that is often associated with inflammation. Inflammation can result from tissue damage (e.g., a surgical incision), exposure to chemical stimuli (e.g., the chemical constituents of a bee sting), or autoimmune processes (e.g., rheumatoid arthritis) (Negus et al., 2006). In each case, stimulation of the immune system results in release of multiple nociceptive mediators, which in turn produce numerous effects, including sustained activation and sensitization of both primary nociceptors and higher order neurons involved in the transmission of nociceptive input (Julius Basbaum, 2001). This hypersensitivity of nociceptive pathways contributes to the behavioral phenomena of allodynia (pain-like responses to normally innocuous stimuli) and/or hyperalgesia (enhanced pain-like responses to normally noxious stimuli), and the goal of drug treatment is to normalize pain sensitivity (Woolf and Costigan, 1999; Marchand et al., 2005).

It is well known that acute and chronic inflammatory pain diseases are still one of the most important health problems in the world (Buyukokuroglu, 2002). At present, few drugs are effective in treating these disorders and a great part of them present side effects (Bortalanza et al., 2002). In this context, the search for new compounds that could be applied in inflammatory pain therapy has been essential. The results of the present study show that the novel pyrazoline methyl ester MPF4 produced marked antinociception in models of inflammatory pain induced by adjuvant arthritis and incisional pain in mice. We have also confirmed the anti-allodynic effect produced by dipyrone and morphine in both models of pain.

CFA produces a chronic inflammatory condition in rodents and has served extensively as a laboratory model in the study of arthritic pain (Hogan et al., 2002; Nagakura et al., 2003). In the current study, we demonstrated that intraperitoneal or oral administration of MPF4 produced an inhibition of mechanical allodynia induced

by CFA in mice. MPF4 given by both routes showed roughly the same antinociceptive effect. The fact that this new pyrazole, given by different routes, presented similar efficacy seems to be relevant, because oral administration of drugs is more clinically usable due to its easy administration and low cost (Buxton, 2006). The antinociception caused by MPF4 seems unlikely to be associated with its anti-inflammatory action, as revealed by the complete lack of inhibition of paw edema caused by CFA. When compared with dipyrone and morphine, two clinically used analgesics, MPF4 presented a very similar anti-allodynic efficacy, as well as, an absence of the anti-edematogenic effect. Classical non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) or selective COX-2 inhibitors have been reported to reduce the development of allodynia and paw swelling in inflammation induced by injection of adjuvant arthritis in rats (Attal et al., 1988; Engelhardt et al., 1995; Ochi and Goto, 2000). The atypical NSAIDs, such as acetaminophen and dipyrone, seem to be more potent as analgesics than as anti-inflammatory agents. In fact, dipyrone possesses a significant antinociceptive effect even in the absence of an anti-inflammatory response in models of acute inflammation such as formalin and carrageenin tests (Lorenzetti et al., 1985; Beirith et al., 1998). Accordingly, in the model of chronic inflammation induced by CFA in rats, dipyrone proved to be more potent as an analgesic than as an anti-inflammatory agent (Tatsuo et al., 1994). The anti-allodynic effect of opiates in acute and chronic inflammation has also been well documented previously, as has their lack of an anti-edematogenic effect (Li et al., 2003; Nagakura et al., 2003; Tatsuo et al., 1994; Fraser et al., 2000). In the current study, we demonstrated that, similar to MPF4, acute treatment with dipyrone or morphine was not capable of reversing an installed edema.

The most common adverse effect of traditional NSAIDs is the induction of gastric lesions (Henry et al., 1996). The epidemiological data suggest that the prevalence of peptic ulcers in patients receiving conventional NSAID therapy ranges between 10 and 30% (Lazzaroni et al., 2004). In the US, traditional NSAID induced gastrointestinal injury is estimated to cause more than 100,000 hospitalisations annually (Singh et al., 1999). On the other hand, atypical NSAIDs with acetaminophen and dipyron did not seem to present this side-effect (Camu and Vanlersnrgue, 2002). In fact, in contrast with traditional NSAIDs, dipyron did not cause apparent gastrointestinal lesions in subchronic treatment in rats (Sánchez et al., 2002; Berenguer et al., 2004). In this study, unlike indomethacin (internal standard), a single oral dose of 1.0 mmol/kg of MPF4 (the dose that caused higher antinociception) did not cause gastric lesions. This suggests that, at experimental conditions, MPF4 possesses a superior gastric safety as compared to indomethacin. In addition, in the present study, we examined the anti-allodynic effect of MPF4 both before and after a surgical incisional pain model in mice. The postoperative incisional pain model displays similarities to the human postoperative pain syndrome, where surgical incision causes mechanical allodynia and other pain behaviours in the post-operative course of time (Brenann et al., 1996). Oral administration of traditional NSAIDs or selective COX-2 inhibitors has been previously shown to reduce tactile allodynia in models of postoperative pain (Yamamoto et al., 2000; Ochi et al., 2003; Whiteside et al., 2004). Morphine also seems to reduce pain behaviours in a rat model of incisional pain when administered pre- or postsurgically *via* the intrathecal, subcutaneous or intraperitoneal route (Brennan et al., 1997; Zahn et al., 1997; Pogatzi et al., 2002). However, the effective dose of morphine is often observed to be in a range that causes sedation (Whiteside et al., 2004). In addition, paracetamol and

dipyrone have been reported to reduce postoperative pain in humans with minimal side effects (Grundmann et al., 2006; Kampe et al., 2006). In our experiments, oral administration of the new MPF4 either pre- or postoperative, similar to dipyrone and morphine, markedly produced a decrease in mechanical allodynia induced by skin incision in a mouse model of postoperative pain. All compounds evaluated presented similar anti-allodynic efficacy between pre- and postoperative treatments. These results are in agreement with those of Prado et al. (2002) who showed that there was no significant difference between pre- and postoperative intraperitoneal treatments with morphine, dipyrone or diclofenac in a model of incisional pain.

Meaningful research on pain and analgesia depends on the development of validated procedures for identifying the presence of pain and quantifying its magnitude (Negus et al., 2006). Behavioural alterations, such as motor incoordination and sedation, might be misinterpreted as analgesia and produce false positive effects (Tabarelli et al., 2004). In the present study, oral administration of MPF4, dipyrone or morphine did not cause motor impairment, as evaluated by either forced locomotion in the rotarod or spontaneous locomotion in the open field test. Thus, the possibility that the antinociceptive effect of the compounds tested is due to any degree of motor impairment or sedation is improbable.

In conclusion, the present findings indicate that the novel MPF4 produces analgesia in inflammatory pain caused by intraplantar injection of CFA and in incisional pain caused by surgical incision in mice without causing motor damage. In addition, MPF4 produces powerful antinociception to pre- and postoperative pain, similar to dipyrone and morphine. Thus, the present results indicate that MPF4 might be of potential interest in the development of new drugs for the management of inflammatory pain.

## **References**

- Apfelbaum, S.J., Chen, C., Metha, S.S., Gan, T.J. 2003. Postoperative pain experience: results from a national survey suggest postoperative pain continues to be undermanaged. *Anesthesia and Analgesia* 97, 534-540.
- Attal, N., Kayser, V., Eschalier, A., Benoist, J.M., Guilbaud, G., 1988. Behavioural and electrophysiological evidence for an analgesic effect of a non-steroidal antiinflammatory agent sodium diclofenac. *Pain* 35, 341-348.
- Besson, J.M., 1999. The neurobiology of pain. *Lancet* 353, 1610-1615.
- Beirith, A., Santos, A.R.S., Rodrigues, A.L.S., Creczynski-Pasa, T.B., Calixto, J.B., 1998. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyron in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. *European Journal of Pharmacology* 345, 233-245.
- Bekhit, A., Abdel-Azien, T., 2004. Design, synthesis and biological evaluation of some pyrazole derivatives as anti-inflammatory-antimicrobial agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 12, 1935-1945.
- Bereguer, B., Alarcon De La Lastra, C., Motilva, V., La Casa, C., Herrerias, J.M., Pozo, D., Calero, M.J., 2004. Effects of celecoxib on acid-challenged gastric mucosa of rats: comparison with metamizole and piroxicam. *Digestive Diseases and Sciences* 49, 937-947.
- Brennan, T.J., Vandermeulen, E.P., Gebhart, G., 1996. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain* 64, 493-491.
- Brennan, T.J., Umali, E.F., Zhan, P.K., 1997. Comparison of pre versus post-incision administration of intrathecal bupivacaine and intrathecal morphine in a rat model of postoperative pain. *Anesthesiology* 87, 1517-1528.



- Bortalanza, L.B., Ferreira, J., Hess, S.C., Monache, F.D., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 2002. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a tritepene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. *European Journal of Pharmacology* 43: 203-208.
- Buyukokuroglu, M.E., 2000. Anti-inflammatory and antinociceptive properties of dantrolene sodium in rats and mice. *Pharmacological Research* 45, 455-459.
- Buxton, I.L.O., 2006. Pharmacokinetics and pharmacodynamics: The dynamics of drug absorption, distribution, action and elimination. In: Brunton, L., Lazo, J.S., Parker, K.L.P. (Ed.), *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. The McGraw-Hill, pp. 1-36.
- Camu, F., Vanlersberghe, C., 2002. Pharmacology of systemic analgesics. *Best Practice and Research in Clinical Anaesthesiology* 16, 475-488.
- Cao, Y.Q., Mantyh, P.W., Carlson, E.J., Gillespie, A., Epsten, C.J., Basbaum, A., 1998. Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature* 392, 390-393.
- Cheng, C.C., Elslager, E.F., Werbel, L.M., Priebe, S.R., Leopold, W.R., 1986. Pyrazole derivatives. 5. Synthesis and antineoplastic activity of 3-(2-chloroethyl)-3,4-dihydro-4-oxopyrazolo{5,1-d}-1,2,3,5-tetrazine-8-carboxamide and related compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* 29, 1544-1547.
- De Souza, F.R., Figuera, M.R., Lima, T.T.F., Bastiani, J., Barcellos, I.B., Almeida, C.E., Oliveira, M.R., Bonacorso, H.G., Flores, A.E., Mello, C.F., 2001. 3-Methyl 5-hydroxy-5-trichloromethyl-1*H*-1-pyrazolcarboxamide (MPCA) induces antinociception. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 68, 525-530.

- Dolin, S.J., Cashman, J.N., Bland, J.M., 2002. Effectiveness of acute postoperative pain management: Evidence from published data. *British Journal of Anaesthesia* 89, 409-423.
- Engelhardt, G., Homma, D., Schlegel, K., Utzmann, R., Schnitzler, C., 1995. Anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and related properties of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory agent with favourable gastrointestinal tolerance. *Inflammation Research* 44, 423-433.
- Ferreira, J., Campos, M.M., Pesquero, J.B., Araújo, R.C., Bader, M., Calixto, J.B., 2001. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 41:1006-1012.
- Fraser, G.I., Gaudreau, G.A., Clarke, P.B., Menard, D.P., Perkins, D., 2000. Antihyperalgesic effects of delta opioid agonists in a rat model of chronic inflammation. *British Journal of Pharmacology* 129:1668-1672.
- Godoy, M.C.M., Figuera, M.R., Flores, A.E., Rubin, M.A., Oliveira, M.R., Zanatta, N., Martins, M.A.P., Bonacorso, H.G., Mello, C.F., 2004.  $\alpha_2$ -Adrenoceptors and 5-HT receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazoles, but not of dipyrrone. *European Journal of Pharmacology* 496, 93-97.
- Gürsoy, A., Demirayak, S., Capan, G., Erol, K., Vural, K., 2000. Synthesis and preliminary evaluation of new 5-pyrazolinone derivatives as analgesic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 35, 359-364.
- Grundmann, U., Wörnle, C., Biedler, A., Kreuer, S., Wrobel, M., Wilhelm, W., 2006. The efficacy of the non-opioid analgesics parecoxib, paracetamol and metamizol for postoperative pain relief after lumbar microdiscectomy. *Anesthesia and Analgesia* 103, 217-222.

