



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

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE DERIVADOS 5-TRIFLUORMETIL-
4,5-DIIDRO-1H-PIRAZOL-1-CARBOXIAMIDA EM MODELOS
ANIMAIS DE NOCICEPÇÃO AGUDA E CRÔNICA**

TESE DE DOUTORADO

Patricia Dutra Sauzem

Santa Maria, RS, Brasil

2008

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE DERIVADOS 5-TRIFLUORMETIL-4,5-
DIIDRO-1H-PIRAZOL-1-CARBOXIAMIDA EM MODELOS ANIMAIS DE
NOCICEPÇÃO AGUDA E CRÔNICA**

por

Patricia Dutra Sauzem

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica Toxicológica

Orientadora: Maribel Antonello Rubin

Co-orientador: Juliano Ferreira

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

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE DERIVADOS 5-TRIFLUORMETIL-
4,5-DIIDRO-1H-PIRAZOL-1-CARBOXIAMIDA EM MODELOS ANIMAIS
DE NOCICEPÇÃO AGUDA E CRÔNICA**

elaborada por

Patricia Dutra Sauzem

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Dra. Maribel Antonello Rubin

(Presidente/Orientadora)

Prof. Dr. Alex Fabiani Claro Flores (UFSM)

Prof. Dr. Jamil Assreuy (UFSC)

Profa. Dra. Maria Ester Pereira (UFSM)

Profa. Dra. Maria Rosa Chitolina Schetinger (UFSM)

Santa Maria, 6 de agosto de 2008.

*Dedico essa tese aos meus pais, José Antonio e Maria Neida,
que sempre souberam guiar meus passos nos caminhos da vida e
que proporcionaram-me plenas condições para atingir meus objetivos.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Maribel Antonello Rubin, por ter me aceito em seu laboratório e por ter acreditado que tudo daria certo, até quando eu mesma não acreditava.

Ao professor Juliano Ferreira pela co-orientação que, sem dúvida, foi imprescindível para a conclusão desta tese. Agradeço, especialmente, por ter suportado com bom humor as minhas crises de pessimismo.

Aos colegas e amigos do LABNEURO, inclusive àqueles que já concluíram suas dissertações e teses e seguiram seus caminhos. Alguns deixaram marcas que nunca serão apagadas, seja pelo profissionalismo, seja pela grande amizade que se estabeleceu entre nós.

À minha fiel companheira de experimentos, Gabriela da Silva Sant'Anna, por ter sido muito mais que uma simples colega de bancada, por ser aquela amiga de todas as horas, por compartilhar comigo as alegrias e as tristezas e por estar sempre disposta a colaborar.

Aos alunos de iniciação científica do LABNEURO que muitas vezes auxiliaram na execução deste trabalho e com os quais, certamente, aprendi muitas coisas.

Aos pesquisadores do NUQUIMHE que sintetizaram os compostos estudados nesta tese, especialmente ao doutorando Pablo Machado que esteve sempre disposto a colaborar na execução de todo o trabalho.

Aos meus pais, José Antônio e Maria Neida, por terem apoiado minhas decisões em todos os momentos da minha vida e pelos ensinamentos morais e éticos que me proporcionaram desde a infância.

Aos meus irmãos, Ismael e Rafael, pela amizade, pelo carinho, pelos momentos de descontração e por estarem sempre presentes em todos os momentos.

À minha irmã, Danusa, e ao meu cunhado, Adriano, que mesmo estando distantes fisicamente, estiveram sempre muito próximos.

Aos meus amados sobrinhos, João Vítor e Artur, duas criaturinhas iluminadas que enchem meu coração de esperança de que haverá um dia em que todas as pessoas tenham a humildade e o coração puro de uma criança.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, à UFSM e ao CNPq/FAPERGS/PRONEX pela disponibilização dos recursos para realização deste trabalho.

E, finalmente, mas não menos importante, aos camundongos e ratos, cujas vidas sacrificamos em prol do desenvolvimento da ciência.

*"Todo mundo é capaz de dominar uma dor, exceto quem a sente."
(William Shakespeare)*

RESUMO

Tese de Doutorado

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

ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE DERIVADOS 5-TRIFLUORMETIL-4,5-DIIDRO-1H-PIRAZOL-1-CARBOXIAMIDA EM MODELOS ANIMAIS DE NOCICEPÇÃO AGUDA E CRÔNICA

Autora: Patricia Dutra Sauzem

Orientadora: Maribel Antonello Rubin

Co-orientador: Juliano Ferreira

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 6 de agosto 2008.

Identificar a causa da dor e aliviá-la é, com certeza, parte importante do tratamento de qualquer patologia. Infelizmente, nem todas as modalidades de dor possuem um tratamento adequado atualmente. Muitos pacientes não respondem aos fármacos disponíveis ou, então apresentam efeitos adversos graves que impedem a continuidade do tratamento. Desta forma, existe a necessidade de pesquisar novas drogas que sejam mais eficazes e que produzam menos efeitos indesejados. Os derivados pirazolínicos são conhecidos pela sua excelente eficácia como analgésicos. Por esse motivo, o NUQUIMHE e o LABNEURO têm unido esforços na intenção de sintetizar e avaliar os efeitos biológicos de vários compostos pirazolínicos. No presente trabalho, foi avaliado o efeito antinociceptivo e antiedematogênico de uma série de derivados 5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-pirazol carboxiamida (**2a-j**) em modelos de nocicepção aguda e crônica em camundongos e ratos. Também foi feita uma avaliação preliminar da toxicidade dos compostos mais ativos, após administração crônica, além da avaliação de alguns parâmetros bioquímicos relacionados à inflamação. Oito dos 10 compostos testados apresentaram efeito antinociceptivo no teste da formalina em camundongos. Os dois compostos de maior eficácia (**2c** e **2j**) foram também avaliados nos testes da placa quente, da carragenina e da artrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA). Tais compostos não causaram efeito na nocicepção térmica, mas foram eficazes na diminuição do edema induzido por carragenina em camundongos. No modelo de artrite em ratos, os compostos **2c** e **2j** causaram antinocicepção, mas não diminuição do edema. Esse efeito foi observado após administração aguda e crônica, e teve longa duração. Os níveis séricos de haptoglobina e a atividade tecidual da mieloperoxidase não se apresentaram alterados nos ratos tratados cronicamente com **2c** e **2j**, indicando que esses compostos, provavelmente, não possuem ação antiinflamatória. Os parâmetros de toxicidade renal e hepática (uréia, creatinina, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase) não se apresentaram alterados, bem como não foram encontrados sinais de lesão da mucosa gástrica, nem evidências de desenvolvimento de tolerância ao efeito antinociceptivo nos ratos tratados cronicamente com **2c** e **2j**. Nenhum dos compostos testados causou alteração na atividade locomotora de camundongos e ratos. Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que essa nova classe de derivados pirazolínicos parece promissora no que diz respeito ao desenvolvimento de novas drogas analgésicas.

ABSTRACT

PhD thesis

Graduating Course in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF 5-TRIFLUOROMETHYL-4,5-DIHDRO-1H-PYRAZOLE-1-CARBOXIAMIDE DERIVATIVES IN ANIMAL MODELS OF ACUTE AND CHRONIC NOCICEPTION

Author: Patricia Dutra Sauzem

Advisor: Prof. Dr. Maribel Antonello Rubin

Co-advisor: Prof. Dr. Juliano Ferreira

Place and date: Santa Maria, August 6th, 2008.

To identify the origin of pain and relieve of it is, certainly, important part of the treatment of any pathology. Unfortunately, nor all pain modalities possess an adequate treatment at a moment. Many patients do not obtain pain relief in response to drugs available or, they present serious adverse effects that hinder the continuity of treatment. So, a search for new drugs that are more efficient and that produce little undesired effect is necessary. Pyrazole derivatives are known for their excellent effectiveness as analgesics. In this context, the NUQUIMHE and LABNEURO have joined efforts for synthesize and evaluate the biological effects of several pyrazole compounds. In the present study, was evaluated the antinociceptive and antiedematogenic effect of one series of 5-trifluoromethyl-4,5-dihidro-1H-pyrazole-1-carboxiamide (**2a-j**) derivatives on acute and chronic nociception models in mice and rats. A preliminary evaluation of the toxicity for more active compounds, after their chronic administration, was carried out too. Some biochemistry parameters relationships to inflammation were also evaluated. Eight of ten compounds analyzed present antinociceptive effect on formalin test in mice. The two most efficient derivatives (**2c** and **2j**) were also evaluated on hot plate, carrageenan and arthritis induced by Complete Freund Adjuvant (CFA). These compounds caused no effect against thermal nociception, but were effective for decrease the edema carrageenan-induced in mice. In the arthritis model in rats, **2c** and **2j** compounds caused antinociception, but do not antiedematogenic action. This antinociceptive effect occurred after acute and chronic administration and has long duration. Parameters indicators of liver and kidney lesion (urea, creatinine, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase) were not altered and were neither detected signals of gastric mucosa lesion nor evidences of tolerance development to antinociceptive effect in rats chronically treated with **2c** or **2j**. The serum level of haptoglobin and the tissue myeloperoxidase activity of the animals that received treatment indicate that these compounds did not present anti-inflammatory effect. None compounds evaluated caused alteration on locomotors activity of mice and rats. The results obtained in the present work suggest that this new class of pyrazole derivatives seems promising for development of new analgesic drugs.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xvi
I – INTRODUÇÃO.....	1
II. OBJETIVOS.....	4
II.1 – OBJETIVO GERAL.....	5
II.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
III – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
III.1 – DOR E NOCICEPÇÃO	7
III.2 – DETECÇÃO, TRANSMISSÃO E MODULAÇÃO DA DOR.....	8
III.3 – MEDIADORES QUÍMICOS DA DOR E DA INFLAMAÇÃO.....	10
III.4 – TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DOR.....	10
III.5 – DERIVADOS PIRAZOLÍNICOS.....	12
III.5.1 – A busca de novos derivados pirazolínicos para o tratamento da dor e da inflamação.....	15
IV – MATERIAL E MÉTODOS.....	22
IV.1 – ANIMAIS.....	23
IV.2 – DROGAS E REAGENTES.....	23
IV.3 – TESTES COMPORTAMENTAIS.....	24
IV.3.1 – Teste da formalina.....	24
IV.3.2 – Teste da placa quente.....	25
IV.3.3 – Teste do edema de pata e alodínia induzidos por carragenina.....	26
IV.3.4 – Avaliação da atividade locomotora.....	27
IV.3.4.1 – Teste da locomoção forçada em cilindro giratório (rotarod).....	27
IV.3.4.2 – Teste da locomoção espontânea.....	28
IV.3.5 – Alodínia mecânica e edema induzidos por CFA.....	28
IV.3.5.1 – Avaliação do efeito da administração aguda dos derivados pirazolínicos 2c e 2j : decurso temporal, relação dose-efeito sobre a nocicepção e avaliação da atividade locomotora de ratos.....	29

IV.3.5.2 – Avaliação do efeito da administração crônica dos derivados pirazolínicos 2c e 2j sobre a alodínia e o edema de pata induzidos por CFA.....	30
IV.3.6 – Avaliação do peso corporal durante a administração crônica e do peso dos órgãos no final do tratamento com os derivados pirazolínicos 2c , 2j ou dipirona.....	31
IV.3.7 – Avaliação da atividade ulcerogênica após administração crônica dos derivados pirazolínicos 2c , 2j ou dipirona.....	31
IV.4 – TESTES BIOQUÍMICOS.....	32
IV.4.1 – Avaliação de parâmetros indicativos de função renal e hepática após administração crônica dos derivados pirazolínicos 2c , 2j ou dipirona.....	32
IV.4.2 – Avaliação de parâmetros hematológicos após administração crônica dos derivados pirazolínicos 2c , 2j ou dipirona.....	32
IV.4.3 – Determinação dos níveis séricos de haptoglobina após administração crônica dos derivados pirazolínicos 2c , 2j ou dipirona.....	33
IV.4.4 – Determinação da atividade tecidual da mieloperoxidase (MPO), N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) e eosinoperoxidase (EPO) na pata de ratos após administração crônica dos derivados pirazolínicos 2c , 2j ou dipirona.....	33
IV.4.5 – Determinação do nível tecidual de TNF- α na pata de ratos após administração crônica dos derivados pirazolínicos 2c , 2j ou dipirona.....	34
IV.5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
V – RESULTADOS	36
V.1 – TESTES COMPORTAMENTAIS.....	37
V.1.1 – Avaliação do efeito dos novos pirazolínicos (2a-j) no teste da formalina.....	37
V.1.2 – Avaliação do efeito dos novos pirazolínicos 2c e 2j no teste da placa quente.....	41
V.1.3 – Avaliação do efeito dos novos pirazolínicos 2c e 2j no teste do edema de pata e da alodínia induzidos por carragenina.....	42
V.1.4 – Avaliação do efeito dos novos pirazolínicos 2c e 2j sobre a atividade locomotora de camundongos.....	43
V.1.4.1 – Teste da locomoção forçada em cilindro giratório (<i>rotarod</i>).....	43
V.1.4.2 – Teste da locomoção espontânea.....	44

V.1.5 – Avaliação do efeito agudo dos derivados pirazolínicos 2c e 2j na alodínia mecânica e no edema de pata induzidos por CFA e na atividade locomotora espontânea em ratos.....	44
V.1.6 – Avaliação do efeito da administração crônica dos derivados pirazolínicos 2c , 2j ou dipirona na alodínia mecânica e no edema induzidos por CFA em ratos.....	50
V.1.7 – Avaliação da variação do peso corporal ao longo do tratamento crônico com os derivados pirazolínicos 2c , 2j ou dipirona.....	55
V.1.8 – Avaliação da percentagem de peso de alguns órgãos em relação ao peso corporal dos ratos ao final do tratamento crônico com os derivados pirazolínicos 2c , 2j e dipirona.....	56
V.1.9 – Avaliação da atividade ulcerogênica dos pirazolínicos 2c , 2j e da dipirona após administração crônica.....	57
V.2 – TESTES BIOQUÍMICOS.....	58
V.2.1 – Efeito da administração crônica de 2c , 2j ou dipirona sobre alguns parâmetros indicativos de toxicidade renal e hepática.....	58
V.2.2 – Efeito da administração crônica de 2c , 2j ou dipirona sobre alguns parâmetros hematológicos	59
V.2.3 – Determinação dos níveis plasmáticos de haptoglobina após a administração crônica de 2c , 2j e dipirona em ratos.....	60
V.2.4 – Determinação da atividade tecidual das enzimas MPO, NAG e EPO na pata de ratos após a administração crônica de 2c , 2j ou dipirona.....	61
V.2.5 – Determinação dos níveis teciduais de TNF- α na pata de ratos após a administração crônica de 2c , 2j ou dipirona.....	62
VI – DISCUSSÃO.....	64
VII – CONCLUSÕES.....	78
VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
IX – ANEXOS.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs – antiinflamatórios não esteroidais

B50 – 2-[5-triclorometil-5-hidróxi-3-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-il]-4-(4-bromofenil)-5-metiltiazol

CFA – Adjuvante completo de Freund

EPO – eosinoperoxidase

FPCA – 3-fenil-5-hidróxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazolcarboxiamida

FR140423 – 3-(difluormetil)-1-(4-metoxifenil)-5-[4-(metilsulfinil)fenil] pirazol

FR143166 – 1-(4-fluorfenil)-3-metil-5-[4-(metilsulfinil)fenil]pirazol

FR188582 – 3-cloro-5-[4-(metilsulfonyl)fenil]-1-fenil-1*H*-pirazol

LABNEURO – Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia

MPCA – 3-metil-5-hidróxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazolcarboxiamida

MPF4 – 4-metil-5-trifluormetil-5-hidróxi-4,5-diidro-1*H*-pirazol metil éster

MPO – mieloperoxidase

NAG – N-acetil- β -D-glucosaminidase

NUQUIMHE – Núcleo de Química de Heterociclos

PZ 2 – 3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1*H*-1-metilpirazol

PZ 3 – 3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1*H*-1-fenilpirazol

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

2c – 3-etil-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboxiamida

2j – 4-metil-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboxiamida

LISTA DE FIGURAS

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FIGURA 1 – Estrutura química do anel pirazol.....	12
FIGURA 2 – Estrutura química da dipirona.....	14
FIGURA 3 – Representação esquemática da estratégia de substituição bioisostérica do anel benzênico da salicilamida para obtenção de novos 5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-pirazóis.....	21

IV. MATERIAL E MÉTODOS

FIGURA 1 – Fórmula estrutural dos derivados 5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-carboxiamida utilizados no presente estudo.....	24
--	----

V. RESULTADOS

FIGURA 1 – Efeito dos novos derivados pirazolínicos 2a-d na nocicepção induzida por formalina, nas fases neurogênica e inflamatória do teste, em camundongos	38
FIGURA 2 – Efeito dos novos derivados pirazolínicos 2e, 2g, 2i e 2j na nocicepção induzida por formalina, nas fases neurogênica e inflamatória do teste, em camundongos.....	39
FIGURA 3 – Comparação entre as eficácias antinociceptivas de 2c, 2j (1000 µmol/kg), salicilamida (1500 µmol/kg) e dipirona (1000 µmol/kg) no teste da formalina em camundongos.....	41
FIGURA 4 – Efeito dos derivados pirazolínicos 2c e 2j (1000 µmol/kg), dipirona (1500 µmol/kg) (DIP) ou veículo na latência para resposta ao estímulo térmico no teste da placa quente em camundongos.....	41

FIGURA 5 – Efeito dos derivados pirazolínicos 2c e 2j (1000 µmol/kg) ou veículo no edema de pata induzido por carragenina 30 min e 4 h após indução do edema em camundongos.....	42
FIGURA 6 – Efeito dos derivados pirazolínicos 2c e 2j (1000 µmol/kg) ou veículo na alodínia mecânica induzida por carragenina em camundongos.....	43
FIGURA 7 – Efeito da administração aguda dos derivados pirazolínicos 2c , 2j e dipirona na dose de 1000 µmol/kg ou veículo na alodínia induzida por injeção intraplantar de CFA ao longo de 24 h.....	46
FIGURA 8 – Efeito da administração aguda dos derivados pirazolínicos 2c , 2j e dipirona na dose de 1000 µmol/kg, sobre o edema induzido por injeção intraplantar de CFA.	48
FIGURA 9 – Curva dose-efeito dos derivados pirazolínicos 2c , 2j e dipirona na alodínia induzida por injeção intraplantar de CFA.....	49
FIGURA 10 – Efeito da administração crônica dos pirazolínicos 2c (100 µmol/kg), 2j (100 µmol/kg) e dipirona (100 µmol/kg) na alodínia induzida por injeção intraplantar de CFA na pata ipsilateral.....	52
FIGURA 11 – Efeito da administração crônica dos pirazolínicos 2c (100 µmol/kg), 2j (100 µmol/kg) e dipirona (100 µmol/kg) na alodínia induzida por injeção intraplantar de CFA na pata contralateral.....	53
FIGURA 12 – Efeito da administração crônica dos pirazolínicos 2c (100 µmol/kg), 2j (100 µmol/kg) e dipirona (100 µmol/kg) no edema de pata produzido por injeção intraplantar de CFA na pata ipsilateral.	54
FIGURA 13 – Efeito da administração crônica dos derivados pirazolínicos 2c , 2j e dipirona (100 µmol/kg/15 dias) nos níveis plasmáticos de haptoglobina de ratos com inflamação crônica induzida por injeção intraplantar de CFA.....	61
FIGURA 14 – Efeito da administração crônica dos derivados pirazolínicos 2c , 2j e dipirona (100 µmol/kg/15 dias) nos níveis teciduais de TNF- α de ratos com inflamação crônica induzida por injeção intraplantar de CFA.....	63

LISTA DE TABELAS

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TABELA 1 – Derivados pirazolínicos sintetizados no NUQUIMHE e testados no LABNEURO..... 19

V. RESULTADOS

TABELA 1 – Eficácia antinociceptiva dos 4,5-diidro-1H-pirazóis **2a-j** (1000 µmol/kg) nas fases neurogênica e inflamatória do teste da formalina (20 µl, 1,5%, ipl) em camundongos 40

TABELA 2 – Efeito dos 4,5-diidro-1H-pirazóis **2c** e **2j** em camundongos submetidos ao teste da locomoção forçada em cilindro giratório..... 43

TABELA 3 – Efeito dos 5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-pirazóis **2c**, **2j**, salicilamida e dipirona na atividade locomotora espontânea de camundongos..... 44

TABELA 4 – Efeito dos 5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-pirazóis **2c**, **2j**, e dipirona na atividade locomotora espontânea de ratos..... 50

TABELA 5 – Variação percentual do volume da pata contralateral à pata injetada com CFA ou salina..... 55

TABELA 6 – Efeito da administração crônica dos derivados pirazolínicos **2c**, **2j** e dipirona (100 µmol/kg) em ratos com inflamação crônica induzida por CFA, sobre a percentagem de variação do peso corporal em relação ao peso inicial (antes da injeção de CFA)..... 56

TABELA 7 – Efeito da administração crônica dos derivados pirazolínicos **2c**, **2j** e dipirona, sobre a percentagem de peso de alguns órgãos em relação ao peso corporal..... 57

TABELA 8 – Efeito da administração crônica dos novos pirazolínicos **2c** e **2j** e da dipirona e da administração aguda de indometacina na mucosa gástrica de ratos..... 58

TABELA 9 – Efeito da administração crônica dos derivados pirazolínicos **2c**, **2j** e dipirona (100 µmol/kg) sobre marcadores de toxicidade hepática (AST e ALT) e renal (uréia e creatinina) em ratos com inflamação crônica induzida por injeção intraplantar de CFA..... 59

TABELA 10 – Efeito da administração crônica dos derivados pirazolínicos **2c**, **2j** e dipirona (100 µmol/kg) sobre alguns parâmetros hematológicos de ratos no modelo da inflamação crônica induzida por injeção intraplantar de CFA..... 60

Tabela 11 – Efeito da administração crônica dos novos pirazóis **2c** e **2j** e da dipirona (100 µmol/kg) na atividade da MPO, NAG e EPO do tecido da pata de ratos com inflamação crônica induzida por CFA..... 62

I. INTRODUÇÃO

A dor é um sintoma clínico de extrema relevância para alertar os indivíduos da ocorrência de alguma anormalidade ou doença. Por esse motivo ela é a causa principal da procura dos consultórios médicos. Não se pode negar o papel vital da dor, mas também não se pode negligenciar o sofrimento causado pela mesma. Quando não adequadamente tratada, a dor pode produzir efeitos desastrosos na vida dos pacientes e também das pessoas que convivem com eles. Uma das principais causas de afastamento do trabalho, de depressão e de isolamento social é, justamente, a dor não tratada adequadamente. Assim, identificar a causa e aliviar esse sintoma é, com certeza, parte importante do tratamento de qualquer patologia.

Neste sentido, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas para que se possa entender melhor a gênese desse processo e, dessa forma, poder intervir adequadamente. Uma vez que se conhece a causa de uma síndrome dolorosa, podem-se utilizar tanto abordagens farmacológicas quanto não farmacológicas para tratá-la. O uso de fármacos é, certamente, uma das condutas mais empregadas no controle da dor. Infelizmente, nem todas as modalidades de dor possuem um tratamento adequado atualmente. Muitos pacientes não respondem aos fármacos disponíveis ou, então, apresentam juntamente com o alívio da dor, efeitos adversos que impedem a continuidade do tratamento.

Levando em consideração a alta incidência da dor e também a falta de analgésicos eficazes e seguros, torna-se relevante pesquisar novas moléculas com potencial terapêutico. Neste sentido, muitos pesquisadores têm procurado desenvolver novas drogas, cuja estrutura química seja de fácil obtenção, tanto em nível de rendimento da síntese propriamente dita, quanto em relação aos subprodutos gerados e à toxicidade dos reagentes intermediários. Além disso, tem-se procurado desenvolver moléculas com boa eficácia e menor incidência de efeitos adversos em relação as já existentes.

Pirazóis e seus derivados, como a dipirona, são conhecidos pela sua excelente eficácia como analgésicos. Por esse motivo, na última década, o NUQUIMHE (Núcleo de Química de Heterociclos) e o LABNEURO (Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia) da UFSM têm unido esforços com o intuito de sintetizar e avaliar os efeitos biológicos de vários compostos pirazolínicos. Em estudos anteriores, foi demonstrado o potencial antinociceptivo e antipirético de

vários derivados dessa classe química, comprovando que, realmente, podem ser interessantes para o desenvolvimento de novos fármacos.

Portanto, este trabalho teve por objetivo estender o conhecimento a respeito dos efeitos dos derivados pirazolínicos sobre a nocicepção em animais de laboratório e, assim, tentar identificar moléculas promissoras para o tratamento da dor.

Parte dos dados que compõem esta tese foram publicados no periódico *European Journal of Medical Chemistry* (**Anexo 1**) e os demais resultados encontram-se sob a forma de manuscrito científico que será submetido para publicação (**Anexo 2**).

II. OBJETIVOS

II.1 – OBJETIVO GERAL

Avaliar o possível efeito antinociceptivo, antiedematogênico e a toxicidade de derivados 5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazol-1-carboxamida, utilizando modelos de nocicepção e inflamação aguda e crônica em camundongos e ratos.

II.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 – Avaliar a atividade antinociceptiva dos derivados pirazolínicos em modelos de nocicepção aguda induzida por estímulo nocivo químico e térmico.

2 – Investigar o efeito dos derivados pirazolínicos sobre o edema de pata induzido por agente químico.

3 – Avaliar o efeito antinociceptivo e antiedematogênico dos derivados pirazolínicos em um modelo de inflamação crônica.

4 – Verificar se a administração crônica dos compostos altera os níveis séricos de haptoglobina (marcador de inflamação), bem como analisar a atividade tecidual de algumas enzimas marcadoras de infiltração celular e os níveis teciduais de TNF- α no local da lesão, após a administração crônica dos compostos.

5 – Avaliar alguns parâmetros bioquímicos de função renal e hepática em animais submetidos à administração crônica dos derivados pirazolínicos.

6 – Verificar alterações no ganho de peso e relação entre o peso de alguns órgãos e o peso corporal, como indicadores de toxicidade, após administração crônica dos novos derivados pirazolínicos.

7 – Avaliar a atividade ulcerogênica dos derivados pirazolínicos após administração crônica.

8 – Verificar se os derivados pirazolínicos alteram as atividades locomotora e exploratória dos animais, nos testes do campo aberto e cilindro giratório.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

III.1 – DOR E NOCICEPÇÃO

A dor é uma experiência consciente, uma interpretação dos sinais nociceptivos que é influenciada pelas memórias individuais, aspectos emocionais, patológicos, genéticos e fatores cognitivos. A dor, portanto, é uma experiência altamente subjetiva, como ilustrado pela definição dada pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), onde ela é descrita como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada à lesão tecidual real ou potencial” (TJOLSEN & HOLE, 1997; TRACEY & MANTYH, 2007). Tendo em vista que um dos componentes da dor é o estímulo nocivo, podemos considerá-la de extrema importância, já que alerta os indivíduos para a ocorrência de alterações na integridade e na funcionalidade do organismo, permitindo que sejam adotados mecanismos de defesa (MILLAN, 1999; TRAUB, 1997). Entretanto, nem sempre a intensidade da dor está diretamente relacionada com a presença de lesão tecidual. Isso é particularmente verdadeiro em estados de dor crônica, onde a dor deixa de ter uma importância adaptativa e passa a ser apenas uma fonte de sofrimento e estresse (MILLAN, 1999; TRACEY & MANTYH, 2007).

Em relação ao tempo de duração, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda é aquela que tem a função de alerta, caracterizando-se por ser de curta duração (alguns segundos até poucos dias), sendo muitas vezes, mas não necessariamente, decorrente de uma lesão tecidual e desaparecendo com a resolução do processo que a originou (BERNARD *et al.*, 1996; LOESER & MELZACK, 1999). Além disso, a dor aguda tem etiologia evidente e seu diagnóstico é facilmente definido, tornando o controle desse tipo de dor bastante eficiente usando-se o arsenal terapêutico disponível atualmente (PORTENOY & LESAGE, 1999).

A dor crônica, por sua vez, estende-se por meses ou anos, persistindo, muitas vezes, mesmo na ausência de qualquer lesão tecidual (ASHBURN & STAATS, 1999). Esse tipo de dor parece resultar de processos patológicos que agredem as estruturas somáticas ou viscerais e de disfunções do sistema nervoso central ou do sistema nervoso periférico. Muitas vezes a etiologia da dor crônica é multifatorial, o que torna seu diagnóstico e tratamento mais complexos, envolvendo múltiplas

abordagens e nem sempre alcançando pleno êxito na sua erradicação (ASHBURN, 1999; LOESER & MELZACK, 1999).

O termo nocicepção foi introduzido por SHERRINGTON em 1906, para diferenciar a percepção de estímulos nocivos da sensação de dor, propriamente dita. Neste sentido, a dor representa uma experiência complexa e, muitas vezes, subjetiva, incluindo componentes afetivos, culturais e psicológicos, enquanto nocicepção é a sensação determinada pela estimulação das fibras aferentes primárias que transmitem o impulso nociceptivo até o sistema nervoso central (DUBNER & BENNET, 1983; MEYER *et al.*, 1994).

Em se tratando da utilização de modelos experimentais de dor em animais, é mais adequado usar-se o termo nocicepção, uma vez que os animais não são capazes de verbalizar os componentes subjetivos da dor. Sendo assim, tem sido proposto que os termos dor e analgesia são mais apropriadamente utilizados para o ser humano, enquanto nocicepção e antinocicepção são mais adequados para animais (JONES, 1992).

III.2 – DETECÇÃO, TRANSMISSÃO E MODULAÇÃO DA DOR

O termo nociceptor é uma abreviatura de “nocirreceptor”, e denota uma estrutura especializada na percepção de estímulos nocivos ou potencialmente nocivos (CATERINA & JULIUS, 1999). Esse termo foi introduzido por Sherrington, que definiu nociceptores como terminações livres de neurônios aferentes primários, que podem ser ativados por estímulos mecânicos nocivos, térmicos ou químicos (SHERRINGTON, 1906, MEYER *et al.*, 1994; JULIUS & BASBAUM, 2001). A percepção da dor inicia-se na periferia pela estimulação dos nociceptores, cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios das raízes dorsais e nos gânglios trigeminiais e projetam seus axônios até o corno dorsal da medula. Os nociceptores podem ser amplamente divididos em duas classes: uma com corpos celulares de pequeno diâmetro e axônios não mielinizados (fibras C) e outra composta por células com corpo celular de diâmetro médio e axônios mielinizados (fibras A δ). As fibras C nociceptoras conduzem o estímulo lentamente, enquanto que as fibras nociceptoras A δ , o fazem mais rapidamente (SMITH, 1984; JULIUS & BASBAUM, 2001). É importante ressaltar que o estímulo, seja ele térmico, químico ou mecânico,

deve exceder um certo limiar para que seja interpretado pelo sistema sensorial como nociceptivo (JULIUS & BASBAUM, 2001). De fato, estudos eletrofisiológicos mostram que neurônios sensoriais primários podem ser estimulados por calor nocivo, pressão intensa e agentes químicos irritantes, mas não por estímulos inócuos como aquecimento e pressão leves (BURGESS & PERL, 1967).

Os mecanismos pelos quais os estímulos térmicos, químicos e mecânicos desencadeiam o aparecimento do potencial de ação na fibra aferente primária (primeiro passo na percepção da dor) ainda não estão completamente elucidados. Contudo, existem evidências de que estímulos algogênicos induzem correntes de cátions através de estruturas protéicas especializadas, culminando na despolarização do aferente primário e na liberação de neurotransmissores no corno dorsal da medula (BONICA, 1990; BEVAN & GEPPETTI, 1994; KIRCHSTEIN *et al.*, 1997; BESSON, 1999). Substâncias endógenas, como ácido araquidônico, neuropeptídeos, cininas, aminoácidos excitatórios, entre outros, são produzidas e/ou liberadas pelo tecido lesionado e estimulam receptores presentes na membrana destes neurônios. Além disso, os mediadores inflamatórios liberados facilitam a neurotransmissão e sensibilizam o nociceptor (BJÖRKMAN, 1995). Mais especificamente, prostaglandinas e leucotrienos sensibilizam os terminais aferentes primários, tornando os nociceptores periféricos mais sensíveis à bradicinina (TAIWO & LEVINE, 1989; COHEN & PERL, 1990).

A informação nociceptiva que chega ao corno dorsal da medula espinhal, através das fibras aferentes primárias, é transmitida via fibras ascendentes (neurônios de projeção) aos centros supra-espinhais, onde ocorre a interpretação e localização da dor (MILLAN, 2002). Entretanto, a avaliação dos primeiros neurologistas, que consideravam a medula como um simples sistema de transmissão da informação nociceptiva, está longe de ser verdadeira. Hoje se sabe que muitos sistemas integrativos estão presentes na medula espinhal, envolvendo a percepção e modulação de estímulos nocivos e não nocivos (SMITH, 1984; MILLAN, 2002).

Muitos trabalhos destacam o papel do sistema descendente de controle endógeno da dor (MILLAN, 2002; VANEGAS & SCHAIBLE, 2004). As vias descendentes podem modular a nocicepção interagindo com alguns elementos

neurônios no corno dorsal da medula: terminações das fibras aferentes primárias, neurônios de projeção, interneurônios inibitórios e excitatórios e terminações de outras vias descendentes (Willis, 1991; FIELDS, 1999, MILLAN, 1999; YAKSH, 1999). O sistema descendente pode exercer tanto ações facilitatórias quanto inibitórias sobre a percepção de estímulos dolorosos e, desta forma, aumentar ou diminuir a sensação de dor. Assim, vias descendentes inibitórias podem atenuar a liberação de substâncias algogênicas das fibras aferentes primárias ou, ainda, direta ou indiretamente suprimir a estimulação dos neurônios de projeção (via interneurônios inibitórios) (MILLAN, 2002). Dentre as vias descendentes, destacam-se as vias noradrenérgica, serotoninérgica, dopaminérgica, opioidérgica e colinérgica. É importante ressaltar que o sistema descendente de controle da dor é bastante complexo, sendo que um mesmo neurotransmissor pode exercer tanto ações inibitórias quanto facilitatórias, dependendo do local onde é liberado (MILLAN, 2002).

III.3 – MEDIADORES QUÍMICOS DA DOR E DA INFLAMAÇÃO

Substâncias como íons K^+ , trifosfato de adenosina, glutamato, substância P e radicais livres participam do mecanismo da nocicepção (DRAY & PERKINS, 1993; DRAY, 1995, 1997a, 1997b). Além disso, os fragmentos celulares resultantes de lesão tecidual são capazes de desencadear uma reação inflamatória local, atraindo neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos. Essas células liberam mediadores inflamatórios como: cininas (bradicinina e calidina); citocinas (interleucinas e fator de necrose tumoral); aminas (serotonina, histamina) e prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina e leucotrienos). Assim, a injúria celular e a reação inflamatória decorrente de tal injúria, expõem o aferente primário a um grande número de substâncias capazes de estimular e sensibilizar o nociceptor (TAIWO & LEVINE, 1991; GUIEU *et al.*, 1996; MILLAN, 1997, 1999; CALIXTO *et al.*, 2000, 2001).

III.4 – TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DOR

Várias estratégias podem ser adotadas para o controle da dor, porém a abordagem farmacológica é, sem dúvida, a mais utilizada. Entre os fármacos

analgésicos mais utilizados, os opióides e os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) são os mais amplamente empregados (CAMU & VANLERSBERGUE, 2002).

Embora os opióides sejam analgésicos muito eficazes, sua utilização é limitada pelo fato dessas drogas produzirem muitos efeitos indesejados, como constipação, náuseas, vômitos, broncoconstrição, hipotensão, bradicardia e depressão respiratória (MCQUEEN, 1983; HOSKIN & HANKS, 1991; CAMU & VANLERSBERGUE, 2002). Além disso, a tolerância aos opióides instala-se rapidamente e a dependência física é verificada após poucos dias de tratamento, o que dificulta seu uso por longos períodos (MARTIN & SLOAN, 1977; NESTLER, 1993). Sendo assim, os AINEs têm algumas vantagens sobre os analgésicos opióides, como não induzir tolerância e dependência com o uso crônico (NUKI, 1983). No entanto, os AINEs também podem produzir efeitos indesejáveis como hemorragias, úlcera gástrica, falência renal e hepática, reações cutâneas, crises asmáticas e problemas cardiovasculares (JICK *et al.*, 1992; CARSON *et al.*, 1993; GARCÍA RODRÍGUEZ & JICK, 1996; BORNE, 1995; WALKER, 1997; VANE & BOTTING, 1998; HINZ & BRUNE, 2002; FLOWER, 2003; MITCHELL & WARNER, 2006).

Os AINEs estão entre os mais largamente utilizados de todos os agentes terapêuticos e incluem uma grande variedade de drogas, de diferentes classes químicas (ácidos salicílicos, como o AAS; ácidos propiônicos, como o ibuprofeno; ácidos acéticos, como a indometacina; fenamatos, como o ácido mefenâmico; ácidos enólicos, como o piroxicam; derivados pirazolínicos, como a dipirona e o celecoxibe; entre outras). O principal mecanismo da ação antiinflamatória, analgésica e antipirética dos AINEs é a inibição da enzima ciclooxigenase (COX), que culmina na diminuição da síntese de prostaglandinas (VANE, 1971; VANE & BOTTING, 1987; VANE, 1994; CHANDRASEKHRARAN *et al.*, 2002). Dentre os AINEs, daremos maior ênfase aos estudos realizados com os derivados pirazolínicos, em especial a dipirona, já que os compostos pesquisados nesse trabalho pertencem a essa classe e que a dipirona foi utilizada em alguns experimentos como controle positivo.

III.5 – DERIVADOS PIRAZOLÍNICOS

Os derivados pirazolínicos são drogas de origem sintética que possuem em sua estrutura um anel pirazol, que é um heterociclo de cinco membros, contendo átomos de nitrogênio nas posições 1 e 2 do anel (Figura 1). Esses compostos aliam atividade antiinflamatória, analgésica e antipirética (BORNE, 1995; GÜRSOY *et al.*, 2000) e, por isso, são eficazes no controle da dor e da febre.

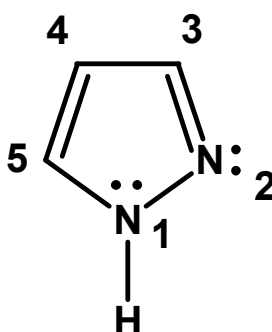


FIGURA 1 – Estrutura química do anel pirazol

A descoberta dos derivados pirazolínicos como agentes antipiréticos data de 1884, quando o químico alemão Ludwig Knorr tentava sintetizar derivados quinolínicos com atividade antipirética e, acidentalmente, obteve a antipirina. Esse composto possui atividade analgésica, antipirética e anti-reumática, porém é muito tóxico. Mais tarde foi sintetizado um derivado 3-metilamino da antipirina, a aminopirina, um análogo mais potente que foi amplamente utilizado como analgésico e antipirético nos Estados Unidos e Europa, até que fossem relatados casos de agranulocitose fatal associados ao uso dessa droga (BORNE, 1995). Devido a esse grave efeito colateral, houve pouco interesse pela pesquisa de novos compostos pirazolínicos até meados de 1940, quando uma série de pirazolidinodionas mais seguras foi sintetizada (INSEL, 1996). O representante mais importante dessa série é a fenilbutazona, um antiinflamatório muito potente, embora seu uso em alguns países seja restrito ao tratamento da espondilite anquilosante, devido aos seus efeitos colaterais (INSEL, 1996). A fenilbutazona foi introduzida na terapia da artrite em 1952, representando um marco no tratamento dessa doença. Entretanto, ela

pode causar náuseas, vômito e desconforto epigástrico em uma parcela importante dos pacientes. Alguns casos de agranulocitose associados ao uso de fenilbutazona também já foram descritos (INSEL, 1996).

Em 1921, o laboratório Hoechst obteve a dipirona (Figura 2), um outro derivado pirazolínico, pela substituição de uma das metilas do grupo amino da 5-pirazolona por metilenosulfoxilato de sódio. Estudos em animais e humanos revelaram que a dipirona é um antipirético potente, tem boa atividade analgésica e fraca atividade antiinflamatória (BRUNE & ALPERMANN, 1983; BRODGEN, 1986; LAIRD & CERVERO, 1996; HINZ *et al.*, 2007). Essa droga foi introduzida no comércio com o nome de Novalgina[®], sendo também denominada genericamente de metamizol. A dipirona ganhou popularidade nos países em desenvolvimento e em alguns países da Europa, especialmente devido ao seu baixo custo e alta eficácia (ARELLANO & SACRISTAN, 1990). Porém, o uso clínico da dipirona foi proibido na década de 70 nos Estados Unidos e em alguns países da Europa, quando seu uso foi relacionado a casos de agranulocitose (INSEL, 1996). Entretanto, estudos mostram que a incidência de agranulocitose em usuários de dipirona é muito baixa, havendo uma ampla variação em relação às diferentes populações estudadas e às doses utilizadas (The international agranulocytosis and aplastic anemia study, 1986; LAPORTE & CARNÉ, 1987). Além disso, outros analgésicos bastante aceitos no meio médico e acadêmico, como o paracetamol e o ácido acetilsalicílico (AAS), também causam efeitos indesejados graves, como necrose hepática (RUMACK *et al.*, 1982; DICKENSON, 1997) e Síndrome de Reye (BENEDETTI & BUTLER, 1990), em uma proporção muito maior do que a dipirona está associada à agranulocitose.