- Henry, D., Lim, I.L.L.Y., Garcia-Rodrigues, L.A., 1996. Variability in risk of gastrointestinal complications with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs: results of a collaborative meta-analysis. *British Medical Journal* 312, 1563-1566.
- Hogan, Q., 2002. Animal pain model. *Regional Anesthesia and Pain Medicine* 27, 385-401
- Julius, D., Basbaum, A., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413: 203-210.
- Kampe, S., Warm, M., Landwers, S., Dagtekin, O., Haussmann, S., Paul, M., Pilgram, B., Kiencke, P., 2006. Clinical equivalence of IV paracetamol compared to IV dipyron for postoperative analgesia after surgery for breast cancer. *Current Medical Research Opinion* 22, 1949-1954.
- Kehlet, H., Jensen, T.S., Woolf, C.J., 2006. Persistent postsurgical pain. *Lancet* 367:1618-1625
- Kromer, W., 1988. Endogenous and exogenous opioids in the control of gastrointestinal motility and secretion. *Pharmacological Reviews* 40, 121-162
- Lazzaroni, M., Bianchi, P. G., 2004. Gastrointestinal side-effects of traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs and new formulations. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 20, 48-58.
- Li, Shao., Zhao, Z., 2003. Morphine –induced decrease in mechanical allodynia is mediated by central, but not peripheral, opioid receptors in rats with inflammation. *European Journal of Pharmacology* 481, 203-206.
- Lorenzetti, B.B., Ferreira, S.H., 1985. Mode of analgesic action of dipyron: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. *European Journal of Pharmacology* 114, 375-381.

- Magistretti, M.J., Conti, M., Cristoni, A., 1998. Antiulcer activity of an anthocyanonidin from *Vaccinium myrtillus*. *Arzneimittelforschung*, 38, 686-690.
- Marchand, F., Perreti, M., McMahon, S., 2005. Role of the immune system in chronic pain. *Nature Reviews Neuroscience* 6, 521-532.
- Matheus, M.E., Oliveira, F.L., Freitas, C.C., 1991. Antinociceptive property of new 4-acyl-arylhydrazone pyrazole compounds. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 24, 1219-1222.
- Martins, M.A.P., Beck, P., Machado, P., Brondani, S., Moura, S., Zanatta, N., Bonacorso, H.G., Flores, A.F.C., 2006. Microwave-assisted synthesis of novel 5-trichloromethyl-4,5-dihydro-1*H*-1-pyrazole methyl esters under solvent free conditions. *Journal of Brazilian Chemical Society* 17, 408-411.
- McDougall, J.J. 2006. Arthritis and pain. Neurogenic origin of joint pain. *Arthritis Research and Therapeutics* 8(6), 220-226.
- Mercadante, S., 1999. Problems of long-term spinal opioid treatment in advanced cancer patients. *Pain* 79, 1-13
- Milano, J., Oliveira, S.M., Rossato, M.F., Drewes, C., Machado, P., Beck, P., Zanatta, N., Martins, M.A.P., Mello, C.F., Rubin, M.A., Ferreira, J., Bonacorso, H.G., 2008. Antinociceptive effect of novel trihalomethyl-substituted pyrazole methyl esters in mice. *European Journal of Pharmacology*, 581, 86-96.
- Nagakura, Y., Okada, M., Kohara, A., Kiso, T., Toya, T., Awanibuchi, F., Yamaguchi, T., 2003. Allodynia and hyperalgesia in adjuvant –induced arthritic rats: time course of progression and efficacy of analgesics. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 306, 490-497.
- Negus, S.S., Bandera, T.W., Brandt, M.R., Bilsky, E.J., Becerra, L., Borsook, D., 2006. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: Recent advances

- and future challenges. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 319, 507-514.
- Ochi, T., Jobo-Magari, K., Yonezawa, A., Matsumori, K., Fuji, T., 1999a. Anti-inflammatory and analgesic effects of a pyrazole derivative FR140423. *European Journal of Pharmacology* 365:259-266.
- Ochi, T., Fujii, T., Motoyama, Y., Goto, T., 1999b. Antinociceptive properties of FR140423 mediated through spinal  $\delta$ -, but not  $\mu$ - and  $\kappa$ -, opioid receptors. *European Journal of Pharmacology* 380:73-79.
- Ochi, T., Goto, T., 2000. Anti-inflammatory effect of FR 140423, a novel selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, in rat adjuvant arthritis without gastrointestinal side effects. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 52, 553-560.
- Ochi, T., Ohkubo, Y., Mutoh, S., 2003. Effect of systemic FR 140423, a new analgesic compound, in a rat model of postoperative pain: contribution of delta-opioid receptors. *Neuroscience Letters* 350, 29-32.
- Pogatzki, E.M., Zahn, P.K., Brennan, T.J., 2000. Effect of pretreatment with intrathecal excitatory amino acid receptor antagonists on the development of pain behavior caused by plantar incision. *Anesthesiology* 93, 489-496.
- Pogatzki, E.M., Vandermeulen, E.P., Brennan, T.J., 2002. Effect of plantar local anesthetic injection on dorsal horn neuron activity and pain behaviors caused by incision. *Pain* 87, 151-161.
- Pogatzki, E.M., Raja, S.N., 2003. A mouse model of incisional pain. *Anesthesiology* 99, 1023-1027.
- Prado, W.A., Pontes, R.M.C., 2002. Presurgical ketoprofen, but not morphine, dipyrrone, diclophenac or tenoxicam, preempts post-incisional mechanical

- allodynia in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35, 111-119.
- Prokopp, C.R., Rubin, M.A., Sauzem, P.D., Souza, A.H., Berlese, D.B., Lorega, R.V., Muniz, M.N., Bonacorso, H.G., Zanatta, N., Martins, M.A.P., Mello, C.F., 2006. A pyrazolyl-thiazole derivative causes antinociception in mice. *Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research* 39, 795-799.
- Sanchez, S., Alarcon de la Lastra, C., Ortiz, P., Moltiva, V., Martin, M.J., 2002. Gastrintestinal tolerability of metamizol, acetaminophen and diclofenac in subchronic treatment in rats. *Digestive Diseases and Sciences* 47, 2791-2798.
- Sauzem, P.D., Machado, P., Rubin, M.A., Sant'Anna, G.S., Faber, H.B., De Souza A.H., Mello, C.F., Beck, P., Burrow, R.A., Bonacorso, H.G., Zanatta, N., Martins, M.A.P., 2007. Design and microwave-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoles: Novel agents with analgesic and anti-inflammatory properties. *European Journal of Medicinal Chemistry*, in press.
- Scholz, J., Woolf, C. 2002. Can we conquer pain? *Nature Neuroscience* 5, 1062-1067.
- Singh, G., Triadafilopoulos, G., 1999. Epidemiology of NSAID induced gastrointestinal complications. *Journal of Reumatology* 26, 18-24.
- Tabarelli, Z., Berlese, D.B., Sauzem, P.D., Rubin, M.A., Missio, T.P., Teixeira, M.V., Sinhorin, A.P., Martins, M.A.P., Zanatta, N., Bonacorso, H.G., Mello, C.F., 2004. Antinociceptive effect of novel pyrazolines in mice. *Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research* 37, 1531-1540.
- Tatsuo, M.A., Carvalho, W.M., Silva, C.V., Miranda, A.E., Ferreira, S.H., Francischi, J.N., 1994. Analgesic and inflammatory affects of dipyron in rat adjuvant arthritis model. *Inflammation* 18, 399-405.

- Whiteside, G.T., Harrison, J., Boulet, J., Mark, L., Perason, M., Gottshal, S., Walker, K., 2004. Pharmacological characterization of a rat model of incisional pain. *British Journal of Pharmacology* 141, 85-91.
- Whiteside, G.T., Boulet, J.M., Walker, K., 2005. The role of central and peripheral  $\mu$ -opioid receptors in inflammatory pain and edema: A study using morphine and DiPOA [8-(3,3-Diphenyl-propyl)4-Oxo-1 Phenyl-1,3,8-triazaspiro [4,5] dec-3-yl]-acetic acid). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 314, 1234-1240.
- Woolf, C. and Costigan, M., 1999. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proceedings of National Academy of Science USA* 96, 7723-7730.
- Yamamoto, T., Sakashita, Y., Nozaki-Taguchi, N., 2000. Anti-allodynic effects of oral COX-2 selective inhibitor on post-operative pain in the rat. *Canadian Journal of Anaesthesiology* 47, 354-360.
- Zahn, P.K., Gysbers, D., Brennan, T.J., 1997. Effect of systemic and intrathecal morphine in a rat model of postoperative pain. *Anesthesiology* 86, 1066-1077.
- Zahn, P.K., Pogatski, E.M., Brennan, T.J., 2005. Spinal administration of MK-801 and NBQX demonstrates NMDA-independent dorsal horn sensitization in incisional pain. *Pain* 114, 499-510.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.

### **Figure legends**

Figure 1 - Time-courses for the effect of MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p.) on mechanical allodynia (A) and absence of the effect of MPF4 (1.0 mmol/kg, i.p.) in paw edema (B) induced by CFA in mice. \* $p < 0.05$  denotes the significance level when compared with vehicle- treated (rice oil) mice (two-way repeated measures (ANOVA) followed by post hoc SNK test). #  $p < 0.05$  denotes the significance level when compared with baseline (B) value 48 h before CFA injection. The point 0 on the X-axis represents the measured mechanical allodynia or paw diameter immediately before drug treatment (vehicle or MPF4 1.0 mmol/kg). The results represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 10-11 animals.

Figure 2 - Time-courses for the effect of MPF4 (0.1-1.0 mmol/kg, p.o.) (A), dipyrone (1.0 mmol/kg, p.o.) and morphine (0.026 mmol/kg, p.o) (B), on mechanical allodynia and absence of the effect of MPF4 (1.0 mmol/kg, p.o.), dipyrone (1.0 mmol/kg, p.o.) and morphine (0.026 mmol/kg, p.o) in paw edema (C), induced by CFA in mice. \* $p < 0.05$  denotes the significance level when compared with vehicle -treated (20% PEG) mice (two-way repeated measures (ANOVA) followed by SNK test). # $p < 0.05$  denotes the significance level when compared with baseline (B) value 48 h before CFA injection. The point 0 on the X-axis represents the measured mechanical allodynia or paw diameter immediately before drug treatment. The results represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 6-9 animals

Figure 3 - Time-courses for the preemptive (A) or curative (B) effect of MPF4 (1.0 mmol/kg, p.o.), dipyrone (1.0 mmol/kg, p.o.) and morphine (0.026 mmol/kg, p.o) on



mechanical allodynia caused by skin incision. \* $p < 0.05$  denotes the significance level when compared with vehicle-treated (20% PEG) mice (two-way repeated measures (ANOVA) followed by SNK test). # $p < 0.05$  denotes the significance level when compared with baseline value (B) before incision. The results represent the mean  $\pm$  S.E.M. of 7-9 animals.

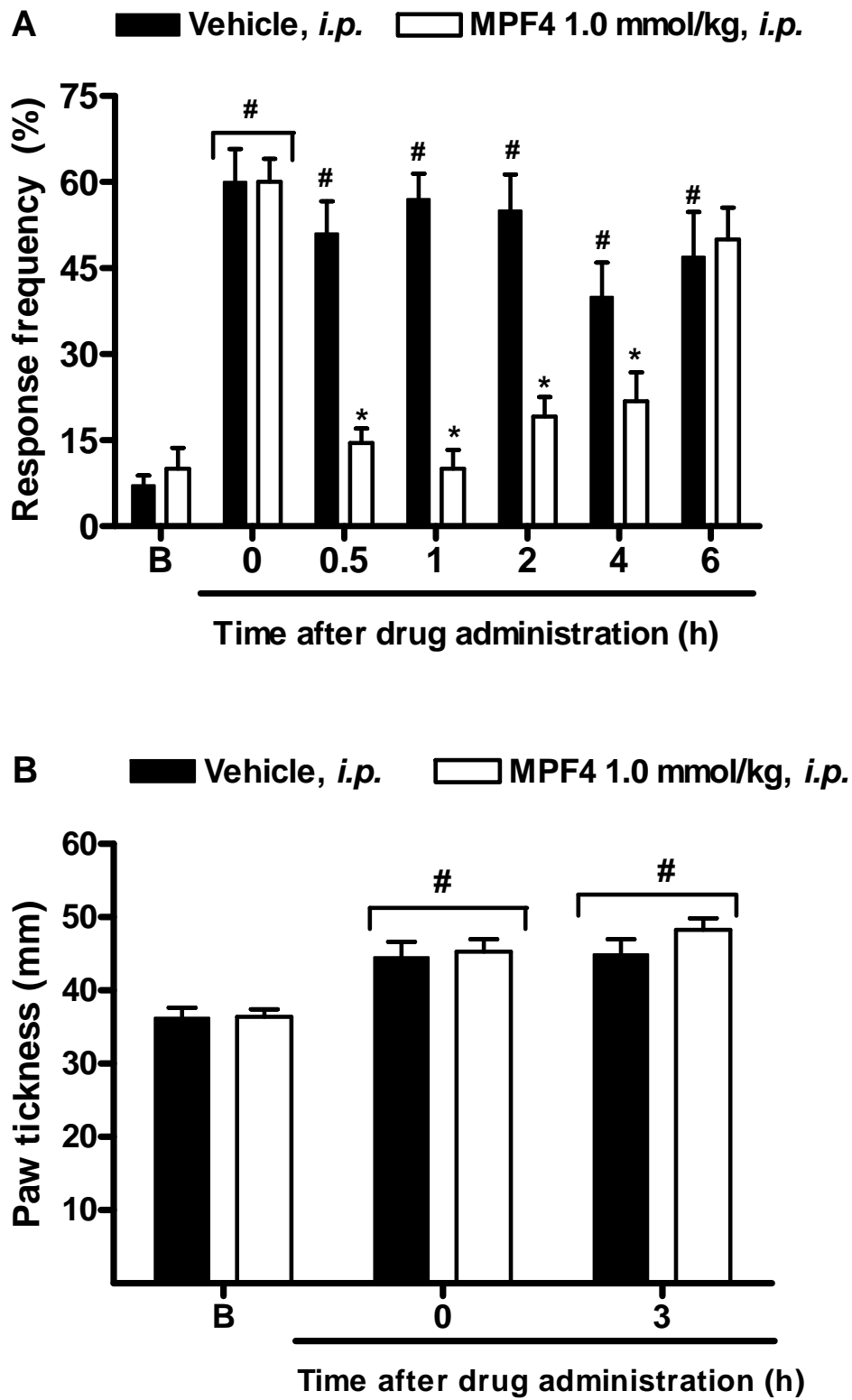


Fig. 1

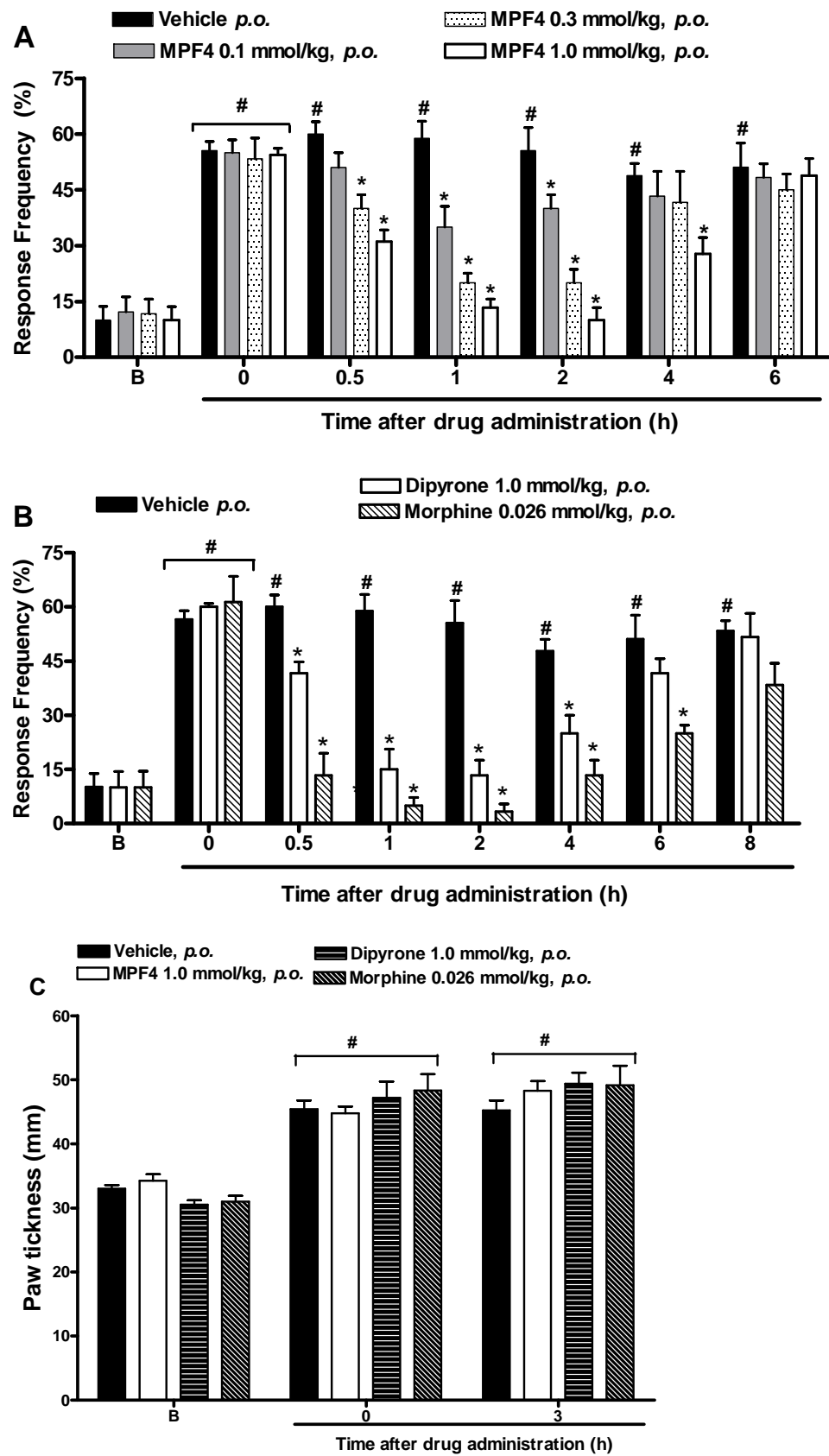


Fig. 2

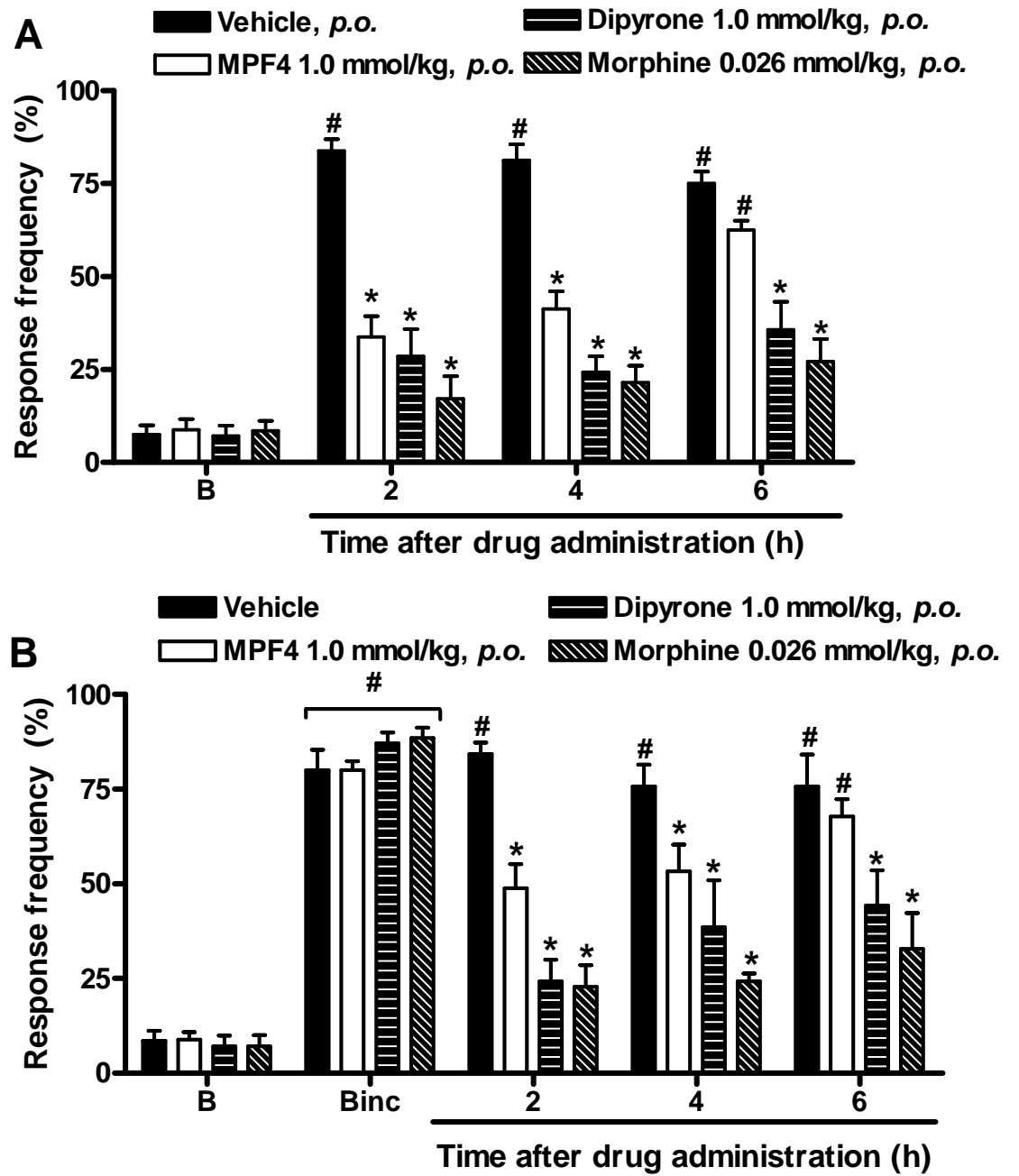


Fig. 3

**Table 1** Effect of the MPF4, dipyrone and morphine oral administration on the latency for the first fall and on the number of falls from the rotaroad

| Treatment<br>(mmol/kg) | Fall latency (s) |        |        |        | Number of falls |      |      |       |
|------------------------|------------------|--------|--------|--------|-----------------|------|------|-------|
|                        | 0.5 h            | 1 h    | 2 h    | 4 h    | 0.5 h           | 1 h  | 2 h  | 4 h   |
| Saline                 | 72.1±            | 83.5 ± | 127.7± | 197.0± | 3.4±            | 2.5± | 1.6± | 0.6 ± |
|                        | 22.4             | 20.7   | 32.4   | 16.6   | 0.5             | 0.5  | 0.5  | 0.3   |
| 20% PEG                | 83.6±            | 104.6± | 205.0± | 212.0± | 2.2±            | 1.6± | 0.6± | 0.2±  |
|                        | 29.2             | 21.4   | 19.6   | 27.6   | 0.5             | 0.3  | 0.3  | 0.2   |
| MPF4 (1.0)             | 60.6±            | 155.8± | 164.0± | 210.0± | 2.6±            | 1.0± | 0.5± | 0.3 ± |
|                        | 5.2              | 28.4   | 44.6   | 30.0   | 0.4             | 0.4  | 0.3  | 0.3   |
| Dipyrone(1.0)          | 82.6±            | 140.3± | 119.0± | 194.3± | 2.2±            | 0.8± | 0.6± | 0.3±  |
|                        | 31.8             | 45.7   | 42.1   | 8.2    | 0.6             | 0.5  | 0.3  | 0.2   |
| Morphine (0.026)       | 82.3±            | 114.3± | 208.3± | 207.1± | 2.0±            | 1.2± | 0.6± | 0.2±  |
|                        | 33.5             | 32.6   | 24.5   | 32.5   | 0.5             | 0.5  | 0.4  | 0.2   |

Data are means ± S.E.M. N= 6-7 number of animals in each group.

**Table 2** Effect of the MPF4, dipyrone and morphine oral administration on the number of crossings and rearings in open-field test in mice

| Treatment<br>(mmol/kg) | Crossings  |             |            |            | Rearings   |           |           |           |
|------------------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|
|                        | 0.5 h      | 1 h         | 2 h        | 4 h        | 0.5 h      | 1 h       | 2 h       | 4 h       |
| Saline                 | 28.7± 3.1  | 25.3 ± 2.7  | 23.5 ± 4.0 | 15.0 ± 5.0 | 12.0 ± 1.5 | 7.8 ± 2.0 | 5.6 ± 1.7 | 3.5 ± 1.6 |
| 20% PEG                | 25.6 ± 6.2 | 23.5 ± 5.0  | 17.0 ± 2.0 | 13.7 ± 2.0 | 12.5 ± 3.0 | 6.7 ± 2.5 | 5.5 ± 1.2 | 5.2 ± 1.3 |
| MPF4 (1.0)             | 33.6 ± 8.8 | 31.2 ± 11.0 | 18.0 ± 4.0 | 14.0 ± 2.0 | 10.5 ± 1.0 | 7.7 ± 6.0 | 4.2 ± 0.7 | 3.5 ± 0.9 |
| Dipyrone (1.0)         | 26.6 ± 5.2 | 16.0 ± 2.0  | 16.5 ± 3.0 | 14.0 ± 3.0 | 12.0 ± 2.5 | 3.7 ± 2.0 | 4.2 ± 1.0 | 4.5 ± 0.8 |
| Morphine (0.026)       | 34.0 ± 8.0 | 36.5 ± 8.0  | 32.5 ± 7.0 | 26.0 ± 6.0 | 7.0 ± 1.5  | 3.7 ± 0.6 | 4.0 ± 0.8 | 3.5 ± 1.7 |

Data are means ± S.E.M. N= 6-7 number of animals in each group.