A dipirona é o analgésico e antipirético mais utilizado no Brasil. Por isso, a fim de esclarecer aspectos relacionados à sua segurança, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) promoveu em 2001, o “Painel Internacional de Avaliação da Segurança da Dipirona”. Nessa oportunidade, pesquisadores de vários países discutiram, com base em evidências científicas, os riscos do uso da dipirona. As conclusões a que os participantes do painel chegaram foram as seguintes: a eficácia da dipirona como analgésico e antitérmico é inquestionável; os riscos atribuídos à sua utilização em nossa população são baixos e os dados científicos disponíveis apontando a ocorrência destes riscos não são suficientes para indicar uma alteração do *status* regulatório (venda sem prescrição); os riscos do uso de

dipirona são similares, ou menores, do que o de outros analgésicos/antitérmicos disponíveis no mercado; a mudança de regulamentação atual da prescrição de dipirona incorreria em aspectos negativos para a população, aumentando os riscos de utilização de outros fármacos indicados para a mesma finalidade terapêutica (ANVISA, 2001).

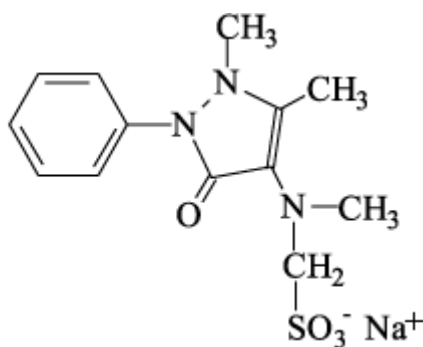


FIGURA 2 – Estrutura química da dipirona

Muitos estudos já foram realizados na tentativa de elucidar completamente o local e o mecanismo de ação da dipirona. Nesse sentido estão descritas ações centrais, apontando um papel da dipirona na ativação de vias descendentes inibitórias (YAKSH & HAMMOND, 1982; TAIWO & LEVINE, 1988; BJÖRKMAN, 1995; TORTORICI *et al.*, 1996; HERNANDEZ & VANEGAS, 2001; CARLSSON *et al.*, 1986; CARLSSON & JURNA, 1987; TORTORICI & VANEGAS, 1994). Além disso, AKMAN *et al.* (1996) e TORTORICI *et al.* (1996) demonstraram que a antinocicepção produzida por dipirona envolve mecanismos opióides. MARQUEZ & FERREIRA (1987) demonstraram que infusões repetidas de dipirona em humanos aliviavam a dor crônica. O efeito analgésico e antiinflamatório da dipirona na dor crônica também foi pesquisado por TATSUO *et al.* (1994). Eles compararam a atividade da dipirona, da dexametasona (corticóide) e da indometacina (AINE), e verificaram que a dipirona tem atividade analgésica significativa e fraca atividade antiinflamatória, enquanto que a indometacina e a dexametasona mostram equilíbrio de atividades analgésica e antiinflamatória. Através desses resultados, os autores concluíram que, uma vez que a dipirona não mostra atividade antiinflamatória, o mecanismo de ação analgésico não envolve a inibição da enzima ciclooxigenase. No entanto, esses resultados são conflitantes com os achados de CAMPOS *et al.*

(1998), que, injetando lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos, demonstraram que essa endotoxina provoca a liberação de um fator que produz contorções abdominais. Esse fator é liberado pelos macrófagos e seu efeito é mediado pela ação das prostaglandinas a partir do aumento de atividade da COX-2, principalmente. A dipirona impede a liberação do fator indutor das contorções, evitando o seu aparecimento. A seguir, CAMPOS *et al.*, (1999) demonstraram que a dipirona, em concentrações terapêuticas, inibe seletivamente a COX-2. Além disso, a dipirona inibe o edema produzido pela aplicação de capsaicina na pele (inflamação neurogênica) (SCHMELTZ *et al.*, 2000) e inibe a nocicepção produzida por injeção de prostaglandinas (LORENZETTI & FERREIRA, 1996). Existem, também, evidências de que a dipirona pode inibir diretamente a atividade dos neurônios aferentes (NEUGEBAUER *et al.*, 1994). Estes dados são corroborados pelos achados de BEIRITH e colaboradores (1998), que demonstraram que a dipirona diminui a ligação de aminoácidos excitatórios a seus receptores, que são responsáveis pela estimulação dos neurônios aferentes espinhais. Outro mecanismo sugerido para a antinocicepção provocada pela dipirona é a via L-arginina-óxido nítrico-GMP, já que inibidores dessa via previnem o efeito antinociceptivo da dipirona (DUARTE *et al.*, 1992). Apesar desses estudos citados, e de inúmeros outros, o mecanismo de ação da dipirona ainda não está totalmente elucidado.

III.5.1 – A busca de novos derivados pirazolínicos para o tratamento da dor e da inflamação

Desde o surgimento da dipirona, muitos outros compostos, contendo o anel pirazol, têm sido estudados. Em 1969, OSHIMA e colaboradores estudaram a atividade farmacológica do 1-(4-metóxi-6-metil-2-pirimidinil)-3-metil-5-metoxipirazol e uma série de 43 análogos desse composto. Após a triagem desses compostos em relação ao efeito analgésico, os autores verificaram que seis eram promissores e investigaram o potencial antipirético e antiinflamatório, bem como a toxicidade desses derivados pirazolínicos. Eles encontraram que os derivados 1-pirimidinilpirazol são igual ou mais potentes que a aminopirina, enquanto que os derivados 2-pirimidinilpirazol exibem atividade analgésica extremamente menor que a aminopirina. Quanto à atividade antipirética e antiinflamatória, tais compostos são menos potentes do que a aminopirina no combate à febre e equipotentes com a

aminopirina no teste de edema de pata induzido por carragenina e formalina. Além disso, esses derivados pirazólicos não se mostraram mais tóxicos do que a aminopirina, quando comparados os valores de DL_{50} de ambos. Eles concluíram, ainda, que compostos contendo um grupamento metóxi na posição 5 do anel pirazol apresentam ação analgésica, antipirética e antiinflamatória mais pronunciada do que compostos análogos com outros substituintes nesta posição (OSHIMA *et al.*, 1969).

MATHEUS e colaboradores (1991) demonstraram a ação antinociceptiva de uma série de pirazol 4-acil-arilhidrazonas, quando administradas por via oral e avaliadas no teste de contorções abdominais induzidas por acetilcolina em camundongos. Os compostos dessa série que possuem um substituinte *p*-N(CH₃)₂ ou *m*-OH e *p*-OCH₃ no anel aromático acil-arilhidrazona são dez vezes mais potentes do que a dipirona, usada como droga de referência.

Vários estudos têm demonstrado a atividade antinociceptiva e antiinflamatória do composto 3-(difluormetil)-1-(4-metoxifenil)-5-[4-(metilsulfinil)fenil] pirazol (FR140423). O FR140423 foi sintetizado em 1997 por um grupo de pesquisadores japoneses durante a triagem de novos compostos com potencial antiinflamatório (TSUJI *et al.*, 1997). Esse composto apresenta ação antinociceptica e antiinflamatória, inibindo seletivamente a COX-2 (OCHI *et al.*, 1999a; OCHI & GOTO, 2001). Além disso, o FR140423 tem efeito antinociceptivo em um modelo de dor induzida por estímulo térmico e esse efeito é antagonizado por naloxona, um antagonista do receptor opióide (OCHI *et al.*, 1999b). Os autores consideram que o FR140423 é uma droga que tem ação por dois mecanismos distintos, ou seja, inibição da COX-2 em tecidos inflamados e interação com o sistema opióide (OCHI *et al.*, 1999c). A administração por via oral ou intratecal, mas não intracerebroventricular, do FR140423 também induz antinocicepção em um modelo de dor provocada por estímulo mecânico, sendo essa ação mediada por receptores opióides do subtipo δ , mas não pelos receptores μ e κ . O fato de a administração i.t., mas não i.c.v., de FR140423 causar antinocicepção indica que o sítio de ação desse composto é espinhal e não supra-espinhal (OCHI *et al.*, 1999b). Em estudos de ligação, realizados com membranas preparadas a partir da medula espinhal de camundongos, o FR140423 inibiu muito pouco a ligação de [³H] DPDPE ao receptor opióide do subtipo δ , indicando que o FR140423 não se liga com grande especificidade a esse receptor. Sendo assim, é provável que o efeito antinociceptivo

do FR140423 não resulte de sua interação direta com os receptores δ -opioides, mas de mecanismos indiretos (OCHI *et al.*, 1999b). A ação desse composto envolve, além do sistema opióide, os sistemas inibitórios noradrenérgico e serotoninérgico descendentes, uma vez que o efeito antinociceptivo do FR140423, injetado intratecalmente, é antagonizado pela fentolamina (antagonista adrenérgico) e pela metisergida (antagonista serotoninérgico) (OCHI & GOTO, 2000a, 2000b). Além de sua comprovada ação antinociceptiva, esse composto possui ação antiinflamatória duas vezes maior do que a indometacina no modelo de artrite induzida por colágeno tipo II em ratos. Ao contrário da indometacina, o FR140423 não causa lesão gástrica em ratos, mostrando-se, portanto, mais seguro do que a droga de referência (OCHI & GOTO, 2001).

Outro composto testado pelo mesmo grupo de pesquisadores foi o FR188582 (3-cloro-5-[4-(metilsulfonil)fenil]-1-fenil-1*H*-pirazol), o qual mostrou-se um inibidor altamente seletivo da COX-2, foi mais potente do que a indometacina contra o edema de pata induzido por CFA e não causou lesão gástrica em ratos tratados com a droga durante 10 dias (OCHI *et al.*, 2001). Além disso, OCHI e colaboradores (2002) também estudaram o efeito do 1-(4-fluorfenil)-3-metil-5-[4-(metilsulfonil)fenil]pirazol (FR143166) no teste da pressão da cauda em camundongos. O FR143166 produziu um efeito antinociceptivo mediado pela ativação do sistema inibitório serotoninérgico descendente, da mesma forma que o FR140423 (OCHI *et al.*, 2002).

Tendo em vista o bom perfil analgésico, antipirético e antiinflamatório de vários derivados pirazolínicos, muitos pesquisadores têm investido na síntese e avaliação da atividade biológica de novos compostos dessa classe, que aliem boa ação farmacológica e baixo índice de efeitos indesejáveis. É nesse sentido que pesquisadores do LABNEURO vêm desenvolvendo um trabalho conjunto com pesquisadores do NUQUIMHE da UFSM, buscando sintetizar compostos com atividade antinociceptiva, antipirética e antiinflamatória.

Na tabela 1 estão representadas as estruturas químicas de alguns compostos sintetizados no NUQUIMHE e já testados no LABNEURO. A administração subcutânea de 3-metil-5-hidróxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazolcarboxiamida (MPCA) induz antinocicepção nas fases neurogênica e inflamatória do teste da formalina, mas não tem efeito antinociceptivo no teste de imersão da cauda. O

MPCA parece não apresentar ação antiinflamatória, já que não diminui o edema induzido por carragenina (SOUZA *et al.*, 2001). Ainda em relação ao MPCA, GODOY *et al.* (2004) mostraram que esse composto e seu análogo 3-fenil-5-hidróxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazolcarboxiamida (FPCA) apresentam efeito antinociceptivo no teste das contorções abdominais. Nesse trabalho, os autores também demonstram que a ação antinociceptiva do MPCA e do FPCA foi prevenida pela administração intratecal de metisergida e ioimbina, ao contrário do que ocorre para a dipirona. Esses resultados sugerem que receptores serotoninérgicos e α_2 -adrenérgicos espinhais estão envolvidos na antinocicepção induzida por MPCA e FPCA, mas não naquela induzida por dipirona.

Além disso, o MPCA e o FPCA revertem a febre induzida por lipopolissacarídeo em camundongos e por *Saccharomyces cerevisiae* em ratos jovens (SOUZA *et al.*, 2002; TOMAZETTI, 2005).

O 3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1*H*-1-metilpirazol (PZ 2) e seu análogo 3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1*H*-1-fenilpirazol (PZ 3), ao contrário do MPCA e do FPCA, apresentam ação antinociceptiva num teste que emprega estímulo nocivo térmico, o teste de imersão da cauda em água à 55°C. O efeito antinociceptivo do PZ 3, mas não do PZ 2, envolve a participação de mecanismos opióides (TABARELLI *et al.*, 2004).

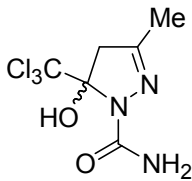
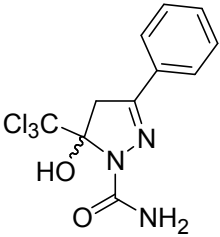
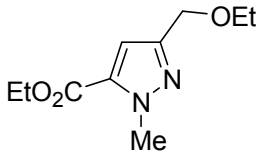
Outro derivado pirazolínico recentemente estudado no LABNEURO é o 2-[5-triclorometil-5-hidróxi-3-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-il]-4-(4-bromofenil)-5-metiltiazol (B50), um derivado pirazolil-tiazol. O B50 apresenta ação antinociceptiva no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, mas, da mesma forma que o MPCA, não apresenta efeito no teste de imersão da cauda. O efeito antinociceptivo do B50 foi prevenido pela administração de naloxona, um antagonista não seletivo dos receptores opióides, mas não por nor-binaltorfimina, antagonista do receptor κ -opióide. Estes resultados sugerem que os receptores do subtipo κ -opióide não estão envolvidos no mecanismo de ação do B50, embora exista uma participação do sistema opióide (PROKOPP *et al.*, 2004). A administração do B50, por via intratecal também causa antinocicepção em camundongos submetidos ao teste de contorções abdominais e este efeito é mediado pelo sistema opióide (De SOUZA *et al.*, 2008).

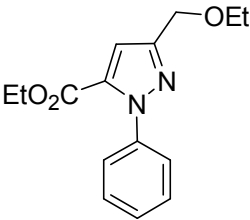
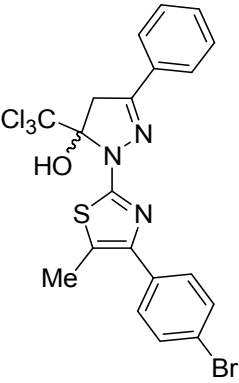
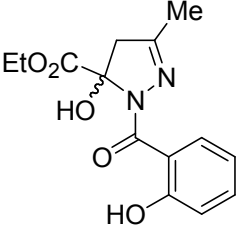
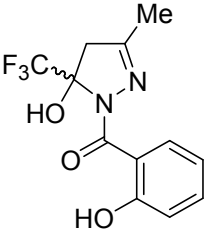
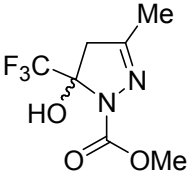
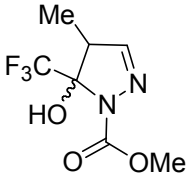
Em 2006, uma série de trihalometil pirazolinas metil ester substituídas foi sintetizada por MARTINS e colaboradores. Esses compostos foram avaliados no

teste da formalina e placa quente, onde foi demonstrada uma ação antinociceptiva desses derivados pirazolínicos (MILANO *et al.*, 2008). Os autores verificaram, ainda, que compostos trifluormetil substituídos na posição 5 do anel pirazol apresentaram maior eficácia antinociceptiva e ação mais prolongada do que aqueles triclorometil substituídos. Os resultados desse trabalho também mostram que a mudança de um grupamento metil da posição 3 para a posição 4 do anel pirazol, parece melhorar a ação antinociceptiva desses compostos (MILANO *et al.*, 2008). Além disso, MILANO e colaboradores (2008) verificaram que a ação do MPF4 (4-metil-5-trifluormetil-5-hidróxi-4,5-diidro-1*H*-pirazol metil éster), composto mais eficaz da série testada, é mediada pelo sistema opióide.

Em 2007, MACHADO e colaboradores obtiveram derivados pirazolínicos pela hibridização de 4,5-dihidro-1*H*-pirazol com ácido salicílico. Os autores demonstraram que esses compostos apresentam ação antinociceptiva no teste das contorções abdominais, com uma eficácia similar àquela do ácido acetilsalicílico.

TABELA 1 – Derivados pirazolínicos sintetizados no NUQUIMHE e testados no LABNEURO

Estrutura	Nomenclatura	Abreviatura
	3-metil-5-hidróxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-carboxiamida	MPCA
	3-fenil-5-hidróxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-carboxiamida	FPCA
	3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1 <i>H</i> -1-metilpirazol	PZ 2

	3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1 <i>H</i> -1-fenilpirazol	PZ 3
	2-[5-triclorometil-5-hidróxi-3-fenil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il]-4-(4-bromofenil)-5-metiltiazol	B50
	5-etilcarboxilato-5-hidróxi-3-metil-1-(2-hidroxibenzoil)-4,5-diidro-1 <i>H</i> -pirazol	6a
	5-hidróxi-3-metil-5-trifluormetil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-(2-hidroxibenzoil)pirazol	7a
	3-metil-5-trifluormetil-5-hidróxi-4,5-diidro-1 <i>H</i> -pirazol metil éster	MPF3
	4-metil-5-trifluormetil-5-hidróxi-4,5-diidro-1 <i>H</i> -pirazol metil éster	MPF4

	3-metil-5- triclorometil -5-hidróxi-4,5-diidro-1 <i>H</i> -pirazol metil éster	MPCI3
	4-metil-5- triclorometil-5-hidróxi-4,5-diidro-1 <i>H</i> -pirazol metil éster	MPCI4

Levando-se em consideração os estudos anteriormente citados e muitos outros que constam na literatura sobre o assunto, pode-se sugerir que os derivados pirazolínicos são uma classe promissora de compostos, principalmente no que diz respeito à sua atividade antinociceptiva. Nesse sentido, o NUQUIMHE sintetizou novos derivados pirazolínicos baseando-se na substituição bioisostérica do anel benzênico da salicilamida pelo anel 5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-pirazol, 3 ou 4 substituído (Figura 3). Sendo assim, o presente trabalho, foi realizado com o intuito de avaliar os efeitos antinociceptivos e antiinflamatórios dessa série de 10 novos derivados pirazolínicos recentemente sintetizada.

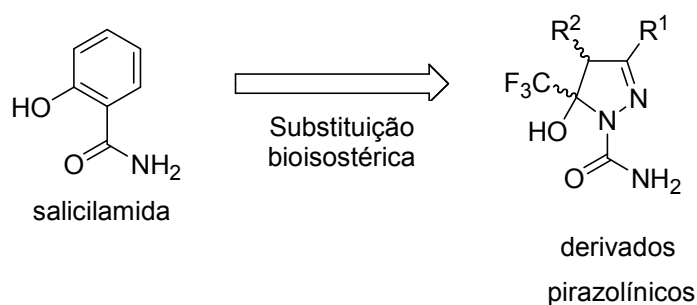


FIGURA 3 – Representação esquemática da estratégia de substituição bioisostérica do anel benzênico da salicilamida para obtenção de novos 5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-pirazóis.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

IV.1 – ANIMAIS

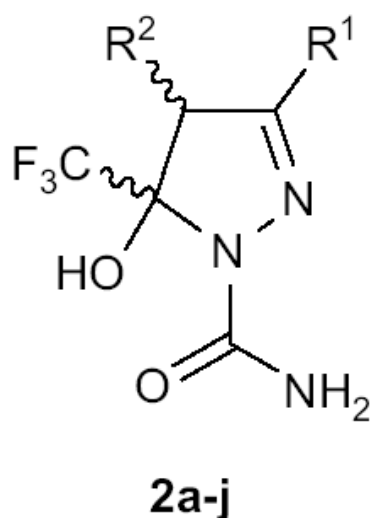
Foram utilizados camundongos albinos machos adultos (30-40 g) e ratos Wistar machos adultos (180-220 g), fornecidos pelo Biotério Central da UFSM. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas, em temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e com livre acesso à água e ração.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com orientações para os cuidados com animais de laboratório e considerações éticas para investigação de dor experimental em animais conscientes (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais empregado e os estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar efeitos consistentes dos procedimentos empregados e dos tratamentos com drogas. O projeto foi encaminhado ao comitê de ética em Pesquisa e Bem Estar Animal da UFSM e aprovado, estando registrado sob o número 23081.018371/2006-94.

IV.2 – DROGAS E REAGENTES

Os derivados 5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboxiamida (**2a-j**) foram sintetizados no NUQUIMHE do Departamento de Química da UFSM (Figura1). Todos os demais reagentes empregados foram adquiridos comercialmente.

Foram preparadas soluções ou suspensões dos pirazóis utilizando-se Tween 80 (5%) e água destilada (95%) ou Tween 80 (5%), polietilenoglicol 400 (20%) e água destilada (75%), dependendo do protocolo experimental. Os pirazóis, veículo e drogas usadas como controle positivo foram administrados por via subcutânea. As drogas e reagentes foram sempre preparadas no dia do ensaio, a menos que se conhecesse a estabilidade das mesmas após o preparo. Para minimizar a geração de resíduos, procurou-se preparar apenas a quantidade de drogas e reagentes necessária para a execução do experimento.



	2a	2b	2c	2d	2e	2f	2g	2h	2i	2j
R¹	H	Me	Et	Pr	<i>i</i> -Pr	Bu	<i>t</i> -Bu	Ph	4-Br-Ph	H
R²	H	H	H	H	H	H	H	H	H	Me

FIGURA 1 – Fórmula estrutural dos derivados 5-trifluorometil-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboxiamida utilizados no presente estudo.

IV.3 – TESTES COMPORTAMENTAIS

IV.3.1 – Teste da formalina

O teste da formalina foi utilizado a fim de verificar o efeito dos novos compostos pirazolínicos em um modelo de dor aguda induzida por agente químico. A injeção de formalina causa uma resposta tipicamente bifásica, que consiste em morder e/ou lambida a pata. Durante os primeiros 5 minutos após a administração de formalina observa-se intensa resposta nociceptiva, sendo esta primeira fase conhecida como fase neurogênica. Logo após essa fase, ocorre uma interfase (5-15 min) onde pouca ou nenhuma resposta nociceptiva é observada. A partir de 15 minutos após a injeção de formalina ocorre uma segunda fase de intensa resposta de lambida/morder a pata injetada que é chamada de fase inflamatória. Essa segunda fase prolonga-se até cerca de 30 minutos depois da injeção intraplantar de formalina (HUNSKAAR & HOLE, 1987).

Para avaliar o efeito dos derivados 5-trifluorometil-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboxiamida sobre a nocicepção induzida por formalina, camundongos foram

tratados com várias doses de cada composto (25-1000 $\mu\text{mol/kg}$) ou veículo (5 % de Tween 80 em água). Vinte minutos após esse tratamento, os animais receberam injeção de 20 μl de formalina 1,5% (v/v) na pata. Imediatamente após a injeção de formalina, os animais foram transferidos para uma caixa de vidro (20 x 20x 20 cm) como o assoalho dividido em 9 áreas iguais e o comportamento nociceptivo (tempo que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada) foi observado durante 30 minutos (HUNSKAAR & HOLE (1987).

Os resultados obtidos nesse experimento foram utilizados para selecionar os compostos que apresentaram maior efeito antinociceptivo, os quais foram utilizados nos demais protocolos experimentais. Para isso foi considerada a eficácia da maior dose testada nas duas fases do teste da formalina.

A eficácia dos compostos selecionados foi comparada com a eficácia da dipirona e da salicilamida nas fases neurogênica e inflamatória do teste. As doses de dipirona e salicilamida foram determinadas com base em experimentos piloto. A dipirona foi administrada na dose de 1000 $\mu\text{mol/kg}$ (mesma dose dos derivados pirazolínicos em teste) e a salicilamida foi injetada na dose de 1500 $\mu\text{mol/kg}$.

IV.3.2 – Teste da placa quente

O teste da placa quente, um modelo de nocicepção aguda, foi realizado conforme descrito por WOOLFE & MACDONALD (1944) modificado por ANKIER (1974). O teste da placa quente consiste em expor os animais a um estímulo térmico nocivo. Nesse experimento, a placa quente (Ugo Basile, modelo DS 37) foi mantida na temperatura de $50 \pm 1^\circ\text{C}$. O teste consistia em colocar o camundongo sobre essa superfície metálica uniformemente aquecida e observar a latência (em segundos) para ele lambem as patas traseiras ou saltar. Para evitar lesão tecidual, foi estabelecido um teto de 90 s. Quando o animal não apresentava nenhum dos comportamentos acima citados, ele era removido do aparelho pelo experimentador. No dia anterior ao experimento, os animais foram habituados ao procedimento, a fim de evitar a ocorrência de analgesia induzida pela novidade (SIEGFRIED, 1987), a qual poderia mascarar os resultados. Essa habituação consistiu em expor os animais às mesmas condições a que estariam sujeitos no dia do teste, ou seja, manipulação pelo experimentador, injeção (salina) e exposição à placa quente. No dia do teste,

os animais receberam injeção subcutânea de veículo (salina com 5% de Tween 80) ou dos derivados pirazolínicos selecionados anteriormente (**2c** e **2j**; 1000 µmol/kg) 30 minutos antes da exposição ao estímulo térmico. A dipirona foi usada como controle positivo, numa dose eficaz (1500 µmol/kg, s.c.) conforme determinado em experimentos piloto.

IV.3.3 – Teste do edema de pata e alodínia induzidos por carragenina

Os compostos pirazolínicos **2c** e **2j** foram avaliados no edema de pata e na alodínia induzidos por carragenina, um modelo experimental amplamente usado para avaliação de inflamação aguda (WINTER, 1962, HENRIQUES *et al.*, 1987). A inflamação induzida por carragenina é bifásica, sendo que a primeira fase é a que ocorre até 1h após a injeção da carragenina e a segunda fase (tardia) é a que se segue após à primeira hora. Essas duas fases diferem quanto aos mediadores envolvidos na formação do edema causado pela carragenina (DI ROSA *et al.* 1971; SALVEMINI *et al.*, 1996).

A carragenina foi dissolvida em solução salina numa concentração de 15 mg/ml e essa solução foi fervida por 1-2 s e resfriada em temperatura ambiente. Camundongos receberam 20 µl dessa solução na pata traseira direita, subcutaneamente, na superfície plantar. A formação de edema foi quantificada por mudanças no volume da pata injetada. O volume da pata foi medido antes da administração de carragenina, 30 minutos e 4 horas após a injeção. A avaliação do volume da pata foi realizada pela imersão da pata injetada em uma recipiente contendo solução aquosa de 2,5% de extran (v/v), colocado sobre uma balança eletrônica com precisão de 0,01 g (DAHER *et al.*, 2005). A pata foi cuidadosamente imersa no líquido, evitando contato com as paredes do recipiente, produzindo um deslocamento do líquido, acompanhado por um aumento do peso registrado na balança. Visto que a densidade do líquido contido no recipiente era de 1 mg/ml, o valor registrado pela balança foi assumido como sendo igual ao volume da pata.

Para avaliar o efeito antiedematogênico e antialodínico dos pirazolínicos, camundongos foram administrados subcutaneamente com uma dose de 1000 µmol/kg de **2c** ou **2j** ou com veículo, 30 minutos antes da injeção intraplantar de carragenina.

O edema de pata foi calculado de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ edema} = [(V_{\text{inicial}} - V_{\text{final}})/V_{\text{inicial}}] \times 100$$

Onde: V_{inicial} é o volume da pata antes da injeção de carragenina e V_{final} é o volume da pata 30 min ou 4 h após a injeção de carragenina.

O limiar de 50% de resposta foi determinado pelo método de *up-and-down* de DIXON (1980). Para isso, a pata injetada foi estimulada com um de uma série de sete filamentos de von Frey com incrementos logarítmicos crescentes (0,016; 0,06; 0,15; 0,45; 1,3; 3,7 e 10,5 g). Foram apresentados 6 estímulos, com um intervalo entre os estímulos de pelo menos 30 s. Foi considerada como resposta positiva, a retirada da pata do contato com o filamento ou comportamento de sacudir ou lambear a pata no momento ou imediatamente após a estimulação. Ambulação foi considerada uma resposta ambígua, logo, quando ocorreu no momento da aplicação do estímulo, este foi repetido (CHAPLAN et al., 1994). O conjunto de 6 respostas obtido foi utilizado para o cálculo do limiar 50% de resposta (DIXON, 1980), como mostrado a seguir:

$$\text{Limiar } 50\% \text{ (g)} = 10^{[X_f + k\delta]}$$

onde X_f = valor do último filamento de von Frey usado (em log); k = valor tabelado para o padrão de respostas positivas/negativas obtidas (DIXON, 1980); δ = diferença média (em log) entre os estímulos (0,4695).

IV.3.4 – Avaliação da atividade locomotora

IV.3.4.1 – Teste da locomoção forçada em cilindro giratório (*rotarod*)

Este teste foi usado para avaliar a coordenação motora dos camundongos, a fim de verificar se as drogas testadas produziam ataxia. O aparelho do *rotarod* consiste de um cilindro de 3,7 cm de diâmetro que gira em uma velocidade constante de 8 rpm. Vinte e quatro horas antes do teste, todos os animais foram treinados no *rotarod* até que conseguissem equilibrar-se no cilindro, sem cair, durante 1 minuto. No dia seguinte, 30 min após receberem os derivados pirazolínicos (1000 $\mu\text{mol/kg}$) ou veículo, os animais foram avaliados no cilindro giratório. Dois parâmetros foram observados: a latência para a primeira queda e o

número de quedas durante 4 min (TSUDA *et al.*, 1996). Neste teste foram utilizados os mesmos animais avaliados no teste da placa quente.

IV.3.4.2 – Teste da locomoção espontânea

Da mesma forma que o teste do cilindro giratório, a avaliação da locomoção espontânea dos camundongos foi realizada para descartar a possibilidade dos compostos causarem algum prejuízo locomotor. A atividade locomotora espontânea foi avaliada nos mesmos animais usados no teste da formalina, de forma que foram quantificados concomitantemente o comportamento nociceptivo e o número de cruzamentos realizados pelos animais. O teste foi realizado 20 min após a administração dos pirazolínicos (1000 µmol/kg), dipirona (1000 µmol/kg), salicilamida (1500 µmol/kg) ou veículo e os animais foram observados durante 30 min (TSUDA *et al.*, 1996).

IV.3.5 – Alodínia mecânica e edema induzidos por CFA

O efeito dos derivados 5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboxiamida previamente selecionados no teste da formalina foi avaliado no modelo de inflamação crônica induzida por adjuvante completo de Freund (CFA) em ratos. O efeito dos compostos foi avaliado após administração aguda e após administração de repetidas doses. Para induzir inflamação, os animais foram levemente anestesiados por inalação de halotano (2-3 min) e receberam 150 µl de CFA (1 mg/ml of *Mycobacterium tuberculosis* inativado por calor) subcutaneamente na região plantar da pata traseira direita (WILSON *et al.*, 2005). O desenvolvimento de alodínia foi avaliado pelo teste com os filamentos de von Frey. Para isso, os ratos foram colocados sobre uma plataforma elevada, cujo assoalho era formado por uma tela metálica, permitindo o acesso à região plantar dos animais. Os animais foram ambientados nesse aparelho por aproximadamente 15-30 min, até que a exploração do local e comportamentos de limpeza tivessem cessado. A pata injetada e a pata contralateral foram estimuladas com um de uma série de sete filamentos de von Frey com incrementos logarítmicos crescentes (0,8; 1,5; 3,5; 6,0; 7,5; 10,0 e 15,0 g). O filamento foi pressionado perpendicularmente à região plantar da pata com força

suficiente para produzir um leve dobramento, permanecendo em contato por 6-8 s, caso o animal não retirasse a pata antes. Foram apresentados 6 estímulos, com um intervalo entre os estímulos de pelo menos 30 s ou até que houvesse uma resolução aparente do comportamento gerado pelo estímulo anterior. Foi considerada como resposta positiva, a retirada da pata do contato com o filamento e o comportamento de sacudir e lambar a pata no momento ou imediatamente após a estimulação. Ambulação foi considerada uma resposta ambígua, logo, quando ocorreu no momento da aplicação do estímulo, este foi repetido (CHAPLAN *et al.*, 1994). O limiar de 50% de resposta foi determinado pelo método de *up-and-down* de DIXON (1980). Resumidamente, o primeiro estímulo foi realizado com o filamento de 10 g e, dependendo da resposta do animal, um estímulo de maior ou menor intensidade foi aplicado, de forma que no final do teste se obtivesse um conjunto de 6 respostas. Esse conjunto de respostas foi utilizado para o cálculo do limiar 50% de resposta (DIXON, 1980), como mostrado a seguir:

$$\text{Limiar 50\% (g)} = 10^{[X_f + k\delta]}$$

onde X_f = valor do último filamento de von Frey usado (em log); k = valor tabelado para o padrão de respostas positivas/negativas obtidas (DIXON, 1980); δ = diferença média (em log) entre os estímulos (0,2122).

Considerou-se que houve desenvolvimento de alodínia quando os animais apresentaram queda significativa em seu limiar de resposta em relação ao apresentado antes da injeção de CFA. Ou seja, um estímulo que antes era percebido como inócuo passou a ser percebido como nocivo, fenômeno este que corresponde à alodínia.

O edema de pata foi avaliado da mesma maneira que foi descrita para o teste da carragenina.

IV.3.5.1 – Avaliação do efeito da administração aguda dos derivados pirazolínicos 2c e 2j: decurso temporal, relação dose-efeito sobre a nocicepção e avaliação da atividade locomotora de ratos

O limiar basal de resposta ao estímulo mecânico e o volume da pata foram avaliados imediatamente antes da injeção de CFA ou salina (controle) na pata traseira direita. Dois a três dias após a injeção intraplantar, o limiar 50% de resposta

e o volume da pata foram novamente avaliados, a fim de se verificar o aparecimento de alodínia mecânica e edema, respectivamente. Aqueles animais que desenvolveram alodínia e edema em resposta a injeção de CFA foram divididos em grupos que receberam veículo ou derivados pirazolínicos ou dipirona (controle positivo). Os animais tratados com salina foram tratados com veículo e usados como controle do procedimento de injeção apenas.

Inicialmente, os animais receberam as drogas na dose de 1000 $\mu\text{mol/kg}$ e a alodínia e o edema foram avaliados 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h e 24 h após o tratamento, para se obter um perfil temporal de ação das mesmas. A seguir, construiu-se uma curva dose-efeito, com as doses de 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{mol/kg}$ dos derivados pirazolínicos e da dipirona. Nesse caso, a alodínia foi avaliada 1 h após o tratamento. Esses mesmos animais, após avaliação com os filamentos de von Frey, foram transferidos para um campo aberto (arena circular com assoalho dividido em 12 áreas iguais) e foi avaliado o número de cruzamentos, como indicativo da atividade locomotora, durante 5 min.

IV.3.5.2 – Avaliação do efeito da administração crônica dos derivados pirazolínicos 2c e 2j sobre a alodínia e o edema de pata induzidos por CFA

Os procedimentos para indução de inflamação, avaliação da alodínia e do edema de pata induzidos por CFA foram os mesmos adotados para a avaliação do efeito da administração aguda dos compostos, anteriormente mencionados. Entretanto, além das medidas na pata direita (ipsilateral), também foram realizadas as mesmas medidas na pata esquerda (contralateral). Isso foi realizado no intuito de verificar uma possível propagação da inflamação para a pata contralateral, bem como avaliar o efeito dos compostos nesse fenômeno. Com base nos resultados dos experimentos com administração aguda mencionados acima, foi escolhida a dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$ para o tratamento crônico. Com o objetivo de avaliar o efeito agudo de cada dose do composto e comparar com o efeito cumulativo das doses repetidas, foram feitas medidas antes e depois da administração dos compostos nos dias 1, 2, 3, 6, 9, 12 e 15 do protocolo experimental. O dia 1 corresponde ao dia do início dos tratamentos (48-72 h após CFA). As medidas da alodínia e do edema foram feitas imediatamente antes da injeção subcutânea e 1 h após esse tratamento. As drogas

foram administradas uma vez por dia, durante 15 dias, sempre no mesmo horário. Vale lembrar que, como não é conhecida a farmacocinética desses compostos, a realização das medidas 1 h após a injeção nos permitiriam identificar o desenvolvimento de tolerância aos efeitos dos compostos. Isto por que, caso não se fizessem essas medidas, mas apenas aquelas medidas antes da administração dos compostos, seria difícil dizer se uma ausência de efeito seria devido a um intervalo entre doses inadequado (24 h) ou ao desenvolvimento de tolerância. Dipirona, na mesma dose dos derivados pirazolínicos, foi utilizada como controle positivo.

IV.3.6 – Avaliação do peso corporal durante a administração crônica e do peso dos órgãos no final do tratamento com os derivados pirazolínicos 2c, 2j ou dipirona

Variações no peso corporal em animais que estão recebendo algum tipo de tratamento podem ser adotadas como um sinal de toxicidade de drogas. Por esse motivo, os animais que receberam tratamento crônico (experimento anterior) com os derivados pirazolínicos, dipirona ou veículo foram pesados diariamente antes do tratamento e foi calculada a percentagem de ganho/perda de peso em relação ao peso basal (antes de receber CFA ou salina intraplantar). Além disso, os rins, o fígado, o baço e o estômago foram removidos no final dos experimentos e foi calculada a percentagem do peso desses órgãos em relação ao peso corporal dos animais.

IV.3.7 – Avaliação da atividade ulcerogênica após administração crônica dos derivados pirazolínicos 2c, 2j ou dipirona

A atividade ulcerogênica foi avaliada após administração crônica dos pirazóis 2c, 2j ou dipirona (100 µmol/kg, uma dose diária, durante 15 dias; controles receberam veículo). A avaliação da mucosa gástrica foi feita 24 h após a última injeção. Seis horas antes do sacrifício, uma dose aguda de indometacina (30 mg/kg) foi administrada a um grupo separado de ratos, que foi usado como controle positivo. A ração, mas não a água, foi retirada 18 h antes da eutanásia. Os animais foram eutanasiados por overdose de thiopental e o estômago foi removido, aberto e cuidadosamente lavado com solução salina. A seguir, o estômago foi observado ao microscópio e foram determinados o índice de lesão (IL) e o número de úlceras

(NU). O índice de lesão foi calculado pela observação dos seguintes parâmetros: descoloração da mucosa, presença de petéquias e perda de muco. Para o cálculo do IL, foi atribuído um valor numérico (pontos) para as alterações encontradas, sendo 1 ponto para alteração leve, 2 pontos para alteração moderada ou 3 pontos para alteração intensa. Essa pontuação dada para cada parâmetro foi somada para obtenção do IL. Além disso, para úlceras maiores que 1 mm, foi atribuído 1,5 ponto por mm de lesão. O número de úlceras foi obtido pela contagem direta do número de lesões de até 1 mm (DJAHANGUIRI, 1969; GHEDINI *et al.*, 2002).

IV.4 – TESTES BIOQUÍMICOS

Vinte e quatro horas após a última administração das drogas (protocolo de administração crônica), os ratos foram eutanasiados por overdose de pentobarbital. Amostras de sangue coletadas da aorta abdominal e de tecido da pata dos animais foram coletadas para posterior análise.

IV.4.1 – Avaliação de parâmetros indicativos de função renal e hepática após administração crônica dos derivados pirazolínicos 2c, 2j ou dipirona

Amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo gel separador de soro e foram utilizadas para dosagem da atividade da aspartato aminotransferase (AST) e da alanina aminotransferase (ALT) como indicadores de lesão hepática, e para dosagem de uréia e creatinina, como indicadores de toxicidade renal. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas e encaminhadas para um laboratório de análises clínicas. Os níveis de AST, ALT, uréia e creatinina foram quantificados por método enzimático usando os reagentes Ortho-Clinical Diagnostics – Johnson & Johnson, em sistema automatizado (Vitros 950, dry chemistry; Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA).

IV.4.2 – Avaliação de parâmetros hematológicos após a administração crônica dos derivados pirazolínicos 2c, 2j ou dipirona

Alguns parâmetros hematológicos foram avaliados a fim de identificar possíveis alterações causadas pelo tratamento prolongado dos animais com os pirazolínicos em teste ou com dipirona. Amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo EDTA (anticoagulante) e foram encaminhadas para um laboratório de

análises clínicas para determinação automatizada de: eritrócitos, leucócitos, linfócitos, monócitos, plaquetas, concentração de hemoglobina e hematócrito.

IV.4.3 – Determinação dos níveis séricos de haptoglobina após administração crônica dos derivados pirazolínicos 2c, 2j ou dipirona

A haptoglobina é uma proteína de fase aguda, cujos níveis aumentam durante a inflamação e a determinação de sua quantidade no soro pode indicar a evolução da doença (GIFFEN *et al.*, 2003). Amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo gel separador de soro e foram encaminhadas a um laboratório de análises clínicas, onde a haptoglobina foi quantificada por nefelometria, usando o kit Dade Behring (BN II System. Analyzer Dade Behring, Germany).

IV.4.4 – Determinação da atividade tecidual da mieloperoxidase (MPO), N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG) e eosinoperoxidase (EPO) na pata de ratos, após administração crônica dos derivados pirazolínicos 2c, 2j ou dipirona

Durante o decurso da inflamação produzida por CFA na pata dos animais, ocorre a infiltração de células relacionadas ao sistema imunológico no local da injeção, numa tentativa do organismo de eliminar o agente inflamatório. Essas células, tais como neutrófilos, eosinófilos e macrófagos, produzem enzimas (MPO, EPO e NAG) que são capazes de destruir agentes invasores. Logo, a determinação da atividade dessas enzimas, pode fornecer uma idéia da presença ou não dessas células no local da lesão.

Amostras de pele da pata dos animais que receberam injeção intraplantar de CFA ou salina e que foram tratados cronicamente com veículo, dipirona ou com os novos derivados pirazolínicos foram coletadas para análise da atividade da MPO, NAG e EPO. As amostras de pele foram homogeneizadas com 20 volumes de acetato de sódio 80 mM (pH 5,4) contendo 0,5 % de brometo de hexadeciltrimetilamônio. A seguir esse homogeneizado foi centrifugado (11.200 g, 4 °C, 20 min) e coletou-se o sobrenadante para a determinação da atividade das enzimas.

Para o ensaio da MPO, 10 μ l do sobrenadante e 220 μ l de acetato de sódio 80 mM (pH 5,4) contendo 15% de H_2O_2 0,3 mM foram adicionados em triplicada numa placa de 96 poços. A reação foi iniciada pela adição de 20 μ l de

tetrametilbenzidina 18,4 mM e a mistura foi incubada por 3 min a 37°C. A reação foi terminada pela imersão em banho de gelo e adição de 30 µl ácido acético ao meio reacional. A absorbância foi verificada em 630 nm (SUZUKI *et al.*, 1983).

O ensaio da NAG foi realizado de acordo com (LLORET *et al.*, 1995), onde 25 µl de amostra, 150 µl de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,5) e 25 µl de 4-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminidase foram transferidos para uma placa de 96 poços, em triplicata. Foi feita uma incubação a 37 °C, durante 60 min e a reação foi parada pela adição de 100 µl de tampão glicina 200 mM (pH 10,4). A absorbância em 405 nm foi quantificada.

A determinação da atividade da EPO foi ensaiada conforme KANG e colaboradores (2008). Para isso, foi preparado numa placa de 96 poços, uma mistura reacional contendo 100 µl do sobrenadante, 100 µl de H₂O₂ 6,6 mM e 100 µl de o-fenilenodiamina 0,1 mM. Essa mistura foi incubada durante 30 min a 37 °C e a reação foi terminada pela adição de 75 µl de H₂SO₄ 30%. A absorbância foi quantificada em 490 nm.

A concentração de proteínas nas amostras (sobrenadante) foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), usando albumina sérica bovina como padrão. Para as três enzimas, o resultado foi expresso como a razão entre a absorbância e a quantidade de proteínas da amostra.

IV.4.5 – Determinação do nível tecidual de TNF-α na pata de ratos após administração crônica dos derivados pirazolínicos 2c, 2j ou dipirona

Os ratos injetados com CFA intraplantar e que receberam tratamento crônico com **2c**, **2j**, dipirona ou veículo foram eutanasiados 24 h após a última injeção das drogas e a pele da pata injetada com CFA foi removida e congelada para posterior dosagem de TNF-α. Um grupo de animais que recebeu injeção intraplantar de salina e foi tratado durante 15 dias com veículo, foi usado como controle. O tecido da pata foi homogeneizado em tampão fosfato 80 mM (pH 7.4) contendo: 0,5% de Tween 20, 0,1 mM de PMSF, 2 mM de EDTA, 0,01 µg/ml de inibidor de tripsina obtido de soja, 0,1% de bacitracina e 0,1% de albumina sérica bovina. O homogeneizado foi centrifugado a 16.000 x g, por 10 min, a 4°C e o sobrenadante foi estocado a -20 °C até o momento da análise (SOUZA *et al.*, 2000; CAMPOS *et al.*, 2002). A

quantificação do TNF- α tecidual foi feita usando um kit ELISA, e os procedimentos foram aqueles descritos pelo fabricante (DuoSet ELISA Development System, rat TNF- α /TNFSF1A, R&D Systems).

IV.5 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguido do teste de Student-Newman-Keuls (SNK) ou Teste F, conforme o caso. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

V. RESULTADOS

V.1 – TESTES COMPORTAMENTAIS

V.1.1 – Avaliação do efeito dos novos pirazolínicos (2a-j) no teste da formalina

Todos os 10 novos derivados pirazolínicos (**2a-j**) foram avaliados no teste da nocicepção induzida por formalina em camundongos. Nas **Figuras 1 e 2** é mostrado o efeito desses novos compostos nas fases neurogênica e inflamatória do teste. Os compostos **2a**, **2c-e**, **2g**, **2i** e **2j** foram capazes de diminuir o comportamento nociceptivo dos animais, tanto na fase neurogênica quanto na fase inflamatória (**Figuras 1 e 2**). Já o derivado pirazolínico **2b**, foi ineficaz na fase neurogênica, inibindo o comportamento nociceptivo apenas na fase inflamatória (**Figura 1**). Por outro lado, o composto **2f** mostrou-se efetivo na primeira fase, mas não na segunda fase do teste (**Tabela 2**). Além disso, o composto **2h** não causou qualquer efeito sobre a resposta nocifensiva causada por formalina, sendo inativo em ambas as fases, neurogênica e inflamatória (**Tabela 2**).

Utilizando os resultados obtidos com a maior dose testada de cada derivado pirazolínico e seus respectivos controles, foi calculada a eficácia antinociceptiva desses compostos nas fases neurogênica e inflamatória do teste da formalina (**Tabela 1**). Esses dados de eficácia serviram para indicar quais os compostos mais promissores para dar continuidade à investigação do perfil desses derivados pirazolínicos. Os derivados pirazolínicos **2c** e **2j**, na dose de 1000 µmol/kg, mostraram maior eficácia nas duas fases do teste. Como mostrado na tabela 1, ambos os compostos causaram inibição de quase 100% da resposta nociceptiva na fase inflamatória. Além disso, a inibição da fase neurogênica foi também bastante pronunciada, sendo cerca de 88% e 75% para os compostos **2c** e **2j**, respectivamente. Por apresentarem maior eficácia antinociceptiva, **2c** e **2j** foram escolhidos para todos os demais testes que foram realizados.

A eficácia antinociceptiva dos compostos **2c** e **2j** foi comparada com a eficácia da dipirona e da salicilamida, como mostrado na **Figura 3**. Os derivados pirazolínicos **2c** e **2j**, assim como a dipirona, foram efetivos na nocicepção neurogênica produzida por formalina, enquanto que a salicilamida não apresentou esse efeito. Porém, a dipirona teve uma eficácia estatisticamente menor que os compostos **2c** e **2j**. Na fase inflamatória, **2c**, **2j**, dipirona e salicilamida foram bastante eficazes na diminuição do comportamento nociceptivo, porém os novos derivados pirazolínicos apresentaram efeito mais pronunciado.

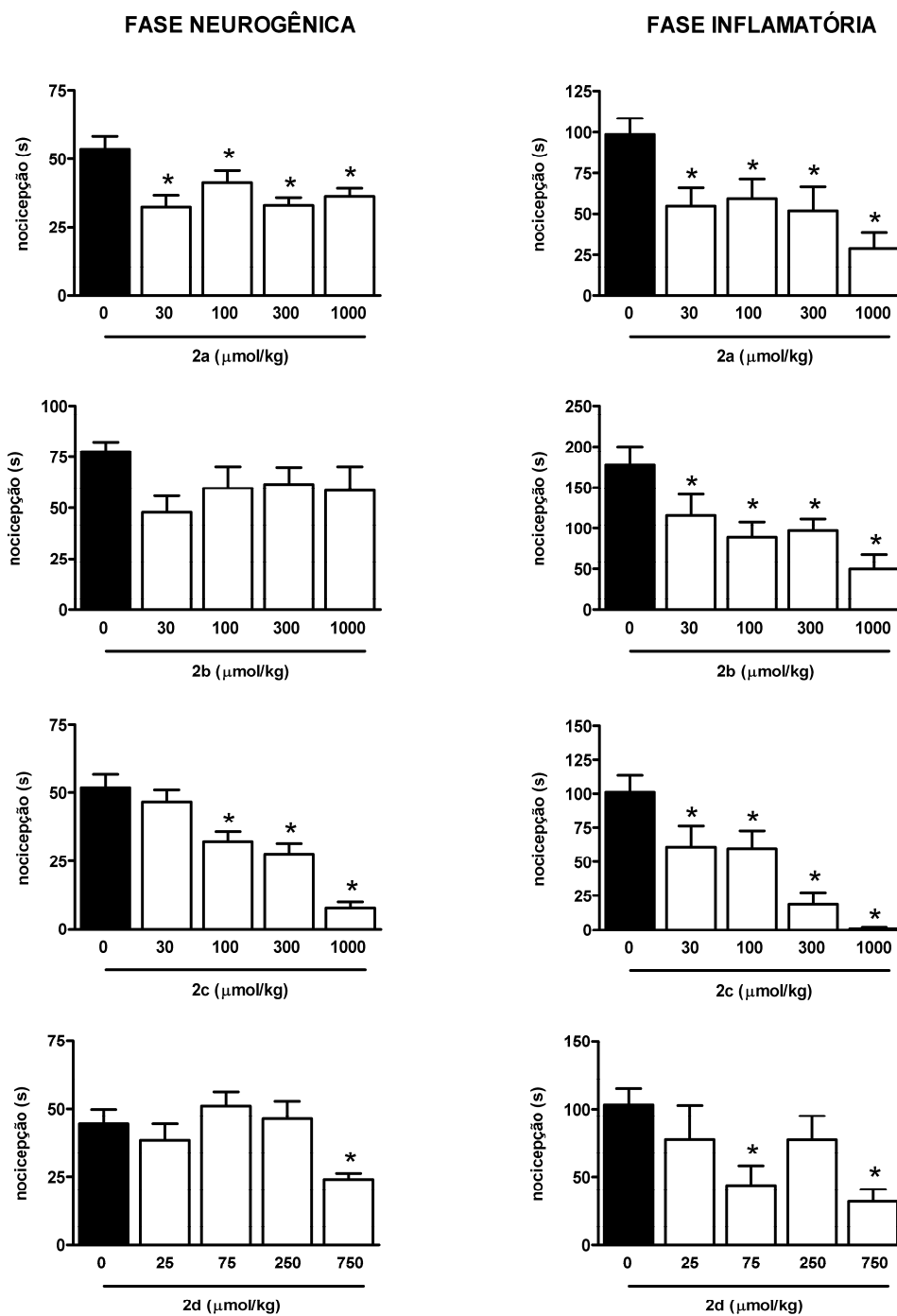


FIGURA 1 – Efeito dos novos derivados pirazolínicos **2a-d** na nociceção induzida por formalina, nas fases neurogênica e inflamatória do teste, em camundongos. Dados expressos como média ± erro padrão; * $p < 0,05$ comparado com o veículo.

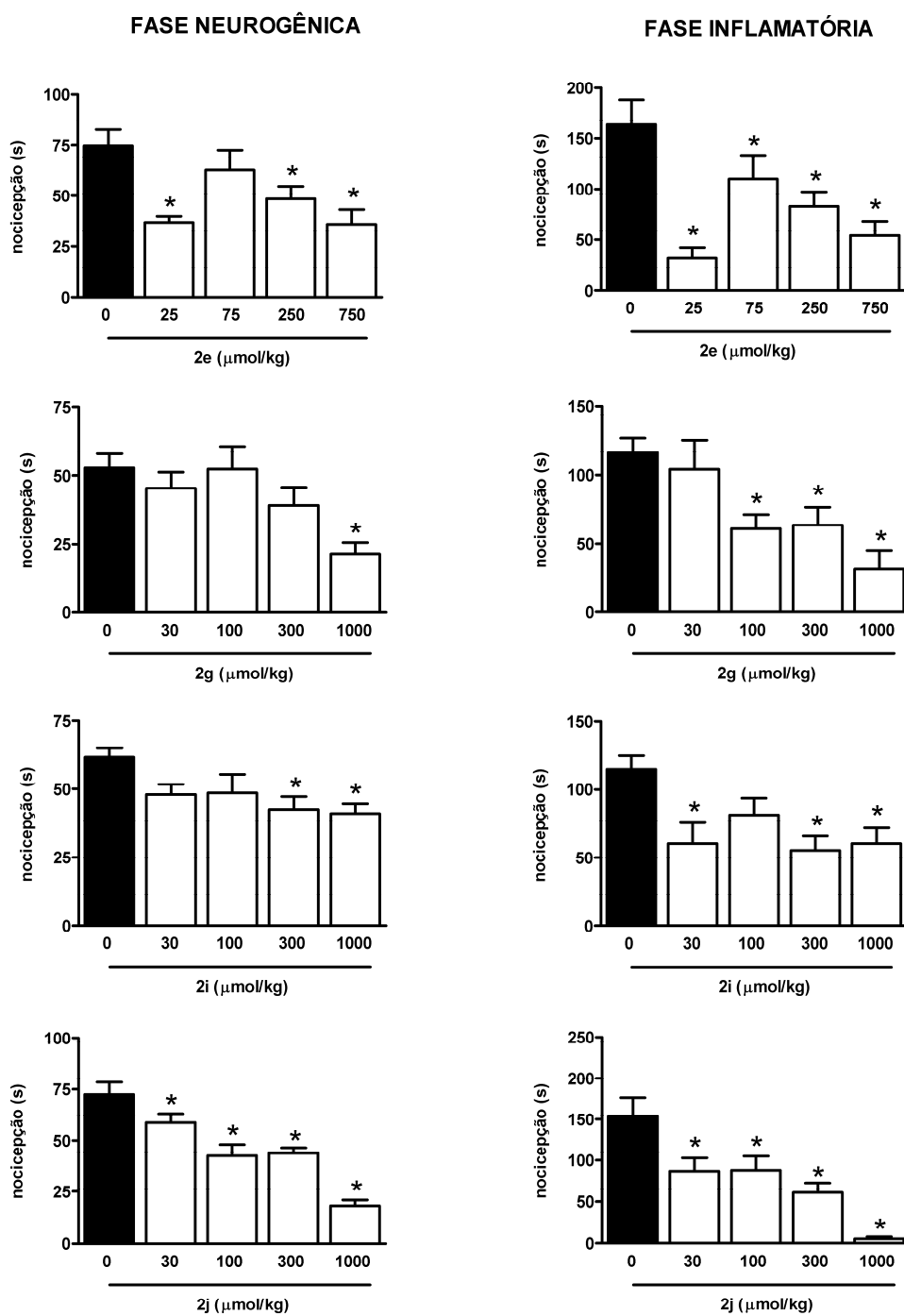


FIGURA 2 – Efeito dos novos derivados pirazolínicos **2e**, **2g**, **2i** e **2j** na nociceção induzida por formalina, nas fases neurogênica e inflamatória do teste, em camundongos. Dados expressos como média ± erro padrão; * $p < 0,05$ comparado com o veículo.

TABELA 1 – Eficácia antinociceptiva dos 4,5-diidro-1H-pirazóis **2a-j** (1000 µmol/kg) nas fases neurogênica e inflamatória do teste da formalina (20 µl, 1,5%, ipl) em camundongos.

Composto	Fase	Fase	N	
	neurogênica	inflamatória	Veículo	Tratado
	Analgesia (%)	Analgesia (%)		
2a	32,8 ± 6,2 [*]	70,8 ± 9,6 [*]	17	15
2b	23,3 ± 11,9	55,5 ± 10,5 [*]	9	8
2c	87,9 ± 3,6 [*]	98,2 ± 1,3 [*]	14	9
2d	48,2 ± 4,7 [*]	70,1 ± 8,4 [*]	16	12
2e	51,9 ± 9,5 [*]	67,0 ± 8,8 [*]	10	9
2f	46,0 ± 7,2 [*]	-22,3 ± 15,1	6	8
2g	59,1 ± 7,6 [*]	72,9 ± 11,9 [*]	12	11
2h	10,0 ± 11,8	8,2 ± 17,1	8	8
2i	33,3 ± 5,9 [*]	47,3 ± 9,8 [*]	17	18
2j	74,6 ± 3,6 [*]	97,2 ± 1,6 [*]	10	10

Valores estão expressos como média ± erro padrão; N=número de animais por grupo.

* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao veículo quando os dados brutos foram comparados ($p < 0,05$).

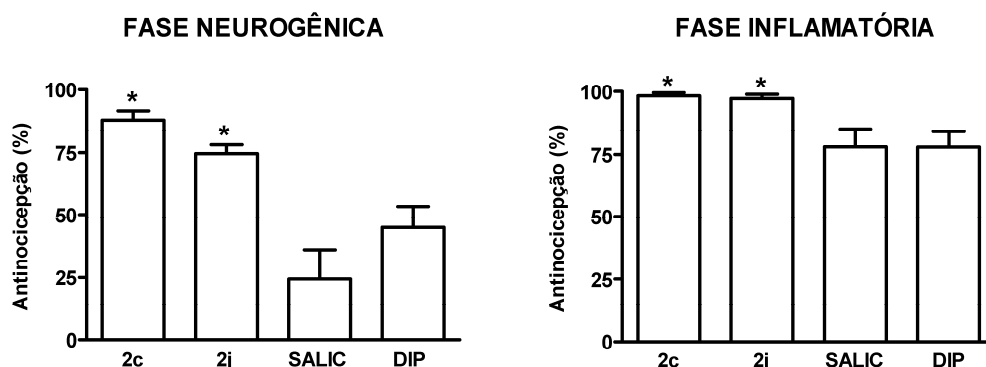


FIGURA 3 – Comparação entre as eficácias antinociceptivas de **2c**, **2j** (1000 $\mu\text{mol/kg}$), salicilamida (1500 $\mu\text{mol/kg}$) (SALIC) e dipirona (1000 $\mu\text{mol/kg}$) (DIP) no teste da formalina em camundongos. Dados expressos como média \pm erro padrão; $n=6-9$ por grupo; * $p < 0,05$ comparado com salicilamida e dipirona.

V.1.2 – Avaliação do efeito dos novos pirazolínicos (**2c** e **2j**) no teste da placa quente

O efeito dos compostos **2c** e **2j** na dose de 1000 $\mu\text{mol/kg}$ foi avaliado no teste da placa quente. Na **figura 4** pode-se verificar que a administração subcutânea de **2c** e **2j** não foi capaz de produzir elevação da latência de resposta ao estímulo térmico. Por outro lado, a dipirona na dose de 1500 $\mu\text{mol/kg}$, incluída no teste como um padrão interno, aumentou a latência de resposta, validando o modelo.

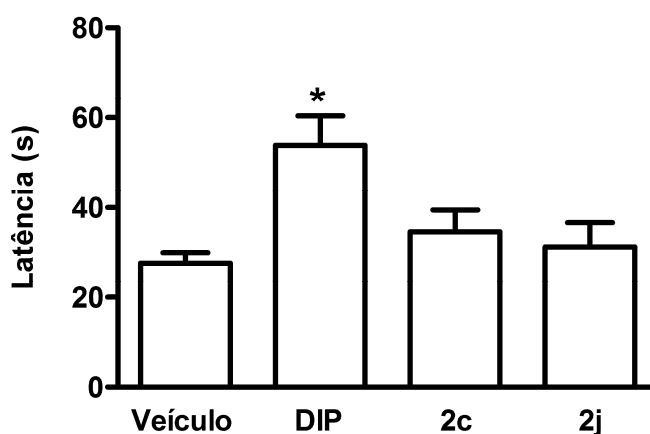


FIGURA 4 – Efeito dos derivados pirazolínicos **2c** e **2j** (1000 $\mu\text{mol/kg}$), dipirona (1500 $\mu\text{mol/kg}$) (DIP) ou veículo na latência para resposta ao estímulo térmico no teste da placa quente em camundongos. Dados expressos como média \pm erro padrão; $n=14-15$ por grupo; * $p < 0,05$ comparado com o veículo.

V.1.3 – Avaliação do efeito dos novos pirazolínicos **2c** e **2j** no teste do edema de pata e da alodínia induzidos por carragenina

As **Figuras 5** e **6** mostram os resultados obtidos quando os compostos **2c** e **2j** foram avaliados no teste do edema de pata induzido por carragenina. O volume da pata dos animais foi avaliado 30 min e 4h após a injeção de carragenina, enquanto que o limiar de resposta mecânica foi avaliado 30 min, 1h, 2h e 4h depois da injeção de carragenina. Foi possível observar um aumento significativo do volume da pata dos camundongos, observando-se um edema de cerca de 30% nos primeiros 30 min e de mais de 65% 4h após a injeção. Além disso, os animais apresentaram queda de aproximadamente três vezes no limiar de resposta ao estímulo tátil. Nos animais que receberam o tratamento com **2c** ou **2j** (1000 $\mu\text{mol/kg}$) 30 min antes da injeção de carragenina, observou-se um aumento menor do volume da pata no tempo de 4 h e um aumento no limiar de resposta nos tempos de 1h e 2h, quando comparados aos animais que receberam veículo.

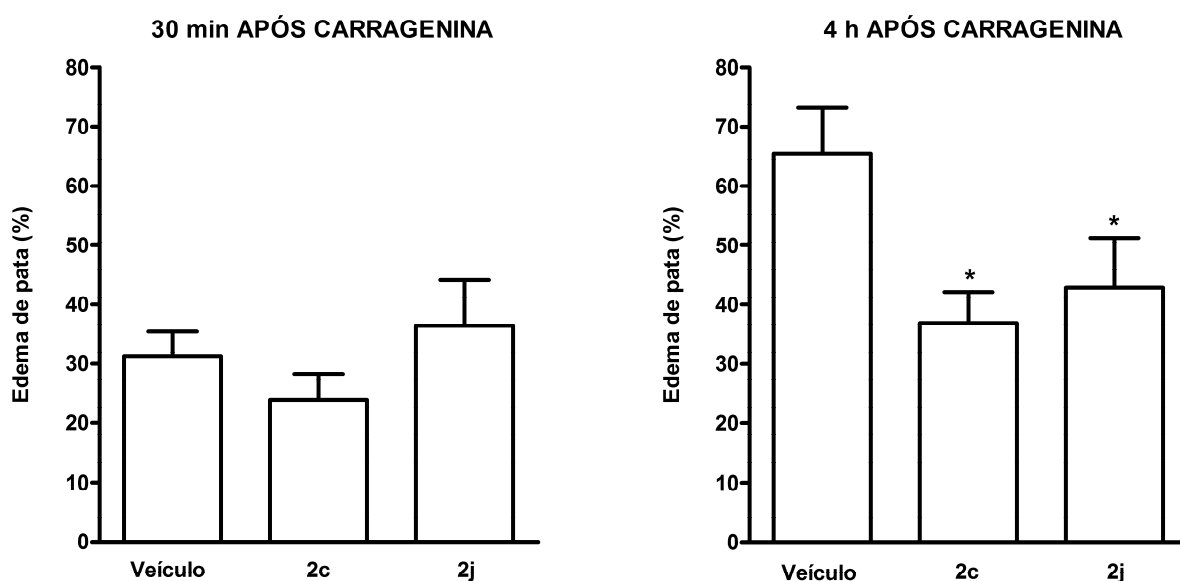


FIGURA 5 – Efeito dos derivados pirazolínicos **2c** e **2j** (1000 $\mu\text{mol/kg}$) ou veículo no edema de pata induzido por carragenina 30 min e 4 h após indução do edema em camundongos. Dados expressos como média \pm erro padrão; n=14-16 por grupo; * p < 0,05 comparado com o veículo.

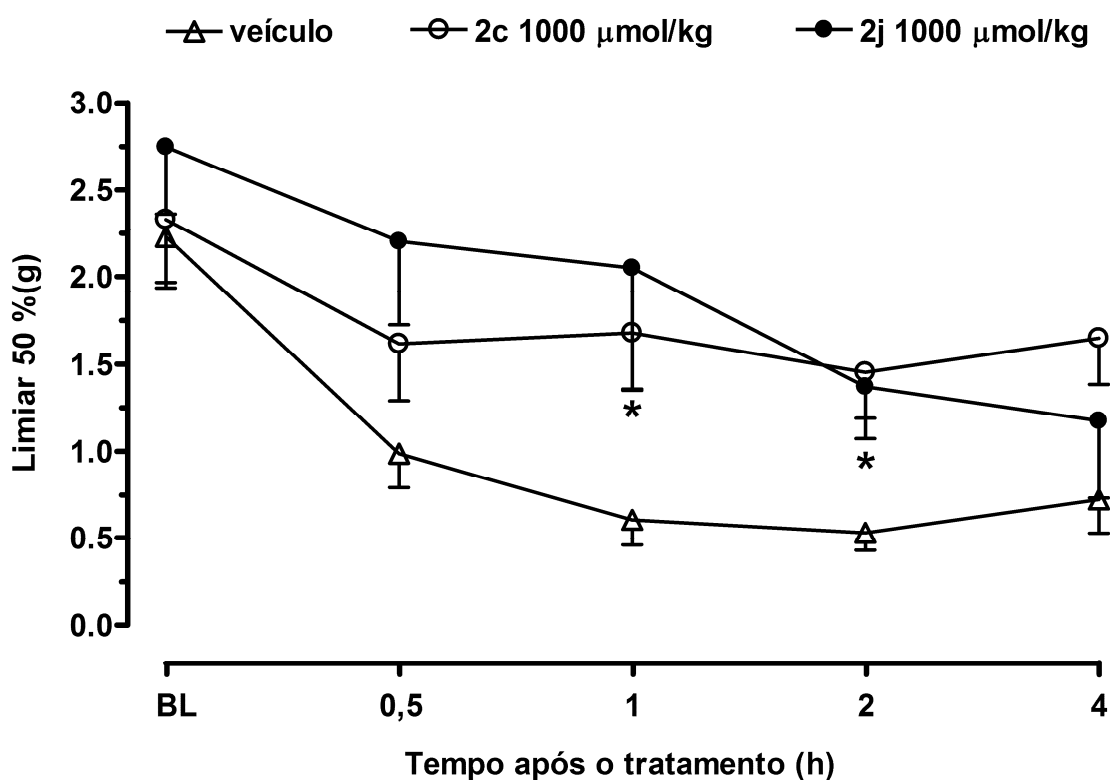


FIGURA 6 – Efeito dos derivados pirazolínicos **2c** e **2j** (1000 µmol/kg) ou veículo na alodínia mecânica induzida por carragenina em camundongos. Dados expressos como média ± erro padrão; n=14-16 por grupo; * p < 0,05 comparado com o veículo.

V.1.4 – Avaliação do efeito dos novos pirazolínicos **2c** e **2j** sobre a atividade locomotora de camundongos

V.1.4.1 – Teste da locomoção forçada em cilindro giratório (*rotarod*)

O desempenho de camundongos tratados com 1000 µmol/kg de **2c**, **2j** ou seu veículo foi verificado no teste de locomoção forçada em cilindro giratório. O tratamento não alterou nem a latência para a primeira queda nem o número de quedas do aparelho (**Tabela 2**).

TABELA 2 – Efeito dos 4,5-diidro-1H-pirazóis **2c** e **2j** em camundongos submetidos ao teste da locomoção forçada em cilindro giratório.

Tratamento	Latência para 1 ^a queda (s)	Número de quedas
Veículo	76,9 ± 17,0	5,4 ± 1,3
2c 1000 µmol/kg	112,5 ± 21,3	3,7 ± 2,1
2j 1000 µmol/kg	62,6 ± 17,6	5,1 ± 1,0

Dados expressos como média ± erro padrão; n= 14-15 animais por grupo.

V.1.4.2 – Teste da locomoção espontânea

O efeito da administração subcutânea de **2c**, **2j**, dipirona, salicilamida sobre a atividade locomotora espontânea foi avaliado durante 30 minutos. Os resultados, mostrados na **Tabela 3**, revelaram que somente a salicilamida causou um aumento no número de ambulações dos camundongos durante o período de observação.

TABELA 3 – Efeito dos 5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-pirazóis **2c**, **2j**, salicilamida e dipirona na atividade locomotora espontânea de camundongos.

Tratamento	Número de cruzamentos	N
Veículo	146,1 ± 24,7	10
2c 1000 µmol/kg	165,6 ± 30,5	8
Veículo	115,5 ± 10,0	14
2j 1000 µmol/kg	167,3 ± 31,2	9
Veículo	45,6 ± 7,2	9
Salicilamida 1500 µmol/kg	102,1 ± 26,4 *	7
Veículo	114,3 ± 22,8	6
Dipirona 1000 µmol/kg	87,7 ± 29,2	7

Dados expressos como média ± erro padrão; N = número de animais em cada grupo; * p < 0,05 comparado com o respectivo veículo.

VI.1.5 – Avaliação do efeito agudo dos derivados pirazolínicos **2c** e **2j** na alodínia mecânica e no edema de pata induzidos por CFA e na atividade locomotora espontânea em ratos

Na **Figura 7** pode-se observar que a administração intraplantar de CFA (150 µl, 1 mg/ml) produziu um decréscimo significativo no limiar de resposta dos animais ao estímulo mecânico. Antes da injeção de CFA os animais apresentavam um limiar 50% de resposta em torno de 14 g (basal) e esse limiar caiu para cerca de 4,0 g 48-72 h após o CFA, caracterizando o desenvolvimento de alodínia. A **Figura 7** mostra o decurso temporal do efeito da administração subcutânea de **2c**, **2j**, dipirona ou veículo em ratos que desenvolveram alodínia mecânica. O pirazolínico **2c** causou um aumento do limiar de resposta, de 30 min até 12 h após sua administração, quando comparado com os animais tratados com veículo. Uma hora depois da injeção **2c** produziu seu efeito máximo, causando um aumento de $70,8 \pm 8,1$ % no limiar de resposta mecânica. O composto **2j** apresentou o mesmo decurso temporal que o composto **2c**. Porém, o efeito máximo do composto **2j** foi mais tardio, isto é, apresentado um efeito máximo 4 h após a administração ($85,6 \pm 12,2$ %). A dipirona, incluída como controle positivo, também causou efeito anti-alodínico de 30 min até 12 h após a injeção. Entretanto, o efeito máximo do tratamento com dipirona só ocorreu após 6 h ($72,7 \pm 9,5$ %). Vinte e quatro horas após o tratamento dos ratos com **2c**, **2j** ou dipirona, o limiar de resposta ao estímulo mecânico retornou aos valores basais em todos os grupos, não diferindo dos animais tratados com veículo. Os animais que receberam salina intraplantar e que foram tratados subcutaneamente com veículo não apresentaram alterações significativas no limiar ao longo do período de observação.

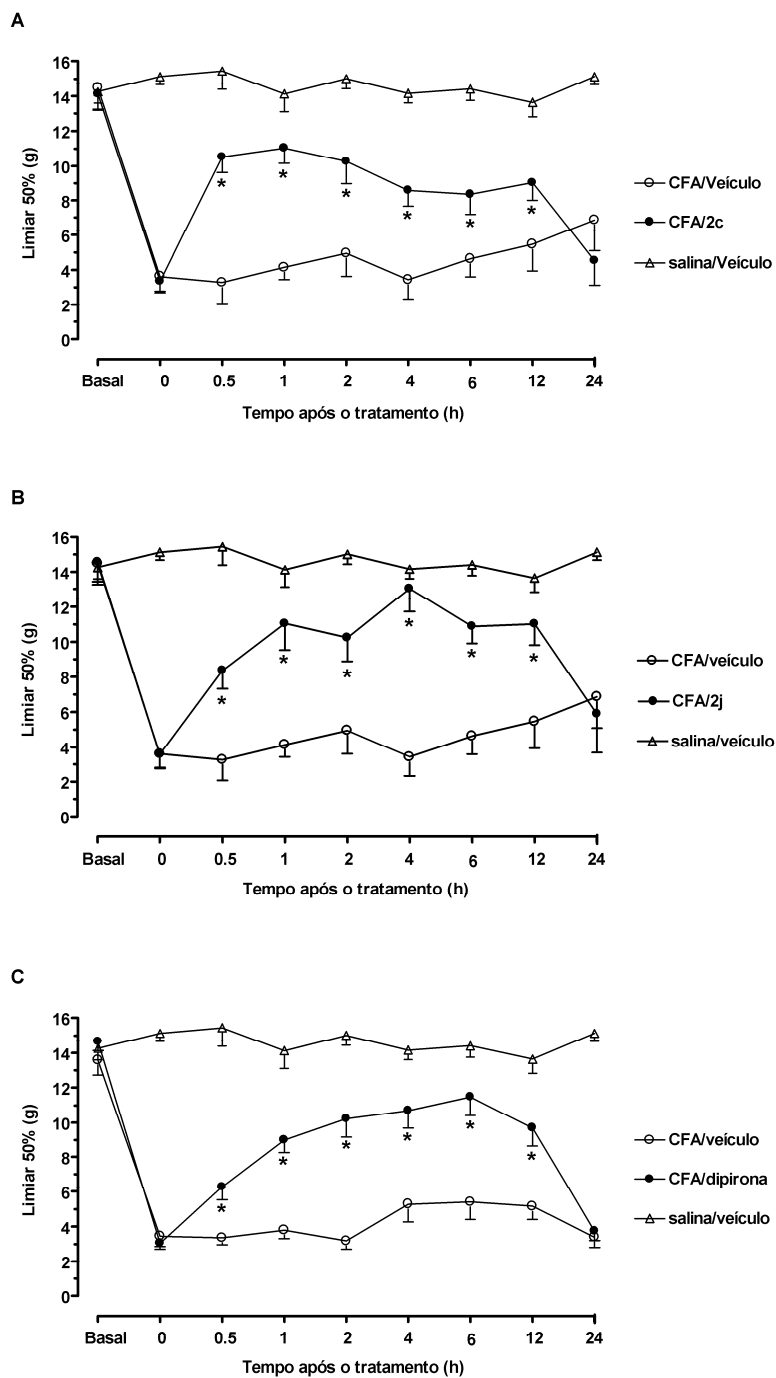


FIGURA 7 – Efeito da administração aguda dos derivados pirazolínicos **2c** (figura A), **2j** (figura B) e dipirona (figura C) na dose de 1000 $\mu\text{mol/kg}$ ou veículo na alodínia induzida por injeção intraplantar de CFA ao longo de 24 h. Um grupo injetado com salina na pata e tratado com veículo foi utilizado com controle. Dados expressos como média \pm erro padrão; n = 9-14 por grupo; * p < 0,05 comparado com o grupo CFA/veículo.

Nesse mesmo grupo de animais foi avaliado o volume da pata traseira direita, a fim de verificar o desenvolvimento de edema pela injeção intraplantar de CFA. De fato, os animais que receberam CFA, mas não aqueles que receberam salina intraplantar, apresentaram edema da pata ipsilateral. O tratamento subcutâneo com **2c**, **2j** ou dipirona não foi capaz de reverter o edema induzido por CFA (**Figura 8**).

Em outro grupo de animais foi investigada a relação dose-efeito dos compostos **2c**, **2j** e dipirona (1-1000 $\mu\text{mol/kg}$) sobre a alodínia induzida por CFA (**Figura 9**). Os compostos **2c** e **2j**, assim como a dipirona, foram eficazes contra a alodínia a partir de 10 $\mu\text{mol/kg}$, como pode ser verificado pelo aumento no limiar de resposta dos animais tratados com as drogas, em relação aos animais controle que receberam veículo. Os derivados pirazolínicos **2c**, **2j** e a dipirona apresentaram potência similar, com DE_{50} de 11,3 (1,94-65,9), 9,93 (0,86-114,2) e 10,78 (2,62-44,4) $\mu\text{mol/kg}$, respectivamente. Entretanto, o composto **2c** apresentou maior eficácia que os demais, revertendo completamente a alodínia, na maior dose testada.

Os animais tratados com a dose de 1000 $\mu\text{mol/kg}$ de **2c**, **2j** e dipirona e os tratados com veículo, foram avaliados no campo aberto, imediatamente após a avaliação da alodínia induzida por CFA. Nesse teste, foi quantificado o número de cruzamentos realizados pelos animais. A análise estatística não demonstrou qualquer efeito dos tratamentos sobre a locomoção espontânea (**Tabela 4**).

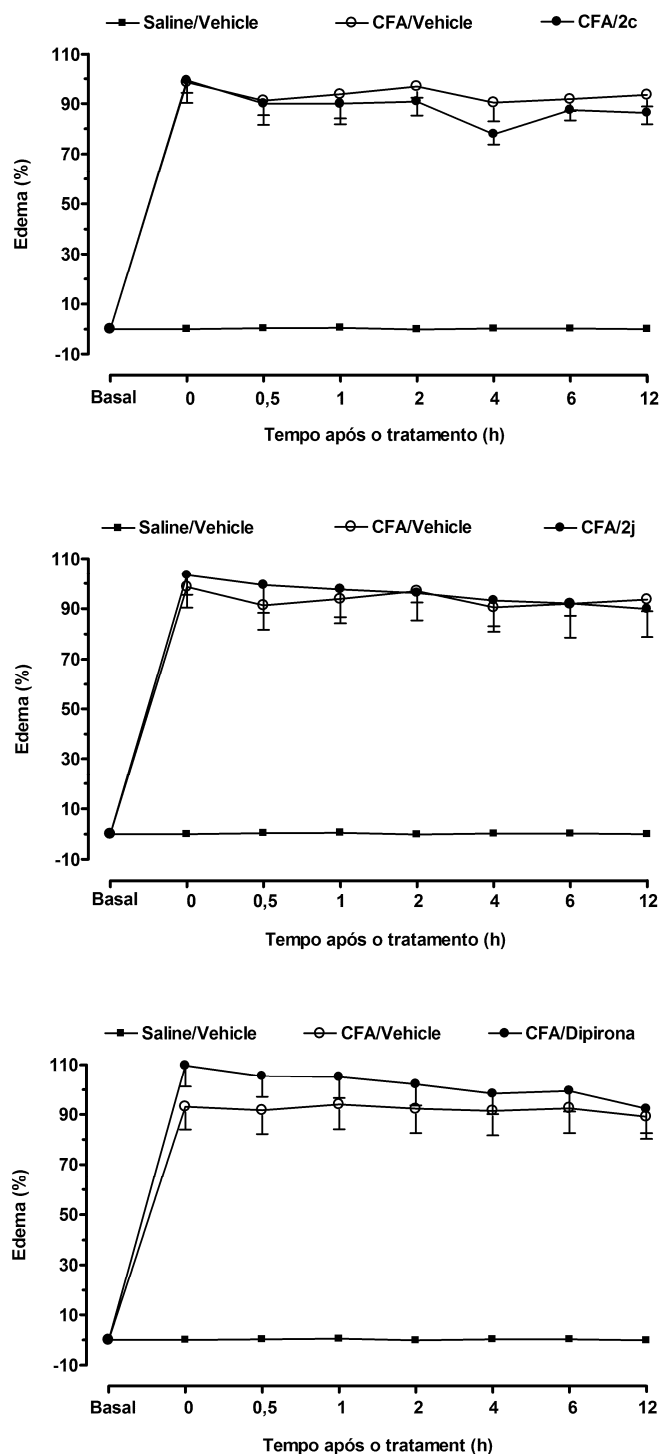


FIGURA 8 – Efeito da administração aguda dos derivados pirazolínicos **2c** (figura A), **2j** (figura B) e dipirona (figura C) na dose de 1000 $\mu\text{mol/kg}$, sobre o edema induzido por injeção intraplantar de CFA. Dados expressos como média \pm erro padrão; $n=7-11$ por grupo.

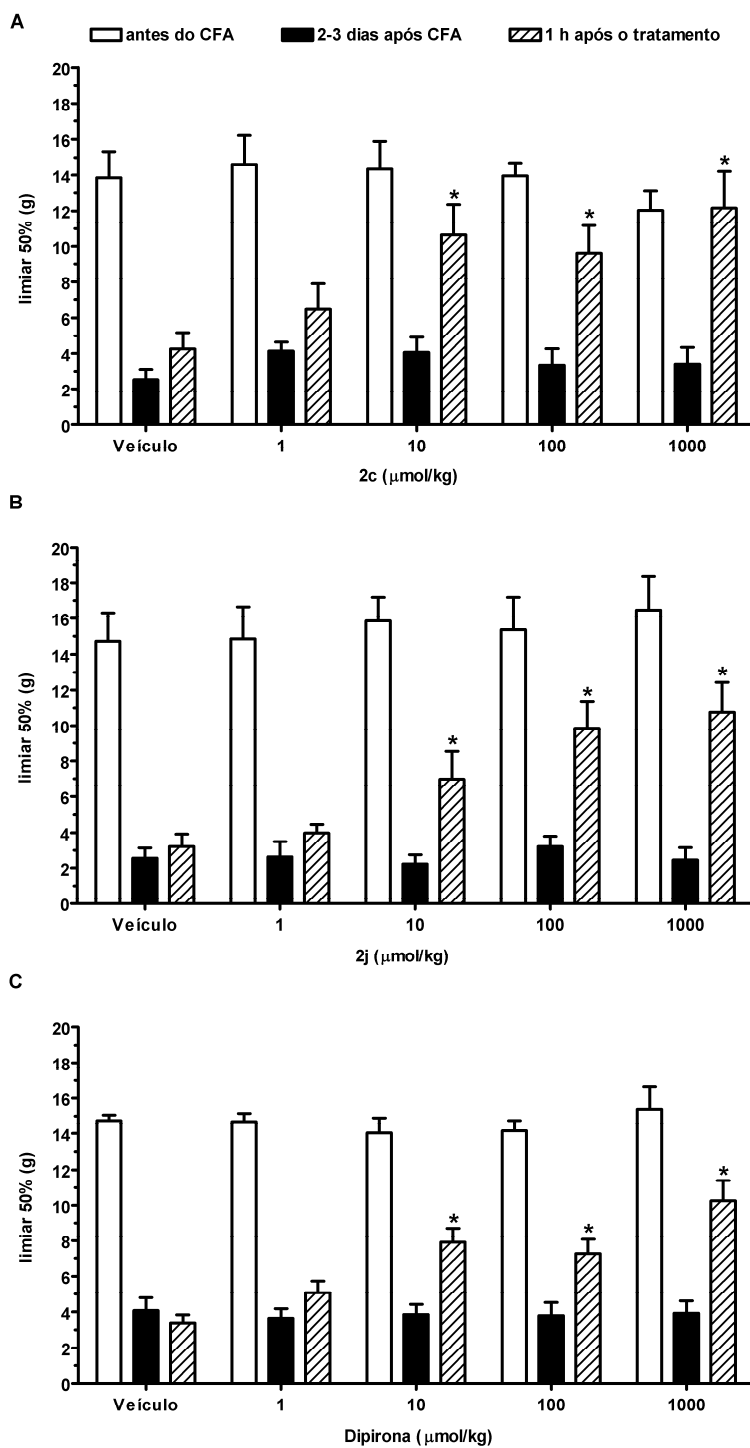


FIGURA 9 – Curva dose-efeito dos derivados pirazolínicos **2c** (figura A), **2j** (figura B) e dipirona (figura C) na alodínia induzida por injeção intraplantar de CFA. Dados expressos como média \pm erro padrão; $n = 7-11$ por grupo; * $p < 0,05$ comparado com o veículo.