## 5 DISCUSSÃO

A dor é um sintoma que afeta milhares de indivíduos diariamente, sendo comum a muitas patologias. Embora exista uma ampla gama de analgésicos disponíveis no mercado, estes possuem efeitos adversos que acabam por limitar o tratamento terapêutico. Além disto, alguns tipos de dor são refratárias aos analgésicos disponíveis (MENDELL & SAHENK, 2003). Portanto, é bem conhecido o grande interesse das companhias farmacêuticas no desenvolvimento de compostos mais efetivos e seguros para o tratamento da dor.

Neste contexto, os resultados obtidos no presente estudo confirmam e estendem os dados da literatura que revelam que para o tratamento da dor, compostos contendo o núcleo pirazólico são promissores. O tratamento sistêmico dos animais com os pirazóis inéditos MPF3, MPF4, MPC13 e MPC14, foi efetivo em inibir a nocicepção em modelos de dor induzida por estímulo nocivo químico (formalina) e térmico (placa-quente).

Além disso, o pirazol MPF4 foi efetivo no tratamento da nocicepção inflamatória crônica induzida pela administração de Adjuvante Completo de Freund (ACF) e dor inflamatória aguda causada por incisão na pata de camundongos. O efeito de MPF4 na nocicepção térmica não foi revertido pelo pré-tratamento dos animais com ioimbina ou PCPA, mas sim, pelo antagonista opióide não seletivo naloxona. Em adição, o tratamento dos animais durante um período de oito dias consecutivos com MPF4, ao contrário daqueles tratados com morfina, não desenvolveram tolerância antinociceptiva, nem tolerância cruzada com os animais tolerantes à morfina. Similar ao opióide morfina, MPF4 inibiu o TGI de camundongos tratados agudamente, sendo este efeito revertido por naloxona. Além disso, diferente do AINE tradicional indometacina, a administração oral de MPF4 não desenvolveu lesão gástrica em camundongos.

Vários modelos de nocicepção podem ser utilizados para avaliar a atividade antinociceptiva de diferentes compostos. No entanto, de uma maneira geral, esses modelos possuem características próprias que devem ser consideradas, tais como simplicidade, reprodutibilidade, validade dos resultados obtidos, e principalmente, a

possibilidade de serem correlacionados com estudos clínicos (BESSON, 1999; LE BARS et al., 2001).

O modelo de dor induzido pela injeção intraplantar de formalina, é uma das ferramentas mais usadas para pesquisa de compostos com ação antinociceptiva (HUNSKAAR & HOLE, 1987; McNAMARA et al., 2007). O modelo da formalina é caracterizado por dois tipos distintos de nocicepção: a nocicepção neurogênica (primeira fase) e a nocicepção inflamatória (segunda fase). A primeira fase da nocicepção, causada pela formalina, envolve principalmente a estimulação das fibras aferentes do tipo C, que induzem um comportamento de dor de lambe ou morder a pata injetada (SHIBATA et al., 1989; TJOLSEN et al., 1992).

Recentemente, foi demonstrado que a formalina pode ativar os nociceptores pela sua interação direta com o receptor de potencial transitório tipo anquirina 1 (TRPA1) (McNAMARA et al., 2007). A formalina também é capaz de degranular mastócitos causando a liberação de histamina e serotonina (PARADA et al., 2001). A ativação do nociceptor por histamina e serotonina libera neuropeptídeos dos terminais periféricos dos aferentes primários, como substância P, neurocinina A, neurocinina B e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (SANTOS & CALIXTO, 1997), além de aminoácidos excitatórios como glutamato e aspartato (OMOTE et al., 1998). Estes mediadores químicos parecem ser os responsáveis pela nocicepção transitória observada nos primeiros cinco minutos após a injeção de formalina.

A entrada de estímulos nociceptivos no SNC ativa as vias descendentes inibitórias analgésicas, e comportamentalmente, pode ser observada uma interfase entre cinco a quinze minutos após a aplicação de formalina, período no qual praticamente não é observada resposta nociceptiva (MILLAN, 2002).

Por outro lado, a liberação de mediadores nociceptivos, durante a primeira fase do teste da formalina, causa extravasamento plasmático, vasodilação de capilares vizinhos, ativação de fibras simpáticas, de mastócitos e de macrófagos. Este processo também induz a liberação de mais mediadores do processo inflamatório, tais como as cininas, prostaglandinas, citocinas, dentre outros (SHIBATA et al., 1989; CORRÊA & CALIXTO, 1993). Este conjunto de mediadores inflamatórios produz sensibilização das vias periféricas e centrais de condução da dor, característica da segunda fase da nocicepção (fase inflamatória), observada de

quinze a trinta minutos após a aplicação da formalina (HUNSKAAR & HOLE, 1987; TJOLSEN et al., 1992).

A ação de drogas analgésicas é diferente na primeira e segunda fase do teste da formalina. Os opióides que possuem ação primariamente central inibem as duas fases similarmente. Porém, analgésicos não opióides (como a dipirona, por exemplo), os quais possuem ação central e periférica, produzem efeito antinociceptivo em ambas as fases, mas particularmente na segunda, a qual é inibida por doses menores que a primeira fase (HUNSKAAR & HOLE, 1987; SHIBATA et al., 1989).

Similar aos analgésicos não opióides, os compostos avaliados no presente estudo, apresentaram maior potência e eficácia em inibir a segunda fase da resposta álgica do modelo de nocicepção induzida por formalina. Contudo, em relação aos pirazóis trifluormetil substituídos (MPF3 e MPF4), posicionando o substituinte metila na posição 3 do anel pirazólico (MPF3), há uma redução na potência do composto na nocicepção causada por formalina. Por outro lado, para os compostos triclorometil substituídos análogos (MPC13 e MPC14), ocorreu um aumento na eficácia em ambas as fases do teste de nocicepção induzido por formalina (MPC13). No entanto, é oportuno enfatizar que um maior número de compostos análogos devem ser sintetizados e avaliados para realizar uma relação estrutura química-atividade biológica mais completa.

A fim de obter a confirmação do efeito antinociceptivo dos compostos testados, avaliando-os frente a outro tipo de estímulo nocivo, utilizou-se o teste da placa-quente. Este modelo de dor, diferente do teste da formalina, mede a resposta nociceptiva a um breve estímulo nocivo. No teste da placa quente, o estímulo térmico ativa nociceptores, que transmitem a informação nociceptiva aguda ao corno dorsal da medula espinhal e, posteriormente, a centros corticais, produzindo uma resposta nociceptiva organizada (MOGIL & ADHIKARI, 1999). Por este motivo a placa quente é também um dos modelos mais utilizados no estudo de drogas analgésicas, principalmente de drogas que possuem ação no SNC, tais como opióides (ANKIER, 1974; LE BARS et al., 2001).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que os pirazóis avaliados aumentaram significativamente a latência dos animais na nocicepção térmica quando analisada no teste da placa quente mantido à temperatura de 50°C.



Além disso, verificou-se que MPF3 e MPF4, que possuem o grupamento trifluormetil na posição 5 do anel pirazol, ao contrário dos análogos MPC13 e MPC14, que apresentam o grupo triclorometil na posição 5 do anel pirazol, causaram antinocicepção no teste da placa quente até 60 min após sua administração. De acordo com a literatura, a incorporação de um átomo de flúor, em substituição ao átomo de H, pode resultar em um composto metabolicamente mais estável e com maior lipossolubilidade (PARCK et al., 2001; BERGSTROM & SWARTLING, 1988). Porém, estudos farmacocinéticos deverão ser desenvolvidos para melhor elucidar esta questão.

O uso de estímulo nocivo térmico como ferramenta para avaliar a ação antinociceptiva de analgésicos não-opioides é controverso. Enquanto alguns estudos demonstram que a dipirona produz antinocicepção em roedores contra a nocicepção térmica (BEIRITH et al., 1998; HERNÁNDEZ-DELGADILLO et al., 2003), outros estudos não verificaram tal efeito (AKMAN et al., 1996; TAYLOR et al., 1998).

As discrepâncias na literatura são provavelmente devidas à intensidade do estímulo térmico aplicado. De fato, o efeito antinociceptivo de analgésicos não opioides, como o ácido acetil salicílico e o paracetamol, pode ser facilmente quantificado no teste da placa quente mantida à temperatura de 50°C (ANKIER, 1974). Em acordo, no presente estudo o analgésico não opioide dipirona (usado como controle positivo) induziu antinocicepção no teste da placa-quente mantida à temperatura 50°C, a qual não foi verificada à temperatura de 55°C (dado não mostrado).

Outro objetivo deste trabalho foi analisar alguns dos mecanismos pelos quais os pirazóis poderiam estar promovendo seu efeito antinociceptivo. Para tal, foi utilizado o modelo de nocicepção da placa quente, devido à praticidade deste modelo. O composto escolhido foi o MPF4, devido a maior durabilidade do efeito antinociceptivo apresentada pelos compostos trifluormetil substituídos, bem como, a maior potência e similar eficácia apresentada por MPF4 em relação ao seu análogo MPF3.

Na literatura, diferentes mecanismos são propostos para a antinocicepção mediada por pirazóis, entre eles, os sistemas noradrenérgico, serotoninérgico e opioidérgico parecem estar envolvidos (OCHI et al., 1999 b; OCHI; GOTO, 2000 a; GODOY et al., 2004; TABARELLI et al., 2004).

Godoy et al. (2004) verificaram o envolvimento do mecanismo noradrenérgico  $\alpha_2$  na ação antinociceptiva do pirazol MPCA. Porém, no presente estudo, os dados obtidos sugerem que os receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$  parecem não estar envolvidos na antinocicepção causada por MPF4, pois o pré-tratamento dos animais com ioimbina, na mesma dose que reverteu o efeito do agonista clonidina, não reverteu a ação antinociceptiva de MPF4.

Da mesma forma, o mecanismo serotoninérgico endógeno, o qual pode estar envolvido na antinocicepção da dipirona parece não interferir na antinocicepção de MPF4. Esta afirmação é sustentada pela observação de que o pré-tratamento dos animais com PCPA (inibidor da enzima triptofano hidroxilase, a qual é responsável pela síntese de serotonina), em uma dose que inibe a síntese de serotonina (DAILLY et al., 2006), reverteu a antinocicepção causada por dipirona, mas não interferiu na antinocicepção causada por MPF4. De fato, Miranda, Lemus e Pinardi (2003) verificaram que o pré-tratamento dos animais com PCPA, reverteu o efeito antinociceptivo de dipirona, diclofenaco e piroxicam no teste das contorções abdominais e da retirada de cauda, sugerindo o envolvimento da rota serotoninérgica descendente na antinocicepção destes compostos. Contudo, é importante salientar que embora a síntese de 5-HT pareça não estar envolvida com a antinocicepção de MPF4, uma possível interação direta do MPF4 com os receptores serotoninérgicos 5-HT não pode ser excluída.

Finalmente, a antinocicepção produzida por MPF4 parece envolver o sistema opióide. O pré-tratamento dos animais com o antagonista não seletivo naloxona, reverteu completamente a antinocicepção induzida pela morfina, na mesma dose que reverteu a atividade antinociceptiva causada por MPF4 no teste da placa quente e na fase inflamatória do teste da formalina.

Diferente da fase inflamatória, na fase neurogênica, verificou-se apenas uma tendência da naloxona em reverter a antinocicepção provocada por MPF4, a qual não foi significativa. Isto sugere que o efeito antinociceptivo de MPF4 na fase neurogênica do teste da formalina pode envolver outros mecanismos além do sistema opióide. Em adição, o tratamento combinado dos animais com MPF4 e morfina produziu um efeito aditivo na antinocicepção, ou seja, um efeito antinociceptivo igual à soma daquele produzido por cada droga individualmente. A administração combinada de AINEs com opióides pode produzir um aumento no efeito antinociceptivo (SANDRINI et al., 1998; ZELCER et al., 2005). De fato, a co-

administração de dipirona aumenta o efeito antinociceptivo da morfina, por um mecanismo que parece envolver, principalmente, o sistema opióide endógeno (TAYLOR et al., 1998; AGUIRRE-BANUELOS & GRANADOS-SOTO, 1999; HERNÁNDEZ-DELGADILLO et al., 2002; HERNÁNDEZ-DELGADILLO & CRUZ, 2006).