TABELA 4 – Efeito dos 5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-pirazóis **2c**, **2j**, e dipirona na atividade locomotora espontânea de ratos.

Tratamento	Número de cruzamentos	N
CFA/Veículo	31,1 ± 3,8	16
CFA/ 2c 1000 µmol/kg	30,1 ± 8,6	10
CFA/ 2j 1000 µmol/kg	33,6 ± 6,0	11
CFA/Dipirona 1000 µmol/kg	30,0 ± 5,2	8

Dados expressos como média ± erro padrão; N = número de animais por grupo

V.1.6 – Avaliação do efeito da administração crônica dos derivados pirazolínicos **2c**, **2j** ou dipirona na alodínia mecânica e no edema de pata induzidos por CFA em ratos

A administração intraplantar de CFA produziu uma significativa e duradoura diminuição do limiar de resposta ao estímulo mecânico no teste com filamentos de von Frey. Na **Figura 10** está mostrado o efeito cumulativo de doses diárias de **2c**, **2j** e dipirona sobre a alodínia tátil, durante 15 dias de observação. Os valores do dia 1 correspondem ao limiar imediatamente antes do início do tratamento e os valores dos dias 2, 3, 6, 9, 12 e 15 são os limiares 24 h após a injeção subcutânea das drogas. É possível observar que no 3º dia de tratamento todas as drogas produziram um efeito anti-alodínico estável. A partir de então, a alodínia foi avaliada a cada 3 dias apenas. Os compostos **2c** e **2j** causaram diminuição da alodínia desde o dia 3 até o final das observações experimentais (dia 15). Entretanto, a dipirona, na mesma dose já apresentou efeito a partir do dia 2, permanecendo eficaz até o dia 15. É interessante ressaltar que nenhum dos tratamentos foi capaz de elevar o limiar de resposta aos níveis basais, ou seja, aqueles apresentados antes da administração de CFA intraplantar. Os gráficos do lado direito da **Figura 10** (D-F) representam os limiares de resposta dos animais tratados com **2c**, **2j** ou dipirona 1 h após a injeção subcutânea das drogas. Pode-se observar que todos os tratamentos produziram efeito anti-alodínico em todos os tempos observados. É interessante verificar que até o dia 3 o efeito parece ser mais pronunciado, sendo menor nos dias seguintes. Além disso, praticamente não se observou um incremento no efeito antinociceptivo

quando se compara o efeito cumulativo dos tratamentos (figuras à direita, A-C) como o efeito adicional de cada dose diária, 1 h após receber tal dose (figuras à esquerda).

A **Figura 11** mostra os valores de limiar de resposta da pata contralateral dos animais que receberam injeção intraplantar de CFA na pata direita e dos animais controle que receberam salina intraplantar, bem como dos animais que receberam tratamento com **2c**, **2j**, dipirona ou veículo após CFA. Como pode ser visto, os limiares da pata esquerda não foram afetados pela injeção de CFA na pata direita. Apenas no 15º dia de observação (17-18 dias após CFA), apareceu uma tendência de diminuição do limiar na pata esquerda dos animais que receberam CFA intraplantar e tratamento subcutâneo com veículo. Essa tendência não foi observada nos animais que receberam tratamento com **2c**, **2j** ou dipirona. Entretanto, esses resultados não apresentaram significância estatística.

O edema de pata decorrente da administração de CFA também foi avaliado nesses mesmos animais em que se avaliou a presença de alodínia. Foi observado que a injeção de CFA na pata traseira direita dos ratos produziu aumento significativo do volume da pata em comparação com os animais que receberam salina intraplantar (**Figura 12**). Esse aumento de volume representa o edema produzido pela inflamação causada pelo CFA e foi verificado apenas na pata injetada com CFA (**Figura 12 versus Tabela 5**). O efeito do tratamento com **2c**, **2j** ou dipirona foi avaliado imediatamente antes da dose diária e 1 h depois da injeção. Em nenhuma das duas situações, esse tratamento causou qualquer alteração no edema da pata dos ratos (**Figura 12**).

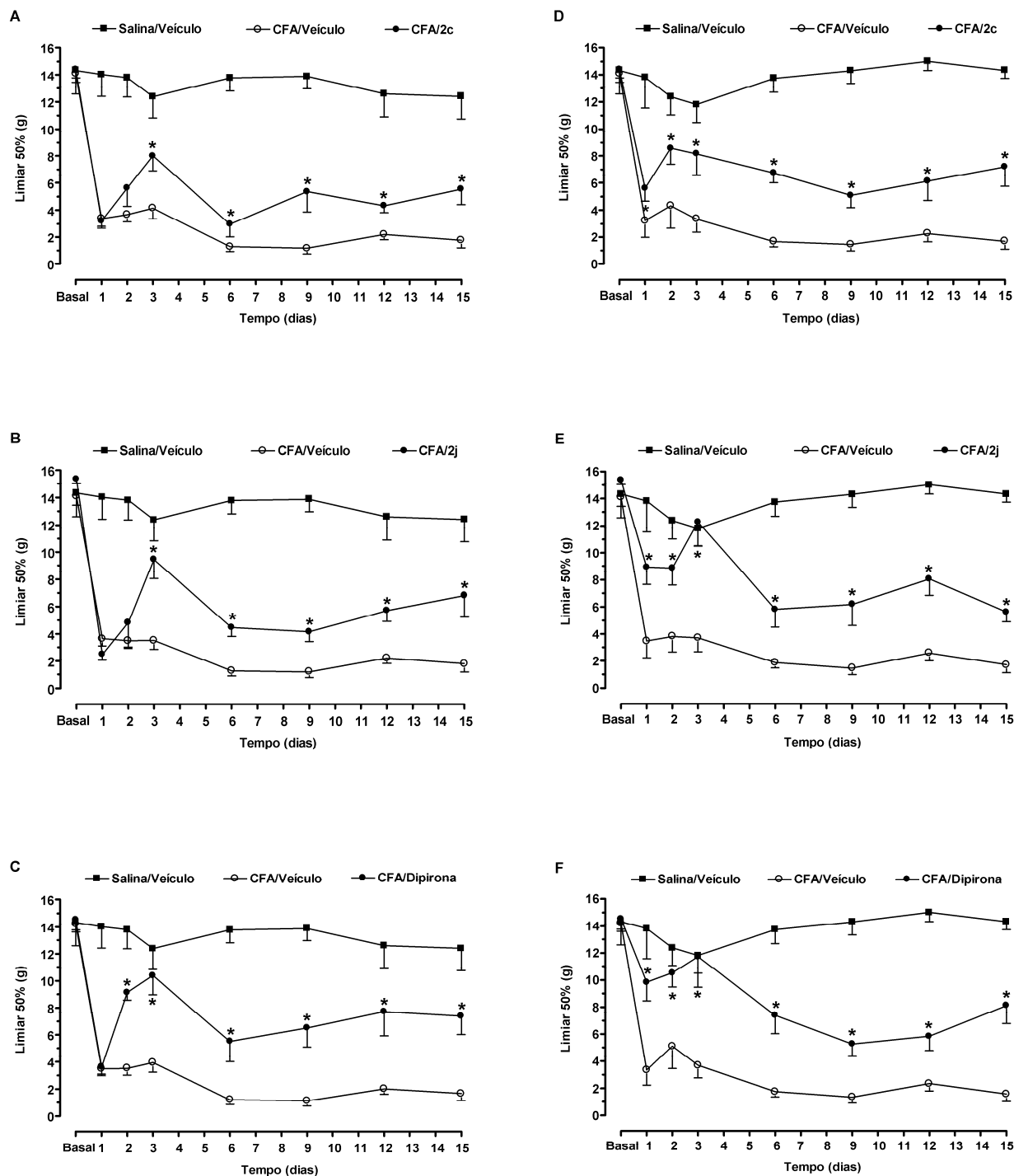


FIGURA 10 – Efeito da administração crônica dos pirazolínicos **2c** (100 $\mu\text{mol/kg}$), **2j** (100 $\mu\text{mol/kg}$) e dipirona (100 $\mu\text{mol/kg}$) na alodínia induzida por injeção intraplantar de CFA na pata ipsilateral. Os gráficos da esquerda (A, B e C) representam os limiares antes da administração das drogas e os da direita (D, E e F) 1 h após o tratamento. Dados expressos como média \pm erro padrão; $n = 7-9$ por grupo; * $p < 0,05$ comparado com o grupo CFA/veículo.

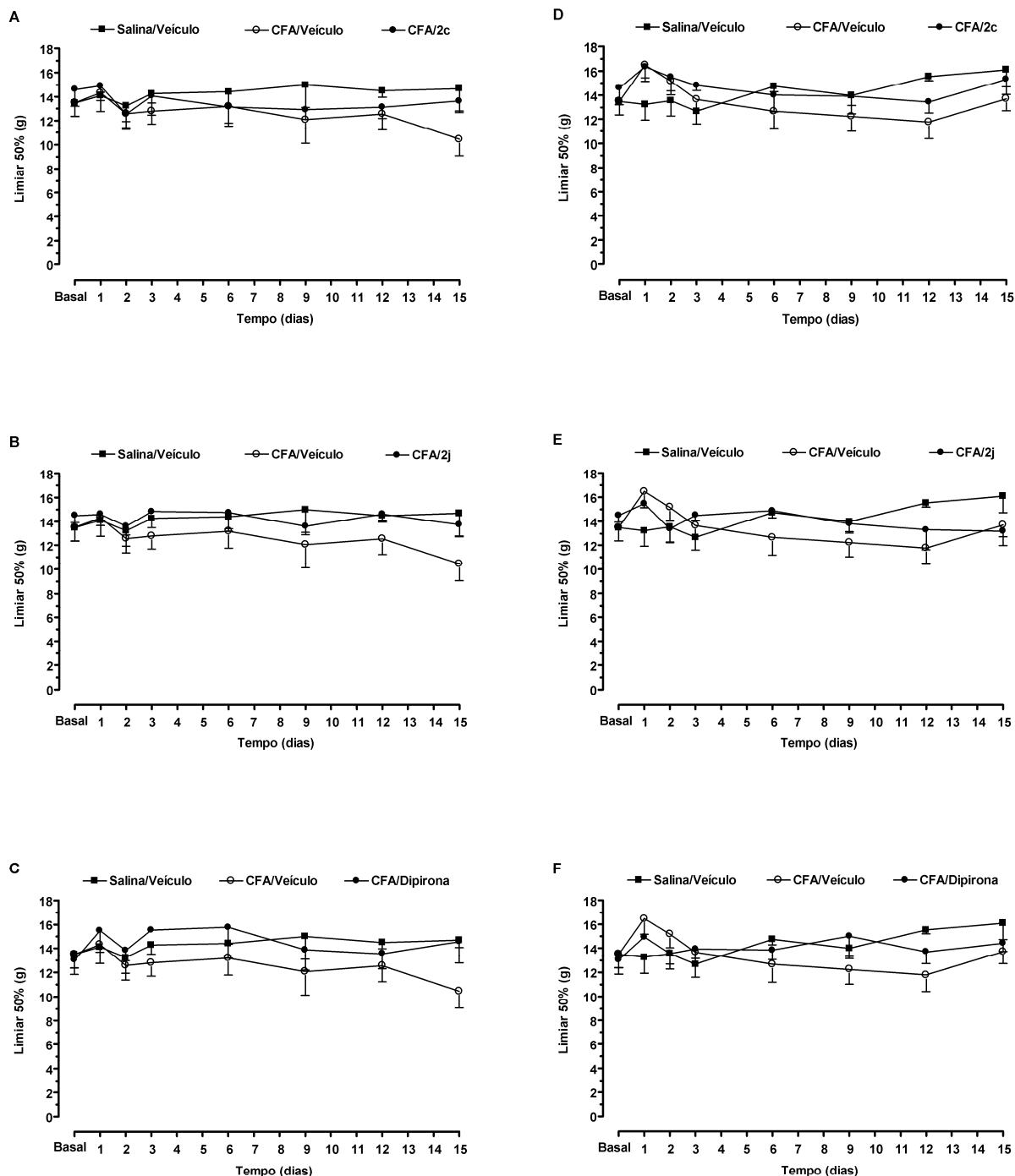


FIGURA 11 – Efeito da administração crônica dos pirazolônicos **2c** (100 μ mol/kg), **2j** (100 μ mol/kg) e dipirona (100 μ mol/kg) na alodínia induzida por injeção intraplantar de CFA na pata contralateral. Os gráficos da esquerda (A, B e C) representam os limiares antes da administração das drogas e os da direita (D, E e F) 1 h após o tratamento. Dados expressos como média \pm erro padrão; n = 7-9 por grupo; * p < 0,05 comparado com o grupo CFA/veículo.

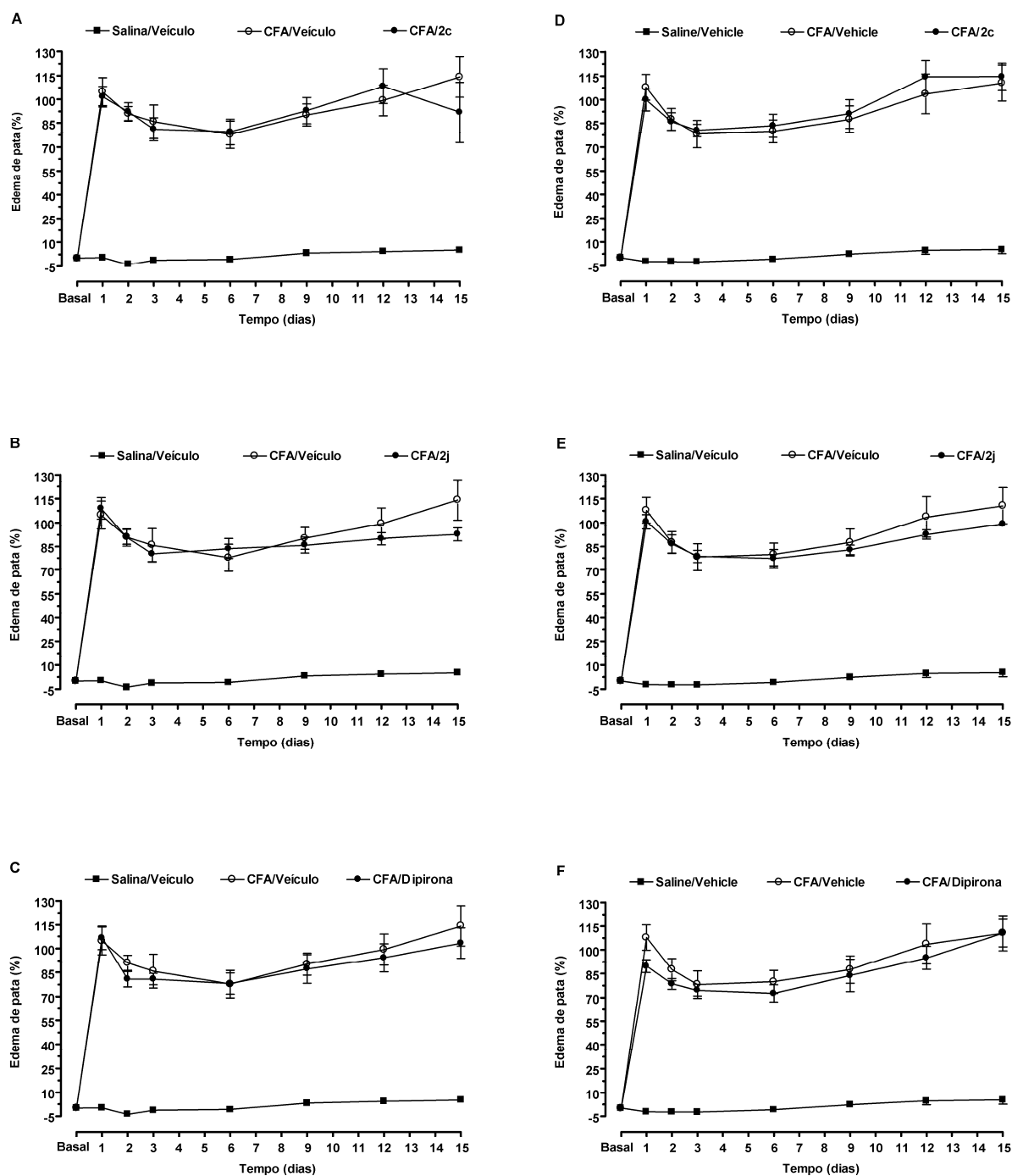


FIGURA 12 – Efeito da administração crônica dos pirazolínicos **2c** (100 $\mu\text{mol/kg}$), **2j** (100 $\mu\text{mol/kg}$) e dipirona (100 $\mu\text{mol/kg}$) no edema de pata produzido por injeção intraplantar de CFA na pata isplateral. Os gráficos da esquerda (A, B e C) representam os limiares antes da administração das drogas e os da direita (D, E e F) 1 h após o tratamento. Dados expressos como média \pm erro padrão; n = 5-6 por grupo.

TABELA 5 – Variação percentual do volume da pata contralateral à pata injetada com CFA ou salina.

	Tratamento				
	Salina/Veículo	CFA/Veículo	CFA/2c	CFA/2j	CFA/Dipirona
Dia 1	-1,36 ± 2,02	-2,82 ± 1,51	-1,33 ± 2,62	-2,89 ± 1,40	-1,44 ± 1,36
Dia 2	-2,65 ± 0,86	-2,01 ± 1,56	-4,59 ± 1,22	-1,62 ± 0,77	-0,52 ± 2,10
Dia 3	-1,11 ± 2,49	-2,12 ± 1,58	-1,17 ± 1,47	-2,66 ± 0,95	1,25 ± 1,89
Dia 6	-1,19 ± 1,72	3,43 ± 1,00	0,32 ± 2,36	0,78 ± 2,27	2,32 ± 1,92
Dia 9	4,03 ± 2,79	3,71 ± 0,87	2,40 ± 1,49	4,56 ± 2,40	5,66 ± 2,30
Dia 12	3,80 ± 1,63	4,28 ± 0,78	9,09 ± 6,38	5,04 ± 1,38	7,24 ± 1,47
Dia 15	6,40 ± 1,85	4,68 ± 1,67	3,78 ± 1,98	11,80 ± 7,77	6,76 ± 1,85

Dados expressos como média ± erro padrão; percentagens calculadas em relação ao volume basal antes da injeção de CFA ou salina; n = 5-6 animais por grupo.

V.1.7 – Avaliação da variação do peso corporal ao longo do tratamento crônico com os derivados pirazolínicos 2c, 2j ou dipirona

O peso corporal dos animais foi avaliado antes da injeção de CFA ou salina intraplantar e foi monitorado ao longo do tratamento subcutâneo com 2c, 2j, dipirona ou veículo. Na **Tabela 6** nota-se que nos primeiros 2 dias de tratamento, os animais que receberam CFA na pata, apresentaram uma menor percentagem de ganho de peso em relação aos animais que receberam injeção de salina na pata. Entretanto, os animais tratados com 2c, 2j ou dipirona não apresentaram diferenças entre si nem em relação aos tratados com veículo. A partir do 3º dia de avaliação experimental, não foram verificadas diferenças no ganho de peso nem em relação à injeção intraplantar de salina ou CFA, nem em relação ao tratamento subcutâneo crônico com os novos pirazolínicos, dipirona ou veículo.

TABELA 6 – Efeito da administração crônica dos derivados pirazolínicos **2c**, **2j** e dipirona (100 µmol/kg) em ratos com inflamação crônica induzida por CFA, sobre a percentagem de variação do peso corporal em relação ao peso inicial (antes da injeção de CFA).

	Salina/ veículo	CFA/ veículo	CFA/ 2c	CFA/ 2j	CFA/ dipirona
Dia 1	4,00 ± 0,88	-2,94 ± 0,85*	-1,84 ± 1,21*	-2,92 ± 0,93*	-0,43 ± 0,94*
Dia 2	7,64 ± 1,78	0,50 ± 1,12*	1,34 ± 1,15*	1,57 ± 1,08*	2,61 ± 1,24*
Dia 3	7,00 ± 1,50	2,78 ± 1,21	1,27 ± 1,24	0,71 ± 1,73	4,09 ± 2,07
Dia 4	9,23 ± 1,54	3,86 ± 1,67	3,62 ± 1,56	3,58 ± 1,50	5,33 ± 0,88
Dia 5	11,12 ± 0,81	4,65 ± 2,91	5,94 ± 1,53	5,40 ± 1,68	6,65 ± 0,90
Dia 6	12,99 ± 1,44	6,14 ± 3,32	7,71 ± 1,80	5,90 ± 3,21	8,30 ± 1,01
Dia 7	13,79 ± 1,95	6,84 ± 3,90	8,74 ± 1,59	9,15 ± 1,82	9,62 ± 0,92
Dia 8	17,27 ± 2,12	9,48 ± 4,33	11,68 ± 1,73	12,07 ± 1,23	11,76 ± 1,13
Dia 9	17,01 ± 2,11	10,21 ± 4,11	14,16 ± 1,79	12,62 ± 1,83	12,64 ± 1,46
Dia 10	20,92 ± 2,93	13,53 ± 4,18	16,08 ± 1,82	15,88 ± 2,02	15,49 ± 2,19
Dia 11	22,86 ± 2,50	14,50 ± 3,75	18,83 ± 2,60	17,04 ± 1,69	16,54 ± 1,59
Dia 12	22,96 ± 3,12	15,25 ± 3,95	16,46 ± 2,38	17,81 ± 2,34	17,18 ± 2,25
Dia 13	25,19 ± 2,79	16,36 ± 3,76	17,28 ± 2,70	18,54 ± 2,83	18,49 ± 2,00
Dia 14	26,43 ± 2,98	18,01 ± 3,27	17,58 ± 3,03	19,02 ± 3,34	19,90 ± 1,98
Dia 15	28,72 ± 3,13	19,57 ± 3,38	17,94 ± 3,36	21,80 ± 3,58	20,21 ± 2,97

Dados expressos como média ± erro padrão; n=5-6 por grupo; * p < 0,05 em relação ao grupo salina/veículo.

V.1.8 – Avaliação da percentagem de peso de alguns órgãos em relação ao peso corporal dos ratos ao final do tratamento crônico com os derivados pirazolínicos 2c, 2j ou dipirona

Vinte e quatro horas após a última dose dos tratamentos subcutâneos, os animais foram eutanasiados e os órgãos descritos na **Tabela 7** foram removidos e pesados. Na **Tabela 7** está mostrada a percentagem de peso dos órgãos em relação

ao peso corporal dos animais. Os tratamentos não causaram nenhuma alteração no peso fígado, baço, rim e estômago nem no aspecto geral externo dos mesmos.

TABELA 7 – Efeito da administração crônica dos derivados pirazolínicos **2c**, **2j** e dipirona, sobre a percentagem de peso de alguns órgãos em relação ao peso corporal.

	Salina/ Veículo	CFA/ veículo	CFA/ 2c	CFA/ 2j	CFA/ dipirona
Fígado	3,81 ± 0,11	3,94 ± 0,10	3,95 ± 0,11	4,03 ± 0,26	4,06 ± 0,23
Baço	0,31 ± 0,02	0,40 ± 0,04	0,39 ± 0,03	0,49 ± 0,06	0,46 ± 0,10
Rim	0,37 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,39 ± 0,03	0,39 ± 0,01	0,38 ± 0,02
Estômago	0,63 ± 0,03	0,65 ± 0,03	0,68 ± 0,02	0,67 ± 0,02	0,66 ± 0,03

Dados expressos como média ± erro padrão; n=5-6 por grupo.

V.1.9 – Avaliação da atividade ulcerogênica dos pirazolínicos 2c, 2j e da dipirona após administração crônica

Foram avaliados o índice de lesão (IL) e o número de úlceras (NU) nos ratos que receberam tratamento crônico com **2c**, **2j** e dipirona (100 µmol/kg/15 dias) ou veículo. Como mostrado na **Tabela 8**, nem os novos pirazóis nem a dipirona produziram lesão gástrica significativa. Entretanto, aqueles animais que foram tratados com uma dose de indometacina (30 mg/kg, controle positivo), apresentaram IL e NU significativamente aumentados (**Tabela 8**).

TABELA 8 – Efeito da administração crônica dos novos pirazolínicos **2c** e **2j** e da dipirona e da administração aguda de indometacina na mucosa gástrica de ratos.

	IL ^a	NU ^b	N
Salina/veículo	0,75 ± 0,25	0	4
CFA/veículo	0,71 ± 0,18	0	7
CFA/2c	1,00 ± 0,26	0,67 ± 0,67	6
CFA /2j	1,00 ± 0,36	0	6
CFA/ dipirona	1,40 ± 0,25	0,40 ± 0,40	5
Salina	0,67 ± 0,33	0	4
Indometacina	6,25 ± 0,83*	32,00 ± 7,82*	3

^a índice de lesão; ^b número de úlceras; N = número de animais por grupo; * p < 0.05 comparado com o grupo salina.

V.2 – TESTES BIOQUÍMICOS

V.2.1 – Efeito da administração crônica de **2c**, **2j** ou dipirona sobre alguns parâmetros indicativos de toxicidade renal e hepática

A **Tabela 9** mostra o efeito da administração de **2c**, **2j** e dipirona, na dose de 100 µmol/kg, uma vez ao dia, durante 15 dias sobre os níveis séricos de marcadores de lesão hepática e renal (AST e ALT, uréia e creatinina). Os resultados obtidos indicam que os ratos que receberam os derivados pirazolínicos **2c** e **2j** ou dipirona não apresentaram alterações nos níveis desses marcadores.

TABELA 9 – Efeito da administração crônica dos derivados pirazolínicos **2c**, **2j** e dipirona (100 $\mu\text{mol/kg}$) sobre marcadores de toxicidade hepática (AST e ALT) e renal (uréia e creatinina) em ratos com inflamação crônica induzida por injeção intraplantar de CFA.

	Salina/ veículo	CFA/ veículo	CFA/ 2j	CFA/ 2c	CFA/ Dipirona
AST (U/l) ^a	154,0 \pm 9,9	153,0 \pm 9,4	175,2 \pm 11,4	180,7 \pm 16,3	154,7 \pm 7,9
ALT (U/l) ^b	57,2 \pm 2,7	52,5 \pm 4,3	57,5 \pm 3,7	53,3 \pm 3,7	53,2 \pm 3,1
Uréia (mg/dl)	35,7 \pm 3,1	36,7 \pm 2,5	39,4 \pm 1,7	38,3 \pm 1,9	39,8 \pm 1,7
Creatinina (mg/dl)	0,36 \pm 0,02	0,35 \pm 0,02	0,40 \pm 0,04	0,40 \pm 0,04	0,38 \pm 0,03

^a aspartato aminotransferase; ^b alanina aminotransferase; dados expressos como média \pm erro padrão; n = 5-6 por grupo.

V.2.2 – Efeito da administração crônica de **2c**, **2j** ou dipirona sobre alguns parâmetros hematológicos

A fim de identificar alguma discrasia sanguínea produzida pela administração crônica de **2c**, **2j** ou dipirona, foram avaliados alguns parâmetros hematológicos ao final de 15 dias de tratamento subcutâneo com uma dose de 100 $\mu\text{mol/kg}$. Na **Tabela 10** estão mostrados os resultados obtidos, onde se pode verificar que tanto os novos derivados pirazolínicos **2c** e **2j** quanto a dipirona, causaram um aumento estatisticamente significativo no número de leucócitos, quando comparado com os animais que receberam veículo. O número de eritrócitos, a concentração de hemoglobina, o hematócrito, o número de plaquetas, a percentagem de linfócitos e monócitos permaneceram inalterados após o tratamento crônico com **2c**, **2j** ou dipirona.

TABELA 10 – Efeito da administração crônica dos derivados pirazolínicos **2c**, **2j** e dipirona (100 µmol/kg) sobre alguns parâmetros hematológicos de ratos no modelo da inflamação crônica induzida por injeção intraplantar de CFA.

	Salina/ veículo	CFA/ veículo	CFA/ 2c	CFA/ 2j	CFA/ dipirona
Leucócitos (x 10 ³ /mm ³)	8,18 ± 1,28	10,73 ± 0,89	16,20 ± 1,41*	15,32 ± 3,10*	14,28 ± 2,09*
Eritrócitos (x 10 ⁶ /mm ³)	7,71 ± 0,21	7,40 ± 0,15	7,73 ± 0,43	7,36 ± 0,11	7,13 ± 0,35
Hemoglobina (g/dl)	14,08 ± 0,12	13,13 ± 0,27	14,08 ± 0,76	13,60 ± 0,24	13,00 ± 0,44
Hematócrito (%)	41,78 ± 0,70	39,32 ± 0,36	41,23 ± 2,09	40,35 ± 0,76	38,85 ± 1,6
Plaquetas (x 10 ³ /mm ³)	863,00 ± 126,24	993,83 ± 121,14	1.050,67 ± 152,55	962,00 ± 118,84	1.051,33 ± 151,12
Linfócitos (%)	86,90 ± 3,88	74,40 ± 7,93	67,50 ± 8,36	72,53 ± 7,98	69,48 ± 7,82
Monócitos (%)	2,22 ± 0,47	1,88 ± 0,27	2,30 ± 0,33	2,38 ± 0,32	2,03 ± 0,69

Dados expressos como média ± erro padrão; n = 5-6 por grupo; * p < 0.05 comparado com o grupo salina/veículo

V.2.3 – Determinação dos níveis séricos de haptoglobina após a administração crônica de **2c**, **2j** ou dipirona em ratos

Ao final de 15 dias de tratamento com os compostos **2c**, **2j**, dipirona ou veículo foi dosada a quantidade da proteína de fase aguda haptoglobina dos animais que receberam injeção de CFA na pata. Um grupo de animais injetados com salina intraplantar e que foi tratado com veículo durante os 15 dias foi introduzido como controle. A injeção intraplantar de CFA produziu um aumento significativo nos níveis de haptoglobina, quando comparado aos animais que receberam salina na pata (**Figura 13**). Porém, nem o tratamento com **2c** ou **2j** nem o tratamento com dipirona foi capaz de reduzir ou impedir esse aumento de haptoglobina no soro.

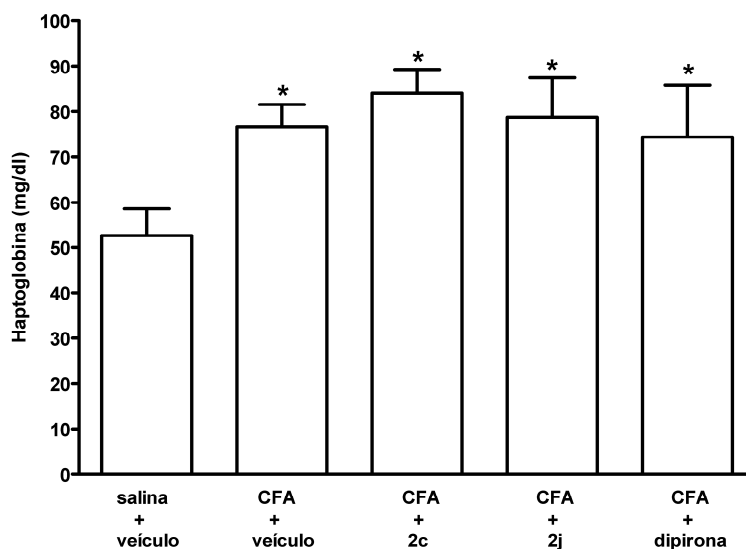


FIGURA 13 – Efeito da administração crônica dos derivados pirazolínicos **2c**, **2j** e dipirona (100 $\mu\text{mol/kg/15}$ dias) nos níveis plasmáticos de haptoglobina de ratos com inflamação crônica induzida por injeção intraplantar de CFA. Dados expressos como média \pm erro padrão; $n = 5-6$ animais por grupo; * $p < 0,05$ comparado com o grupo salina/veículo.

V.2.4 – Determinação da atividade tecidual das enzimas MPO, NAG e EPO na pata de ratos após a administração crônica de **2c**, **2j** ou dipirona

Na **Tabela 11** pode-se verificar que a administração de CFA intraplantar produziu um aumento da atividade da MPO no local da injeção, quando comparado com os animais que receberam salina intraplantar. Esse aumento foi encontrado 17-18 dias após a injeção de CFA. Os animais que receberam **2c**, **2j** ou dipirona durante 15 dias (iniciando 2-3 dias após a injeção de CFA na pata) apresentaram níveis similares de atividade da MPO em relação àqueles animais que receberam CFA/veículo.

Ao contrário do que se observou para a MPO, a administração de CFA na pata dos ratos não causou aumento da atividade da NAG e da EPO (**Tabela 11**).

Tabela 11 – Efeito da administração crônica dos novos pirazóis **2c** e **2j** e da dipirona (100 µmol/kg) na atividade da MPO, NAG e EPO do tecido da pata de ratos com inflamação crônica induzida por adjuvante completo de Freund.

	MPO^a	NAG^b	EPO^c
	(absorbância/ mg proteína)	(absorbância/ mg proteína)	(absorbância/ mg proteína)
Salina/veículo	0,02 ± 0,03	0,14 ± 0,13	0,14 ± 0,07
CFA/ veículo	0,40 ± 0,21*	0,14 ± 0,08	0,42 ± 0,14
CFA/2c	0,61 ± 0,24*	0,16 ± 0,12	0,45 ± 0,10
CFA /2j	0,43 ± 0,13*	0,15 ± 0,08	0,51 ± 0,19
CFA/dipirona	0,23 ± 0,05*	0,11 ± 0,04	0,32 ± 0,12

^a mieloperoxidase; ^b N-acetil-β-D-glucosaminidase; ^c peroxidase de eosinófilos; dados mostrados como média ± SEM. * p < 0,05 comparado ao grupo salina/veículo.

V.2.5 – Determinação dos níveis teciduais de TNF-α na pata de ratos após a administração crônica de **2c**, **2j** ou dipirona

A injeção de CFA na pata dos ratos induziu um aumento no nível tecidual de TNF-α, que foi significativamente maior que os níveis presentes no tecido da pata dos animais que receberam salina intraplantar. Esse aumento do TNF- α não foi revertido pelo tratamento crônico dos animais com **2c**, **2j** ou dipirona (**Figura 14**).

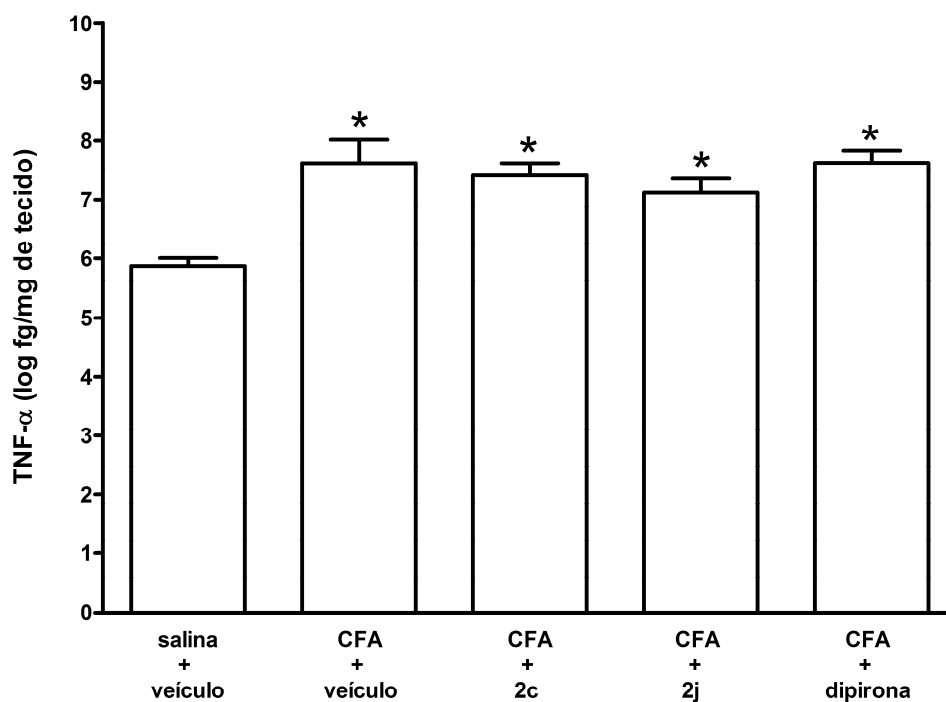


FIGURA 14 – Efeito da administração crônica dos derivados pirazolínicos **2c**, **2j** e dipirona (100 $\mu\text{mol/kg}$ /15 dias) nos níveis teciduais de TNF- α de ratos com inflamação crônica induzida por injeção intraplantar de CFA. Dados expressos como média \pm erro padrão; n = 3-5 animais por grupo; * p < 0,05 comparado com o grupo salina/veículo.

VI. DISCUSSÃO

No presente trabalho, os efeitos de uma nova série de derivados 5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboxiamida (**2a-j**) foram demonstrados em modelos de nocicepção e inflamação aguda e crônica, em camundongos e ratos. Inicialmente, os efeitos dos 10 compostos que fazem parte desta série foram avaliados nas fases neurogênica e inflamatória do teste da formalina em camundongos. Foi, então, verificado que apenas o derivado pirazólico **2h**, o qual possui um grupamento fenil como substituinte na posição 3 do anel pirazol, foi ineficaz nesse teste. Os demais compostos apresentaram efeito em uma ou em ambas as fases do teste. O composto **2a** possui apenas átomos de hidrogênio nas posições 3 e 4 do anel pirazol e causou efeito antinociceptivo tanto na fase neurogênica quanto na fase inflamatória. Entretanto, quando um grupamento metil foi adicionado na posição 3 do anel pirazol (composto **2b**), o efeito na fase neurogênica não foi mais encontrado. Por outro lado, quando esse grupamento metila foi transferido da posição 3 para a posição 4 do anel pirazol (composto **2j**), o efeito antinociceptivo em ambas as fases do teste foi melhorado significativamente. O composto **2c** (etil substituído na posição 3 do anel pirazol) também foi bastante eficaz em ambas as fases do teste. Já o derivados propil e isopropil substituídos na posição 3 do anel pirazol (**2d** e **2e**, respectivamente), além de apresentarem ação nas fases neurogênica e inflamatória, também produziram curvas dose-resposta com um perfil diferente dos demais compostos. Ou seja, no caso do composto **2d**, doses de 75 e 750 µmol/kg foram efetivas no combate à nocicepção na fase inflamatória, mas a dose intermediária de 250 µmol/kg não produziu qualquer efeito. O composto **2e** apresentou um perfil ainda mais surpreendente, visto que a menor dose (25 µmol/kg) foi a mais eficaz, tanto na fase neurogênica quanto na fase inflamatória. Até o momento, o que se conhece a respeito dessas moléculas não permite uma explicação clara desse perfil dose-resposta atípico. É possível que estudos posteriores que venham a elucidar características farmacocinéticas e o(s) mecanismo(s) de ação desses compostos, possam esclarecer esse ponto.

Outra observação interessante foi à diferença de efeito do composto **2b** e seu análogo MPCA (3-metil-5-hidróxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1*H*-1-carboxiamidapirazol), cujas ações já foram descritas na literatura (SOUZA *et al.*, 2001). Diferente do composto **2b**, o MPCA é ativo contra a dor neurogênica, em doses semelhantes e no mesmo teste utilizado no presente trabalho. Entretanto, o composto **2b** foi mais

eficaz na redução da nocicepção na fase inflamatória do que o MPCA. Assim, a troca de um grupamento triclorometil da posição 5 do anel pirazol por um grupamento trifluormetil parece melhorar o efeito antinociceptivo na fase inflamatória, enquanto abole o efeito na fase neurogênica. O composto **2h** é estruturalmente similar ao FPCA (3-fenil-5-hidróxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1H-1-carboxiamidapirazol), sendo que ambos diferem apenas em relação ao substituinte da posição 5 do anel pirazol. Trabalhos anteriores relatam a ação antinociceptiva e antipirética do FPCA (SOUZA *et al.*, 2002; GODOY *et al.*, 2004). Já o pirazolínico **2h** aqui estudado, não produziu efeito antinociceptivo, sugerindo que a substituição de triclorometil por trifluormetil de alguma maneira torna essa molécula inativa. Há que se considerar, ainda, que FPCA e **2h** foram avaliados em diferentes modelos de nocicepção, o que torna a comparação de seus efeitos menos precisa do que se tivessem sido avaliados em condições idênticas. Uma possível explicação para essa diferença de efeitos dos compostos possuindo cloro ou flúor em sua estrutura pode estar relacionada ao tamanho e eletronegatividade desses átomos. Enquanto o cloro possui um raio de 1,81 Å (WATSON & MOKLER, 1987), o flúor tem um raio de 1,47 Å (KEVIN & KITTERINGHAN, 2001). Além disso, o cloro é menos eletronegativo do que o flúor. Essas características podem causar efeitos estéricos e conferir às moléculas contendo cloro ou flúor diferentes propriedades de ligação a seu sítio de ligação. Entretanto, como até o momento não se conhece o mecanismo de ação dessas drogas, essas conclusões são meramente especulativas. Alguns possíveis mecanismos de ação, tais como as vias opioidérgicas, serotoninérgicas, noradrenérgicas e glutamatérgicas, já foram investigados. Os resultados apontam para o não envolvimento de receptores opióides, α 2-adrenérgicos e do “pool” endógeno de serotonina. Indícios sugerem uma participação da via glutamatérgica, mas esse estudo está em andamento, não sendo conclusivo até o momento (dados não publicados).

Após ter sido feita essa avaliação preliminar de todos os compostos da série de derivados 5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-carboxiamida no teste da formalina, foi calculada a eficácia dos mesmos, na maior dose administrada, a fim de selecionar o melhor composto. Analisando os dados de eficácia nas duas fases do teste da formalina, verificou-se que os derivados pirazolínicos **2c** e **2j** apresentaram efeito extremamente similar, principalmente na fase inflamatória, onde ambos

praticamente aboliram a resposta nociceptiva. Em resumo, para essa série de compostos, parece que a presença de metil na posição 4 ou etil na posição 3 do anel pirazol parecem conferir melhor eficácia antinociceptiva. Por esse motivo, **2c** e **2j** foram escolhidos para os demais estudos realizados.

Os efeitos dos compostos **2c** e **2j** foram comparados aos efeitos da dipirona e da salicilamida no teste da formalina. A comparação com dipirona foi feita devido a essa droga também pertencer à classe dos derivados pirazolínicos e também devido ao seu amplo emprego na clínica médica como analgésico e antitérmico. Já a comparação com salicilamida teve por objetivo esclarecer as propriedades conferidas às novas moléculas pela substituição bioisostérica do benzeno da salicilamida pelo 5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-pirazol nos novos compostos. De fato, essa substituição melhorou a atividade dos novos derivados pirazolínicos, uma vez que os compostos **2c** e **2j** produziram maiores percentagens de antinocicepção, sendo estatisticamente maiores que aquela induzida pela salicilamida. Outro dado interessante foi que a dose de **2c** e **2j** para produzir significativa antinocicepção menor que a de salicilamida, a qual foi ativa apenas a partir da dose de 1500 $\mu\text{mol/kg}$. Em experimentos piloto, ela foi testada na mesma dose de **2c** e **2j** (1000 $\mu\text{mol/kg}$), porém não apresentou nenhum efeito. É possível, sem dúvida, que doses maiores que 1500 $\mu\text{mol/kg}$ possuam eficácia similar ou até melhor que **2c** e **2j**. Entretanto, isso não foi testado em virtude da baixa solubilidade da salicilamida que não permitiu administrar doses maiores. De qualquer forma, pode-se supor que os compostos **2c** e **2j** apresentam maior potência que a salicilamida. Em relação à dipirona, parece que as substituições, presentes no anel pirazol, nos compostos **2c** e **2j** também tornaram esses compostos significativamente mais eficazes que a dipirona. Isso foi verificado tanto na fase neurogênica quanto na fase inflamatória do teste da formalina.

Uma característica interessante dessa série de derivados pirazolínicos é que, de forma similar à dipirona, mas diferente da maioria dos AINEs, alguns compostos apresentaram efeito na fase neurogênica do teste da formalina. Isso pode sugerir que o mecanismo pelo qual eles exercem sua ação pode ser, pelo menos em parte, diferente daquele dos AINEs clássicos. Esse efeito na nocicepção neurogênica é interessante, uma vez que se sabe que a dor de origem neurogênica não é aliviada com boa eficácia pelos analgésicos convencionais, o que pode dificultar o

tratamento de pacientes que sofrem desse tipo de dor (DAVIS *et al.*, 1994; NIV & DEVOR, 2006).

Os compostos **2c** e **2j** foram avaliados em sua capacidade de inibir a nocicepção induzida por estímulo térmico, no teste da placa quente. Nesse modelo, tais compostos mostraram-se inativos, enquanto a dipirona, incluída como controle positivo, produziu antinocicepção. Existem controvérsias na literatura a respeito da utilidade de testes térmicos para avaliação de analgésicos fracos, como os AINEs. Alguns autores consideram que os AINEs, assim como a dipirona, não são eficazes em teste nocivos térmicos (AKMAN *et al.*, 1996; TAYLOR *et al.*, 1998). Por outro lado, outros autores têm mostrado que a dipirona causa antinocicepção em modelos de estimulação térmica (CARLSSON *et al.*, 1986; CARLSSON & JURNA, 1987; TORTORICI & VANEGAS, 1994; HERNÁNDEZ-DELGADILLO *et al.*, 2003). Essas discrepâncias na literatura podem ser decorrentes das diferenças na intensidade do estímulo empregada em cada trabalho. Quando a intensidade do estímulo está ao redor de 50°C, o efeito de analgésicos fracos pode ser detectado (NISHIYAMA & HANAOKA, 1974; ANKIER, 1974; HUNSKAAR *et al.*, 1986). No presente estudo, as divergências de efeito entre dipirona e os novos compostos testado pode ter ocorrido devido às diferentes doses empregadas para **2c** e **2j** (1000 µmol/kg) e para dipirona (1500 µmol/kg). Entretanto, doses maiores de **2c** e **2j** não foram possíveis em função de sua solubilidade no veículo empregado. Além disso, os derivados pirazolínicos tricloro substituídos FPCA e MPCA, os quais têm estrutura química bastante similar a de **2c** e **2j**, e que foram avaliados em doses semelhantes as aqui empregadas, também não apresentam atividade antinociceptiva no modelo da placa quente (SOUZA *et al.*, 2001). Portanto, é possível que compostos 5-trialometil-4,5-diidro-1H-pirazol-1-carboxiamida sejam, realmente, inativos contra a nocicepção térmica.

Os novos derivados pirazolínicos **2c** e **2j** foram, também, testados no modelo do edema de pata e da alodínia induzidos por carragenina, um modelo experimental amplamente utilizado para avaliar efeito de drogas na inflamação aguda em animais (WINTER *et al.*, 1962). A inflamação produzida por carragenina é caracteristicamente bifásica (WINTER *et al.*, 1962). Alguns trabalhos sugerem que a primeira fase (até 1 h após a injeção de carragenina) envolve a liberação de histamina, serotonina e bradicinina (Di ROSA & WILLOUGHBY, 1971, SALVEMINI *et al.*, 1996). Já a

segunda fase ou fase tardia, que ocorre após 1 h da administração de carragenina, parece ser relacionada a outros mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas (DI ROSA & WILLOUGHBY, 1971, SALVEMINI *et al.*, 1996). Baseado nesses pressupostos, uma inibição na segunda fase poderia estar relacionada à inibição da ciclooxigenase (SALVEMINI *et al.*, 1996). Nossos resultados demonstraram que os compostos **2c** e **2j** foram ativos contra o edema de pata induzido por carragenina apenas na fase mais tardia do teste, implicando numa possível ação antiinflamatória para esses compostos. Além disso, não houve diferença de efeito entre os dois compostos, sugerindo que a presença de metil na posição 4 ou etil na posição 3 do anel pirazol não alteram a eficácia anti edematogênica dessas drogas. É interessante ressaltar que o MPCA, composto análogo ao **2c** e ao **2j**, foi ineficaz contra o edema de pata produzido por carragenina em ratos (SOUZA *et al.*, 2001). Isso pode indicar que a substituição de cloro por flúor pode ter conferido aos compostos **2c** e **2j** propriedades antiinflamatórias que não estavam presentes no MPCA. Outra hipótese plausível para essa diferença de efeitos é que a presença de CF₃ (grupo trifluormetil) torna os compostos metabolicamente mais estáveis em comparação com aqueles que apresentam o isómero CCl₃ (PARK *et al.*, 2001) e isso poderia influenciar no efeito das drogas. Além disso, o efeito tardio de **2c** e **2j** (4,5 h após sua administração) pode também estar relacionado a essa estabilidade metabólica conferida pela presença de CF₃ nas moléculas. De fato, a ligação flúor-carbono é bem mais forte que a ligação cloro-carbono (PARK *et al.*, 2001; LAUVERGNAT *et al.*, 1996), o que torna a primeira bem menos suscetível à oxidação que a primeira (LAUVERGNAT *et al.*, 1996). Essa maior resistência à oxidação pode contribuir para uma maior estabilidade das moléculas e, assim, fazer com que sua biodisponibilidade seja maior em relação aos compostos triclorometilados. Entretanto, o estudo de SOUZA e colaboradores (2001) foi realizado em ratos, diferente do presente estudo onde a inflamação induzida por carragenina foi analisada em camundongos. Então, a diferença entre as espécies empregadas nos dois trabalhos também pode estar relacionada aos resultados divergentes obtidos.

Além dos efeitos dos compostos **2c** e **2j** sobre a nocicepção e o edema de pata em camundongos, também foram avaliados os efeitos sobre a atividade locomotora espontânea e forçada. Nesses testes, os compostos não causaram nenhum prejuízo da locomoção dos animais, sugerindo que os efeitos sobre a

nocicepção não podem ser relacionados com algum prejuízo da capacidade de resposta dos animais ao estímulo nocivo. A salicilamida, cujo efeito antinociceptivo foi comparado com o efeito de **2c** e **2j**, causou um aumento na ambulação dos camundongos, demonstrando que ela pode exercer outros efeitos além de antinocicepção. Sabe-se que drogas psicoestimulantes, como as anfetaminas, podem causar hiperexcitabilidade e aumentar a ambulação dos animais no campo aberto (KELLEY, 2001; WELLMAN *et al.*; 2005). Entretanto, não há relatos na literatura a esse respeito em relação à salicilamida.

Numa segunda etapa do trabalho, foram avaliados os efeitos dos derivados pirazolínicos **2c** e **2j** em um modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA). As ações dos compostos sobre a alodínia e o edema induzidos por CFA foram avaliadas após administração aguda e crônica dos mesmos. Além disso, naqueles animais que receberam tratamento crônico, foram avaliados alguns parâmetros indicadores de toxicidade. A avaliação da toxicidade é um aspecto importante desse trabalho, no sentido de ampliar os dados da literatura em relação ao perfil farmacológico dos derivados pirazolínicos. Em pesquisas anteriores realizados no LABNEURO com outros derivados pirazolínicos, a avaliação da toxicidade ainda não havia sido estudada.

Como previamente relatado (CHAPLAN *et al.*, 1994; WILSON *et al.*, 2006), a injeção de CFA intraplantar em ratos produziu uma intensa e duradoura alodínia mecânica, como verificado pela diminuição dos limares de resposta aos filamentos de von Frey, a partir de 2-3 dias após a injeção. Também foi detectado edema significativo da pata injetada com CFA, chegando a mais de 100% em relação ao volume basal da pata antes da injeção. Tanto a alodínia quanto o edema permaneceram evidentes até o último dia de observação experimental (17-18 dias após CFA), caracterizando o desenvolvimento de um processo inflamatório crônico. Além disso, os sinais inflamatórios ficaram restritos ao local da injeção, sem propagarem-se para a pata contralateral.

Inicialmente, os compostos **2c** e **2j** foram administrados de forma aguda e foi avaliada a sua ação sobre a alodínia e o edema de pata induzido por CFA. Nesse protocolo experimental, a dipirona foi administrada a um grupo de ratos, sendo usada como controle positivo. Após o tratamento agudo com **2c**, **2j** e dipirona, o efeito anti-alodínico instalou-se rapidamente, alterando significativamente os limi

de resposta dos animais 30 min após sua administração. Além disso, tanto os novos derivados pirazolínicos quanto a dipirona causaram um efeito antinociceptivo de longa duração (até 12 h após a injeção). Os compostos **2c**, **2j** e dipirona diferiram, entretanto, no tempo necessário para atingir seu efeito antinociceptivo máximo, enquanto **2c** produziu inibição máxima da alódinia 1h após a injeção, **2j** somente atingiu seu efeito máximo 4 h após o tratamento. A dipirona causou um efeito inibitório máximo ainda mais tardio (6 h), o que está de acordo com o fato de que ela gera metabólitos ativos (HINZ *et al.*, 2007). A longa duração de ação dos compostos **2c** e **2j** pode estar relacionada com a presença do grupamento CF₃, que pode tornar os compostos metabolicamente mais estáveis (PARK *et al.*, 2001; KARTHIKEYAN *et al.*, 2007). De fato, substituições com flúor tornam a molécula bem mais resistente ao ataque direto pelo citocromo P450 (PARK *et al.*, 2001). Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de que, assim como a dipirona, esses compostos possam também gerar metabólitos ativos, os quais poderiam ser responsáveis pela manutenção dessa ação prolongada. Porém, estudos farmacocinéticos são necessários para que futuramente esse ponto seja esclarecido. É importante destacar que drogas que produzem efeitos de longa duração são interessantes na aplicação clínica, uma vez que proporcionam maior conforto ao paciente, já que o número de doses diárias a serem tomadas pode ser reduzido. Por esse motivo, os compostos **2c** e **2j** parecem ser bons protótipos para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas.

Comparando o efeito anti-alodínico dos compostos **2c** e **2j** com o efeito da dipirona, foi verificada uma diferença em termos de magnitude do efeito dessas drogas. Na maior dose testada (1000 µmol/kg), o composto **2c** foi capaz de reverter completamente a alodínia induzida pelo CFA, enquanto que a dipirona, na mesma dose, apenas proporcionou reversão parcial. Esse resultado sugere que o pirazolínico **2c** parece ser mais eficaz que a dipirona no combate à dor de origem inflamatória.

Por outro lado, o edema induzido por CFA não foi revertido nem pela administração aguda nem pela administração crônica de **2c**, **2j** ou dipirona. Relatos prévios demonstram que a dipirona previne o edema induzido por alguns agentes, como endotoxinas (FRACASSO *et al.*, 1996), carragenina (BRUNE *et al.*, 1983) e CFA (WEITHMANN *et al.*, 1985; TATSUO *et al.*, 1994). Entretanto, os trabalhos

demonstrando a ação antiedematogênica da dipirona no modelo de inflamação induzida por CFA diferem do presente estudo, pois foram usados diferentes protocolos de indução e avaliação da inflamação. No caso do estudo realizado por TATSUO e colaboradores (1994), foi usado um modelo onde o CFA foi injetado na base da cauda dos animais e o edema foi avaliado na pata 14 dias após a indução da inflamação. Nesse modelo, ocorre uma reação sistêmica provocada pela injeção de CFA na cauda, provocando, entre outras coisas, inflamação na pata do animal. No presente trabalho, o CFA foi injetado na pata traseira direita dos ratos e a inflamação ficou restrita ao local da injeção, visto que alodínia e edema não foram detectados na pata contralateral. Tais diferenças no local da injeção do CFA podem produzir diferentes graus de inflamação e, assim, as drogas podem agir de maneira diferente ou mesmo serem ineficazes dependendo do modelo empregado. Outro fator que pode explicar as divergências com relação aos dados da literatura reportando ação antiedematogênica para a dipirona, diz respeito à cepa de *Mycobacterium* utilizada na preparação do adjuvante e à linhagem dos ratos empregados. No trabalho de WEITHMANN e colaboradores (1985), por exemplo, foi usado CFA proveniente de *Mycobacterium butyricum* e os experimentos foram realizados em ratos Lewis, diferente do presente estudo, onde foi usado CFA de *Mycobacterium tuberculosis* e ratos Wistar. Nesse sentido, relatos prévios na literatura confirmam que existe ampla variação na incidência e severidade da artrite induzida pelo CFA, dependendo da cepa de *Mycobacterium* e da linhagem de ratos usados (SWINGLE *et al.*, 1969; VAN EDEN *et al.*, 2001; BANIK *et al.*, 2002; WONG *et al.*, 2006). Levando em consideração essas diferenças em relação aos procedimentos adotados em trabalhos anteriores e neste, é possível que a falta de efeito antiedematogênico da dipirona esteja relacionada ao protocolo experimental usado.

Os compostos **2c** e **2j** parecem não exercer ação antiinflamatória, no modelo de inflamação crônica induzida por CFA em ratos, como demonstrado pela sua ineficácia em diminuir o edema de pata. Esse resultado é, de certa maneira, conflitante com aquele encontrado quando a inflamação foi induzida por carragenina em camundongos, onde esses compostos apresentaram ação antiedematogênica significativa. A eficácia contra o edema induzido por carragenina parecia, realmente, fornecer indícios de que **2c** e **2j** exercessem alguma atividade antiinflamatória, já

que eles apresentaram efeito justamente na fase tardia do teste, que é considerada ser decorrente da produção de prostaglandinas (SALVEMINI *et al.*, 1996). Em relação a essa discrepância nos efeitos observados nos dois modelos de inflamação, há que se considerar as diferenças entre os dois modelos e também o protocolo experimental empregado em cada caso. A inflamação causada pela carragenina é considerada uma inflamação aguda, enquanto a inflamação induzida por CFA é crônica, ou seja, com o passar dos dias os animais não apresentam resolução do quadro inflamatório (WINTER *et al.*, 1962; VAN EDEN *et al.*, 2001). Além disso, no caso do teste da carragenina, os camundongos foram tratados com **2c** e **2j** antes da indução da inflamação. Já no caso do teste do CFA, os compostos foram administrados depois de instalada a inflamação, um protocolo que permitiria ver efeitos terapêuticos dos compostos e não efeitos preventivos, como no caso do protocolo de administração adotado no teste da carragenina. A utilização de protocolos de administração de drogas após a instalação de uma lesão ou doença é, em geral, mais estreitamente relacionada com a realidade na clínica médica. São poucos os casos em que se administram drogas antiinflamatórias antes que o processo inflamatório tenha se instalado e produzido sinais e sintomas. Deve-se considerar, ainda, que nesses dois modelos de inflamação aqui empregados, foram usadas diferentes espécies de roedores, o que também pode contribuir para essa diferença de efeito.

Após administração crônica, os derivados pirazolínicos **2c** e **2j**, assim como a dipirona, reduziram a alodínia induzida pela injeção intraplantar de CFA. Além disso, os compostos parecem não produzir tolerância, visto que eles continuaram a apresentar efeito após administração de várias doses, sendo que até o 15º dia ainda se observava a eficácia dos mesmos contra a alodínia. No caso deste protocolo de administração crônica, foi dada uma injeção das drogas a cada 24 h. É interessante notar que 24 h após receber a segunda dose (dia 3 do protocolo experimental), os animais já apresentavam um aumento significativo em seu limiar de resposta ao estímulo mecânico, sugerindo um alívio da dor inflamatória. Apesar disso, não foi obtida uma reversão total da alodínia causada pelo CFA ao longo de 15 dias de tratamento com **2c**, **2j** ou dipirona. É possível que doses maiores ou um maior número de doses diárias possa produzir um bloqueio completo da alodínia, porém isso precisa ser testado futuramente.

Nos animais injetados intraplantarmente com CFA e que foram tratados cronicamente com **2c**, **2j** ou dipirona foi avaliada a concentração de haptoglobina no soro. Essa é uma proteína de fase aguda, cujos níveis aumentam durante a inflamação induzida por CFA em ratos, servindo como um marcador da evolução ou regressão da doença (GIFFEN *et al.*, 2003). De fato, a injeção intraplantar de CFA causou um aumento na concentração de haptoglobina, quando esse parâmetro foi avaliado 17 a 18 dias após a indução da inflamação da pata. Entretanto, o tratamento dos ratos com **2c**, **2j** ou dipirona, durante 15 dias, não foi capaz de diminuir os níveis de haptoglobina, sugerindo que tais drogas não alteram o curso da doença. Esse resultado está de acordo com aqueles obtidos na avaliação do edema de pata, onde **2c**, **2j** e dipirona foram ineficazes em reduzir esse sinal de inflamação. Tomados juntos, esses achados apontam para uma falta de efeito dos novos pirazolínicos, assim como da dipirona, sobre a inflamação crônica, nas condições em que foram testados.

Os sinais e sintomas da inflamação incluem, além de dor e edema, a migração de células do sistema imunológico para o local inflamado (MARCHAND *et al.*, 2005). Os tipos de células que contribuem para a dor inflamatória dependem do tipo de inflamação, mas, em geral, vários tipos celulares podem ser recrutados e contribuir, ainda que em diferentes graus, para uma sensibilidade dolorosa aumentada (MARCHAND *et al.*, 2005). Sendo assim, a atividade das enzimas MPO, NAG e EPO, em amostras de tecido da pata de ratos que receberam injeção intraplantar de CFA, foram analisadas como indicadores do recrutamento de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos para o local da lesão, respectivamente (SUZUKI *et al.*, 1983; LLORET *et al.*, 1995; KANG *et al.*, 2008). Foi encontrado neste estudo que a atividade da MPO, mas não da NAG ou da EPO, estava aumentada quando avaliada 17-18 dias após a injeção do CFA, sugerindo acúmulo apenas de neutrófilos no local da inflamação. Além disso, foi verificado que o tratamento com **2c**, **2j** ou dipirona não foi capaz de reduzir a atividade da MPO e, por dedução, a infiltração de neutrófilos no sítio inflamado. No entanto, é importante ressaltar que, até o presente momento, o decurso temporal do recrutamento de células imunológicas após indução de inflamação por injeção intraplantar de CFA não está completamente descrito na literatura. Em 2006, LEVY e colaboradores mostraram que 28 dias após a indução de monoartrite na articulação do joelho de ratos pela

injeção de CFA, o número de leucócitos totais aumentou drasticamente no líquido sinovial local, enquanto que o número de macrófagos foi apenas modestamente aumentado. Se a infiltração de células imunológicas na pata injetada com CFA ocorre de maneira semelhante àquela encontrada no modelo de monoartrite empregado por Levy e colaboradores, os resultados obtidos no presente estudo corroboram, pelo menos em parte, com os resultados obtidos pelo estudo anteriormente citado. Entretanto, aqui a remoção do tecido da pata para análise indireta da infiltração celular foi feita 17-18 após a indução de inflamação com CFA, sendo que no trabalho anteriormente citado, essa avaliação foi feita 28 dias após a injeção do CFA. Talvez o protocolo empregado no presente trabalho não tenha sido adequado para a detecção de um aumento de macrófagos e eosinófilos, em função do tempo após CFA em que foram coletadas as amostras.

Existem relatos de que macrófagos e neutrófilos contribuem para a manifestação de dor em modelos experimentais. Eles podem liberar mediadores inflamatórios, incluindo o TNF- α , uma citocina pró-inflamatória (MARCHAND *et al.*, 2005). No presente trabalho, nós verificamos que os níveis teciduais de TNF- α aumentaram na pata inflamada dos ratos, 17-18 dias após a injeção de CFA. Porém, o tratamento crônico dos animais com **2c**, **2j** ou dipirona não causou redução desse parâmetro. Esse dado aliado à falta de efeito dos compostos **2c** e **2j** na infiltração de neutrófilos, reforça a idéia de que esses compostos são desprovidos de ação antiinflamatória.

A dosagem de AST, ALT, uréia e creatinina foi realizada com o objetivo de identificar possíveis lesões hepáticas e renais decorrentes da administração crônica dos compostos **2c** e **2j** e da dipirona. Nenhum dos tratamentos produziu qualquer alteração nesses indicadores de toxicidade, sugerindo que **2c**, **2j** e dipirona não são tóxicos em ratos, ao menos na dose e duração do tratamento em que foram avaliados.

Além dos parâmetros de toxicidade renal e hepática, também foram avaliados outros indicadores de efeitos adversos, como mudanças no ganho de peso corporal e alterações em parâmetros hematológicos. Estudos têm reportado que a injeção intraplantar de CFA causa uma redução do ganho de peso corporal dos animais ao longo do tempo, além de produzir sinais de poliartrite (WALTZ *et al.*, 1971; FRANCH *et al.*, 1994; YU *et al.*, 2006). No presente trabalho, o peso corporal foi avaliado

diariamente ao longo dos dias de tratamento crônico. Nos dias 1 e 2 do protocolo experimental (2 a 4 dias após a injeção de CFA) foi detectada uma diminuição no ganho de peso dos animais que receberam CFA em relação aos que receberam salina intraplantar. Entretanto, isso não foi afetado pelo tratamento com **2c**, **2j** ou dipirona, indicando que essa diminuição no peso não tem relação com a administração dessas drogas, mas somente com a injeção do CFA. Além disso, sinais de poliartrite, observados por outros autores, não foram detectados no presente estudo. É possível que essa discrepância em relação aos resultados obtidos por outros pesquisadores esteja relacionada ao desenho experimental, assim como à linhagem de ratos e à cepa de *Mycobacterium* usada na preparação do adjuvante.

A avaliação de alguns parâmetros hematológicos nos animais que receberam tratamento crônico com **2c**, **2j** ou dipirona foi feita para verificar se esse tratamento causava alguma alteração na hematopoiese. Dentre os parâmetros avaliados, somente foi encontrado um aumento no número de leucócitos totais dos animais que receberam CFA intraplantar e tratamento crônico com **2c**, **2j** ou dipirona. Nos animais que receberam salina intraplantar em vez de CFA e que foram submetidos ao mesmo protocolo de tratamento com as drogas, esse aumento no número de leucócitos não foi encontrado. Então, essa leucocitose parece ocorrer apenas na presença de inflamação induzida por CFA, descartando a possibilidade de um efeito *per se* dos derivados pirazolínicos **2c**, **2j** e da dipirona sobre a produção de leucócitos. Nesse contexto, alguns trabalhos têm mostrado diminuição no hematócrito e nos níveis de hemoglobina, produzindo anemia, e pronunciado aumento no número de leucócitos e linfócitos em ratos injetados com CFA (MIKOLAJEW et al., 1969; WALZ et al., 1971). Entretanto, mais uma vez, diferenças entre os protocolos experimentais impedem uma comparação adequada como os resultados obtidos no presente estudo.

Os efeitos adversos associados com os AINEs clássicos incluem desconforto gastrointestinal e surgimento de lesões e úlceras da mucosa, sendo que uma percentagem relevante dos pacientes que experimentam tais efeitos apresentam risco de morte (VANE et al., 1998). No presente estudo, foi demonstrado que a administração crônica dos pirazolínicos **2c**, **2j** ou dipirona não causou lesões da mucosa do estômago de ratos, sugerindo uma boa tolerabilidade gástrica para essas

drogas. Além disso, uma análise macroscópica do fígado, rins e baço não mostrou lesões aparentes e também não houve mudança na percentagem de peso desses órgãos em relação ao peso corporal dos animais.

Ainda em relação à toxicidade dos novos derivados pirazolínicos avaliados neste trabalho, vale ressaltar que eles não causaram morte de nenhum animal nem produziram sinais comportamentais de toxicidade (por exemplo, convulsões, apatia, dificuldades locomotoras) que justificassem a eutanásia dos mesmos e a interrupção dos experimentos.

Em resumo, os resultados obtidos nos estudos realizados com camundongos e ratos, usando modelos de nocicepção e inflamação aguda e crônica, bem como a análise preliminar da toxicidade dos derivados 5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-pirazol-1-carboxiamida, especialmente dos compostos **2c** e **2j**, permite concluir que estes são bons protótipos para estudos posteriores visando o desenvolvimento de novas drogas analgésicas.

VII. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos no presente trabalho foi possível concluir que:

1 – Todos os derivados 5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazol-1-carboxamida, exceto o derivado 3-fenil substituído (**2h**), causaram antinocicepção no teste da formalina (estímulo nocivo químico). Os compostos 3-etil e 4-metil substituídos (**2c** e **2j**, respectivamente) foram mais eficazes contra a nocicepção neurogênica e inflamatória produzida pela formalina. Os derivados **2c** e **2j** foram ineficazes contra a nocicepção térmica aguda (teste da placa quente).

2 – O edema de pata induzido por carragenina foi prevenido pela administração dos novos derivados pirazolínicos 3-etil-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazol-1-carboxamida (**2c**) e 4-metil-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazol-1-carboxamida (**2j**). Além disso, esses compostos foram capazes de inibir a alodínia induzida pela carragenina.

3 – Os derivados pirazolínicos **2c** e **2j** causaram efeito anti-alodínico no modelo de inflamação crônica induzida por CFA, tanto quando administrados agudamente quanto cronicamente. Porém, não produziram efeito antiedematogênico após tratamento agudo ou crônico.

4 – A administração crônica dos derivados pirazolínicos **2c** e **2j** não foi capaz de diminuir os níveis plasmáticos de haptoglobina (marcador de inflamação), e nem a atividade da mieloperoxidase e a concentração de TNF- α tecidual, aumentados pela injeção intraplantar de CFA. Esses dados indicam falta de efeito antiinflamatório desses compostos.

5 – A administração crônica de **2c** e **2j** não alterou os parâmetros bioquímicos indicadores de toxicidade renal e hepática, sugerindo que tais compostos não causam lesão dos rins e do fígado.

6 – Não houve alteração no ganho de peso corporal nem do tamanho de alguns órgãos internos de ratos que foram cronicamente tratados com **2c** e **2j**, indicando, mais uma vez, que esses compostos parecem não apresentar toxicidade.

7 – Não foram encontrados sinais de lesão da mucosa gástrica após tratamento crônico com **2c** e **2j**, indicando boa tolerabilidade gástrica para esses derivados pirazolínicos.

8 – Os derivados 5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazol-1-carboxamida, não alteraram a atividade locomotora de camundongos e ratos, sugerindo ausência de efeitos inespecíficos que pudessem mascarar os resultados obtidos sobre os parâmetros relacionados à nocicepção.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKMAN, H.; AKSU, F.; GÜLTEKIN I.; OZBEK, H.; ORAL, U.; DORAN, F.; BAYSAL, F. A possible central antinociceptive effect of dipyron in mice. **Pharmacology**. 53(2): 71-78, 1996.
- ANKIER, S. I. New hot plate tests to quantify antinociceptive and narcotic antagonist activities. **Eur J Pharmacol**. 27(1): 1-4, 1974.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (sítio na Internet). Resolução RE Nº 1260, de 15 de agosto de 2001. Determina a publicação do Relatório Final do “Painel Internacional de Avaliação da Segurança da Dipirona” (citado em 14/07/2008). Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/relatoriodipirona2.pdf>
- ARELLANO, R & SACRISTAN, S. A. Metamizole: reassessment of its therapeutic role. **Eur J Clin Pharmacol**. 38:617-619, 1990.
- ASHBURN, M. A. & STAATS, P. S. Management of chronic pain. **Lancet**. 353: 1865-1869, 1999.
- BANIK, R. K.; KASAI, M.; MIZUMURA, K. Reexamination of the difference in susceptibility to adjuvant-induced arthritis among LEW/Crj, Slc/Wistar/ST and Slc/SD rats. **Exp Anim** 51(2): 197-201, 2002.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; RODRIGUES, A. L. S.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; CALIXTO, J. B. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyron in formalin, capsaicin and glutamate tests. **Eur J Pharmacol**. 345 (3):223-245, 1998.
- BERNARD, J. F.; BESTER, H.; BESSON, J. M. Involvement of the spinobarabrachio-amygdaloid and hypothalamic pathways in the autonomic and effective emotional aspects of pain. **Prog Brain Res**. 107:243-255, 1996.
- BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, 353:1610-15, 1999.
- BEVAN, S.; GEPPETTI, P. Protons: small stimulants of capsaicin-sensitive sensory nerves. **Trends Neurosci**. 17(12): 509-512. 1994.
- BJÖRKMAN, R. Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. **Acta Anaesthesiol Scand**. 39 (103):1-44, 1995.
- BONICA, J. J. Anatomic and physiologic basis of nociception and pain. In: Bonica, K.; Loeser, J. D.; Chapman, C. R.; Fordyce, W. E. **The management of Pain**. 2 ed. Philadelphia–London: Lea & Febiger, 1990.

- BORNE, R. F. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: Foye, W. O.; Lemke, T. L.; Williams, D. A. **Medicinal Chemistry**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 72:248-54, 1976
- BROGDEN, R. N. Pyrazolone derivatives. **Drugs** 32(4): 60-70 1986.
- BRUNE, K. & ALPERMANN, H. Non-acidic pyrazole: inhibition of prostaglandin production carrageenan oedema and yeast fever. **Agents Actions**. 13:360-363, 1983.
- BURGESS, P. R. & PERL, E. R. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. **J Physiol** 3: 541-62, 1967.
- CAI, X.; WONG, Y. F.; ZHOU, H.; LIU, Z. Q.; XIE, Y.; JIANG, Z. H.; BIAN, Z. X.; XU, H. X.; LIU, L. Manipulation of the induction of adjuvant arthritis in Sprague-Dawley rats. **Inflamm Res** 55(9): 368-77, 2006.
- CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M. Inflammatory pain: kinins and antagonists. **Curr Opin Anesthesiol**. 14:519-526, 2001.
- CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**. 87:1-5, 2000.
- CAMPOS, C.; GREGÓRIO, R.; GARCIA NIETO, R.; GAGO, F.; ORTIZ, P.; ALEMANY, S. Regulation of cyclooxygenase activity by metamizol. **Eur J Pharmacol**. 378: 339-347, 1999.
- CAMPOS, D. I.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. A new mechanism of action of dipyron: blockade of the release of a nociceptive factor from macrophages. **Braz J Med Biol Res**. 21:565-568, 1998.
- CAMPOS, M. M.; SOUZA, G. E. P.; RICCI, N. D.; PESQUERO, J. L.; TEIXEIRA, M. M.; CALIXTO, J. B. The role of migrating leukocytes in IL-1b-induced up-regulation of kinin B1 receptors in rats. **Br J Pharmacol**. 135: 1107-1114, 2002.
- CAMU, R. & VANLERSBERGUE C. Pharmacology of systemic analgesics. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**. 16 (4): 475-488, 2002.
- CARLSSON, K. H. & JURNA, I. The role of descending inhibition in the antinociceptive effects of the pyrazolone derivatives, metamizol (dipyron) aminophenazone ("Pyramidon"). **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. 335:154-159, 1987.
- CARLSSON, K. H.; HELMREICH, J.; JURNA, I. Activation of inhibition from the

- periaqueductal grey matter mediates central analgesic effect of metamizol (dipyrone). **Pain**. 27(3):373-390, 1986.
- CARSON, J. L.; STROM, B. L.; DUFF, A.; GUPTA, A.; DAS, K. Safety of nonsteroidal anti-inflammatory drugs with respect to acute liver disease. **Arch Intern Med**. 153: 1331-1336, 1993.
- CATERINA, M. J. & JULIUS, D. Sense and specificity: a molecular identity for nociceptors. **Curr Opin Neurobiol**. 9:525-530, 1999.
- CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, L. T.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, 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**. 99 (21):13926-13931, 2002.
- CHAPLAN, S. R.; BACH, F. W.; POGREL, J. W.; CHUNG, J. M.; YAKSH, T. L. Quantitative assesment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods**. 53: 55-63, 1994.
- COHEN, R. D. & PERL, E. R. Contributions of arachidonic acid derivatives and substance P to the sensitization of cutaneous nociceptors. **J Neurophysiol**. 64:457-464, 1990.
- DAVIES, H. T. O.; CROMBIE, I. K.; MACRAE, W. A. J. Why use a pain clinic? Management of neurogenic pain before and after referral. **J R Soc Med**. 87:382-385, 1994.
- De SOUZA, A., H.; MELLO, C. F.; SAUZEM, P. D.; SINHORIN, V. D. G.; SANT'ANNA, G. S.; DALMOLIN, G. D.; DREWES, C. C.; BONACORSO, H. G.; ZANNATA, N.; MARTINS, M. A. P.; RUBIN, M. A. Intratechal administration of a novel pyrazolyl-thiazole derivative induces delayed antinociception in mice. **Braz J Med Biol Res**, 2008 (submetido para publicação).
- DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, J. Screens for anti-inflammatory drugs. **J Pharm Pharmacol**. 23: 297-298, 1971.
- DICKENSON, A. Mechanisms of central hypersensitivity: excitatory amino acid mechanisms and their control. In: Dickenson, A & Besson, J.-M. The Pharmacology of Pain. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Berlin: Springer-verlag, 1997.
- DIXON, W. J. Efficient analysis of experimental observations. **Ann Rev Pharmacol Toxicol**. 20: 441-462, 1980.
- DJAHANGUIRI, B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. **Scand J Gastroenterol**. 4: 265-267, 1969.

- DRAY, A & PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends Neurosci.** 16:99-104, 1993.
- DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br J Anaesth.** 75:125-131, 1995.
- DRAY, A. Kinins and their receptors in hyperalgesia. **Can J Clin Pharmacol.** 75:704-71, 1997a.
- DRAY, A. Peripheral mediators of Pain. In The Pharmacology of Pain/Editors Dickenson and J.M. Besson: Contributors: I Appleton et al. **Handbook of Experimental Pharmacology.** 130:21-41, 1997b.
- DUARTE, I. D.; 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.** 217(2):225-227, 1992.
- DUBNER, R. & BENNETT, G. J. Spinal mechanisms of nociception. **Annu Rev Neurosci.** 6:11-14, 1983.
- FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; ARAÚJO, R.; BADER, J. B.; PESQUERO, J. B.; CALIXTO, J. B. The use of kinin 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, 2002.
- FIELDS, H.L. & BASBAUM, A.I. Central nervous system mechanisms of pain modulation, in: P.D. Wall, R. Melzack (Eds.), **Textbook of Pain**, Churchill Livingstone, London, pp. 309-329, 1999.
- FLOWER, R. J. The development of cox-2 inhibitors. **Nat Rev.** 2: 179-191, 2003.
- FRACASSO, J. F.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; TEIXEIRA, C. E.; CASTRO, R. C.; LEPERA, E. Z. P.; SILVA, R. F. P. Effect of dipyron, L-NAME and L-arginine on endotoxin-induced rat paw edema. **Braz J Med Biol Res.** 29:1543-1548, 1996.
- FRANCH, A., CASTELLOTE, C., CASTELL, M. Blood lymphocyte subsets in rats adjuvant arthritis. **Ann Rheum Dis** 53: 461-466, 1994.
- GARCÍA RODRÍGUEZ, L. A. & JICK, H. Risk of upper gastrointestinal bleeding and perforation associated with individual nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Lancet** 343: 769-772, 1994.
- GHEDINI, P. C.; ALMEIDA, C. E.; BÜRGER, M. E.; BAUERMANN, L. F.; MAGNI, D. V.; BORGMANN, S. H. M. Preliminary studies of anti-ulcrogenic effect of *Aster squamatus* Leaves hydroalcoholic extract on various ulcer models in rats. **Acta Farm Bonaerense.** 21:165-168, 2002.
- GIFFEN, P. S.; TURTON, J.; ANDREWS, C. M.; BARRETT, P.; CLARKE, C. J.;

- FUNG, K.-W.; MUNDAY, M. R.; ROMAN, I. F.; SMYTH, R.; WALSH, K.; YORK, M. J. Markers of experimental acute inflammation in the Wistar Han rat with particular reference to haptoglobin and C-reactive protein. **Arch Toxicol.** 77:392-402, 2003.
- GODOY, M. C. M.; FIGHERA, M. R.; SOUZA, F. R.; FLORES, A. E.; RUBIN, M. A.; OLIVEIRA, M. R.; ZANATTA, N.; MARTINS, M. A. P.; BONACORSO, H. G.; MELLO, C. F. α_2 -adrenoceptors and 5-HT receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazolines, but not of dipyron. **Eur J Pharmacol.** 496:93-97, 2004.
- GUIEU, R.; PERAGUT, J. C.; ROUSSEL, P.; HASSANI, H.; SAMPIERI, F.; BECHIS, G.; GOLA, R.; ROCHAT, H. Adenosine and neuropathic pain. **Pain.** 68:271-274, 1996.
- GÜRSOY, A.; DEMIRAYAK, S.; CAPAN, G.; EROL, K.; VURAL, K. Synthesis and preliminary evaluation of new 5-pyrazolinone derivatives as analgesics agents. **Eur J Med Chem.** 35:359-364, 2000.
- HENRIQUES, M. G.; SILVA, P. M.; MARTINS, M. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R. S. Mouse paw edema. A new model for inflammation? **Braz J Med Biol Res** 20(2):243-249, 1987.
- 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.** 469:71-79, 2003.
- HINZ, B.; CHEREMINA, O.; BACHMAKOV, J.; RENNER, B.; ZOLK, O.; FROMM, M. F.; BRUNE, K. Dipyron elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic. **FASEB J** 21(10): 2343-51, 2007.
- HINZ, B. & BRUNE, K. Cyclooxygenase-2 – 10 years later. **J Pharmacol Exp Ther** 300(2): 367-375, 2002.
- HUNSKAAR, S. & HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain.** 30:103-114, 1987.
- HUNSKAAR, S.; BERGE, O. G.; HOLE, K. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. **Beh Brain Res.** 21:101-108, 1986.
- INSEL, P. A. Analgesic – antipyretic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; Molinoff, P. B.; Ruddon, R. W.; Goodman, L.S.; Gilman, A. **Pharmacological Basis of Therapeutics.** Atlampa: Mc Graw Hill Interamericana, 1996.
- JICK, H.; DERBY, L. E.; GARCIA RODRIGUEZ, L. A.; JICK, S. S.; DEAN, A. D. Liver

- disease associated with diclofenac, naproxen, and piroxicam. **Pharmacotherapy** 12: 207–212, 1992.
- JONES, S. L. Anatomy of pain. In Sinatra, R S; Hord, A H; Ginsberg, B; PREBLE, L. **Acute Pain: Mechanisms & Management**. St. Louis: Mosby–Year Book, 1992.
- JULIUS, D. & BASBAUM, A. L. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. 431:203-109, 2001.
- KANG, H. S., LEE, J. Y., KIM, C. J. Anti-inflammatory activity of arctigenin from Forsythiae Fructus. **J Ethnopharmacol** 116: 305-312, 2008.
- KELLEY, A. E. Measurement of rodent stereotyped behavior. **Curr Protoc Neurosci**. Chapter 8:Unit 8.8, 2001.
- KIRSCHSTEIN, T.; BÜSSELBERG, D.; TREEDE, R. D. Coexpression of heat-evoked and capsaicin-evoked inward currents in acutely dissociated rat dorsal root ganglion neurons. **Neurosci. Lett**. 231(1):33-36, 1997.
- LAIRD, J. M. & CERVERO, F. Effects of metamizol on nociceptive responses to stimulation of the ureter and on ureter motility in anaesthetised rats. **Inflamm Res**. 45(3): 150-154, 1996.
- LAPORTE, J. R.; CARNÉ, X. Blood dyscrasias and the relative safety of non-narcotic analgesics. **Lancet**. 329:809, 1987.
- LAUVERGNAT, D.; HIBERTY, P. C.; DANOVICH, D.; SHAIK, S. Comparison of C-Cl and Si-Cl Bonds. A Valence Bond Study. **J Phys Chem**. 100: 5715-5720, 1996.
- LEVY, A. S., SIMON, O., SHELLY, J., GARDENER, M. 6-Shogaol reduced chronic inflammatory response in the knees of rats treated with complete Freund's adjuvant. **BMC Pharmacol** 6: 12-19, 2006.
- LLORET, S., MORENO, J. J. Effects of an anti-inflammatory peptide (antiflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol dermal application. **Biochem Pharmacol** 50: 347-53, 1995.
- LOESER, J. D. & MELZACK, R. Pain, an overview. **Lancet**. 353:1607-1609, 1999.
- LORENZETTI, B. B. & FERREIRA, S. H. Activation of the arginine-nitric pathway in primary sensory neurons contributes to dipyrrone-induced spinal and peripheral analgesia. **Inflam Res**. 45:308-311, 1996.
- MACHADO, P.; ROSA, F. A.; ROSSATTO, M.; SANT'ANNA, G. S.; SAUZEM, P. D.; SILVA, R. M. S.; RUBIN, M. A.; FERREIRA, J.; BONACORSO, H. G.; ZANATTA,

- N.; MARTINS, M. A. P. Synthesis and structure of novel 4,5-dihydro-1H-pyrazoles: salicylic acid based analgesic agents. **ARKIVOC** (xvi):281-297, 2007.
- MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S. B. Role of the immune system in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**. 6(7): 521-532, 2005.
- MARQUEZ, J. O. & FERREIRA, S. H. Regional dipyrone nociceptor blockade: a pilot study. **Braz J Med Biol Res**. 20:441-444, 1987.
- MARTIN, W. R. & SLOAN, J. W. Neuropharmacology and neurochemistry of subjective effects, analgesia, tolerance and dependence produced by narcotic analgesics. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Berlin: Springer-Verlag, 1977.
- MARTINS, M. A. P.; BECK, P.; MACHADO, P.; BRONDANI, S.; MOURA, S.; ZANATTA, N.; BONACORSO, H. G.; FLORES, A. F. C. Microwave-assisted synthesis of novel 5-trichloromethyl-4,5-dihydro-1H-1-pyrazole methyl esters under solvent free conditions. **J Braz Chem Soc**. 17:408-411, 2006.
- MATHEUS, M. E.; OLIVEIRA, L. F.; FREITAS, A. C. C.; CARVALHO, A. M. S. P.; BARREIRO, E. J. Antinociceptive property of new 4-acyl-arylhydrazone pyrazole compounds. **Braz J Med Biol Res**. 24:1219-1222, 1991.
- MCQUEEN, D. S. Opioid peptide interactions with respiratory and circulatory systems. **Br Med Bull**. 39:77-82, 1983.
- MEYER, R. A.; CAMPBELL, J. N.; RAJA, S. N. Peripheral mechanisms of pain. In: WALL, P. D. & MELZACK, R. **Textbook of Pain**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994.
- MIKOLAJEW, M., KURATOWSKA, Z., KOSSAKOWSKA, M., PLACHECKA, M., KOPEC, M. Haematological changes in adjuvant disease in the rat. I. Peripheral blood and bone marrow after repeated injections of Freund's adjuvant. **Ann Rheum Dis** 28: 35-40, 1969.
- MILANO, J.; OLIVEIRA, S. M.; ROSSATO, M. F.; SAUZEM, P. D.; MACHADO, P.; BECK, P.; ZANATTA, N.; MARTINS, M. A. P.; MELLO, C. F.; RUBIN, M. A.; FERREIRA, J.; BONACORSO, G. H. Antinociceptive effect of novel trihalomethyl-substituted pyrazoline methyl esters in formalin and hot-plate tests in mice. **Eur J Pharmacol**. 581:86-96, 2008.
- MILLAN, M. J. The role of descending noradrenergic and serotonergic pathways in the modulation of nociception: focus on receptor multiplicity. In: DICKENSON, A. & BESSON, J-M. The Pharmacology of Pain. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Berlin: Springer Verlag, 1997.
- MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog Neurobiol**. 66:355-474, 2002.

- MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progr Neurobiol.** 57:1-164, 1999.
- MITCHELL, J. A. & WARNER, T. D. Cox isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Nat Rev Drug Disc** 5: 75-86.
- NESTLER, E. J. Cellular responses to chronic treatment with drugs of abuse. **Crit Rev Neurobiol.** 7:23-39, 1993.
- NEUGEBAUER, V.; SCHAIBLE, H. G.; HE, X.; LUCKE, T.; GUNDLING, P.; SCHMIDT, R. F. Electrophysiological evidence for a spinal antinociceptive action of dipyrone. **Agents Actions.** 41:62-70, 1994.
- NISHIYAMA, T. & HANAOKA, K. The effects of epidural bupivacaine, morphine, and their combination on thermal nociception with different stimulus intensity in rats. **Anesth Analg.** 91:652-656, 2000.
- NIV, D. & DEVOR, M. Refractory neuropathic pain: the nature and extent of the problem. **Pain Pract.** 6:3-9, 2006.
- NUKI, G. Nonsteroid analgesic and inflammatory agents. **BMJ.** 287:39-42, 1983.
- OCHI, T. & GOTO, T. Anti-inflammatory activity of a novel selective cyclooxygenase-2 inhibitor, FR140423, on type II collagen-induced arthritis in Lewis rats. **Prostaglandin Other Lipid Mediat.** 66 (4): 317-327, 2001.
- OCHI, T. & GOTO, T. The antinociceptive effect induced by FR140423 is mediated through spinal 5-HT_{2A} and 5-HT₃ receptors. **Eur J Pharmacol.** 409:167-172, 2000b.
- OCHI, T. & GOTO, T. The antinociceptive effect of FR140423 in mice: involvement of spinal α_2 -adrenoceptors. **Eur J Pharmacol.** 400:199-203, 2000a.
- OCHI, T.; FUJII, T.; MOTOYAMA, Y.; GOTO, T. Antinociceptive properties of FR140423 mediated through spinal δ -, but not μ - and κ -, opioid receptors. **Eur J Pharmacol.** 380:73-79, 1999b.
- OCHI, T.; FUJII, T.; MOTOYAMA, Y.; GOTO, T. The profile of FR140423, a novel anti-inflammatory compound, in yeast-induced rat hyperalgesia. **Jpn J Pharmacol.** 81(1):94-98, 1999c.
- OCHI, T.; JOBO-MAGARI, K.; YONEZAWA, A.; MATSUMORI, K.; FUJII, T. Anti-inflammatory and analgesic effects of a novel pyrazole derivative, FR140423. **Eur J Pharmacol.** 365:259-266, 1999a.
- OCHI, T.; OHKUBO, Y.; MUTOH, S. FR143166 attenuates spinal pain transmission

- through activation of the serotonergic system. **Eur J Pharmacol.** 452(3): 319-324, 2002.
- OCHI, T.; YAMANE-SUGIYAMA, A.; OHKUBO, Y.; SAKANE, K.; TANAKA, H. The anti-inflammatory effect of FR188582, a highly selective inhibitor of cyclooxygenase-2, with an ulcerogenic sparing effect in rats. **Jpn J Pharmacol.** 85(2): 175-182, 2001.
- OSHIMA, Y.; AKIMOTO, T.; TSUKADA, W.; YAMASAKI, T.; YAMAGUCHI, K.; KOJIMA, H. Studies on pyrimidinylpyrazoles. IV. Pharmacological activities of 1-(4-methoxy-6-methyl-2-pyrimidinyl)-3-methyl-5-methoxypyrazole and its related compounds. **Chem Pharm Bull.** 17(7):1492-1497, 1969.
- PARK, B. K.; KITTERINGHAM, N. R.; O'NEILL, P.M. Metabolism of fluorine-containing drugs. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** 41: 443-470, 2001.
- PORTENOY, R. K. & LESAGE, P. Management of cancer pain. **Lancet.** 353:1695-1700, 1999.
- PROKOPP, C. R.; RUBIN, M. A.; SAUZEM, P. D.; SOUZA, A. H.; BERLESE, D. B.; LOUREGA, R. V.; MUNIZ, M. N.; BONACORSO, H. G.; ZANATTA, N.; MARTINS, M. A.; MELLO, C. F. A pyrazolyl-thiazole derivative causes antinociception in mice. **Braz J Med Biol Res.** 39(6):795-799, 2006.
- RUMACK, B. H.; PETERSON, R. C.; KOCH, G. G.; AMARA, I. A. Acetaminophen overdose. 662 cases with evaluation of oral acetylcysteine treatment. **Arch Int Med.** 141:380-385, 1982.
- SALVEMINI, D.; WANG, Z. Q.; BOURDON, D. M.; STERN, M. K. Evidence of peroxybrite involvement in the carrageenan-induced paw edema. **Eur J Pharmacol.** 303:217-220, 1996.
- SCHMELTZ, M.; WEBER, S.; KRESS, M. Topical acetyl salicylate and dipyrrone attenuated neurogenic protein extravasation in rat skin in vitro. **Neurosci Lett.** 290:57-60, 2000.
- SHERRINGTON, C. S. **The integrative action of the nervous system.** Scribner, New York, 1906.
- SIEGFRIED, B.; NETTO, C.; IZQUIERDO, I. Exposure to novelty induces naltrexone-reversible analgesia in rats. **Behav Neurosci.** 101:436-438, 1987.
- SMITH, T. W. The mechanisms of pain and opioid-induced analgesia. **Mol Asp Med.** 7:509-545, 1984.
- SOUZA, D. G.; CARA, D. C.; CASSALI, G. D.; COUTINHO, S. F.; SILVEIRA, M. R.; ANDRADE, S. P.; POOLE, S. P.; TEIXEIRA, M. M. Effects of the PAF receptor

- antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia mesenteric artery in the rat. **Br J Pharmacol.** 131:1800-1808, 2000.
- SOUZA, F. R.; FIGHERA, 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-1H-1-pyrazolcarboxamide induces antinociception. **Pharmacol Biochem Behav.** 68:525-530, 2001.
- 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. Hypothermic and antipyretic effects of 3-methyl and 3-phenyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-4,5-dihydro-1H-1-pyrazolcarboxamide induces antinociception. **Pharmacol Biochem Behav.** 451:141-147, 2002.
- SUZUKI, K.; OTA, H.; SASAGAWA, S.; SAKATANI, T.; FUJIKURA, T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. **Anal Biochem.** 132:345-352, 1983.
- SWINGLE, K. F.; JAQUES, L. W.; KVAM, D. C. Differences in the severity of adjuvant arthritis in four strains of rats. **Proc Soc Exp Biol Med** 132(2): 608-12, 1969.
- TABARELLI, Z.; RUBIN, M. A.; BERLESE, D. B.; SAUZEM, P. D.; 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.** 37(10):1531-1540, 2004.
- TAIWO, Y. & LEVINE, J. D. Characterization of the arachidonic acid metabolites mediating bradikinin and noradrenaline hyperalgesia. **Brain Res.** 458:402-406, 1988.
- TAIWO, Y. O. & LEVINE, J. D. Further confirmation of the role of adenylyl-cyclase and of α AMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. **Neuroscience.** 44:131-135, 1991.
- TAIWO, Y. O. & LEVINE, J. D. Prostaglandin effects after elimination of indirect hyperalgesic mechanisms in the skin of the rat. **Brain Res.** 492:397-399, 1989.
- TATSUO, M. A.; CARVALHO, W. M.; SILVA, C. V.; MIRANDA, A. E.; FERREIRA, S. H.; FRANCISCHI, J. N. Analgesic and anti-inflammatory effects of dipyron in rat adjuvant arthritis model. **Inflammation.** 18:399-405, 1994.
- TAYLOR, J.; MELLSTRÖM, B.; FERNAUD, I.; NARANJO, J. R. Metamizol potentiates morphine effects on visceral pain and evoked c-Fos immunoreactivity in spinal cord. **Eur J Pharmacol.** 351:39-47, 1998.
- The international agranulocytosis and aplastic anemia study. Risks of agranulocytosis and aplastic anemia. A first report of their relation to drug use

- with special reference to analgesics. **JAMA**. 256:1749-1757, 1986.
- TJOLSEN, A. & HOLE, K. Animal models of analgesia. In: DICKENSON, A. & BESSON, J. M. **The Pharmacology of Pain**. Germany: Ed Springer, 1997.
- TOMAZETTI, J.; AVILA, D. S.; FERREIRA, A. P.; MARTINS, J. S.; SOUZA, F. R.; ROYER, C.; RUBIN, M. A.; OLIVEIRA, M. R.; BONACORSO, H. G.; MARTINS, M. A.; ZANATTA, N.; MELLO, C. F. Baker yeast-induced fever in young rats: characterization and validation of an animal model for antipyretics screening. **J Neurosci Methods**. 147(1):29-35, 2005.
- TORTORICI, V. & VANEGAS, H. Putative role of medullary off-and on- cells in the antinociception produced by dipyron (metamizol) administered systematically or microinjected into PAG. **Pain**. 57:197-205, 1994.
- TORTORICI, V.; VASQUEZ, E.; VANEGAS, H. Naloxone partial reversal of the antinociception produced by dipyron microinjected into the periaqueductal grey of rats. Possible involvement of medullary off- and on- cells. **Brain Res**. 726:106-111, 1996.
- TRACEY, I. & MANTYH, P. W. The cerebral signature for pain perception and its modulation. **Neuron**. 55: 377-391, 2007.
- TRAUB, R. J. The Spinal Contribution Of The Induction Of Central Sensibilization. **Brain Res**. 778:34-42, 1997.
- TSUDA, M.; SUZUKI, T.; MISAWA, M.; NAGASE, H. Involvement of the opioid system in the anxiolytic effect of diazepam in mice. **Eur J Pharmacol**. 307:7-14, 1996.
- TSUJI, K.; KONISHI, N.; SPEARS, G. W.; OGINO, T.; NAKAMURA, K.; TOJO, T.; OCHI, T.; SHIMOJO, F.; SENOH, H.; MATSUO, M. Studies on anti-inflammatory agents. V. Synthesis and pharmacological properties of 3-(difluoromethyl)-1-(4-methoxyphenyl)-5-[4-(methylsulfinyl)-phenyl] pyrazole and relates compounds. **Chem Pharm Bull**. 45:1475-1481, 1997.
- VAN EDEN, W.; WAGENAAR-HILBERS, J. P.; WAUBEN, M. H. Adjuvant arthritis in the rat. **Curr Protoc Immunol** Chapter 15:Unit 15.4, 2001.
- VANE, J. & BOTTING, R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **FASEB J**. 1:89-96, 1987.
- VANE, J. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nat New Biol**. 231:232-239, 1971.
- VANE, J. R., BAKHLE, Y. S., BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 38: 97-120, 1998.

- VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Res Brain Res Rev.** 46(3):295-309, 2004.
- WALKER, A. M. Quantitative studies of the risk of serious hepatic injury in persons using nonsteroidal antiinflammatory drugs. **Arthritis Rheum.** 40: 201-208, 1997.
- WALZ, D. T., DIMARTINO, M. J., KUCH, J. H., ZUCCARELLO, W. Adjuvant-induced arthritis in rats. I. Temporal relationship of physiological, biochemical, and hematological parameters. **Proc Soc Exp Biol Med** 136: 907-910, 1971.
- WATSON, P. R.; MOKLER S. M. Adsorption and reaction of chlorine with the titanium(0001) surface. **J Phys Chem.** 91:5705-5709, 1987.
- WEITHMANN, K. U. & ALPERMANN, H. G. Biochemical and pharmacological effects of dipyrone and its metabolites in model systems related to arachidonic acid cascade. **Drug Res.** 35:947-952, 1985.
- WELLMAN, P. J.; HO, D. H.; DAVIS, K. W. Concurrent measures of feeding and locomotion in rats. **Physiol Behav.** 84(5):769-74, 2005.
- WILLIS, W. D. JR. Role of the forebrain in nociception. **Prog Brain Res** 87: 1-12, 1991.
- WILSON, A. W.; MEDHURST, S. J.; DIXON, C. I.; BONTOFT, N. C.; WINYARD, L. A.; BRACKENBOROUGH, K. T.; ALBA, J.; CLARKE, C. J.; GUNTHORPE, M. J.; HICKS, G. A.; BOUNTRA, C.; MCQUEEN, D. S.; CHESSELL, I. P. An animal model of chronic inflammatory pain: Pharmacological and temporal differentiation from acute models. **Eur J Pain.** 6:537-549, 2005.
- WINTER, C. A.; RESLEV, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc Soc Exp Biol Med.** 111:544-547, 1962.
- WOOLFE, G. & MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). **J Pharmacol Exp Ther.** 80:300-307, 1944.
- YAKSH, T. L. & HAMMOND, D. L. Peripheral and central substrates involved in the rostral transmissions of nociceptive information. **Pain.** 13:1-85, 1982.
- YAKSH, T. L. Regulation of spinal nociceptive processing: where we went when we wandered onto the path marked by the gate. **Pain Suppl** 6: S149-152, 1999.
- YU, Y., XIONG, Z., LV, Y., QIAN, Y., JIANG, S., TIAN, Y. In vivo evaluation of early disease progression by X-ray phase-contrast imaging in the adjuvant-induced arthritic rat. **Skeletal Radiol** 35: 156-164, 2006.
- ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in

conscious animals. **Pain.** 16, 109-110, 1983.

**ANEXO 1 – ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO
EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY**

Available online at www.sciencedirect.com

European Journal of Medicinal Chemistry 43 (2008) 1237–1247

**EUROPEAN JOURNAL OF
MEDICINAL
CHEMISTRY**
<http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Original article

Design and microwave-assisted synthesis of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoles: Novel agents with analgesic and anti-inflammatory properties

Patricia D. Sauzem^b, Pablo Machado^a, Maribel A. Rubin^b,
Gabriela da S. Sant'Anna^b, Henrique B. Faber^b, Alessandra H. de Souza^b,
Carlos F. Mello^c, Paulo Beck^a, Robert A. Burrow^a, Helio G. Bonacorso^a,
Nilo Zanatta^a, Marcos A.P. Martins^{a,*}

^a Núcleo de Química de Heterociclos (NUQUIMHE), Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas,
Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

^b Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia, Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas,
Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

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

Received 23 March 2007; received in revised form 12 July 2007; accepted 20 July 2007

Available online 15 August 2007

Abstract

In this work, we reported the synthesis and evaluation of the analgesic and anti-inflammatory properties of novel 3- or 4-substituted 5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1*H*-1-carboxamidepyrazoles (where 3-/4-substituent = H/H, Me/H, Et/H, Pr/H, *i*-Pr/H, Bu/H, *t*-Bu/H, Ph/H, 4-Br-Ph/H and H/Me) designed in the exploration of the bioisosteric replacement of benzene present in salicylamide with a 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole scaffold. Target compounds were synthesized from the cyclocondensation of 4-alkoxy-1,1,1-trifluoromethyl-3-alken-2-ones with semicarbazide hydrochloride through a rapid one-pot reaction via microwave irradiation. In addition to spectroscopic data, the structure of the compounds was supported by X-ray diffraction. Subcutaneous administration of the 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoles decreased pain-related behavior during neurogenic and inflammatory phases of the formalin test in mice. Moreover, the more active analgesic compounds (3-/4 = Et/H and H/Me) significantly decreased carrageenan-induced paw edema in mice. The data obtained in this work suggest that the synthesized compounds could be promising candidates for the future development of novel analgesic and anti-inflammatory agents.
© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Pyrazoles; Microwave-assisted synthesis; Analgesic; Anti-inflammatory; Pain

1. Introduction

Although pain is the most common complaint in the medical field, the arsenal of effective and safe analgesics is still relatively small. Thus, the identification of compounds that can effectively treat painful states without induction of side effects remains a major challenge in biomedical research [1].

Pyrazoles and their derivatives are widely known for their excellent effectiveness as analgesics and antipyretics, dipyron being a well documented and commercially available example [1]. This compound is a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) used with success in the treatment of fever and pain showing a relatively weak anti-inflammatory effect [1,2]. Other NSAIDs have been used in the treatment of chronic arthropathies, as well as for fever and pain. However, long-term use of these agents is limited by a high incidence of unpleasant effects in the gastrointestinal tract since these

* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8756; fax: +55 55 3220 8031.
E-mail address: mmartins@base.ufsm.br (M.A.P. Martins).

complications are a major cause of morbidity and mortality produced by NSAIDs [3]. Nonetheless, some data have shown that the ulcerogenic activity of dipyron in rats and humans is substantially lower than the risk associated with other NSAIDs, such as acetylsalicylic acid and diclofenac, commonly used for pain relief [4,5]. These findings suggest better tolerability of dipyron in relation to other NSAIDs.

In this context, our research group has reported the biological effect of novel pyrazole derivatives in animal models of inflammation, fever and pain [6–11]. The lead-like compound, 3-methyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-4,5-dihydro-1*H*-1-carboxamidepyrazole (MPCA) possessed analgesic, but not anti-inflammatory properties against neurogenic, inflammatory and visceral pain in rodents [6]. This effect seemed to be related with the activation of spinal α_2 -adrenoceptors and 5-HT receptors, but not with opioid receptor stimulation [7].

In accordance with the increasing interest in the medicinal chemistry community in technologies and concepts that facilitate a more rapid synthesis and, consequently, the screening of novel chemical substances [12], we have demonstrated the use of microwave irradiation in heterocyclic preparations [13,14]. This form of energy has been recently used to accelerate organic reactions due to its high heating efficiency, providing a remarkable rate of enhancement and a dramatic reduction in reaction times. Reactions that require hours or even days by conventional heating can often be accomplished in seconds or minutes by microwave heating [15].

In this study, our initial efforts were focused on the design of new pyrazole derivatives to be used as analgesics. For this purpose, we have explored the hypothesis that benzene, which is present in salicylamide, could be mimicked with an appropriate 3- or 4-substituted 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole scaffold (Fig. 1). Salicylamide is a salicylate derivative endowed with good analgesic and antipyretic activity [16,17]. In addition, the presence of a trifluoromethyl group within cyclic compounds, especially at a strategic position, has become an important aspect to be studied in pharmaceutical research, due to the unique physical and biological properties of fluorine [18]. In many systems, the substitution of a methyl group with a trifluoromethyl group, for example, has resulted in added lipophilicity, which may lead to easier absorption and transportation of molecules within biological systems and thereby improve the overall pharmacokinetic properties of drug candidates [18,19].

Thus, in an attempt to identify novel pyrazole derivatives endowed with analgesic activity and as a part of our search

for basic information about the structural requirements for the analgesic properties of such compounds, we have synthesized a series of 3-alkyl(aryl)-5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-1-carboxamidepyrazoles using microwave induced techniques (Scheme 1). Furthermore, we investigated the analgesic and anti-inflammatory profile of the synthesized compounds in mice. The effects of bioactive pyrazoles on other behavioral measures, such as spontaneous and forced locomotion were also evaluated.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

Over the last decade, our research group has reported the general synthesis of 1,1,1-trihalo-4-alkoxy-3-alken-2-ones, which are 1,3-dielectrophilic building blocks, and have demonstrated their use in the preparations of a wide range of heterocyclic compounds [20]. In this study, the 1,1,1-trifluoromethyl-4-alkoxy-3-alken-2-ones **1** were synthesized from the reaction of the respective enol ether or acetal with trifluoroacetic anhydride [21,22]. The 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoles **2** were synthesized by the cyclocondensation reaction of the enones **1** with semicarbazide hydrochloride (Scheme 1).

The mixture of enones **1** and semicarbazide hydrochloride reacted in the presence of pyridine and methanol/water solution (3:1 v/v) as solvent. The solution was submitted to microwave irradiation (100 W) for 4 min, at a temperature of 70 °C and at 2.2 bar of pressure, to produce 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoles **2** with yields of 82–96%. The new method for forming 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoles under microwave irradiation offers several advantages including faster reaction rates, fewer byproducts, and higher yields, while the conventional method entails moderate yields and a long process (ca. 24 h) [23].

¹H and ¹³C NMR, mass spectral data and elemental analysis of all compounds are in full agreement with the proposed structure. In addition to these data, the structures of the two most active compounds (**2c** and **2j**) were supported by crystallographic studies (Figs. 2 and 3). On the basis of these experiments, it was observed that the presence of intramolecular hydrogen bonds between the carbonyl and the hydroxyl groups of tetrasubstituted pyrazole rings generated a six membered ring with O...H bond distances of 2.17 Å [O(5)–H(5)...O(11)] and 2.28 Å [O(5)–H(5)...O(11)] in structures of **2c** and **2j**, respectively [25].

2.2. Pharmacological studies

2.2.1. Formalin test

All compounds **2a–j** were screened for analgesic activity using the formalin test in mice. In Figs. 4 and 5 the effect of these novel pyrazole derivatives on formalin-induced neurogenic and inflammatory pain is shown. The synthesized compounds **2a**, **2c–e**, **2g**, **2i** and **2j** exhibited a significant analgesic effect on neurogenic and inflammatory phases of the formalin test. Compound **2b** was ineffective on neurogenic

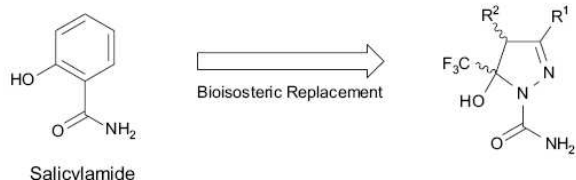
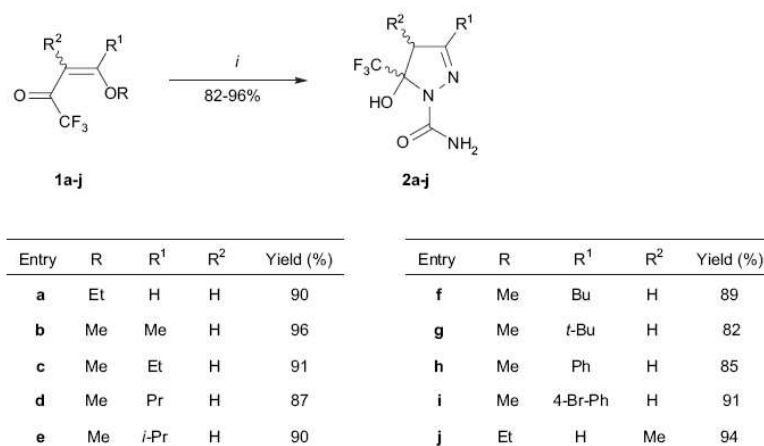
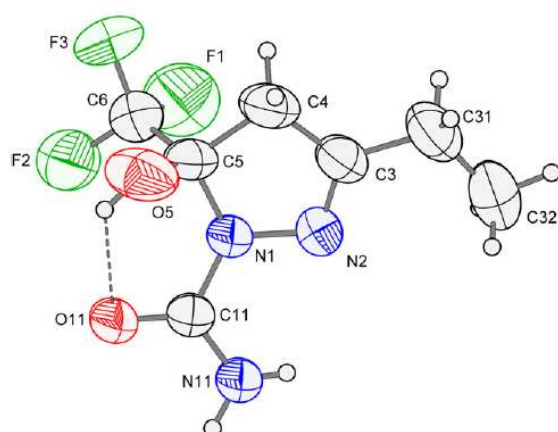
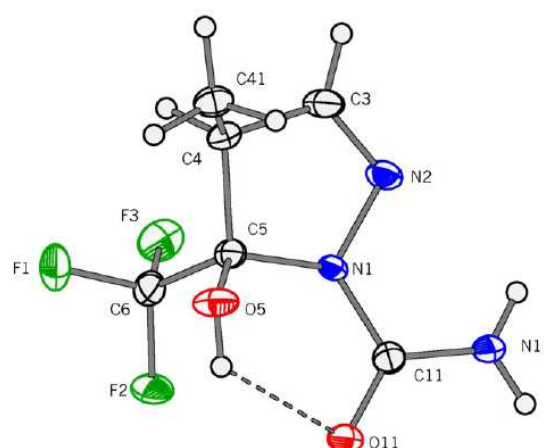


Fig. 1. Design of the new 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoles based on the bioisosteric replacement of the benzene scaffold of salicylamide.

Scheme 1. Reagents and conditions: (i) $\text{NH}_2\text{NHCONH}_2 \cdot \text{HCl}$, $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, Py, MW, 100 W, 70 °C, 2.2 bar, 4 min.

pain, causing a significant analgesic effect only in the inflammatory phase of the test. On the other hand, compound **2f** showed a significant analgesic effect in the neurogenic phase but was ineffective in the inflammatory phase (data not shown in Fig. 5). Furthermore, the 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole **2h** proved to be ineffective against the pain response induced by formalin (data not shown in Fig. 5). Interestingly, compounds **2d** and **2e** presented an analgesic profile that was not linear with the dose. In the inflammatory phase, **2d** presented an effect at doses of 75 and 750 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ but not at 250 $\mu\text{mol}/\text{kg}$. On the other hand, **2e** had an analgesic effect at all doses tested in the inflammatory phase, but, surprisingly, the greatest effect was achieved at the smallest dose (25 $\mu\text{mol}/\text{kg}$). It would be possible to explain this dose-independent profile through future research on the mechanism(s) of action for the 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole derivatives.

Another interesting observation was the different profile of the action of compound **2b** in relation to its analogue 3-methyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-4,5-dihydro-1*H*-1-carboxamidepyrazole (MPCA), which has been previously reported [6]. Compound **2b** was ineffective against formalin-induced neurogenic pain, while MPCA caused analgesia at a similar dose as that administered in the present study [6]. However, **2b** was more potent than MPCA to induce analgesia against inflammatory pain. Therefore, the replacement of the trichloromethyl group at position 5 of the pyrazole ring by a trifluoromethyl group seems to increase the analgesic potency of the novel pyrazoles. Compound **2h** is structurally similar to 3-phenyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-4,5-dihydro-1*H*-1-carboxamidepyrazole (PPCA), a pyrazole derivative also previously described [7,8]. Different from PPCA, **2h**

Fig. 2. ORTEP [24] obtained from crystal structure of 3-ethyl-5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-1-carboxamidepyrazole (**2c**). Displacement ellipsoids are drawn at the 50% probability level. The intramolecular hydrogen bond is indicated with dashed lines.Fig. 3. ORTEP [24] obtained from crystal structure of 5-hydroxy-4-methyl-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-1-carboxamidepyrazole (**2j**). Displacement ellipsoids are drawn at the 50% probability level. The intramolecular hydrogen bond is indicated with dashed lines.

did not exhibit an analgesic effect in mice. This discrepancy may be explained by the different models of pain used to evaluate the analgesic effect of PPCA and **2h**. One significant change caused by the replacement of trichloromethyl with a trifluoromethyl group is related to their differences in size. While the van der Waals radius of chlorine has been shown to be 1.81 Å [26], the fluorine atom has shown a van der Waals radius of 1.47 Å [27]. This greater size of chlorine could cause steric effects at putative receptor sites, thus changing the pharmacological properties of the compounds.

In order to determine the most promising compounds for the next tests, we calculated the analgesic efficacy of the 4,5-dihydro-1*H*-pyrazoles in both the neurogenic and inflammatory phases. As shown in Table 1, compounds **2c** and **2j**, at a dose of 1000 µmol/kg, presented the best analgesic efficacy against neurogenic and inflammatory pain. Therefore, these compounds were selected for evaluation with hot-plate, carrageenan-induced paw edema, rotarod and spontaneous locomotor activity tests. Furthermore, the analgesic efficacy of **2c** and **2j** in the formalin test was compared with that of dipyrone and salicylamide (Fig. 6). Compounds **2c**, **2j** and dipyrone, but not salicylamide, were effective against formalin-induced neurogenic pain. Moreover, compounds **2c** and **2j** were equally effective against inflammatory pain, but more effective than salicylamide and dipyrone. These data suggest that the replacement of the benzene from salicylamide with a 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole scaffold was well tolerated leading to compounds with better analgesic efficacy than salicylamide. It is noteworthy that the crystallographic studies revealed that the 4,5-dihydro-1*H*-pyrazole rings, similar to the benzene ring, showed a planar structure where the sum of internal angles [N(1)–N(2)–C(3)–C(4)–C(5)] was found to be 539.65° and 539.8° for compounds **2c** and **2j**, respectively, deviating only slightly from the ideal value of 540°. This fact may be associated with the retention of analgesic activity of the pyrazole derivatives of salicylamide as the structural planarity often guides the molecular elements toward the correct binding pockets of the putative target.

The analgesic profile of compounds **2a–j** also suggests that the analgesic efficacy is greater when R¹ is an ethyl or when R² is a methyl group such as in compounds **2c** and **2j**, respectively. Furthermore, a change in the methyl group from R² to R¹ seemed to decrease the analgesic effect (**2j** versus **2b** compound).

Another interesting finding is that most of the pyrazole derivatives, similar to dipyrone and unlike most of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), were effective in preventing the neurogenic pain response induced by formalin [28–30]. The analgesic effect of such pyrazole compounds during the neurogenic phase of the formalin test may suggest that they have a different mechanism of action than classical NSAIDs. Neurogenic pain generally responds poorly to conventional analgesics and its treatment can be difficult [31,32]. Therefore, to discover new drugs for treatment of this kind of pain is clinically relevant.

2.2.2. Hot-plate test

The subcutaneous administration of pyrazole compounds **2c** and **2j** (1000 µmol/kg) did not produce an analgesic effect according to the thermal behavior model of pain, the hot-plate test, maintained at 50 °C (Fig. 7). On the other hand, dipyrone (1500 µmol/kg), included in the experiment as an internal standard, increased the latency response after subcutaneous administration.

There is controversy in the literature about the usefulness of the thermal stimulus test for the evaluation of the analgesic efficacy of mild analgesics, such as NSAIDs. Some authors consider that NSAIDs, as well as dipyrone, are not effective in thermal stimulation tests [33,34]. In contrast, other groups have found that dipyrone is effective against the nociception produced by the thermal stimulus [35–38]. The discrepancies in the literature are probably due to differences in the intensity of the thermal stimulus applied [39–41]. When the intensity of the thermal stimulus is around 50 °C, the antinociceptive effect of mild analgesics has been detected [39,41]. In our work, high doses of **2c** and **2j** were not evaluated due to their low solubility in the vehicle used. The lack of analgesic effect may, therefore, be attributed to the low doses. In summary, our findings suggest that **2c** and **2j** have a different analgesic profile in relation to dipyrone, perhaps because they present a different mechanism of action or different analgesic potency.

2.2.3. Evaluation of anti-inflammatory action in carrageenan-induced paw edema test

The pyrazole compounds **2c** and **2j** (1000 µmol/kg) were evaluated for anti-inflammatory activity by the carrageenan-induced paw edema test, a suitable experimental animal model, widely used for determining acute inflammation [42]. The inflammation induced by carrageenan is believed to be biphasic [42]. The early phase (up to 1 h) involves the release of histamine, serotonin and bradykinin and the late phase (over 1 h) is due to the release of prostaglandin-like substances [43,44]. Based on this, a decrease in the second phase may be, at last in part, explained by inhibition of cyclooxygenase [44].

Fig. 8 shows that the intraplantar injection of carrageenan in mice produced an increase in paw volume, a signal of inflammation. However, carrageenan-induced paw edema was significantly prevented in a time-dependent manner by previous treatment with compounds **2c** and **2j** at a dose of 1000 µmol/kg. In fact, when the paw volume was evaluated 30 min after the carrageenan injection, **2c** and **2j** did not prevent the development of paw edema. In contrast, **2c** and **2j** presented an anti-edematogenic effect when evaluated 4 h after the induction of inflammation. This inhibition of paw edema, only in the late phase of inflammation, suggests that the 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoles **2c** and **2j** act on prostaglandin biosynthesis, which is involved in the late phase of carrageenan-induced inflammation.

It is important to consider that **2c** and **2j** inhibited carrageenan-induced inflammation almost equally (43.7 ± 8.1% and 34.6 ± 12.8%, respectively), suggesting that the R¹ or R²

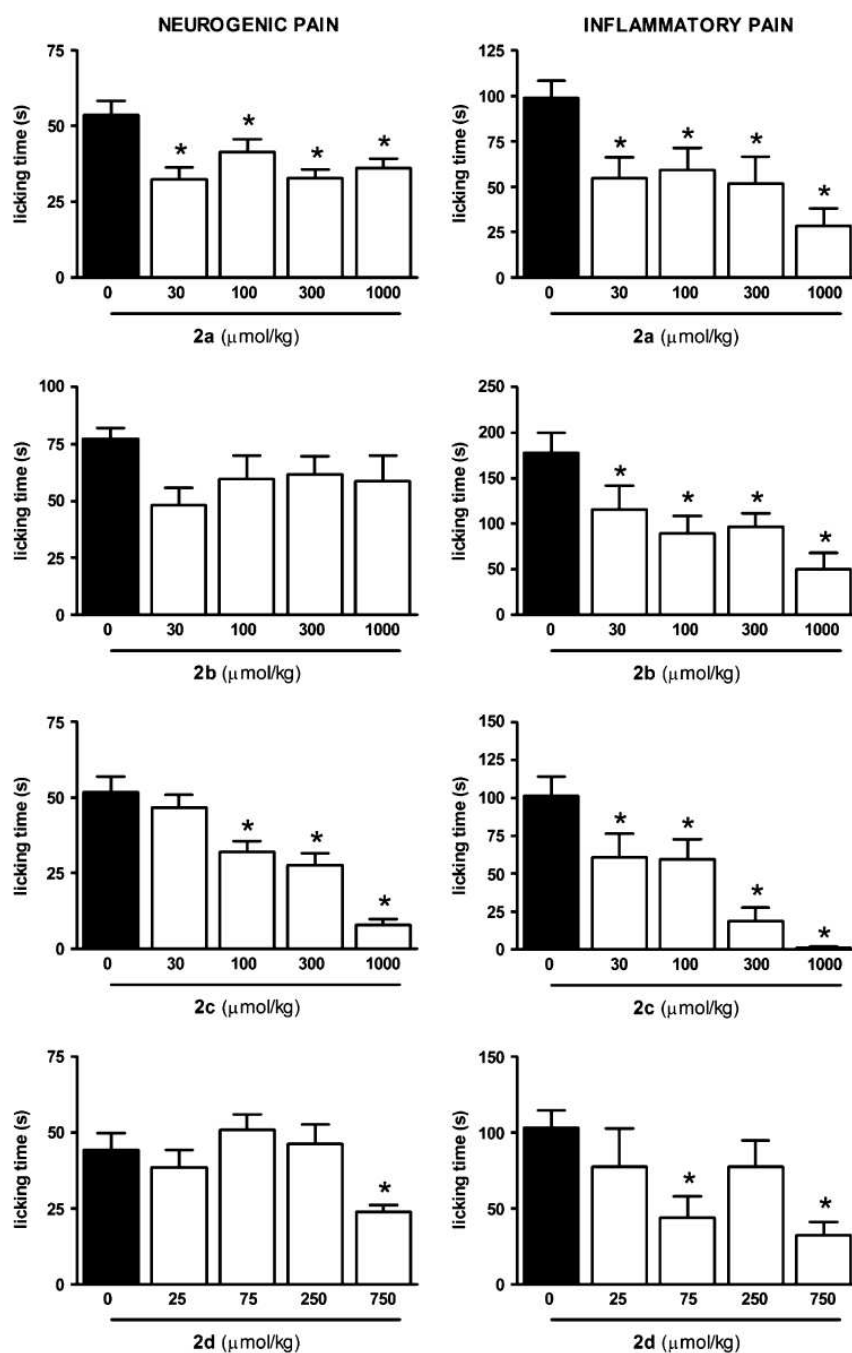


Fig. 4. Effect of novel pyrazole derivatives **2a–d** on nociception during neurogenic and inflammatory phases of the formalin test in mice. Data are reported as mean \pm SEM; * p < 0.05 compared to vehicle (SNK test).

substituent did not significantly affect the anti-inflammatory effect.

In contrast with compounds **2c** and **2j**, the trichloromethylated analogue, MPCA, was ineffective against carrageenan-

induced paw edema [6]. As the substitutions in R^1 and R^2 positions seem not to modify the anti-inflammatory efficacy of these compounds, it is possible that such an effect is due to the trifluoromethyl group attached at position 5 of

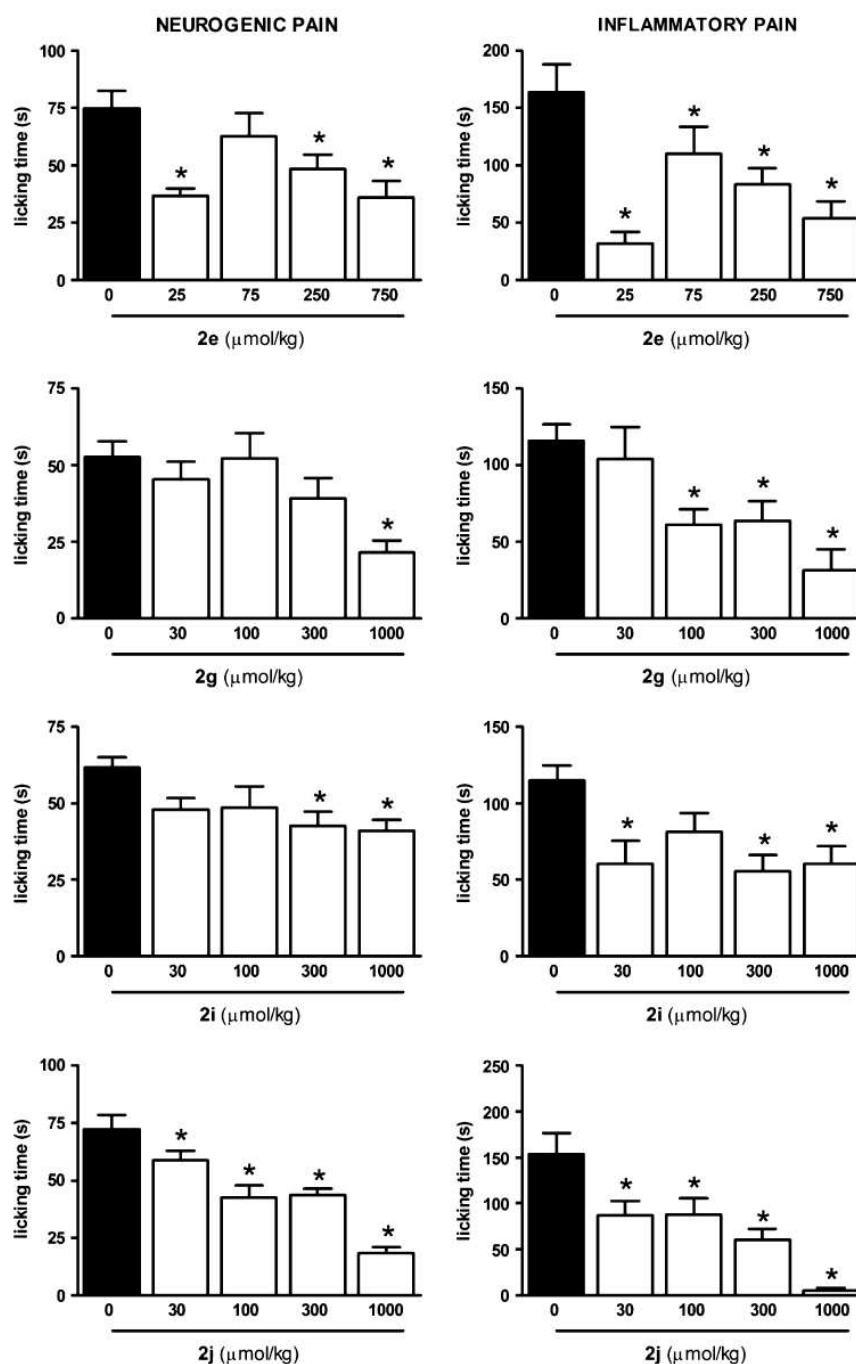


Fig. 5. Effect of novel pyrazole derivatives **2e**, **2g**, **2i** and **2j** on nociception during neurogenic and inflammatory phases of the formalin test in mice. Data are reported as mean \pm SEM; * $p < 0.05$ compared to vehicle (SNK test).