Na literatura, ensaios de ligação específica demonstram que pirazóis, tais como dipirona e FR140423 não se ligam diretamente aos receptores opióides (POPOVA & STANEVA-STOYCHEVA, 1989; OCHI et al., 1999 b). Contudo, a ação antinociceptiva destes pirazóis parece estar relacionada à liberação de opióides endógenos (VLASKOVSKA, 1989; OCHI et al., 2000; HERNÁNDEZ & VANEGAS, 2001; VASQUEZ et al., 2005).

Portanto, é importante salientar que os resultados deste estudo sugerem que o sistema opióide está envolvido na mediação da atividade antinociceptiva de MPF4. Entretanto, estudos adicionais são necessários para indicar qual o tipo de receptor envolvido, bem como, se o efeito antinociceptivo de MPF4 é devido à sua ligação direta ao receptor opióide ou se é mediado indiretamente, via liberação de opióides endógenos.

Devido à possibilidade do envolvimento do mecanismo opióide na antinocicepção produzida por MPF4, julgou-se oportuno, verificar o se MPF4 compartilha de alguns efeitos adversos comumente apresentados pela classe de opióides, tais como a constipação e a tolerância ao efeito antinociceptivo. A constipação é um dos mais comuns efeitos adversos que aparece com o uso de analgésicos opióides. Entretanto, o desenvolvimento da constipação se difere do desenvolvimento de tolerância ao efeito analgésico. Enquanto a tolerância ao efeito analgésico ocorre somente após repetidas administrações, a constipação aparece após a primeira administração de morfina (KROMER, 1988).

Um dos métodos mais utilizados para avaliar a inibição do TGI em roedores é através da administração oral de uma suspensão aquosa de carvão vegetal, onde a distância percorrida pelo carvão no intestino do animal representa a medida da motilidade gástrica (MITTELSTARDT, 2005). No presente estudo, similarmente à morfina, o MPF4 produziu inibição do TGI após uma única administração. Porém, a inibição do TGI causada por MPF4 foi menor que a inibição causada pelo opióide morfina. Contudo, similar ao resultado observado no teste de nocicepção, o

antagonista opióide não seletivo naloxona reverteu a inibição do TGI causada por morfina, na mesma dose que reverteu a inibição do TGI causada por MPF4.

A inibição do TGI provocada por opióides parece estar associada ao efeito analgésico, visto que, o efeito da morfina no TGI é mediado principalmente por receptores  $\mu$  opióides localizados em nível central e periférico (KROMER, 1988; PUIG & POL, 1997). De fato, o agonista seletivo  $\mu$  (DAMGO) e morfina produzem maior efeito analgésico e maior inibição do TGI do que o agonista seletivo  $\delta$  (DPDPE) e o agonista seletivo  $\kappa$  (U-50488) (PORRECA et al., 1984). Além disso, a inibição do TGI provocada por opióides pode ser mediada por opióides endógenos presentes no sistema gastrointestinal (KROMER, 1988). Em adição, os resultados obtidos neste estudo confirmam dados da literatura que mostram que a dipirona não causa inibição do TGI em roedores (HERNÁNDEZ-DELGADILLO et al., 2002).

Já a tolerância analgésica, como um efeito adverso de opióides, é uma resposta adaptativa. Repetidas administrações de morfina reduzem gradualmente sua eficácia analgésica, desencadeando o fenômeno conhecido como tolerância analgésica, a qual também parece estar mais ligada ao receptor opióide  $\mu$  (WONG et al., 1996; PASTERNAK, 2001).

No presente estudo, após o tratamento diário dos animais com morfina (uma vez ao dia), durante oito dias consecutivos, observou-se o aparecimento de tolerância ao efeito antinociceptivo. Porém, quando o mesmo protocolo experimental foi aplicado ao MPF4, a tolerância ao efeito antinociceptivo não foi observada. É descrito na literatura que administrações repetidas de morfina podem desenvolver tolerância não somente à própria morfina, mas também a outras drogas que agem pelo mesmo mecanismo, sendo esse efeito conhecido como tolerância cruzada (COLLETT, 1998; PASTERNAK, 2001). Contudo, no presente estudo, não foi observada tolerância cruzada entre a ação antinociceptiva da morfina e MPF4, nas condições experimentais avaliadas.

A dor que requer intervenção clínica é freqüentemente associada com inflamação. A inflamação pode resultar de dano tecidual (por exemplo, incisão cirúrgica), de exposição a um estímulo químico (por exemplo, picada de abelha), ou de processos autoimunes (por exemplo, na artrite reumatóide). Os tratamentos terapêuticos disponíveis, algumas vezes, apresentam eficácia limitada, em particular

no tratamento da dor inflamatória crônica como nos casos de artrite (McDOUGALL, 2006).

Devido à alta efetividade de MPF4 em inibir a segunda fase do teste da formalina, e somando-se ao fato da grande dificuldade de tratamento da dor inflamatória, julgou-se oportuno avaliar a ação deste composto em modelos de dor inflamatória. Para isso foram utilizados o modelo de dor inflamatória crônica, induzida pela aplicação intraplantar de ACF e o modelo de dor inflamatória aguda, provocada por incisão plantar.

Tanto a dor causada por ACF quanto a dor causada por incisão geram um estado de hiperexcitabilidade periférica e central dando origem aos fenômenos conhecidos como hiperalgesia e alodínia (BRENNAN et al., 1996; NAGAKURA et al., 2003). Considerando-se que a alodínia mecânica (dor patológica e persistente que é produzida por estímulos mecânicos anteriormente inócuos) é um dos sintomas clínicos mais comuns em casos de dor patológica, investigou-se no presente estudo a possível propriedade antialodínica de MPF4 frente à um estímulo mecânico.

A injeção intraplantar de ACF (composto por *Mycobacterium tuberculosis* inativadas por calor) em animais produz uma condição inflamatória crônica, que tem similaridade com doenças crônicas humanas, tais como a artrite reumatóide e as inflamações graves nas articulações, por isso é extensamente utilizado como modelo experimental (HOGAN, 2002).

O mecanismo da dor inflamatória mediada por ACF parece envolver uma sensibilização local do nociceptor (sensibilização periférica), sensibilização de neurônios no corno dorsal da medula (sensibilização central) e ativação do sistema imune. Aumento nos níveis de prostaglandina  $E_2$  no líquido cérebro espinhal e aumento nos níveis de  $TNF\alpha$  na pata inflamada e na pata contralateral de animais injetados com CFA, também reforçam a hipótese de processo sistêmico (WOOLF et al., 1997; SAMAD et al., 2001).

No presente estudo, a injeção intraplantar de ACF produziu uma acentuada alodínia mecânica na pata injetada dos animais, 48 horas após sua administração. Um fato interessante é que o tratamento dos animais com MPF4, administrado por via intraperitoneal ou oral, foi similarmente eficaz em inibir a alodínia mecânica induzida por ACF, um efeito que iniciou 30 minutos após sua administração e que perdurou até quatro horas.

Diferente da grande parte das drogas analgésicas utilizadas na clínica, o MPF4 apresentou praticamente a mesma eficácia quando administrado por via oral e por via intraperitoneal, sugerindo que a sua biodisponibilidade é praticamente a mesma quando administrado por ambas as vias. Porém, estudos farmacocinéticos específicos deverão ser realizados para avaliar melhor esta possibilidade.

A administração de ACF também causou edema na pata injetada dos animais, porém ao contrário da ação antialodínica, o MPF4 não foi eficaz em diminuir o edema produzido por ACF.

Tendo em vista que o uso da via oral em humanos é a mais utilizada, devido às inúmeras vantagens apresentadas por sua utilização, tais como segurança, praticidade e economia (BUXTON, 2006), optou-se somente pela administração oral em experimentos realizados posteriormente.

Com a finalidade de comparar o MPF4 com analgésicos mais comumente utilizados na clínica, foram realizados experimentos paralelos utilizando dipirona e morfina. Os dados obtidos demonstram que nas condições experimentais avaliadas, de maneira semelhante à dipirona e a morfina, o MPF4 possui efeito antialodínico na dor inflamatória crônica induzida por ACF, e como estes, não apresenta efeito antiedematogênico.

Os AINEs tradicionais e os inibidores seletivos da COX-2 parecem ser efetivos em diminuir a alodínia e o edema de pata induzido por ACF (ENGELHARDT et al., 1995; OCHI & GOTO, 2000). Os AINEs atípicos como a dipirona parecem ser mais potentes como antihiperálgicos do que antiedematogênicos (TATSUO et al., 1994). Já os opióides, como a morfina, parecem ser eficazes em inibir a alodínia induzida por ACF, porém não diminuem o edema desenvolvido (FRASER et al., 2000, NAGAKURA, 2003; LI & ZHAO, 2003).

Além da dor inflamatória crônica, a dor inflamatória aguda também é um problema atual. Na clínica, o controle da dor pós-operatória mostra-se ainda pouco eficaz, pois em torno de 41% dos casos, os pacientes pós-cirúrgicos sentem dor moderada a intensa (DOLIN et al., 2002; KHELET et al., 2006).

Neste contexto, nos últimos anos esforços têm sido direcionados a fim de elucidar os mecanismos da dor pós-cirúrgica (ZAHN et al., 2002; ZAHN et al., 2005). A incisão induz hiperálgia e alodínia devido à sensibilização do aferente primário na pata incisionada, que resulta em um aumento na excitabilidade da rota nociceptiva central (BRENNAN et al., 1996). De fato, estudos eletrofisiológicos no

modelo de dor incisional demonstram que a sensibilização periférica de nociceptores C e A  $\delta$  contribuem para o aumento da excitabilidade de neurônios no corno dorsal da medula espinhal (POGATZKI et al., 2002).

O modelo de dor induzida por incisão plantar, é uma ferramenta amplamente utilizada para estudo experimental da dor pós-operatória, devido às similaridades com a dor pós-operatória em humanos (BRENNAN et al., 1996; POGATZKI & RAJA, 2003; KEHLET et al., 2006). Além disso, o perfil farmacológico de diferentes classes de analgésicos no modelo de dor incisional parece ser muito similar ao obtido na clínica. A administração oral de AINEs, como a indometacina ou de inibidores seletivos da COX-2, reduzem a hiperalgesia e a alodínia mecânica induzida por incisão plantar em ratos (WHITESIDE et al., 2004). Opióides, como a morfina, também reduzem a dor pós-operatória quando administrados antes ou após o procedimento incisional por via intratecal ou subcutânea em ratos, porém, em uma dose que freqüentemente causa sedação (ZAHN et al., 1997; WHITESIDE et al., 2004). Além disso, estudos clínicos demonstram que dipirona e paracetamol reduzem a dor pós-operatória em humanos com mínimos efeitos adversos (GRUNDMANN et al., 2006).

No presente estudo, o procedimento incisional na superfície plantar da pata traseira dos animais provocou uma acentuada alodínia mecânica. O tratamento dos animais com MPF4, dipirona ou morfina, decresceu a alodínia mecânica induzida por incisão quando administrados antes ou após o procedimento incisional. Um dado interessante obtido é o fato de que a administração oral destes compostos produziu efeito profilático (quando administrados antes do procedimento incisional) e terapêutico (quando administrados após o procedimento incisional), com similar eficácia antinociceptiva.

Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos por Prado e Pontes (2002), que não verificaram diferença significativa na eficácia antialodínica produzida pela administração intraperitoneal de morfina, dipirona e diclofenaco, quando administrados antes ou após o procedimento incisional. Da mesma forma, Ochi et al., (2003) verificaram que a administração oral do pirazol FR140423 inibiu a hiperalgesia mecânica induzida por incisão em ratos, um efeito que iniciou 30 minutos após sua administração e perdurou até quatro horas. Além disso, o efeito antinociceptivo de FR140423 foi revertido pelo antagonista  $\delta$  opióide (naltrindol), mas não pelo antagonista  $\kappa$  (norbinaltorfimina) ou antagonista  $\mu$  (naloxonazina).

Neste contexto, o MPF4 apresentou atividade antinociceptiva quando avaliado no modelo de nocicepção induzida por CFA e por incisão em camundongos, porém, estudos adicionais são necessários para indicar qual o mecanismo envolvido na atividade antinociceptiva de MPF4 na dor inflamatória.

Sabe-se que um fator importante a ser descartado em experimentos destinados a avaliar a ação antinociceptiva de novos compostos, é se o tratamento farmacológico causa outras alterações comportamentais, tais como incoordenação motora e sedação, os quais podem produzir uma resposta antinociceptiva falso-positiva (JANSSEN, 1976; HAYES & TYERS, 1983; TABARELLI et al., 2004). Neste sentido, a maior fonte de erros em estudos sobre drogas que interferem na transmissão da resposta nociceptiva é a modificação na performance motora do animal (MILLAN, 2002).

A fim de eliminar a possibilidade de que os pirazóis avaliados no presente estudo, possam estar provocando alterações no comportamento dos animais, confundindo efeitos musculo-relaxantes e/ou sedativos com antinocicepção, foi avaliado o comportamento motor e exploratório dos animais. Os resultados obtidos demonstraram que nenhum dos compostos avaliados, nas doses que causam antinocicepção, provocaram dano motor, quando avaliados pela locomoção forçada no teste do cilindro giratório (*rotarod*) ou alteração na locomoção espontânea no teste do campo aberto (*open-field*).

Outro dado interessante observado no presente estudo é que, ao contrário do AINE tradicional indometacina (usada como controle positivo), o MPF4 não causou lesão gástrica nos animais, quando administrado na dose que causa maior efeito antinociceptivo. Portanto, nas condições experimentais avaliadas, sugere-se que o MPF4, administrado em uma dose dez vezes maior que a indometacina, possui um menor potencial em causar lesão gástrica em camundongos. Este é um dado relevante, pois na clínica a incidência de úlcera em pacientes que fazem tratamento com AINEs tradicionais chega a 30%, e as complicações gastrintestinais representam a principal causa de mortalidade induzida por esta classe de fármacos (HENRY et al., 1996; BRUNE & HINZ, 2004).

Analisados em conjunto, esses resultados permitem sugerir que os pirazóis avaliados no presente estudo, em especial o composto MPF4, parecem ser promissores para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas terapeuticamente relevantes. Contudo, estudos posteriores devem ser realizados a fim de verificar o



exato mecanismo de ação, características farmacocinéticas e possíveis efeitos tóxicos produzidos por estes pirazóis inéditos.

## 6 CONCLUSÕES

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

- ✓ Os pirazóis trialometil substituídos inéditos MPF3, MPF4, MPC13 e MPC14 apresentaram efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção aguda induzida por estímulo químico (teste da formalina) e estímulo térmico (teste da placa quente) em camundongos.
- ✓ Nenhum dos compostos avaliados, nas doses que causam antinocicepção, provocaram dano motor, quando avaliados pela locomoção forçada no teste do cilindro giratório ou alteração na locomoção espontânea no teste do campo aberto. Portanto, a atividade antinociceptiva dos pirazóis trialometil substituídos inéditos MPF3, MPF4, MPC13 e MPC14 não está relacionada com efeito inespecífico sobre a atividade locomotora.
- ✓ O pré-tratamento dos animais com o antagonista opióide naloxona, reverteu a antinocicepção induzida por MPF4. Assim, o sistema opióide parece ser o responsável pela atividade antinociceptiva do MPF4.
- ✓ O tratamento dos animais durante oito dias consecutivos com o MPF4 não causou alteração no tempo de latência dos animais no teste da placa quente, bem como, quando administrado em animais tolerantes à morfina. Desta forma, o MPF4 não produziu tolerância antinociceptiva, nem tolerância cruzada com a morfina, sob as condições experimentais avaliadas.
- ✓ O MPF4 produziu inibição do TGI em camundongos, porém, a inibição do TGI causada por MPF4 foi menor que a inibição causada pela morfina. Assim, o MPF4 inibiu o TGI de camundongos com menor eficácia que o opióide morfina.
- ✓ O MPF4 possui efeito antinociceptivo no modelo de nocicepção inflamatória crônica causada por ACF e no modelo de nocicepção inflamatória aguda induzida por incisão na pata em camundongos.
- ✓ O MPF4 não causou o aparecimento de lesão gástrica em camundongos, nas condições experimentais avaliadas.

## 7 PERSPECTIVAS

Tendo em vista os promissores resultados obtidos nesta tese, os conhecimentos relacionados aos pirazóis inéditos avaliados, em especial MPF4, podem ser aprofundados, ainda mais, seguindo as perspectivas abaixo:

- ✓ Reverter o efeito antinociceptivo de MPF4 com antagonistas seletivos de opióides
- ✓ Realizar estudo de ligação específica
- ✓ Dosar opióides endógenos
- ✓ Realizar estudos de toxicidade
- ✓ Realizar estudos de farmacocinética

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE-BANUELOS, P.; GRANADOS-SOTO, V. Evidence for a peripheral mechanism of actino for the potentiation of the antinociceptive effect of morphine by dipyrone. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v.42, p.79-85, 1999.

AKMAN, H.; AKSU, F.; GÜLTEKIN, I.; ÖZBEK, H.; ORAL, U.; DORAN, F.; BAYSAL, F. A possible central antinociceptive effect of dipyrone in mice. **Pharmacol**, v.53, p.71-8, 1996.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res**, v.1000, p.40-56, 2004.

ALVES, D. P.; DUARTE, D. G. Involvement of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrone. **Eur J Pharmacol**, v.444, p.47-52, 2002.

AMIR, M.; KUMAR H.; KHAN S. A. Synthesis and pharmacological evaluation of pyrazoline derivatives as new anti-inflammatory and analgesic agents. **Bioorg Med Chem Lett**, v.18, p.918-22, 2008.

ANDRADE, S. E.; MARTINEZ, C.; WALKER, A. M. Comparative safety evaluation of non-narcotic analgesics. **J Clin Epidemiol**, v.51, n.12, p.1357-65, 1998.

ANKIER, S. I. New hot-plate tests to quantify antinociceptive and narcotic antagonist activities. **Eur J Pharmacol**, v.27, p.1-4, 1974.

BANKS, A.T.; ZIMMERMAN, H.J.; SHAK, K.G.; HARTER, G. Diclofenac-associated hepatotoxicity: Analysis of 180 cases reported to the Food and Drug Administration as adverse reactions. **Hepatology**, 22, p. 820-27,1995.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; RODRIGUES, A. L. S.; CRECZYNSKI, P. T. B.; CALIXTO, J. B. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. **Eur J Pharmacol**, v.345, p.233-45, 1998.

BERGSTROM, D. E.; SWARTLING, D. J. Fluorine substituted analogs of nucleic acid components. In: LIEBMAN, J. F.; GREENBERG, A.; DOLBIER, W. R. (eds). **Fluorine-Containing Molecules: structure, reactivity, synthesis e applications**. USA, cap.1, p.259-63, 1988.

BEKHIT, A.; ABDEL, A. T. Design, synthesis and biological evaluation of some pyrazole derivatives as anti-inflammatory-antimicrobial agents. **Bioorg Med Chem**, v.12, p.1935-45, 2004.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v.353, p.1610-15, 1999.

BLOBAUM, A. L.; MARNETT, L. J. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. **J Med Chem**, v.50, p.1425-41, 2007.

BOELSTERLI, U. A. Diclofenac- induced liver injury: a paradigm of idiosyncratic drug toxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.192, p.307-22, 2003.

BONACORSO, H. G.; WENTZ, A.; LOUREGA, V. R.; CECHINEL, C. A.; MORAES, T. S.; FLORES, A. F. C.; ZANATTA, N.; MARTINS, M. A. P. Regiospecific synthesis of trichloromethyl substituted 4,5-dihydro-1*H*-1-tosylpyrazoles. **J Heterocyclic Chem**, v.44, p.233-6, 2007.

BRENNAN, F.; CARR, D. B.; COUSINS, M. Pain management: A fundamental human right. **Anesth Analg**, v.105, p.205-21, 2007.

BRENNAN, T. J.; VANDERMEULEN, E. P.; GEBHART, G. Characterization of a rat model of incisional pain. **Pain**, v.64, p.491-3, 1996.

BRUNE, K. Persistence of NSAIDs at effect sites and rapid disappearance from side-effect compartments contributes to tolerability. **Curr Med Res Opin**, v.23, p.2985-95, 2007.

BRUNE, K.; HINZ, B. The discovery and development of antiinflammatory drugs. **Arthritis and Rheumatism**, v.50, n.8, p.2391-9, 2004.

BUXTON, I. L. O. Pharmacokinetics and pharmacodynamics: The dynamics of drug absorption, distribution, action and elimination. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (eds). GOODMAN and GILMAN: **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 11<sup>th</sup> ed., New York: McGraw-Hill, cap.1, p.1-36, 2006.

CAMPOS, C.; GREGÓRIO, R.; GARCÍA, N. Regulation of cyclooxygenase activity by metamizol. **Eur J Pharmacol**, v.378, p.339-47, 1999.

CAMU, F.; VANLERSBERGHE, C. Pharmacology of systemic analgesics. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v.16, p.475-88, 2002.

CARLSSON, K. H.; HELMREICH, J.; JURNA, I. Activation of inhibition from the periaqueductal grey matter mediates central analgesic effect of metamizol (dipyrone). **Pain**, v.27, p.373-90, 1986.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L. T.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTOS, T. S.; SIMONNS, D. L. Cox-3, a cyclooxygenase 1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.99, p.13926-31, 2002.

COCCO, M. T.; CONGIU, C.; ONNIS, V.; MORELLI, M.; CAULI, O. Synthesis of ibuprofen heterocyclic amides and investigation of their analgesic and toxicological properties. **Eur J Med Chem**, v.38, p.513-8, 2003.

COLLETT, B. J. Opioid tolerance: the clinical perspective. **Br J Anaesth**, v.81, p.58-68, 1998.

CORRÊA, C.R.; CALIXTO, J. B. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **Br. J. Pharmacol**, v. 110, p.193-8, 1993

CORUZZI, G.; VENTURY, N.; SPAGGIARI, S. Gastrointestinal safety of novel nonsteroidal antiinflammatory drugs: selective COX-2 inhibitors and beyond. **Acta Biomed**, v.78, p.96-110, 2007.

COUSINS, M. J. Persistent pain: A disease entity, **J Pain Symptom Manage**, v.22, p.94-8, 2007.

DAILLY, E.; CHENU, F.; PETIT, D. B.; BOURIN, M. Specificity and efficacy of noradrenaline, serotonin depletion in discrete brain areas of swiss mice by neurotoxins. **J Neurosci**, v.150, p.111-15, 2006.

DE SOUZA, F. R.; FIGUERA, M. R.; LIMA, T. T. F.; BASTIANI, J.; BARCELLOS, I. B.; ALMEIDA, C. E.; OLIVEIRA, M. R.; BONACORSO, H. G.; FLORES, A. E.;

MELLO, C. F. 3-Methyl 5-hydroxy-5-trichloromethyl-1*H*-1-pyrazolcarboxamide (MPCA) induces antinociception. **Pharmacol Biochem**, v.68, p.525-30, 2001.

DE SOUZA, F. R.; SOUZA, V. T.; RATZLAFF, V.; BORGES, L. P.; OLIVEIRA, M. R.; BONACORSO, H. G.; ZANATTA, N.; MARTINS, M. A. P.; MELLO, C. F. Hypotermic and antipyretic effects of 3-methyl and 3-phenyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole-1-carboxyamides. **Eur J Pharmacol**, v.451, p.141-7, 2002.

DICKENSON, A. H.; KIEFFER, B. Opiates: basic mechanism. In: McMAHON, S., KOLTZENBURG, M. (eds). WALL and MELZACK'S **Textbook of Pain** 5<sup>th</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, cap.27, p.427-57, 2006.

DOLIN, S. J.; CASHMAN, J. N.; BLAND J. M. Effectiveness of acute postoperative pain management: Evidence from published data. **Br J Anesth**, v.89, p.409-23, 2002.

DUARTE, D. F. Uma breve história do ópio e dos opióides. **Rev Bras Anesthesiol**, v.55, p.135-46, 2005.

DUARTE, I. D.; DOS SANTOS, I. R.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **Eur J Pharmacol**, v.217, p.225-7, 1992.

DRAY, A.; PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends Neurosci**, v.16, p.99-104, 1993.

ENGELHARDT, G.; HOMMA, D.; SCHLEGEL, K.; UTZMANN, R.; SCHNITZLER, C. Anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and related properties of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory agent with favourable gastrointestinal tolerance. **Inflamm Res**, v.44, n.10, p.423-33, 1995.

FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I.; HEINRICHER, M.M. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: McMAHON, S., KOLTZENBURG, M. (eds). WALL and MELZACK'S: **Textbook of Pain** 5<sup>th</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, cap. 7, p.125-42, 2006.

FITZGERALD, G. A. Cox-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. **Nat Rev Drug Discov**, v.2, p.879-90, 2003.

FRASER, G. L.; GAUDREAU, G. A.; CLARKE, P. B.; MENARD, D. P.; PERKINS, D. Antihyperalgesic effects of delta opioid agonists in a rat model of chronic inflammation. **Br J Pharmacol**, v.129, p.1668-72, 2000.

FURST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal Cord. **Brain Res Bull**, v.48, p.129-41, 1999.

GODOY, M. C. M.; FIGUERA, M. R.; FLORES, A. E.; RUBIN, M. A.; OLIVEIRA, M. R.; ZANATTA, N.; MARTINS, M. A. P.; BONACORSO, H. G.; MELLO, C. F.  $\alpha_2$ -Adrenoceptors and 5-HT receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazoles, but not of dipyron. **Eur J Pharmacol**, v.496, p.93-7, 2004.

GRUNDMANN, U.; WÖRNIE, C.; BIEDLER, A.; KREUER, S.; WROBEL, M.; WILHELM, W. The efficacy of the non-opioid analgesics parecoxib, paracetamol and metamizol for postoperative pain relief after lumbar microdiscectomy. **Anesth Anal**, v.103, n.1, p.217-22, 2006.

GÜRSOY, A.; DEMIRAYAK, S.; CAPAN, G.; EROL, K.; VURAL, K. Synthesis and preliminary evaluation of new 5-pyrazolinone derivatives as analgesic agents. **Eur J Med Chem**, v.35, p.359-64, 2000.

GUTSTEIN, H. B.; AKIL, H. Opioid analgesics In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. (eds). **GOODMAN and GILMAN: The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 11<sup>th</sup> ed., New York: McGraw-Hill, cap.21, p.487-526, 2006.

HAYES, A. G.; TYERS, M. B. Determination of receptors that mediate opiate side effects in the mouse. **Br J Pharmacol**, v.79, p.731-6, 1983.

HENRY, D.; LIM, L. L. Y.; GARCÍA-RODRIGUES, L. A. Variability in risk of gastrointestinal complications with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs: results of a collaborative meta-analysis. **BMJ**, v.312, p.1563-6, 1996.

HERNÁNDEZ-DELGADILLO, G. P.; CRUZ, S. L. Endogenous opioids are involved in morphine and dipyron analgesic potentiation in the tail flick test in rats. **Eur J Pharmacol**, v.546, n.1-3, p.54-9, 2006.

HERNÁNDEZ-DELGADILLO, G. P.; LÓPEZ-MUNOZ, F. J.; SALAZAR, L. A.; CRUZ, S. L. Morphine and dipyron co-administration delays tolerance development and potentiates antinociception. **Eur J Pharmacol**, v.469, p.71-9, 2003.



HERNÁNDEZ-DELGADILLO, G. P.; MARTÍNEZ, R. V.; REVAL, M. I. D.; RAMÍREZ, A. M. D.; LÓPEZ-MUNOZ, F. J. Metamizol potentiates morphine antinociception but not constipation after chronic treatment. **Eur J Pharmacol**, v.441, p.177-83, 2002.

HERNÁNDEZ, N.; VANEGAS, H. Antinociception induced by PAG-microinjected dipyron (metamizol) in rats: involvement os spinal endogenous opioids. **Brain Res**, v.896, p.175-8, 2001.

HILL, R.G. Molecular basis for the perception of pain. **The Neurosci**, v. 7, p.282-92, 2001.

HOGAN, Q. Animal pain model. **Reg Anesth and Pain Med**, v.27,p.385-401, 2002.

HOLDEN, J.E.; PIZZI, J. A. The Challenge of chronic pain. **Adv Drug Deliv Rev**, v.55, p. 935-48, 2003.

HUCHO, T.; LEVINE, J. D. Signaling pathways in sensitization: Toward a nocieptor cell biology. **Neuron**, v.55, p.365-76, 2007.

HUGHES, J. Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. **Brain Res**, v.88, p. 295-308, 1975.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v.30, n.1, p.103-14, 1987.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. W. The molecular dynamics of pain control. **Nat Rev Neurosci**, v.2, p.83-91, 2001.

IBANEZ, L.; VIDAL, X.; BALLARÍN, E.; LAPORTE, J. R. Agranulocytosis associated with dipyron (metamizol). **Eur J Clin Pharmacol**, v.60, p.821-9, 2005.

JAGE, J. Opioid tolerance and dependence. Do they matter? **Eur J Pain**, v.9, p.157-62, 2005.

JANSSEN, P. A. J. The pharmacology of haloperidol. **Int J Neuropsychiat**, v.3, p.10-15, 1976.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, p.203-10, 2001.

KEHLET, H.; JENSEN, T. S.; WOOLF, C. J. Persistent postsurgical pain. **Lancet**, v.367, p.1618-25, 2006.

KESKINBORA, K.; PEKEL, A. F.; AYDINLI, I. Gabapentin and an opioid combination versus opioid alone for the management of neuropathic cancer pain: a randomized open trial. **J Pain Symptom Manage**, v.34, p.183-9, 2007.

KROMER, W. Endogenous and exogenous opioids in the control of gastrointestinal motility and secretion. **Pharmacol Rev**, v.40, p.121-62, 1988.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev**, v.53, n.4, p.597-652, 2001.

Li, S.; ZHAO, Z. Morphine –induced decrease in mechanical allodynia is mediated by central, but not peripheral, opioid receptors in rats with inflammation. **Eur J Pharmacol**, v. 481, p. 203-206, 2003.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: An Overview. **Lancet**, v.353, p.1607-09, 1999.

MARCHAND, F.; PERRETI, M.; MACMAHON, S. Role of the immune system in chronic pain. **Nature Rev Neurosci**, v.6, p. 521-32, 2005.

MATHEUS, M. E.; OLIVEIRA, F. L.; FREITAS, C. C. Antinociceptive property of new 4-acyl-arylhydrazone pyrazole compounds. **J Braz Med Biol Res**, v.24, p.1219-22, 1991.

McDOUGALL, J. J. Arthritis and pain. Neurogenic origin of joint pain. **Arth Res Ther**, v.8, n.6. p.220-6, 2006.

McNAMARA, C. R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D. M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K. L.; ZHAO, M.; HAYWARD, N. J.; CHONG, J. A.; JULIUS, D.; MORAN, M. M.; FANGER, C. M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **PNAS**, v.104, n.33, 2007.

MCQUAY H. J.; MOORE, R. A. NSAIDS and Coxibs: clinical use. In: McMAHON, S., KOLTZENBURG, M. (eds). **WALL and MELZACK'S Textbook of Pain** 5<sup>th</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, cap.30, p.471-457, 2006.

MENDELL J. R.; SAHENK, Z. Painful sensory neuropathy. **N Engl J Med**, v.348, p.1243-55, 2003.

MERCADANTE, S. Problems of long-term spinal opioid treatment in advanced cancer patients. **Pain**, v.79, p.1-13, 1999.

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 induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, v.57, p.1-164, 1999.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol**, v.66, p.3474-555, 2002.

MIRANDA, H. F.; LEMUS, I.; PINARDI, G. Effect of the inhibition of serotonin biosynthesis on the antinociception induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Brain Res Bull**, v.61, p.417-25, 2003.

MITTELSTARDT, S. W. Effects of fasting on evaluation of gastrointestinal transit with charcoal meal. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v.52, p.154-8, 2005.

MOGIL, J. S.; ADHIKARI, S. M. Hot and cold nociception are genetically correlated. **J Neurosci**, v.19, p.RC25 (21-25), 1999.

MUKHERJEE, D.; NISSEN, S. E.; TOPOL, E. J. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. **JAMA**, v.286, n.8, p.954-9, 2001.

NAGAKURA, Y.; OKADA, M.; KOHARA, A.; KISO, T.; TOYA, T.; IWAI, A.; WANIBUCHI, F.; YAMAGUCHI, T. Allodynia and hyperalgesia in adjuvant –induced arthritic rats: time course of progression and efficacy of analgesics. **J Pharmacol Exp Ther**, v.306, p.490-7, 2003.

NEGUS, S. S.; BANDERA, T. W.; BRANDT, M. R.; BILSKY, E. J.; BECERRA, L.; BORSOOK, D. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: Recent advances and future challenges. **J Pharmacol Exp Ther**, v.319, p.507-14, 2006.

OCHI, T.; FUJII, T.; MOTOYAMA, Y.; GOTO, T. Antinociceptive properties of FR140423 mediated through spinal  $\delta$ , but not  $\mu$  and  $\kappa$ , opioid receptors. **Eur J Pharmacol**, v.380, p.73-9, 1999b.

OCHI, T.; GOTO, T. The antinociceptive effect of FR 140423 in mice: involvement of spinal  $\alpha_2$ -adrenoceptors. **Eur J Pharmacol**, v.400, p.199-203, 2000a.

OCHI, T.; GOTO, T. The antinociceptive effect induced by FR 140423 is mediated through spinal 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors. **Eur J Pharmacol**, v.409, p.167-72, 2000b.

OCHI, T.; GOTO, T. Anti-inflammatory effect of FR 140423, a novel selective cyclo oxygenase-2 inhibitor, in rat adjuvant arthritis without gastrointestinal side effects. **J of Pharmacy and Pharmac Sci**, v. 52, p. 553-560, 2000.

OCHI, T.; JOBO-MAGARI, K.; YONEZAWA, A.; MATSUMORI, K.; FUJII, T. Anti-inflammatory and analgesics effects of a pyrazole derivative FR140423. **Eur J Pharmacol**, v.365, p.259-66, 1999a.

OCHI, T.; MOTOYAMA, Y.; GOTO, T. The spinal antinociceptive effect of FR140423 is mediated through kyotorphin receptors. **Life Sci**, v.66, p.2239-45, 2000.

OCHI T.; OHKUBO, Y.; MUTOH, S. Effect of systemic FR140423, a new analgesic compound, in a rat model of postoperative pain: contribution of delta-opioid receptors. **Neurosci Lett**, v.350, p.29-32, 2003.

OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; NAMIKI, A. Formalin-induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw. **Brain Res**, v.787, p.161-4, 1998.

OZDEMIR, Z.; KANDILCI, H. B.; GÜMÜŞEL, B.; CALIŞ, U.; BILGIN, A. A. Synthesis and studies on antidepressant and anticonvulsant activities of some 3-(2-furyl)-pyrazoline derivatives. **Eur J Med Chem**, v.42, n.3, p.373-9, 2007.

PARADA, S. A.; TAMBELI, C. H.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, v.4, p.937-44, 2001.

PARCK, K. B.; KITTERINGHAM, N. R.; O'NEILL, P. M. Metabolism of fluorine-containing drugs. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.41, p.443-70, 2001.

PASTERNAK, G. W. Incomplete cross tolerance and multiple mu opioid peptide receptors. **Trends Pharmacol Sci**, v.22, p.67-70, 2001.

PERKINS, P. F.; DRAY, A. Novel pharmacological strategies for analgesia. **Annals Rheum Dis**, v.55, p.715-22, 1996.

PERL, E. R. Ideas about pain, a historical view. **Nat Rev Neuroscience**, v.8, p.71-80, 2007.

PERT, C. B.; SNYDER, S. H. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. **Science**, v.179, p.1011-4, 1973.

PIERRE, S. C.; SCHMIDT, R.; BRENNEIS, C.; MICHAELIS, M.; GEISLINGER, G.; SCHOLICH, K. Inhibition of cyclooxygenases by dipirone. **Br J Pharmacol**, v.151, p.494-503, 2007.

POGATZKI, E. M.; RAJA, S. N. A mouse model of incisional pain. **Anesthesiology**, v.99, p.1023-7, 2003.

POGATZKI, E. M.; VANDERMEULEN, E. P.; BRENNAN, T. J. Effect of plantar local anesthetic injection on dorsal horn neuron activity and pain behaviors caused by incision. **Pain**, v.87, p.151-61, 2002.