4,5-dihydro-1*H*-pyrazole ring. One plausible hypothesis for this fact is that the presence of CF_3 group provides compounds metabolically more stable in comparison to their isostere CCl_3 group [27]. Such an alteration is based on the premise that fluorine forms a strong bond with carbon (bond energy

$\text{C-F} = 116 \text{ kcal/mol}$) [27], which has an increased oxidative and thermal stability compared with the carbon–chlorine bond ($\text{C-Cl} = 87 \text{ kcal/mol}$) [45]. Therefore, this greater stability can lead to better bioavailability of the trifluoromethylated compounds in relation to their trichloromethylated

Table 1
Analgesic efficacy of 4,5-dihydro-1*H*-pyrazoles **2a–j** (1000 $\mu\text{mol/kg}$) on neurogenic and inflammatory phases of the formalin test in mice

Entry	Analgesia (%)		N	
	Neurogenic phase	Inflammatory phase	Vehicle	Treated
2a	32.8 \pm 6.2*	70.8 \pm 9.6*	17	15
2b	23.3 \pm 11.9	55.5 \pm 10.5*	9	8
2c	87.9 \pm 3.6*	98.2 \pm 1.3*	14	9
2d	48.2 \pm 4.7*	70.1 \pm 8.4*	16	12
2e	51.9 \pm 9.5*	67.0 \pm 8.8*	10	9
2f	46.0 \pm 7.2*	–22.3 \pm 15.1	6	8
2g	59.1 \pm 7.6*	72.9 \pm 11.9*	12	11
2h	10.0 \pm 11.8	8.2 \pm 17.1	8	8
2i	33.3 \pm 5.9*	47.3 \pm 9.8*	17	18
2j	74.6 \pm 3.6*	97.2 \pm 1.6*	10	10

Values are reported as means \pm SEM; N is the number of animals in each group.

* Statistically different from vehicle ($p < 0.05$; SNK test).

analogues thus being able to demonstrate a significant effect in the late phase of carrageenan-induced inflammation. However, further investigation is necessary to clarify this point.

2.2.4. Rotarod test and spontaneous locomotor activity evaluation

Tables 2 and 3 show that **2c** and **2j** did not alter rotarod performance and spontaneous locomotor activity of mice, respectively. However, salicylamide increased spontaneous locomotor activity. These results indicate that the observed decrease in pain-related behavior in both the neurogenic and inflammatory phases of the formalin test, after administration of **2c** and **2j**, was not related to gross motor impairment since locomotion was not affected. Nevertheless, salicylamide increased the locomotor activity of mice, suggesting that it induces other effects besides analgesia. In addition, the compounds did not cause the death of the animals in a 72 h observation period, an indication of low toxicity, at least after acute administration.

3. Conclusion

In summary, we have demonstrated here, for the first time, that the 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole scaffold

behaves like benzene bioisosteres, supplying novel analgesic and anti-inflammatory pyrazole derivatives. The synthesized compounds **2a–j** were obtained with the use of microwave-assisted synthesis in a significantly shorter time (4 min) and with high yields (82–96%). Our results suggest that 4,5-dihydro-1*H*-pyrazoles **2a**, **2c–g**, and **2i–j**, unlike most of the NSAIDs, have an additional and interesting analgesic action, in that these compounds were effective on neurogenic pain. However, further investigations are necessary to elucidate their mechanism of action and their effect on other models of pain, including chronic and neuropathic pain models. Finally, the results showed that 5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-1-carboxamidepyrazoles are promising candidates for the future development of novel drugs for the treatment of pain and inflammatory diseases.

4. Experimental protocols

4.1. Chemistry

Unless otherwise indicated, all common reagents were used as obtained from commercial suppliers without further purification. The solvents were dried and purified according to recommended procedures [46]. All melting points were measured using a Reichert-Thermovar apparatus and are uncorrected. Yields listed are of isolated compounds. ^1H and ^{13}C NMR spectra were acquired on a Bruker DPX 200 or Bruker DPX 400 spectrometer (^1H at 200.13 MHz or 400.13 MHz and ^{13}C at 50.32 MHz or 100.63 MHz, respectively) at 300 K, 5 mm sample tubes, and with a digital resolution of ± 0.01 ppm. CDCl_3 was used as solvent with TMS as internal standard. Mass spectra were registered in a HP 5973 MSD connected to a HP 6890 GC and interfaced by a Pentium PC. The GC was equipped with a split-splitless injector, autosampler cross-linked HP-5 capillary column (30 m, 0.32 mm of internal diameter), and helium was used as the carrier gas. The reactions were performed in a multimode microwave *ETHOS 1* (Milestone Inc) which possesses a twin magnetron with a maximum delivered power of 1300 W. The temperature and the pressure were measured throughout with an ATC-400 CE and APC-55 detector, respectively. The crystal data were recorded on a Bruker Kappa Apex

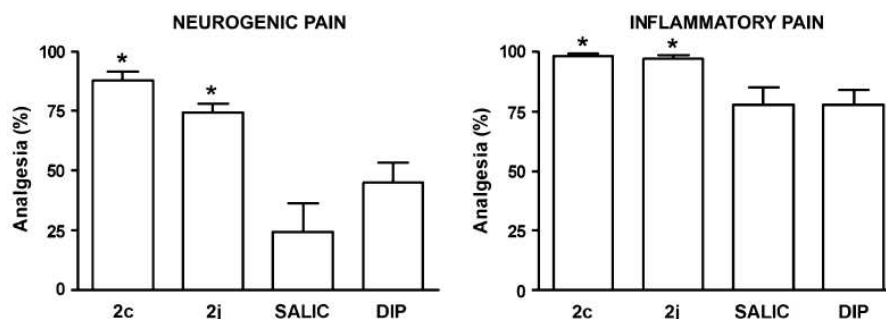


Fig. 6. Comparison between analgesic efficacy of **2c**, **2j** (1000 $\mu\text{mol/kg}$), salicylamide (1500 $\mu\text{mol/kg}$) (SALIC) and dipyron (1000 $\mu\text{mol/kg}$) (DIP) in the formalin test. Data are reported as mean \pm SEM for $n = 6–9$, * denotes a significant difference with regards to salicylamide and dipyron ($p < 0.05$; SNK test).

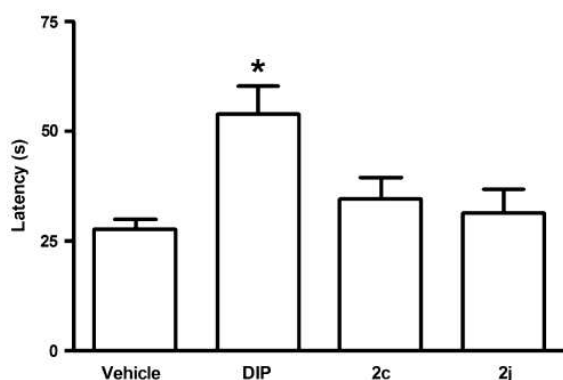


Fig. 7. Effect of pyrazole derivatives **2c** and **2j** (1000 µmol/kg), dipyrone (1500 µmol/kg) or vehicle on the latency to response from thermal stimulus on the hot-plate test. Data are reported as mean ± SEM for $n = 14$ –15 animals per group; * $p < 0.05$ compared to vehicle (SNK test).

II CCD area detector with graphite monochromatized Mo K α radiation ($\lambda = 0.71073$ Å). The data were processed with SAINT and SADABS. The structure was solved by direct methods (SHELXS-97) and additional atoms were located in the Fourier map and refined on F2 (SHELXL-97) using the SHELXTL [47] and Wingx [48] packages. The CHN elemental analyses were performed on a Perkin-Elmer 2400 CHN elemental analyzer (Federal University of São Paulo, USP/Brazil).

4.1.1. General procedure for the synthesis of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles **2a–j**

A solution of 4-alkoxy-1,1,1-trifluoro-3-alken-2-ones **1** (2 mmol) and semicarbazide hydrochloride (0.268 g, 2.4 mmol) in methanol/water 3:1 v/v (6 mL) and pyridine (2 mL) was stirred for a few minutes. The mixture was then irradiated in a microwave ETHOS 1 at 100 W, 2.2 bar of pressure for 4 min. The temperature was set to 70 °C and the irradiation was automatically stopped at this temperature. After cooling to room temperature, the solution was extracted with

chloroform (2 × 20 mL) and ethyl acetate (2 × 20 mL). The organic layers were washed with a solution of H₂O/HCl (10:1) (2 × 10 mL) and with distilled water (2 × 10 mL). Finally, the organic layers were combined and dried with magnesium sulfate, the solvent was removed by rotatory evaporation; the 5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-1-carboxyamidopyrazoles **2a–j** were isolated. When necessary, the products were recrystallized from hexane.

4.1.1.1. 5-Hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-1-carboxyamidopyrazole (2a). Yield 1.8 mmol (90%); mp 125–127 °C; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ (J, Hz) 3.18 (dd, 1H, $J_{H4a-H4b} = 19.6$, H4a), 3.35 (dd, 1H, $J_{H4b-H4a} = 19.6$, H4b), 6.89 (s, 1H, H3); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (J_{C-F} , Hz) 45.2 (C4), 89.4 (q, $^2J = 33.9$, C5), 123.1 (q, $^1J = 286.1$, CF₃), 143.1 (C3), 156.3 (C=O); MS-EI (70 eV); m/z (%) = 197 (M⁺, 1), 154 (9), 128 (4), 85 (100), 69 (14); Anal. Calcd. for C₅H₆F₃N₃O₂: C, 30.47%; H, 3.07%; N, 21.32%. Found: C, 30.69%; H, 2.86%; N, 21.12%.

4.1.1.2. 5-Hydroxy-3-methyl-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-1-carboxyamidopyrazole (2b). Yield 1.92 mmol (96%); mp 108–110 °C; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ (J, Hz) 2.02 (s, 3H, Me), 3.11 (d, 1H, $J_{H4a-H4b} = 19.0$, H4a), 3.24 (d, 1H, $J_{H4b-H4a} = 19.1$, H4b), 5.6 (br, 2H, NH₂); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (J_{C-F} , Hz) 15.3 (CH₃), 47.4 (C4), 90.6 (q, $^2J = 33.9$, C5), 123.1 (q, $^1J = 286.1$, CF₃), 152.9 (C3), 156.7 (C=O); MS-EI (70 eV); m/z (%) = 211 (M⁺, 6), 168 (26), 99 (100), 69 (14); Anal. Calcd. for C₆H₈F₃N₃O₂: C, 34.13%; H, 3.82%; N, 19.90%. Found: C, 34.43%; H, 3.57%; N, 19.64%.

4.1.1.3. 3-Ethyl-5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-1-carboxyamidopyrazole (2c). Yield 1.82 mmol (91%); mp 83–85 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (J, Hz) 1.15 (t, 3H, CH₃), 2.34 (q, 2H, CH₂), 3.11 (d, 1H, $J_{H4a-H4b} = 19.0$, H4a), 3.24 (d, 1H, $J_{H4a-H4b} = 19.0$, H4b), 5.09 (br, 2H, NH₂); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (J_{C-F} , Hz) 9.7 (CH₃),

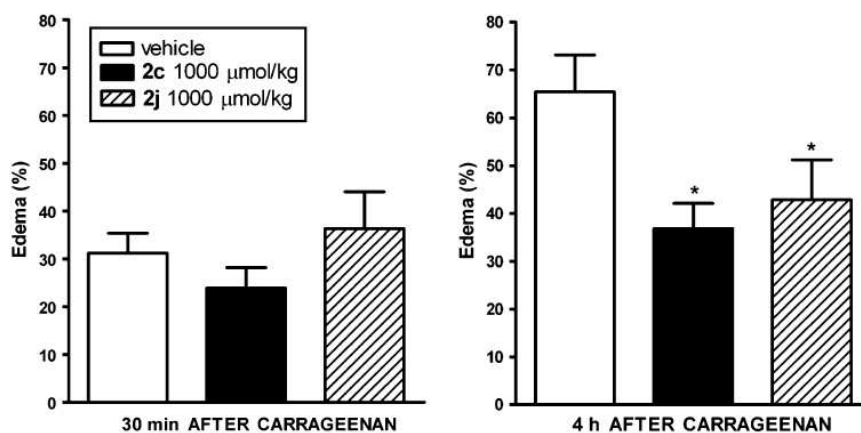


Fig. 8. Effect of pyrazole derivatives **2c** and **2j** (1000 µmol/kg) or vehicle on the paw edema induced by carrageenan (20 µl, 1.5%, ipi) 30 min and 4 h after paw edema-induction in mice. Data are reported as mean ± SEM for $n = 14$ –16 animals per group; * $p < 0.05$ compared to vehicle (SNK test).

Table 2
Effects of 4,5-dihydro-1*H*-pyrazoles **2c** and **2j** on rotarod performance

Group	Fall latency (s)	Number of falls
Vehicle	76.9 ± 17.0	5.4 ± 1.3
2c 1000 μmol/kg	112.5 ± 21.3	3.7 ± 2.1
2j 1000 μmol/kg	62.6 ± 17.6	5.1 ± 1.0

Data are means ± SEM for 14 to 15 animals per group.

22.7 (CH₂), 45.7 (C4), 90.3 (q, ²*J* = 33.9, C5), 123.1 (q, ¹*J* = 286.1, CF₃), 156.8 (C=O), 157.3 (C3); MS-EI (70 eV): *m/z* (%) = 225 (M⁺, 5), 182 (17), 113 (100), 85 (18), 69 (7); Anal. Calcd. for C₇H₁₀F₃N₃O₂: C, 37.34%; H, 4.48%; N, 18.66%. Found: C, 37.15%; H, 4.13%; N, 18.29%.

4.1.1.4. 5-Hydroxy-3-propyl-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-1-carboxyamidopyrazole (**2d**). Yield 1.74 mmol (87%); mp 68–70 °C; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ (*J*, Hz) 0.97 (t, 3H, CH₃), 1.62 (sex, 2H, CH₂), 2.31 (t, 2H, CH₂), 3.09 (d, 1H, *J*_{H4a–H4b} = 18.9, H4a), 3.24 (d, 1H, *J*_{H4a–H4b} = 18.9, H4b), 5.66 (br, 2H, NH₂); ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃) δ (*J*_{C–F}, Hz) 13.4 (CH₃), 19.4 (CH₂), 31.5 (CH₂), 46.0 (C4), 90.4 (q, ²*J* = 33.9, C5), 123.2 (q, ¹*J* = 286.1, CF₃), 156.4 (C3), 156.8 (C=O); MS-EI (70 eV): *m/z* (%) = 239 (M⁺, 6), 196 (18), 168 (8), 127 (100), 85 (29), 69 (8); Anal. Calcd. for C₈H₁₂F₃N₃O₂: C, 40.17%; H, 5.06%; N, 17.57%. Found: C, 40.40%; H, 4.85%; N, 17.28%.

4.1.1.5. 5-Hydroxy-3-isopropyl-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-1-carboxyamidopyrazole (**2e**). Yield 1.8 mmol (90%); mp 78–80 °C; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ (*J*, Hz) 1.18 (d, 6H, C₂H₆), 2.63 (sep, 1H, CH), 3.10 (d, 1H, *J*_{H4a–H4b} = 18.8, H4a), 3.26 (d, 1H, *J*_{H4a–H4b} = 18.8, H4b), 5.35 (br, 2H, NH₂); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (*J*_{C–F}, Hz) 19.5 (C₂H₆), 29.4 (CH), 44.1 (C4), 90.5 (q, ²*J* = 33.9, C5), 123.2 (q, ¹*J* = 286.1, CF₃), 156.9 (C=O), 160.7 (C3); MS-EI (70 eV): *m/z* (%) = 239 (M⁺, 19), 196 (57), 181 (29), 127 (100), 85 (98), 69 (23); Anal. Calcd. for C₈H₁₂F₃N₃O₂: C, 40.17%; H, 5.06%; N, 17.57%. Found: C, 40.30%; H, 4.90%; N, 17.52%.

4.1.1.6. 3-Butyl-5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-1-carboxyamidopyrazole (**2f**). Yield 1.78 mmol (89%); mp

59–61 °C; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ (*J*, Hz) 0.93 (t, 3H, CH₃), 1.36 (sex, 2H, CH₂), 1.55 (quin, 2H, CH₂), 2.33 (t, 2H, CH₂), 3.09 (d, 1H, *J*_{H4a–H4b} = 18.8, H4a), 3.23 (d, 1H, *J*_{H4a–H4b} = 18.8, H4b), 5.06 (br, 2H, NH₂); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (*J*_{C–F}, Hz) 12.3 (CH₃), 21.9 (CH₂), 27.8 (CH₂), 29.0 (CH₂), 45.9 (C4), 90.0 (q, ²*J* = 33.9, C5), 123.1 (q, ¹*J* = 286.1, CF₃), 156.4 (C3), 156.8 (C=O); MS-EI (70 eV): *m/z* (%) = 253 (M⁺, 9), 210 (25), 168 (71), 141 (100), 85 (43), 69 (16); Anal. Calcd. for C₉H₁₄F₃N₃O₂: C, 42.69%; H, 5.57%; N, 16.59%. Found: C, 42.83%; H, 5.19%; N, 16.21%.

4.1.1.7. 3-*tert*-Butyl-5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-1-carboxyamidopyrazole (**2g**). Yield 1.64 mmol (82%); mp 100–102 °C; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ (*J*, Hz) 1.19 (s, 9H, C₃H₉), 3.13 (d, 1H, *J*_{H4a–H4b} = 18.8, H4a), 3.28 (d, 1H, *J*_{H4a–H4b} = 18.8, H4b), 4.99 (br, 2H, NH₂); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (*J*_{C–F}, Hz) 27.7 (C₃H₉), 34.0 (*t*-bu), 43.0 (C4), 90.8 (q, ²*J* = 33.2, C5), 123.3 (q, ¹*J* = 286.8, CF₃), 156.7 (C=O), 163.2 (C3); MS-EI (70 eV): *m/z* (%) = 253 (M⁺, 7), 195 (63), 178 (7), 141 (100), 85 (53), 69 (22); Anal. Calcd. for C₉H₁₄F₃N₃O₂: C, 42.69%; H, 5.57%; N, 16.59%. Found: C, 43.90%; H, 5.69%; N, 16.80%.

4.1.1.8. 5-Hydroxy-3-phenyl-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-1-carboxyamidopyrazole (**2h**). Yield 1.7 mmol (85%); mp 129–131 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (*J*, Hz) 3.56 (d, 1H, *J*_{H4a–H4b} = 18.8, H4a), 3.70 (d, 1H, *J*_{H4a–H4b} = 18.8, H4b), 5.68 (br, 2H, NH₂), 7.43–7.69 (m, 5H, Ph); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (*J*_{C–F}, Hz) 43.9 (C4), 91.0 (q, ²*J* = 33.9 Hz, C5), 123.2 (q, ¹*J* = 286.8, CF₃), 126.4, 128.8, 129.8, 130.9 (Ph), 151.7 (C3), 156.4 (C=O); MS-EI (70 eV): *m/z* (%) = 273 (M⁺, 33), 230 (90), 161 (100), 118 (26), 103 (52), 77 (86); Anal. Calcd. for C₁₁H₁₀F₃N₃O₂: C, 48.36%; H, 3.69%; N, 15.38%. Found: C, 48.10%; H, 3.39%; N, 15.25%.

4.1.1.9. 3-(4-Bromophenyl)-5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-1-carboxyamidopyrazole (**2i**). Yield 1.82 mmol (91%); mp 194–196 °C; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ (*J*, Hz) 3.52 (d, 1H, *J*_{H4a–H4b} = 18.8, H4a), 3.64 (d, 1H, *J*_{H4a–H4b} = 18.8, H4b), 5.6 (br, 2H, NH₂), 7.52 (d, 2H, Ph), 7.57 (d, 2H, Ph); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (*J*_{C–F}, Hz) 49.1 (C4), 91.4 (q, ²*J* = 33.9, C5), 123.3 (q, ¹*J* = 286.8, CF₃), 130.9, 133.3, 134.3, 137.6 (Ph), 156.2 (C=O), 161.4 (C3); MS-EI (70 eV): *m/z* (%) = 351 (M⁺, 15), 308 (47), 239 (100), 160 (47), 102 (55), 75 (26); Anal. Calcd. for C₁₁H₉BrF₃N₃O₂: C, 37.52%; H, 2.58%; N, 11.93%. Found: C, 37.69%; H, 2.65%; N, 12.15%.

4.1.1.10. 5-Hydroxy-4-methyl-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-1-carboxyamidopyrazole (**2j**). Yield 1.88 mmol (94%); mp 118–120 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (*J*, Hz) 1.25 (d, 3H, *J*_{CH3–H4} = 7.5, CH₃), 3.43 (qd, 1H, *J*_{H4–CH3} = 7.5, *J*_{H4–H3} = 1.5, H4), 5.64 (br, 2H, NH₂), 6.79 (d, 1H, *J*_{H3–H4} = 1.5 Hz, H3); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (*J*_{C–F}, Hz) 10.0 (CH₃), 48.2 (C4), 85.1 (q, ²*J* = 33.2, C5),

Table 3
Effect of 4,5-dihydro-1*H*-pyrazoles **2c** and **2j** and salicylamide on spontaneous locomotor activity

Group	Number of crossing	<i>N</i>
Vehicle	146.1 ± 24.7	10
2c 1000 μmol/kg	165.6 ± 30.5	8
Vehicle	115.5 ± 10.0	14
2j 1000 μmol/kg	167.3 ± 31.2	9
Vehicle	45.6 ± 7.2	9
Salicylamide 1500 μmol/kg	102.1 ± 26.4*	7
Vehicle	114.3 ± 22.8	6
Dipyron 1000 μmol/kg	87.7 ± 29.2	7

Data are means ± SEM; *N*, number of animals in each group. **p* < 0.05 compared to vehicle (SNK test).

123.5 (q, $^1J = 286.8$, CF₃), 148.5 (C3), 156.8 (C=O); MS-EI (70 eV): m/z (%) = 211 (M⁺, 3), 168 (17), 142 (22), 99 (100), 69 (10); Anal. Calcd. for C₆H₈F₃N₃O₂: C, 34.13%; H, 3.82%; N, 19.90%. Found: C, 34.38%; H, 3.55%; N, 19.65%.

4.2. Pharmacological studies

4.2.1. Animals

Adult male albino mice (30–40 g) were housed in groups of 20 per cage, at a controlled temperature (22 ± 1 °C), on a 12 h light/12 h dark cycle and with standard lab chow and water ad libitum. The animals were acclimated to the experimental room for at least 2 h before the experiments. Each animal was used only once. All experiments were performed in accordance with the ethical guidelines established for investigations of experimental pain in conscious animals [49] and were approved by the Committee on the Use and Care of Laboratory Animals of our University (register number 23081.018371/2006-94).

4.2.2. Formalin test

The analgesic activity was evaluated by the formalin test carried out as previously described [50]. Animals were injected subcutaneously with 20 μl of 1.5% formalin (v/v) into the dorsal right hindpaw.

The time spent licking or biting the injected paw or leg was recorded for 30 min at 5 min intervals. Subcutaneous administration of formalin causes a typical biphasic response of licking and biting. During the first 5 min the animals lick or bite the injected paw because formalin probably causes direct stimulation of nerve terminals and this phase is termed “neurogenic”. A second burst of licking or biting occurs between 15 and 30 min after the injection and seems to be related to the inflammatory response elicited by formalin and this phase is termed “inflammatory” [50].

Vehicle (saline plus 5% Tween 80) or the 4,5-dihydro-1*H*-pyrazoles **2a–j** (25–1000 μmol/kg) were injected subcutaneously into the dorsal region 20 min before formalin injection into the paw. Salicylamide and dipyron were used as internal standards, at effective doses previously reported [16,17] or determined by pilot experiments. Immediately after formalin injection, the mice were placed in individual glass cages (20 × 20 × 20 cm³), which served as the observation chamber, and were evaluated for 30 min.

Furthermore, the floor of the observation chamber was divided into 12 equal areas and the number of areas that a mouse crossed with all paws was recorded and was assessed simultaneously with the formalin-induced pain evaluation. The number of crossings was used as a spontaneous locomotor activity index.

Initially, the compounds were administered at the maximal possible dose in accordance with their solubility in vehicle (saline plus 5% Tween 80). Therefore, **2a–c**, **2g–j** were injected at a dose of 1000 μmol/kg, while **2d–f** were injected at a dose of 750 μmol/kg. When the compounds that produced analgesia were identified, a dose–response curve was constructed for each one.

4.2.3. Hot-plate test

The hot-plate test was carried out to determine whether the novel pyrazoles produced analgesia in a thermal model of pain. The test was performed according to the method described by Ferreira et al. [51]. In these experiments, the hot-plate (Ugo Basile, model-DS 37) was maintained at 50 ± 1 °C. Animals were placed in a glass cylinder of 24 cm diameter on the heated surface, and the time between placement and shaking, lifting or licking of the hind paws, or jumping, was recorded as the index of response latency. The cutoff latency was set to 90 s to prevent tissue damage. Twenty-four hours before the experiment, all mice were acclimated to the experimental procedure in order to minimize novelty-induced analgesia [52]. On the day of the experiment the animals were injected with vehicle or pyrazole derivatives (1000 μmol/kg, subcutaneously) and the latency time was determined 30 min thereafter. Dipyron (1500 μmol/kg, subcutaneously) was used as an internal standard at effective doses previously determined by pilot experiments.

4.2.4. Carrageenan-induced paw edema

We employed the classical model of carrageenan-induced paw edema to assess the anti-inflammatory effect of the novel pyrazoles [42,53]. Briefly, carrageenan was diluted in physiological saline at a concentration of 15 mg/ml. This solution was boiled for 1–2 s and cooled at room temperature. The mice received 20 μl of this solution in the right hindpaw, subcutaneously, on the intraplantar side. Edema formation was quantified by changes in paw volume measured before, 30 min and 4 h after carrageenan injection. The paw edema evaluation was made by immersing the injected paw into a cuvette filled with a solution of 2.5% extran in water (v/v). The cuvette was fixed on the plate of an electronic scale (precision of 0.01 g), and the careful immersion of the paw into cuvette’s solution was accompanied by an increase in the weight displayed. The weight in grams is related to the increase of the liquid column in the cuvette, but not to the mass of the paw. Since the cuvette’s solution density was 1 mg/ml, the value displayed by the balance was promptly assumed as the paw volume. In order to evaluate the effect of the pyrazole compounds, the animals received subcutaneously vehicle or pyrazole derivatives (1000 μmol/kg) 30 min before intraplantar carrageenan injection and the paw edema was calculated as to the following equation: % edema = [(V_{initial} – V_{final})/V_{initial}] × 100; where V_{initial} is the volume of the paw before carrageenan injection and V_{final} is the volume of the paw 30 min or 4 h after carrageenan injection.

4.2.5. Rotarod performance test

The rotarod test was used to assess whether the pyrazole derivatives caused gross motor impairment in the animals. Twenty-four hours before the experiment, all mice were trained in the rotarod (3.7 cm in diameter, 8 rpm) until they could remain in the apparatus for 60 s without falling. On the day of the experiment, the animals were injected with vehicle or the pyrazole derivatives (1000 μmol/kg) and subjected to the rotarod 30 min thereafter. The latency to fall from the

apparatus was recorded with a stopwatch for up to 240 s, as was the number of falls in a 4 min session [54].

4.2.6. Statistical analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA. *Post hoc* Student–Newman–Keuls test (SNK) was carried out when appropriate.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Erico M.D. Flores (Chemistry Department, Federal University of Santa Maria, Brazil) for the use of his laboratory and the multimode microwave *ETHOS I* (Milestone Inc) used in the synthesis of the compounds. The authors also thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/PRONEX), the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and the Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) for financial support. The fellowships from CNPq, CAPES and FAPERGS are also acknowledged.

References

- [1] M. Williams, E.A. Kowaluk, S.P. Arneric, *J. Med. Chem.* 42 (1999) 1481–1500.
- [2] R.N. Brodgen, *Drugs* 32 (1986) 60–70.
- [3] E. Fosslien, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 28 (2) (1998) 67–81.
- [4] S.E. Andrade, C. Martínez, A.M. Walker, *J. Clin. Epidemiol.* 51 (12) (1998) 1357–1365.
- [5] S. Sánchez, M.J. Martín, P. Ortiz, V. Motilva, C. Alarcón de La Lastra, *Dig. Dis. Sci.* 47 (6) (2002) 1389–1398.
- [6] F.R. Souza, M.R. Figuera, T.T.F. Lima, J. Bastiani, I.B. Barcellos, C.E. Almeida, M.R. Oliveira, H.G. Bonacorso, A.E. Flores, C.F. Mello, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 68 (2001) 525–530.
- [7] M.C.M. Godoy, M.R. Figuera, F.R. Souza, A.E. Flores, M.A. Rubin, M.R. Oliveira, N. Zanatta, M.A.P. Martins, H.G. Bonacorso, C.F. Mello, *Eur. J. Pharmacol.* 496 (2004) 93–97.
- [8] F.R. Souza, V.T. Ratzlaff, L.P. Borges, M.R. Oliveira, H.G. Bonacorso, N. Zanatta, M.A.P. Martins, C.F. Mello, *Eur. J. Pharmacol.* 451 (2002) 141–147.
- [9] J. Tomazetti, D.S. Ávila, A.P.O. Ferreira, J.S. Martins, F.R. Souza, C. Royer, M.A. Rubin, M.R. Oliveira, H.G. Bonacorso, M.A.P. Martins, N. Zanatta, C.F. Mello, *J. Neurosci. Methods* 147 (2005) 29–35.
- [10] Z. Tabarelli, M.A. Rubin, D.B. Berlese, P.D. Sauzem, T.P. Missio, M.V. Teixeira, A.P. Sinhorin, M.A.P. Martins, N. Zanatta, H.G. Bonacorso, C.F. Mello, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37 (2004) 1531–1540.
- [11] C.R. Prokopp, M.A. Rubin, P.D. Sauzem, A.H. de Souza, D.B. Berlese, R.V. Lourega, M.N. Muniz, H.G. Bonacorso, N. Zanatta, M.A.P. Martins, C.F. Mello, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39 (2006) 795–799.
- [12] C.O. Kappe, D. Dallinger, *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 51–63.
- [13] M.A.P. Martins, C.M.P. Pereira, P. Beck, P. Machado, S. Brondani, S. Moura, M.V.M. Teixeira, H.G. Bonacorso, N. Zanatta, *Tetrahedron Lett.* 44 (2003) 6669–6672.
- [14] M.A.P. Martins, P. Beck, W. Cunico, C.M.P. Pereira, A.P. Sinhorin, R.F. Blanco, R. Peres, H.G. Bonacorso, N. Zanatta, *Tetrahedron Lett.* 43 (2002) 7005–7008.
- [15] M. Larhed, C. Moberg, A. Hallberg, *Acc. Chem. Res.* 35 (2002) 717–727 and references therein.
- [16] H-G. Kochem, *PCT Int. Appl.* 2004052356, 2004; *Chem. Abstr.* 2004, 141, 33792.
- [17] C. Lazar, A. Kluczyk, T. Kiyota, Y. Konishi, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 6973–6982.
- [18] P. Lin, J. Jiang, *Tetrahedron* 56 (2000) 3635–3671.
- [19] M.S. Karthikeyan, B.S. Holla, N.S. Kumari, *Eur. J. Med. Chem.* 42 (2007) 30–36.
- [20] M.A.P. Martins, W. Cunico, C.M.P. Pereira, A.F.C. Flores, H.G. Bonacorso, N. Zanatta, *Curr. Org. Synth.* 1 (2004) 391–403 and references therein.
- [21] A. Colla, M.A.P. Martins, G. Clar, S. Krimmer, P. Fischer, *Synthesis* 6 (1991) 483–486.
- [22] M.A.P. Martins, G.P. Bastos, H.G. Bonacorso, N. Zanatta, A.F.C. Flores, G.M. Siqueira, *Tetrahedron Lett.* 40 (1999) 4309–4312.
- [23] H.G. Bonacorso, M.A.P. Martins, S.R.T. Bittencourt, R.V. Lourega, N. Zanatta, A.F.C. Flores, *J. Fluorine Chem.* 99 (1999) 177–182.
- [24] L.J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 565.
- [25] Full crystallographic data for structures reported in this paper have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Center (CCDC 638958 and CCDC 639836 for 2c and 2j, respectively). Copies of the data can be obtained, free of charge, on application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK (Fax: +44-01223-336033) or via www.cam.ac.uk/datarequest/cif.
- [26] P.R. Watson, S.M. Mokler, *J. Phys. Chem.* 91 (1987) 5705–5709.
- [27] B. Kevin Park, N.R. Kitteringham, P.M. O'Neill, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41 (2001) 443–470.
- [28] Z.R. Vaz, V. Cechinel Filho, R.A. Yunes, J.B. Calixto, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278 (1996) 304–312.
- [29] C.R. Corrêa, J.B. Calixto, *Br. J. Pharmacol.* 110 (1993) 193–198.
- [30] A.B. Malmberg, T.L. Yaksh, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263 (1992) 136–146.
- [31] H.T.O. Davies, I.K. Crombie, W.A.J. Macrae, *J. R. Soc. Med.* 87 (1994) 382–385.
- [32] D. Niv, M. Devor, *Pain Pract.* 6 (2006) 3–9.
- [33] H. Akman, F. Aksu, I. Gültekin, H. Özbek, U. Oral, F. Doran, F. Baysal, *Pharmacology* 53 (1996) 71–78.
- [34] J. Taylor, B. Mellström, I. Feraud, J.R. Naranjo, *Eur. J. Pharmacol.* 351 (1998) 39–47.
- [35] K.H. Carlsson, J. Helmreich, *I. Jurna, Pain* 27 (1986) 373–390.
- [36] K.H. Carlsson, *I. Jurna, Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 335 (1987) 154–159.
- [37] V. Tortorici, H. Vanegas, *Pain* 57 (1994) 197–205.
- [38] G.P. Hernández-Delgado, F.J. López-Munoz, L.A. Salazar, S.L. Cruz, *Eur. J. Pharmacol.* 469 (2003) 71–79.
- [39] S. Hunskaar, O.-G. Berge, K. Hole, *Behav. Brain Res.* 21 (1986) 101–108.
- [40] T. Nishiyama, K. Hanaoka, *Anesth. Analg.* 91 (2000) 652–656.
- [41] S.I. Anker, *Eur. J. Pharmacol.* 27 (1974) 1–4.
- [42] C.A. Winter, E.D. Risley, G.W. Nuss, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111 (1962) 544–547.
- [43] M. Di Rosa, D.A. Willoughby, *J. Pharm. Pharmacol.* 23 (1971) 297–298.
- [44] D. Salvemini, Z.Q. Wang, D.M. Bourdon, M.K. Stern, *Eur. J. Pharmacol.* 303 (1996) 217–220.
- [45] D. Lauvergna, P.C. Hiberty, D. Danovich, S. Shaik, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 5715–5720.
- [46] D.D. Perrin, W.L.F. Armarego (Eds.), *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon, Oxford, 1998.
- [47] SHELXTL 6.14, Bruker AXS Inc, Madison, WI, 2003.
- [48] L.J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* 32 (1999) 837–838.
- [49] M. Zimmermann, *Pain* 16 (1983) 109–110.
- [50] S. Hunskaar, K. Hole, *Pain* 30 (1987) 103–114.
- [51] J. Ferreira, M.M. Campos, R. Araújo, M. Bader, J.B. Pesquero, J.B. Calixto, *Neuropharmacology* 43 (2002) 1188–1197.
- [52] B. Siegfried, C.A. Netto, I. Izquierdo, *Behav. Neurosci.* 101 (1987) 436–438.
- [53] J.B. Daher, M.D. Melo, C.R. Tonussi, *Life Sci.* 76 (2005) 2349–2359.
- [54] M. Tsuda, T. Suzuki, M. Misawa, H. Nagase, *Eur. J. Pharmacol.* 307 (1996) 7–14.

ANEXO 2- MANUSCRITO

**Effect of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H- pyrazoles on chronic inflammatory
pain model in rats**

Patricia D. Sauzem^a, Gabriela da S. Sant'Anna^a, Pablo Machado^b, Marta M. M. F. Duarte^d, Juliano Ferreira^a, Carlos F. Mello^c, Paulo Beck^b, Helio G. Bonacorso^b, Nilo Zanatta^b, Marcos A. P. Martins^b and Maribel A. Rubin^a *

^a*Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia and ^bNúcleo de Química de Heterociclos (NUQUIMHE), Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97.105-900, Santa Maria, RS, Brazil.*

^c*Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, 97.105-900, Santa Maria, RS, Brazil.*

^d*Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Luterana do Brasil, 97.020-001, Santa Maria, RS, Brazil.*

*Corresponding author. Tel.: +55 55 3220-8053; Fax: +55 55 3220-8978

E-mail address: maribel.rubin@gmail.com (Maribel A. Rubin)

Abstract

Arthritis is a joint inflammatory disease, and the primary feature which patients present in the clinic is chronic pain. Nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) are commonly used for treatment of arthritis. However, long-term use of the NSAIDs has been associated with considerable morbidity, limiting their use. So, remains a need to develop new drugs for effective and safe relief of chronic inflammatory pain. In this context, the present study was designed to evaluate the antinociceptive and antiedematogenic effect of the 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazole derivatives EPFCA3 and MPFCA4 after acute and chronic administration in rats submitted to model of adjuvant-induced arthritis. Moreover, we also analyzed some biochemistry parameters indicators of toxicity after prolonged administration of these compounds. We find that acute and chronic administration of EPFCA3 and MPFCA4 produces antinociceptive, but not antiedematogenic effect, on arthritis animal model induced by CFA. In the animals that received chronic treatment with EPFCA3 and MPFCA4, were detected no toxicity signals. Dipyrene was used as positive control and their effect was similar to effect of the new pyrazoles. The activity of tissue myeloperoxidase, the tissue TNF- α level and the serum haptoglobin level were increased by CFA intraplantar injection. However, chronic administration of EPFCA3, MPFCA4 or dipyrene was no able to alter these parameters relationship to inflammation. Our results suggest that EPFCA3 and MPFCA4 seems to be good candidates for development of new drugs for pain treatment.

Key words: antinociception, pyrazole carboxiamide derivatives, tactile allodynia, paw edema, toxicity

1. Introduction

Chronic pain affects hundreds of millions of people worldwide and alters their physical and emotional functioning, decreases their quality of life and impairs their ability to work (Goldenberg et al., 1987; Ashburn et al., 1999). Osteoarthritis and rheumatoid arthritis comprise two common forms of joint inflammatory disease, and the primary feature which patients present in the clinic is chronic pain (Wilson et al., 2006).

Nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) are commonly used for treatment of arthritis. However, long-term use of the NSAIDs has been associated with considerable morbidity in terms to dyspepsia, gastrointestinal haemorrhage, renal dysfunction, aggravation of hypertension, and precipitation of heart failure (Narsinghani et al., 2006). Since the currently available therapies used in chronic inflammatory disorders fail to adequately alleviate pain in many patients, and side effects of the treatments often limit their use, there remains a need to develop new drugs for effective and safe relief of chronic inflammatory pain (Wilson et al., 2006).

Pyrazole compounds and their derivatives are widely known for their excellent effectiveness as analgesics and antipyretics (Williams et al., 1999). Moreover, some data have shown that the ulcerogenic activity of dipyron, a pyrazole derivative, in rats and humans is substantially lower than the risk associated with other NSAIDs, such as acetylsalicylic acid and diclofenac, commonly used for pain relief (Andrade et al., 1998; Sánchez et al., 2002). These findings suggest better tolerability of dipyron in relationship to other NSAIDs.

In this context, we have synthesized new pyrazole derivatives and reported their antinociceptive and antipyretic effects in animal models of inflammation, fever and pain (Souza et al., 2001; Souza et al., 2002; Godoy et al., 2004; Tomazetti et al., 2005; Tabarelli et al., 2004; Prokopp et al., 2006; Sauzem et al., 2007; Milano et al., 2008). The compounds 3-ethyl-5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-1-carboxyamidopyrazole (EPFCA3) and 4-methyl-5-hydroxy-4-methyl-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-1-carboxyamidopyrazole (MPFCA4) belong to a series of ten pyrazole derivatives recently synthesized and screened for antinociceptive and antiedematogenic activity in mice. These compounds cause antinociception in neurogenic and inflammatory pain induced by formalin, and antiedematogenic action on carragenin model after acute administration (Sauzem et al., 2007). However, until

present moment, the action in chronic models of pain and the toxicity of these compounds have not been evaluated.