POPOVA, Y.; STANEVA-STOYCHEVA, D. Lack of direct interaction of metamizole with the brain opiate receptors of rats. **Acta Physiol Pharmacol Bulg**, v.15, p.55-8, 1989. (Abstract)

PORRECA, F.; MOSBERG, H. I.; HURST, R.; HRUBY, V. J.; BURKS, T. F. Roles of mu, delta and kappa opioid receptors in spinal and supraspinal mediation of gastrointestinal transit effects and hot-plate analgesia in the mouse. **J Pharmacol Exp Ther**, v.230, p.341-8, 1984.

PORRECA, F.; OSSIPOV, M. H.; GEBHART, G. F. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends Neurosci**, v.25, p.319-25, 2002.

PRADO, W. A.; PONTES, R. M. C. Presurgical ketoprofen, but not morphine, dipyrone, diclophenac or tenoxicam, preempts post-incisional mechanical allodynia in rats. **Braz J Med Biol Res**, v.35, p.111-9, 2002.

PROKOPP, C. R.; RUBIN, M. A.; SAUZEM, P. D.; SOUZA, A. H.; BERLESE, D. B.; LOREGA, R. V.; MUNIZ, M. N.; BONACORSO, H. G.; ZANATTA, N.; MARTINS, M. A. P.; MELLO, C. F. A pyrazolyl-thiazole derivative causes antinociception in mice. **Braz J Med Biol Res**, v.39, p.795-9, 2006.

PUIG, M. M.; POL, O. Reversal of tolerance to the antitransit effects of morphine during acute intestinal inflammation in mice. **Br J Pharmacol**, v.122, p.1216-22, 1997.

RAMANA- REDDY, M. V.; BILLA, V. K.; PALLELA, V. R.; MALLIREDDIGARI, M. R.; BOOMINATHAN, R.; GABRIEL, J. L.; REDDY, E, P. Design, synthesis, and biological evaluation of 1-(4-sulfamylphenyl)-3-trifluoromethyl-5-indolyl pyrazolines as cyclooxygenase-2 (COX-2) and lipoxygenase (LOX) inhibitors. **Bioorg Med Chem**, 2008. [In press]

REN, K.; DUBNER, R. Descending modulation in persistent pain: an update. **Pain**, v.100, p.1-6, 2002.

SAMAD, T.; MOORE, K. A.; SAPIRTEIN, A.; BILLET, S.; ALLCHORNE, A.; POOLE, S.; BONVENTRE, J. V. Interleukin-1 $\beta$ -mediated induction of COX-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **Nature**, v.410, p.471-5, 2001.

SANCHEZ, S.; MARTIN, M. J.; ORTIZ, P.; MOTILVA,V.; HERRERÍAS, J.M.; ALARCON DE LA LASTRA, C. Role of prostaglandins and nitric oxide in gastric damage induced by metamizol in rats. **Inflamm Res**, v.51, p.385-392, 2002.

SANDRINI, M.; OTTANI, A.; VITALE, G.; PINI, L. A. Acetylsalicylic acid potentiates the antinociceptive effect of morphine in the rat: involvement of the central serotonergic system. **Eur J Pharmacol**, v.355, p.133-140, 1998.

SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, v.31, p.381-9, 1997.

SAUZEM, P. D.; MACHADO, P.; RUBIN, M. A.; SANT'ANNA, G. S.; FABER, H. B.; DOUZA, A. H.; MELLO, C. F.; BECK, P.; BURROW, R. A.; BONACORSO, H. G.; ZANATTA, N.; MARTINS, M. A. P. Design and microwave-4,5-dihydro-1H-pyrazoles: Novel agents with analgesic and anti-inflammatory properties. **Eur J Medicinal Chem**, 2007.

SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEHAY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L.; ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of the cyclooxygenase-2 in inflammation and pain. **PNAS**, v.91, p.12013-17, 1994.

SHI, S.; KLOTZ, U. Clinical use and pharmacological properties of selective COX-2 inhibitors. **Eur J Pharmacol**, v.64, n.3, p.233-52, 2008.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v.38, p.347-52, 1989.

SHIMADA, S. G.; OTTERNESS, I. G.; STITT, J. T. A study of the mechanism of action of the mild analgesic dipyrone. **Agents Actions**, v.41, p.188-92, 1994.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Can we conquer pain? **Nature Neurosci**, v.5, p.1062-67, 2002.

TABARELLI, Z.; BERLESE, D. B.; SAUZEM, P. D.; RUBIN, M. A.; MISSIO, T. P.; TEIXEIRA, M. V.; SINHORIN, A. P.; MARTINS, M. A. P.; ZANATTA, N.; BONACORSO, H. G.; MELLO, C. F. Antinociceptive effect of novel pyrazolines in mice. **Braz J Med Biol Res**, v.37, p.1531-40, 2004.

TATSUO, M. A.; CARVALHO, W. M.; SILVA, C. V.; MIRANDA, A. E.; FERREIRA, S. H.; FRANCISCHI, J. N. Analgesic and inflammatory effects of dipyrone in rat adjuvant arthritis model. **Inflammation**, v.18, p.399-405, 1994.

TAYLOR, J.; MELLSTRÖN, B.; FERNAUD, I.; NARANJO, J. R. Metamizol potentiates morphine effects on visceral pain and evoked c-Fos immunoreactivity in spinal cord. **Eur J Pharmacol**, v.351, p.39-47, 1998.

TJOLSEN, A.; BERGE, O.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v.51, p.5-17, 1992.

TJOLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: DICKENSON, A.; BESSON, J. M (eds). **The Pharmacology of Pain**, Germany: Springer, Berlin, p.1-20, 1997.

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 Res**, v.726, p.106-11, 1996.

TRACEY, I.; MANTYH, P. W. The cerebral signature for pain perception and its modulation. **Neuron**, v.55, p.377-91, 2007.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nat New Biol**, v.231, p.232-5, 1971

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Res Rev**, v.46, p.295-309, 2004.

VASQUEZ, E.; HERNANDEZ, N.; ESCOBAR, W.; VANEGAS, H. Antinociception induced by intravenous dipyron (metamizol) upon dorsal horn neurons: involvement of endogenous opioids, at the periaqueductal gray matter, the nucleus raphe magnus, and the spinal cord in rats. **Brain Res**, v.1048, p.211-7, 2005.

VLASKOVSKA, M.; SURCHEVA, S.; OVCHAROV, R. Importance of endogenous opioids and prostaglandins in the action of analgin (metamizole) and verapamil. **Farmakol Toksikol**, v.52, p.25-29, 1989. (Abstract)

WANG, L.X.; WANG, Z. J. Animal and cellular models of chronic pain. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 55, p. 949-65, 2003.

WATKINS, L. R.; MAIER, S. F.; GOEHLER, L. E. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. **Pain**, v.63, p.289-302, 1995.

WHITESIDE, G. T.; HARRISON, J.; BOULET, J.; MARK, L.; PERASON, M.; GOTTSAL, S.; WALKER, K. Pharmacological characterization of a rat model of incisional pain. **Br J Pharmacol**, v.141, p.85-91, 2004.

WHITTLE, B. J. T. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Fund Clin Pharmacol**, v.17, p.301-13, 2003.

WILLETTE, R. E. Analgesics Agents. In: WILSON, C. O.; GISVOLD, O.; DOEGER, R. F. (eds). **Textbook of organic medicinal and Pharmaceutical Chemistry**. 7.<sup>th</sup> ed. EUA: Lippincot, p.671-730,1977.

WILLIAMS, M.; KOWALUK A. E.; STEPHEN P. Emerging Molecular Approaches to Pain Therapy. **Med Chem**, v.42, p.1481-1500, 1999.



WONG, C. S.; CHERNG, C. H.; LUK, H. N.; HO, S. T.; TUNG, C. S. Effects of NMDA receptor antagonists on inhibition of morphine tolerance in rats: binding at  $\mu$  opioid receptors. **Eur J Pharmacol**, v.297, p.27-33, 1996.

WOODCOCK, J.; WITTER, J.; DIONNE, R. A. Stimulating the development of mechanism-based, individualized pain therapies. **Nat Rev**, v.6, p.703-10, 2007.

WOOLF, C. J.; ALLCHORNE, A.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumor necrosis factor  $\alpha$ . **Br J Pharmacol**, v.121, p.417-24, 1997.

WOOLF, C. J.; COSTIGAN, M. transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. **Proc Natl Acad Sci**, v.96, p.7723-30, 1999.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v.288, p.1765-9, 2000.

ZAHN, P. K.; POGATZKI, E. M.; BRENNAN, T. J. Effect of systemic and intrathecal morphine in a rat model of postoperative pain. **Anesthesiology**, v. 86, p. 1066-1077, 1997.

ZAHN, P. K.; POGATSKI, E. M.; BRENNAN, T. J. Mechanism for pain caused by incisions. **Reg Anesth Pain Med**, v.27, p.514-6, 2002.

ZAHN, P. K.; POGATSKI, E. M.; BRENNAN, T. J. Spinal administration of MK-801 and NBQX demonstrates NMDA-independent dorsal horn sensitization in incisional pain. **Pain**, v. 114, 499-510, 2005.

ZELCER, S.; KOLESNIKOV, Y.; KOVALYSHYN, I.; PASTERNAK, D. A.; PASTERNAK, G. W. Selective potentiation of opioid analgesia by nosteroidal anti-inflammatory drugs. **Brain Res**, v.1040, p.151-6, 2005.

ZIMMERMANN, K. C.; SARBIA, M.; SCHOR, K.; WEBER, A. Constitutive cyclooxygenase-2 expression in healthy human and rabbit gastric mucosa. **Mol Pharmacol Bethesda**, v.54, n.3, p.536-40, 1998.

## **ANEXO A**

### **Carta resposta dos revisores da revista Life Sciences**

Ref.: Ms. No. LFS-D-08-00271

Antinociceptive action of 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4, 5-dihydro-1H-pyrazole methyl ester (MPF4) in models of inflammatory pain in mice  
Life Sciences

Dear Dr Ferreira,

Your manuscript has been examined by the editors and qualified referees. We think the manuscript has merit but requires revision before we can accept it for publication in the Journal. Careful consideration must be given to the points raised in the reviewer comments, which are enclosed below.

If you choose to submit a revision of your manuscript, please incorporate responses to the reviewer comments into the revised paper. A complete rebuttal with no manuscript alterations is usually considered inadequate and may result in lengthy re-review procedures.

A letter detailing your revisions point-by-point must accompany the resubmission. You will be requested to upload this Response to Reviewers as a separate file in the Attach Files area.

We ask that you resubmit your manuscript within 45 days. After this time, your file will be placed on inactive status and a further submission will be considered a new manuscript.

To submit a revision, go to <http://ees.elsevier.com/lfs/> and log in as an Author. You will see a menu item called Submission Needing Revision. You will find your submission record there.

Yours sincerely,

Todd Vanderah, Ph.D.  
Editor  
Life Sciences

English Language: It has been recommended to us that you ask a language editor or a native English-speaking individual to read your article before resubmission for minor corrections to grammar and usage.

Format Correction: 1) Abbreviations should be explained at the first use both in the abstract and the main text, such as 'MPF4' and 'PCPA'  
Please access the Guide to Authors at our website to further check the format of your article.

Reviewers' comments:

Reviewer #2: Major: The authors should carefully review their figures and compare with description in text and legends. There is mention of Figure 2C, but no figure with such label. Figure 2 legend states that several doses of MPF4 were tested, but figure shows only one dose (1 mmol/kg, p.o.). I do not know what the two "B"s in panel B are. Both

panels show all 3 drugs tested, although that is not what the figure legend states. Moreover, there is no mention of Figure 3C, but this label exists as one panel in Figure 3. Figure 3A and 3B do not clearly indicate preemptive or curative treatment. What is the unit for "Fall latency" in Table 1? Would it be "seconds"?

Reviewer #3: This study reports the effect of the novel pyrazoline methyl ester MPF4 in two models of pain: arthritic pain caused by Complete Freund's Adjuvant (CFA) and postoperative pain caused by surgical incision in mice. The effect of MPF4 was compared with those of dypirone and morphine.

MPF4 produced an antinociceptive response similar to those of dypirone and morphine (although less pronounced and prolonged) without any evident antiinflammatory effect. MPF4 also did not provoke gross gastric lesions.

The results provide evidence that MPF4 is a potential analgesic. However, the interest of the reader could increase if in addition to the description of the effects, an attempt to identify the mechanism of action of MPF4 is performed. Furthermore, the introduction/discussion could benefit, instead of from the description of the open, but well known, problems associated to inflammatory of postoperative pain, from the illustration and discussion of the possible (if any) advantages of MPF4 vs. the efficacy and safety profile of currently used analgesics and particularly those chemically related to MPF4.