The present study was designed to determine whether the 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoles derivatives EPFCA3 and MPFCA4 (Figure 1) exhibits antinociceptive and anti-inflammatory properties after acute and chronic administration in rats submitted to model of adjuvant-induced arthritis. Moreover, we also analyzed some biochemistry parameters indicative of toxicity after prolonged administration of these compounds. We also compared the action of pyrazole compounds with that of dipyrrone.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

All experiments were performed using adult male Wistar rats weighing 180-220 g. Animals were housed in groups of 6 per cage, at a controlled temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), on a 12 h light/12 h dark cycle and with standard lab chow and water *ad libitum*. The animals were acclimated to the experimental room for at least 2 h before the experiments. All experiments were performed in accordance with the ethical guidelines established for investigations of experimental pain in conscious animals (Zimmermann, 1983) and were approved by the Committee on the Use and Care of Laboratory Animals of our University (register number 23081.018371/2006-94).

2.2. Induction of inflammation

To induce inflammation, rats were briefly anesthetized (2–3 min) with halothane and 150 μl of the complete Freund's adjuvant (CFA, 1 mg/ml of heat killed *Mycobacterium tuberculosis*, from SIGMA) were injected subcutaneously into the right hind paw (Wilson et al., 2006).

2.3. Measurement of tactile allodynia

Rats were placed in cages with a wire mesh bottom which allowed full access to the paws. Behavioral habituation was allowed for approximately 15-30 min, until cage exploration and major grooming activities ceased. The area tested was the mid-plantar right hind paw. The paw was touched with 1 of a series of 7 von Frey hairs with logarithmically incremental (0.8, 1.5, 3.5, 6.0, 7.5, 10.0 and 15.0 g). The von

Frey hairs were presented perpendicular to the plantar surface with sufficient force to cause slight buckling against the paw, and held for approximately 6-8 s. Stimuli were presented at intervals of several seconds, allowing for apparent resolution of any behavioral responses to previous stimuli. Ambulation was considered an ambiguous response, and in such cases the stimulus was repeated (Chaplan et al., 1994). The 50% withdrawal threshold was determined using up-and-down method by Dixon (1980). In this paradigm, testing was initiated with the 10.0 g hair. Stimuli were always presented in a consecutive fashion, whether ascending or descending. In the absence of a paw withdrawal response to the initially selected hair, a stronger stimulus was presented. In the event of paw withdrawal, the next weaker stimulus was chosen. A total of 6 responses were registered and the 50% response threshold was calculated using the equation:

$$50\% \text{ g threshold} = 10^{[X_f + k\delta]}$$

where X_f = value of the final von Frey hair used (in log units); k = tabular value for the pattern of positive/negative responses (Dixon, 1980); and δ = mean difference (in log units) between stimuli (0.2122).

2.4. Measurement of paw edema

Edema formation was quantified by changes in paw volume measured before and after CFA injection (at time indicated in each experimental protocol). The paw volume evaluation was made by immersing the injected paw into a cuvette filled with a solution of 2.5% extran in water (v/v). The cuvette was fixed on the plate of an electronic scale (precision of 0.01 g), and the careful immersion of the paw into cuvette's solution avoiding to touch the cuvette, was accompanied by an increase in the weight displayed. The weight in grams is related to the increase of the liquid column in the cuvette, but not to the mass of the paw. Since the cuvette's solution density was 1 mg/ml, the value displayed by the balance was promptly assumed as the paw volume (Daher et al., 2005). The paw edema was calculated as to the following equation:

$$\% \text{ edema} = [(V \text{ initial} - V \text{ final})/V \text{ initial}] \times 100$$

where V initial is the volume of the paw before FCA or saline injection and V final is the volume of the paw after FCA or saline injection.

2.5. *Open field test*

The effect of the drugs on spontaneous locomotor activity behavior was assessed by the open field test, as previously reported by Guerra et al. (2006). This test was carried out to identify motor disabilities, that could harm the paw withdrawal response of the animals when, stimulated by von Frey filaments. The apparatus was a box measuring 56x40x30 cm with the floor divided into 12 equal areas. The open field session lasted 5 min and during this time the number of crossing responses was recorded. The animal's behaviour was evaluated one hour after drugs treatment.

2.6. *Measurement of body weight*

In the protocol of the chronic administration of the drugs, body weight was followed during all time of treatment. The percentage of change in corporal weight was calculated from basal weight (before CFA or saline paw injection) and was considered as possible indicative of toxicity or side effects of the drugs (Yu et al., 2006).

2.7. *Gastric lesion assessment*

Ulcerogenic activity was evaluated after chronic administration of EPFCA3, MPFCA4 or dipyron (100 $\mu\text{mol/kg}$, one dose daily for 15 days; controls received vehicle). Six hours before sacrifice, an acute dose of indomethacin (30 mg/kg) was administered to separated group of rats that was used as positive control from ulcer presence. Food but not water was removed 18 h before euthanasia. The evaluation was made 24 h after the last dose of the drugs. The animals were euthanized with overdose of pentobarbital and the stomach was extracted, opened along the small curvature to assess the lesion index (LI) and the number of ulcers (NU). The LI of each animal was calculated by adding the following values obtained in the observation of mucosa, considering the lesion degree produced: light (1 point), moderate (2 points) or intense (3 points), evaluating the discoloration of mucosa, the petechial presence and mucus loss. NU was determined by direct count of small lesions (until 1 mm). When larger, the lesions were quantified considering 1.5 points for mm. The observations were made using a microscope (Djahanguiri, 1969; Ghedini et al., 2002).

2.7. Biochemical analysis

2.7.1 Sample collection

Twenty four hours after the cessation of the chronic treatment, the animals were killed by i.p. injection of sodium pentobarbital. Blood samples were collected from the abdominal aorta into serum separator tubes (for aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, urea, creatinine and haptoglobin analysis) or into tubes with EDTA (for hemogram analysis). The skin of the hind paws were removed and immediately frozen for posterior analysis of the myeloperoxidase (MPO), N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity (NAG) and eosinophil peroxidase (EPO). A gross examination was made of the abdominal organs, which were removed and weighed.

2.7.2. Hematological analysis

The number of erythrocytes, leukocytes, lymphocytes, monocytes, platelets and the concentration of hemoglobin and the hematocritus were measured in order to identify any possible blood dyscrasias. Quantitative determinations were measured in whole blood collected in EDTA tubes by use of standard methods with the fully automated PENTRA 120[®] (ABX Diagnostics, Montpellier, France).

2.7.3. Hepatic and renal function analysis

Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels were measured as indicators of hepatic injury, while urea and creatinine levels were used as indicators of renal lesion. The AST and ALT levels were measured using standard enzymatic methods with the use of Ortho-Clinical Diagnostics – Johnson & Johnson reagents with a fully automated analyzer (Vitros 950, dry chemistry; Johnson & Johnson, Rochester, NY, USA).

2.7.4. Haptoglobin analysis

Haptoglobin, an acute phase protein, which the level increases during inflammation (Giffen et al., 2003), was measured by nephelometric immunoassay using Dade Behring kits (BN II System Analyzer Dade Behring, Germany).

2.7.5. Myeloperoxidase (MPO), N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) and eosinophil peroxidase (EPO) assay

The MPO activity was assayed in accordance with Suzuki et al. (1983), with some modifications. Briefly, the skin paw samples were defrosted and homogenized with 20 volumes of 80 mM sodium acetate buffer (pH 5.4) plus 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), centrifuged (11,200 g, 4°C, 20 min) and the supernatants were collected. For assay, 10 µl of supernatant and 220 µl of 80 mM sodium acetate buffer (pH 5.4) containing 15% of 0.3 mM H₂O₂ were added in triplicate to a 96-well plate. The reaction was initiated by the addition of 20 µl of 18.4 mM tetramethylbenzidine. The mixture was incubated for 3 min at 37°C and then immersed into ice bath. The reaction was stopped by the addition of 30 µl of acetic acid and the absorbance was monitored at a wavelength 630 nm.

For NAG and EPO assay, samples had been prepared as previously described for MPO samples. In the NAG assay, the reaction mixture was made with 10 µl of supernatant, 100 µl of 50 sodium citrate buffer (pH 4.5) and 25 µl of 4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide. The reaction mixture was incubated for 1 h at 37°C and was stopped with 100 µl of 200 mM glycine buffer pH 10.4. The enzyme activity was evaluated colorimetrically as absorbance at 405 nm. In the measurement of EPO activity, 100 µl of substrate solution consisted of the 0.1 mM of o-phenylenediamine in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 0.1% Triton X-100 and 1 mM H₂O₂ was add to 100 µl of supernatant (Lloret et al., 1995, Kang et al., 2008). The reaction mixture was incubated for 30 min at 37°C, and then the reaction was stopped by the addition of 50 µl of 4 M H₂SO₄. The enzyme activity was evaluated colorimetrically as absorbance at 490 nm.

2.7.6. Measurement of TNF-α levels in the rat paw

TNF-α production in the rat paw was assessed using a ELISA kit, as described by manufacturer (DuoSet ELISA Development System, rat TNF-α/TNFSF1A, R&D Systems). Briefly, rats that received EPFCA3, MPFCA4, dipyrone or vehicle for 15 days after CFA intraplantar injection were sacrificed 24 h after last administration of the drugs. The subcutaneous tissue of the paws were removed and placed in a PBS 80 mM (pH 7.4) solution containing: Tween 20 0.5%, PMSF 0.1 mM, EDTA 2 mM, antitripsin 0.01 µg/ml, bacitracin 0.1% and BSA 0.1%. Tissues were homogenized, centrifuged at 16000 x g, for 10 min and the supernatant obtained was stored at – 20 °C until further analysis (Souza et al., 2000; Campos et al, 2002).

2.8. Experimental design

2.8.1. Time-course study after acute administration of the new pyrazole compounds and dipyrone

The basal threshold for mechanical stimulus and paw volume was evaluated immediately before CFA or saline administration into right hind paw. On day 2-3 post-CFA or saline, the 50% response threshold and the paw volume were again analyzed to verify tactile allodynia development and paw edema, respectively. Afterwards, the CFA-injected animals that presented allodynia received subcutaneously: vehicle (distilled water, polyethylene glycol 400 and polysorbate 80; 75:20:5), EPFCA3 (1000 $\mu\text{mol/kg}$), MPFCA4 (1000 $\mu\text{mol/kg}$) or dipyrone (1000 $\mu\text{mol/kg}$; internal standard). Separated groups of the animals received saline into the paw and also were treated with vehicle and evaluated together with the others groups. The response threshold and the paw edema were measured from 30 min to 24 h after treatment.

2.8.2. Dose-response study after acute administration of the new pyrazole compounds and dipyrone

The procedures for allodynia induction were identical to described above. The animals CFA-injected that developed allodynia were treated with vehicle, EPFCA3 (1-1000 $\mu\text{mol/kg}$), MPFCA4 (1-1000 $\mu\text{mol/kg}$) or dipyrone (1-1000 $\mu\text{mol/kg}$) and the response threshold was evaluated 1 h after.

In order to identify any impairment in locomotor activity, the animals treated at the dose of 1000 $\mu\text{mol/kg}$ or vehicle were displayed to open field test, immediately after allodynia measurement. In this test, were registered the number of crossings responses of the rats for 5 minutes.

2.8.3. Effect of chronic administration of the new pyrazole compounds and dipyrone on behavioral and biochemical parameters

Before CFA or saline intraplantar injection, the baseline threshold for mechanical stimulus, the volume and the temperature of both paws were assessed. On 2-3 day after CFA or saline, these parameters were again evaluated and initiated the animal's treatment with vehicle, EPFCA3, MPFCA4 or dipyrone. All drugs were administered subcutaneously at dose of 100 $\mu\text{mol/kg}$ and dipyrone was included as

internal standard. The animals received one injection daily for 15 days. On the days 1, 2, 3, 6, 9, 12 and 15, the 50% response threshold for von Frey hairs and the volume of both paws were evaluated before and 1 h after treatments with EPFCA3, MPFCA4, dipyrone or vehicle (day 1 corresponds to the first day of the treatment, 2-3 days after CFA or saline intraplantar injection). Moreover, the body weight of the animals was measured throughout all the experiment. The measures carried through before of the daily injection of the drugs, were made in order to verify the cumulative effect of the treatment. On the other hand, the measures made 1 h after treatments were used for identify to development of tolerance.

2.8.4. Statistical analyses

The results were expressed as mean \pm SEM. DE₅₀ values were reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits. Data were analysed by one way analysis of variance (ANOVA) and post hoc tests (Student-Newman-Keuls test-SNK) were carried out when appropriate. The level of significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Time-course study after acute administration of EPFCA3, MPFCA4 and dipyrone on mechanical allodynia and paw edema

Prior to induction of inflammation by CFA, the mean of threshold was about 15.0 g. By post induction day 2-3, the threshold falls about 4 times, characterizing the allodynia development (Figure 2). For comparison, the mean value for saline intraplantar injected rats remains around 15.0 g (Figure 1). The subcutaneous treatment of the animals with EPFCA3, MPFCA4 or dipyrone produced increase in the threshold response to von Frey hair's in the CFA intraplantar injected animals (Figure 2A-C). The response onsets 30 min after injection of drugs and has a long duration (12 h) for all treatments. The MPFCA4 compound, 4 h after administration, reversed allodynia in 85.6 ± 12.2 % (Figure 2A). The EPFCA3 compound presented similar effectiveness to the MPFCA4 (70.8 ± 8.1 %, Figure 2B), but its effect occurred earlier than the MPFCA4 effect. The effectiveness of the internal standard dipyrone did not differ from the effectiveness of the EPFCA3 and MPFCA4, however its

maximum effect was delayed, occurring 6 hours after the injection (72.7 ± 9.5 %, Fig. 2C).

In this same group of the animals was evaluated the paw volume in order to verify the edema development after CFA or saline intraplantar injection. In fact, CFA, but not saline, caused an increase of the paw volume (about 100 %), characterizing edema development. However, the treatments of the animals with EPFCA3, MPFCA4 or dipyrone, 48-72 h after CFA injection, had no effect on paw edema induced by CFA (Figure 3). The animals that received saline intraplantar injection and were treated with vehicle presented no alterations in the threshold response or paw edema (Figures 2 and 3).

The animals were evaluated in the open field test 1 h after receive subcutaneous treatments. The number of crossings was not modified by EPFCA3, MPFCA4 or dipyrone treatment compared with the animals that had received vehicle (Table 1).

3.2. Dose-response study after acute administration of EPFCA3, MPFCA4 or dipyrone

In the Figure 4 is shown the effect of EPFCA3, MPFCA4 and dipyrone (1-1000 $\mu\text{mol/kg}$) on CFA-induced allodynia. Doses from 10 $\mu\text{mol/kg}$ of EPFCA3, MPFCA4 and dipyrone caused anti-allodynic effect in the animals as demonstrate by increase in the threshold response to von Frey hair's after drugs treatment. All drugs had presented similar antinociceptive potency, with ED_{50} of 9.9 (0.9-114.2), 11.3 (1.9-65.9) and 10.8 (2.6-44.0) $\mu\text{mol/kg}$ for EPFCA3, MPFCA4 and dipyrone, respectively. However, EPFCA3 was more efficacious than MPFCA4, reverting completely the allodynia at dose of 1000 $\mu\text{mol/kg}$ (Figure 4B).

3.3. Effect of chronic administration of the EPFCA3, MPFCA4 or dipyrone on tactile allodynia, edema and biochemical parameters

3.4.1. Tactile allodynia

Complete Freund's adjuvant injection produced a profound and long-lasting decrease in the response threshold to von Frey hairs in the ipsilateral paw. In the Figure 5A-C is shown the cumulative effect of chronic treatment with EPFCA3, MPFCA4 and dipyrone on tactile allodynia CFA-induced. The value of the day 1

corresponds to threshold immediately before treatments onset, and the values of the days 2, 3, 6, 9, 12 and 15 represents the thresholds 24 h after drugs administration. It is possible to note, in the Figure 5A-C, that from the third day of treatment, all drugs already had stable anti-allodynic effect. EPFCA3 and MPFCA4 (100 $\mu\text{mol/kg}$) caused antinociceptive action from day 3 until the last day of observation, while dipyrone (100 $\mu\text{mol/kg}$) produced effect from day 2 of the treatment.

In the Figure 5D-F is shown the threshold responses of the animals 1 h after treatment at days 1, 2, 3, 6, 9, 12 and 15. These observations were performed in order to identify possible tolerance development. The results obtained demonstrate no decrease in effectiveness of the drugs during observation period.

The animals injected with saline intraplantar and treated with EPFCA3, MPFCA4 and dipyrone did not presented threshold alterations when compared to the vehicle treated rats (data not show).

Furthermore, we did not detected allodynia in the contralateral paw during 15 days of evaluation of the response threshold to mechanical stimulus of the rats that received CFA or saline intraplantar injection (data not show).

3.4.2. Paw edema

The injection of CFA into the right hind paw of the rats produced an increase of the ipsilateral paw volume when compared to the animals that received saline intraplantar injection (Figura 6). The treatment of the rats with EPFCA3, MPFCA4 or dipyrone was not able to decrease CFA-induced edema (Figura 6). The contralateral paw of the animals did not present increase in volume (data not show).

3.4.5. Weight of body and some internal organs

The body weight was evaluated before CFA administration and from the beginning the treatment with EPFCA3, MPFCA4, dipyrone or vehicle (Table 2). It was observed that the animals presented reduction in the weight profit only in the 1 and 2 days of the experimental protocol (3-4 days after CFA). This effect was not observed in the rats that received saline intraplantar injection.

Twenty four hours after the last injection of drugs, the animals were sacrificed and liver, spleen, right kidney and stomach were removed and weighed. The percentage of weight of the organs in relationship to body weight was calculated and

is shown in Table 3. The treatment with EPFCA3, MPFCA4 or dipyronone did not caused alteration in the organs weight when compared with vehicle treated animals. The intraplantar CFA injection also did not modify this parameter (Table 3).

3.4.6. Gastric lesion assessment

Chronic administration of EPFCA3, MPFCA4 and dipyronone (100 μ mol/kg daily for 15 days) did not induce significant gastric lesion as shown in Table 4. On the other hand, indomethacin (30 mg/kg/single dose), used as internal standard, produced severe damages to stomach mucosa as demonstrate by elevated lesion index (Table 4).

3.4.7. Haemogram

The haemogram only demonstrated alteration in the leukocyte levels for the rats injected with intraplantar CFA and treated chronically with EPFCA3, MPFCA4 or dipyronone (100 μ mol/kg daily for 15 days) , but not vehicle. The number of erythrocytes and platelets, the hemoglobin concentration and the hematocrit in the blood samples of the animal that received CFA intraplantar had not been modified (Table 5).

3.4.8. AST, ALT, urea and creatinine levels

AST, ALT, urea and creatinine levels were assayed in blood samples of the animals injected with CFA intraplantar and chronically treated with EPFCA3, MPFCA4, dipyronone or vehicle, 24 h after the last injection. The serum levels of the hepatic injury indicators (AST and ALT) and renal injury indicators (urea and creatinine) were not modified by chronic treatment with the new pyrazoles or dipyronone when compared with vehicle treated animals (Table 6).

3.4.9. Haptoglobin levels

Seric haptoglobin level was measured in blood samples of rats that received chronic treatment with EPFCA3, MPFCA4 or dipyronone after CFA intraplantar injection. These treatments did not reverse the increase haptoglobin level produced by CFA (Figure 7)

3.4.10. MPO, NAG and EPO activity

The MPO activity increased in the rat paw tissue after CFA intraplantar administration when compared to animals that receive intraplantar saline (Table 7). However, chronic administration of the novel pyrazole derivatives EPFCA3 and MPFCA4 or dipyrone did not modify the increase on MPO activity CFA-induced. On the other hand, NAG and EPO activities were not modified by CFA injection (Table 7).

3.4.11. Tissue level of TNF- α in the rat paw

The CFA injection into rats paw produced an increase of TNF- α level when compared to animal that received intraplantar injection of saline. This increase was not reverted nor attenuated for daily administration, during 15 days, of EPFCA3 and MPFCA4 or dipyrone (Figure 8).

4. Discussion

In the present study, we evaluated the antinociceptive and antiedematogenic effect of the acute and chronic administration of two novel pyrazole derivatives, EPFCA3 and MPFCA4, against mechanical allodynia and paw edema induced by intraplantar injection of CFA. Additionally, some toxicity indicative parameters of the drugs were also evaluated. Moreover, we include dipyrone as an internal standard, in order to compare its effect with the effect of the new pyrazole derivatives.

As previously related (Chaplan et al., 1994, Wilson et al., 2006), CFA intraplantar injection produced intense and long lasting mechanical allodynia and edema of the injected paw (Figures 2, 3, 4, 5 and 6). The contralateral paw was not affected, suggesting that inflammation was restricted to CFA injection site.

The acute systemic treatment with EPFCA3, MPFCA4 or dipyrone produced antinociceptive effect in the animals that presented tactile allodynia. This effect onsets rapidly (30 min after treatment) and had a long duration (until 12 h after treatment) for both drugs (Figure 2). EPFCA3, MPFCA4 and dipyrone had differed in relation to time necessary to reach its maximum antinociceptive effect. While EPFCA3 reached its maximum effect 1 h after injection, MPFCA4 only reached its maximum effect 4 h after treatment. The long duration of the antinociceptive

effect is in agreement with the idea that the carbon-fluorine bond is stable, probably resulting in metabolically stable compounds (Parck et al., 2001; Karthikeyan et al., 2007). In fact, fluorine substitution makes the molecule much more resistant to direct chemical attack by cytochrome P450 (Parck et al., 2001). However, future studies must be carried out to elucidate the pharmacokinetics of these new pyrazolines. The long duration of action of EPFCA3 and MPFCA4 compounds is an interesting characteristic, because it allows give the drug in long intervals, an advantage for clinical use.

It is important to point out that the pirazole EPFCA3 was capable to revert completely the mechanical allodynia at dose of 1000 $\mu\text{mol/kg}$ (Figure 4A), while MPFCA4 and dipirone reduced only partially CFA-induced tactile hypersensitivity (Figure 4B and 4C, respectively), suggesting that EPFCA3 presents better effectiveness than MPFCA4 and dipyrone.

The paw edema induced by CFA was not reverted by acute nor chronic treatment with EPFCA3, MPFCA4 or dipyrone (Figures 3 and 6). Previous relates demonstrate that dipyrone prevent edema development induced by some agents as endotoxin (Fracasso et al., 1996), carrageenan (Brune et al., 1983) and CFA (Weithmann et al., 1985; Tatsuo et al., 1994). However, studies published demonstrating antiedematogenic effect of dipyrone in CFA model differs from ours because they use different protocols of induction and evaluation of the inflammation. Tatsuo et al. (1994) induced inflammation using a subcutaneous injection of CFA in the dorsal root of the rat tail and measured the paw edema at day 14 after induction. In this model occurs a systemic reaction induced by CFA, which injected in the tail, produces inflammation into the paw of the animal. In the present work, CFA was injected into right hind paw and the inflammation was restricted to injection site (ipsilateral paw), since no allodynia and edema in contralateral paw were detected. Such differences in the site of CFA injection can produces different degrees of inflammation and, thus, the drugs action can be different. Weithmann et al. (1985) had used CFA from *Mycobacterium butyricum* and the experiment was made in Lewis rats, differing from our work, here we used

Mycobacterium tuberculosis and Wistar rats. In fact, as previously reported, there are wide variations in the incidence and severity of the arthritis CFA-induced depending on the rat and *Mycobacterium* strains used (Wong et al., 2006; van Eden et al., 1994; Swingle et al., 1969; Banik et al., 2002). Therefore, the lack of antiedematogenic action of dipyron here described can be related to experimental procedures adopted.

As related, EPFCA3 and MPFCA4 compounds had not produced antiinflammatory effect, as demonstrated for its inefficacy in diminishing the paw edema CFA-induced (Figures 3 and 6). This result is conflicting with previous findings, which pointed a possible antiinflammatory action for EPFCA3 and MPFCA4 pyrazole derivatives (Sauzem et al., 2007). In fact, we have demonstrated antiedematogenic effect in mice after acute administration of EPFCA3 and MPFCA4 compounds, in carrageenan-induced paw edema test (Sauzem et al., 2007). On the other hand, we now verify that nor acute administration (1000 $\mu\text{mol/kg}$) nor chronic administration (100 $\mu\text{mol/kg/15 days}$) of EPFCA3 or MPFCA4 was effective to abolish or reduce the paw inflammation. However, such discrepancies can be related to different inflammation model and animal specie used in the previous and actual work. Other possible explanation is the different experimental design. That is, in the previous work, the compounds were administered before carrageenan intraplantar injection, producing a preventive effect against inflammation development. However, in the present study, the compounds were administered after inflammation development, a more similar protocol to the adopted in medical treatments, and have been unable for revert the inflammatory process already installed.

After chronic administration, the pyrazole derivatives EPFCA3 and MPFCA4, as well as dipyron, presents effect against allodynia CFA-induced (Figure 5). Moreover, EPFCA3 and MPFCA4 seems produces no tolerance, since they had continued producing antinociceptive effect, after administration of repeated doses (one daily dose for 15 days). In this experiment was observed that after receive two doses of the drugs, the animals presented a significant increase into threshold response to tactile stimulus (Figure 5A, 5B and 5C),

suggesting some relief of inflammatory pain. However, a total reversion of the allodynia was not reached. It is possible that higher doses and/or greater number of daily doses can produce a better effect, but this needs to be proven future.

We also evaluated some indicative parameters of evolution of the arthritis induced by CFA and the effect of the treatment with EPFCA3, MPFCA4 and dipyrrone on these parameters. Therefore, the haptoglobin levels, an acute phase protein, whose level increases during inflammation, and that is a good marker to follow the evolution of the disease (Giffen et al., 2003) were measured. In fact, the CFA intraplantar injection caused a significant increase in haptoglobin level, when blood samples were analyzed 17-18 days after induction of paw inflammation. Therefore, the treatment of the animals with EPFCA3, MPFCA4 or dipyrrone, during 15 days, produced no decrease in haptoglobin levels, suggesting that these compounds did not alter the course of the inflammation. This result is in accordance with that finding in paw edema, where the novel pyrazole derivatives and dipyrrone were ineffective.

The signs and symptoms of inflammation include, beyond pain and edema, the cell migration (Marchand et al., 2005). The types of immune cell that contribute to inflammatory pain depend on the inflammatory condition, but, in general, various cell types will be recruited and will contribute to abnormal pain sensitivity, albeit to different degrees (Marchand et al., 2005). In this line, the activities of MPO, NAG and EPO, in samples of paw tissue, were analyzed as indicators of recruitment of neutrophils, macrophages and eosinophils for injection site, respectively (Suzuki et al., 1983; Lloret et al., 1995; Kang et al., 2008). Only MPO activity was increased 17-18 days after CFA injection, suggesting accumulation of neutrophils into inflamed paw (Table 7). The treatment during 15 days with EPFCA3, MPFCA4 and dipyrrone did not reduce the MPO activity, possibly because did not alter the recruitment of immune cells for lesion site. However, is important to point out that, at moment, the time course of immune cell recruitment are no described in the literature, for paw inflammation induced by CFA. Levy et al. (2006) had shown that 28 days

after induction of monoarthritis in knee joint by CFA injection, the number of total leukocytes increased drastically, while the number of macrophages was only modestly increased into inflammation site. If the immune cell infiltration in CFA injected paw occur similarly to demonstrate for monoarthritis in knee joint, is possible that our experimental design did not detect increase in macrophage number or activity. Activated macrophages have been reported to contribute to experimental pain states. They can release many inflammatory mediators, include TNF- α , a pro-inflammatory cytokine (Marchand et al., 2005). In this study, we verify that TNF- α level was increased in paw inflamed tissues from rats that received CFA intraplantar injection (Figure 8). Moreover, the chronic treatment of the animal with EPFCA3, MPFCA4 or dipyrone was ineffective for reduce the TNF- α level. This data and the lack of effect of EPFCA3 and MPFCA4 pyrazoles on neutrophil infiltration, strengthens the idea that these drugs did not posses antiinflammatory action.

The concentration of AST, ALT, urea and creatinine was analyzed in order to identify possible hepatic and renal lesions after chronic treatment with EPFCA3, MPFCA4 and dipyrone compounds. None of the treatments produced any alteration in these parameters, suggesting that EPFCA3, MPFCA4 and dipyrone are not toxic in rats, in the conditions where they had been tested.

Previous studies had shown that CFA intraplantar injection produces decrease in weight profit of the animals throughout the time and poliartthritis signals (Waltz et al., 1971; Franch et al., 1994; Yu at al., 2006). In the present work, the body weight was measured daily throughout treatment and was no detected significant increase or reduction on weight profit, nor signals of poliartthritis development. It is possible that these discrepancies in relationship to published data for other researchers are related to different experimental designs, rats strain and adjuvant used.

The evaluation of some hematological parameters of the animals that received chronic treatment was made to verify any possible alteration on hematopoiesis. Amongst the evaluated parameters, we only find an increase

in number of leukocytes of the animals that received CFA intraplantar and chronic treatment with EPFCA3, MPFCA4 and dipyrone, when compared to animals that received saline intraplantar (Table 5). In the animals that received intraplantar saline injection and were injected subcutaneously with EPFCA3, MPFCA4 and dipyrone, this increase in leukocytes number was not observed (data not shown). So, leukocytosis seems only occur in the CFA-induced inflammation presence, discarding the possibility of the drugs caused *per se* effect on hematopoiesis. In this context, some works shows decrease in hematocrit values and hemoglobin levels, producing anemia, and pronounced increase in leukocytes and lymphocytes number in rats injected with CFA (Mikolajew et al., 1969; Walz et al., 1971). However, one more time, differences between experimental protocols hinder an adjusted comparison with our results.

The side effects associated with the classical NSAIDs include gastrointestinal bleeding, ulceration, perforation of the gastrointestinal mucosa, and relevant percentage those experiencing such effects present death risk (Vane et al., 1998). In this work, we demonstrate that chronic administration of EPFCA3 and MPFCA4, at effective antinociceptive dose, did not causes lesion of stomach mucosa of rats (Table 4), suggesting that possess good gastric tolerability.

In conclusion, the antinociceptive action of EPFCA3 and MPFCA4 against inflammatory pain induced by CFA without cause adverse effects in rats, indicate that these compounds might be interesting for development of new drugs for pain management.

5. References

- Andrade, S. E., Martínez, C., Walker, A. M., 1998. Comparative safety evaluation of non-narcotic analgesics. *J. Clin. Epidemiol.* 12, 1357-1365.
- Brune, K., Alpermann, H., 1983. Non-acidic pyrazole: inhibition of prostaglandin production carrageenan oedema and yeast fever. *Agents Actions* 13, 360-363.
- Campos, M. M., Souza, G. E. P., Ricci, N. D., Pesquero, J. L., Teixeira, M. M., Calixto, J. B., 2002. The role of migrating leukocytes in IL-1b-induced up-regulation of kinin B1 receptors in rats. *Br. J. Pharmacol.* 135, 1107-1114.

- Chaplan, S. R., Bach, F. W., Pogrel, J. W., Chung, J. M., Yaksh, T. L., 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Meth.* 53, 55-63.
- Daher, J. B., Melo, M. D., Tonussi, C. R., 2005. Evidence for a spinal serotonergic control of the peripheral inflammation in the rat. *Life Sci.* 76, 2349-59.
- Dixon, W. J., 1980. Efficient analysis of experimental observations. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20, 441-462.
- Djahanguiri, B., 1969. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. *Scand. J. Gastroenterol.* 4, 265-267.
- Fracasso, J. F., Nunes-de-Souza, R. L., Teixeira, C. E., Castro, R. C., Lepera, E. Z. P., Silva, R. F. P., 1996. Effect of dipyron, L-NAME and L-arginine on endotoxin-induced rat paw edema. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 1543-1548.
- Franch, A., Castellote, C., Castell, M., 1994. Blood lymphocyte subsets in rats adjuvant arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 53, 461-466.
- Ghedini, P. C., Almeida, C. E., Bürger, M. E., Bauermann, L. F., Magni, D. V., Borgmann, S. H. M., 2002. Preliminary studies of anti-ulcerogenic effect of *Aster squamatus* Leaves hydroalcoholic extract on various ulcer models in rats. *Acta Farm. Bonaerense* 21, 165-168.
- Giffen, P. S., Turton, J., Andrews, C. M., Barrett, P., Clarke, C. J., Fung, K.-W., Munday, M. R., Roman, I. F., Smyth, R., Walshe, K., York, M. J., 2003. Markers of experimental acute inflammation in the Wistar Han rat with particular reference to haptoglobin and C-reactive protein. *Arch. Toxicol.* 77, 392-402.
- Giffen, P. S., Turton, J., Andrews, C. M., Barrett, P., Clarke, C. J., Fung, K. W., Munday, M. R., Roman, I. F., Smyth, R., Walshe, K., 2003. Markers of experimental acute inflammation in the Wistar Han rat with particular reference to haptoglobin and C-reactive protein. *Arch. Toxicol.* 77, 392-402.
- Godoy, M. C. M., Figuera, M. R., Souza, F. 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 pyrazolines, but not of dipyron. *Eur. J. Pharmacol.* 496, 93-97.
- Guerra, G. P., Mello, C. F., Sauzem, P. D., Berlese, D. B., Furian, A. F., Tabarelli, Z., Rubin, M. A., 2006. Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. *Psychopharmacology* 186, 150-158.
- Kang, H. S., Lee, J. Y., Kim, C. J., 2008. Anti-inflammatory activity of arctigenin from *Forsythiae Fructus*. *J. Ethnopharmacol.* 116, 305-312.
- 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.

Levy, A. S., Simon, O., Shelly, J., Gardener, M., 2006. 6-Shogaol reduced chronic inflammatory response in the knees of rats treated with complete Freund's adjuvant. *BMC Pharmacol.* 6, 12-19.

Lloret, S., Moreno, J. J., 1995. Effects of an anti-inflammatory peptide (antiflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol dermal application. *Biochem. Pharmacol.* 50, 347-53.

Mikolajew, M., Kuratowska, Z., Kossakowska, M., Plachecka, M., Kopec, M., 1969. Haematological changes in adjuvant disease in the rat. I. Peripheral blood and bone marrow after repeated injections of Freund's adjuvant. *Ann. Rheum. Dis.* 28, 35-40.

Milano, J., Oliveira, S. M., Rossato, M. F., Sauzem, P. D., Machado, P., Beck, P., Zanatta, N., Martins, M. A., Mello, C. F., Rubin, M. A., Ferreira, J., Bonacorso, H. G., 2008. Antinociceptive effect of novel trihalomethyl-substituted pyrazoline methyl esters in formalin and hot-plate tests in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 581, 86-96.

Milano, J., Oliveira, S. M., Rossato, M. F., Sauzem, P. D., 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 pyrazoline methyl esters in formalin and hot-plate tests in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 581, 86-96.

Narsinghani, T., Chaturvedi, S. C., 2005. QSAR analysis of meclofenamic acid analogues as selective COX-2 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 461-468.

Parck, K.B., Kitteringham, N.R., O'Neill, P.M., 2001. Metabolism of fluorine containing drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 443-470.

Prokopp, C. R., Rubin, M. A., Sauzem, P. D., Souza, A. H., Berlese, D. B., Lourega, 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. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39, 795-799.

Sánchez, S., Martín, M. J., Ortiz, P., Motilva, V., Alarcón de la Lastra C., 2002. Gastrointestinal tolerability of metamizol, acetaminophen, and diclofenac in subchronic treatment in rats. *Dig. Dis. Sci.* 47, 1389-1398.

Sauzem, P.D., Machado, P., Rubin, M. A., Sant'Anna, G. S., Faber, H. B., Souza, A. H., Mello, C. F., Beck, P., Burrow, R. A., Bonacorso, H. G., Zanatta, N., Martins, M. A. P., 2007. Design and microwave-assisted synthesis of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazoles: Novel agents with analgesic and anti-inflammatory properties. *Eur. J. Med. Chem.* 43, 1237-1247.

Souza, D. G., Cara, D. C., Cassali, G. D., Coutinho, S. F., Silveira, M. R., Andrade, S. P., Poole, S. P., Teixeira, M. M., 2000. Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia mesenteric artery in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 131, 1800-1808.

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-1H-1-pyrazolcarboxamide induces antinociception. *Pharm. Biochem. Behav.* 68, 525-530.

Souza, F. R., Ratzlaff, V. T., 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-1H-pyrazole-1-carboxyamides in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 451, 141-147.

Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T., Fujikura, T., 1983. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal. Biochem.* 132, 345-352.

Tabarelli, Z., Rubin, M. A., Berlese, D. B., Sauzem, P. D., 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.

Tatsuo, M. A. K. F., Carvalho, W. M., Silva, C. V., Miranda, A. E. G., Ferreira, S. H., Francischi, J. N., 1994. Analgesic and antiinflammatory effects of dipyrone in rat adjuvant arthritis model. *Inflammation* 18, 399-405.

Tomazetti, J., Ávila, D. S., Ferreira, A. P. O., Martins, J. S., Souza, F. R., Royer, C., Rubin, M. A., Oliveira, M. R., Bonacorso, H. G., Martins, M. A. P., Zanatta, N., Mello, C. F., 2005. Baker yeast-induced fever in young rats: characterization and validation of an animal model for antipyretics screening. *J. Neurosci. Meth.* 147, 29-35.

Vane, J. R., Bakhle, Y. S., Botting, R. M., 1998. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38, 97-120.

Walz, D. T., DiMartino, M. J., Kuch, J. H., Zuccarello, W., 1971. Adjuvant-induced arthritis in rats. I. Temporal relationship of physiological, biochemical, and hematological parameters. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 136, 907-910.

Weithmann, K. U., Alpermann, H. G., 1985. Biochemical and pharmacological effects of dipyrone and its metabolites in model systems related to arachidonic acid cascade. *Drug Res.* 35, 947-952.

Williams, M., Kowaluk, E. A., Arneric, S. P., 1999. Emerging molecular approaches to pain therapy. *J. Med. Chem.* 42, 1481-1500.

Wilson, A. W., Medhurst, S. J., Dixon, C. I., Bontoft, N. C., Winyard, L. A., Brackenborough, K. T., De Alba, J., Clarke, C. J., Gunthorpe, M. J., Hicks, G. A., Bountra, C., McQueen, D. S., Chessell, I. P., 2006. An animal model of chronic inflammatory pain: Pharmacological and temporal differentiation from acute models. *Eur. J. Pain.* 10, 537-549.

Yu, Y., Xiong, Z., Lv, Y., Qian, Y., Jiang, S., Tian, Y., 2006. In vivo evaluation of early disease progression by X-ray phase-contrast imaging in the adjuvant-induced arthritic rat. *Skeletal. Radiol.* 35, 156-164.

Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.

Figure legends

Figure 1 –Chemical structure of EPFCA3 and MPFCA4 pyrazole derivatives.

Figure 2 – Effect of acute administration (1000 $\mu\text{mol/kg}$; s.c.) of the novel pyrazole derivatives EPFCA3 (A), MPFCA4 (B) and dipyrone (C) on mechanical allodynia CFA-induced in rats. BL represents the threshold of mechanical response of the animals before CFA or saline intraplantar injection. The time 0 corresponds to threshold immediately before subcutaneous treatment with the pyrazole compounds (48-72 h after CFA or saline intraplantar). Data are reported as mean \pm SEM; n= 9-14. *p < 0.05 compared to CFA/vehicle (SNK test).

Figure 3 – Effect of acute administration (1000 $\mu\text{mol/kg}$; s.c.) of the novel pyrazole derivatives EPFCA3 (A) and MPFCA4 (B) or dipyrone (C) on paw edema CFA-induced in rats. BL corresponds to paw volume of the animals before CFA or saline intraplantar injection. The time 0 corresponds to paw volume immediately before subcutaneous treatment with the pyrazole compounds (48-72 h after CFA or saline intraplantar). Data are reported as mean \pm SEM; n= 7-11.

Figure 4 – Dose-response effect of acute administration of the pyrazole derivatives EPFCA3 (A) and MPFCA4 (B) or dipyrone (C) on mechanical allodynia CFA-induced in rats. Data are reported as mean \pm SEM; n= 7-11. *p < 0.05 compared to CFA/vehicle group (SNK test).

Figure 5 – Effect of chronic administration (100 $\mu\text{mol/kg}$; s.c.; daily for 15 days) of the pyrazole derivatives EPFCA3 (A and D) and MPFCA4 (B and E) or dipyrone (C and F) on ipsilateral mechanical allodynia CFA-induced in rats. The figures A, B and C show the thresholds before daily injection of the drugs and the figures D, E and F show the responses 1 h after administration. BL represents the threshold of mechanical response of the animals before CFA or saline intraplantar injection. Data are reported as mean \pm SEM; n= 7-9. *p < 0.05 compared to CFA/vehicle group (SNK test).

Figure 6 – Effect of chronic administration (100 $\mu\text{mol/kg}$; s.c.; daily for 15 days) of the pyrazole derivatives EPFCA3 (A and D) and MPFCA4 (B and E) or dipyrone (C and F) on ipsilateral paw edema CFA-induced in rats. The figures A, B and C show the paw volume before daily injection of the drugs and the figures D, E and F show the paw volume 1 h after administration. BL represents the threshold of mechanical response of the animals before CFA or saline intraplantar injection. Data are reported as mean \pm SEM; n= 5-6.

Figure 7 – Effect of chronic administration (100 $\mu\text{mol/kg}$; s.c.; daily for 15 days) of the pyrazole derivatives EPFCA3 and MPFCA4 or dipyrone on TNF- α level in rat paw tissue. Data are reported as mean \pm SEM; n= 3-5. *p < 0.05 compared to saline/vehicle group (SNK test).

Figure 8 – Effect of chronic administration (100 $\mu\text{mol/kg}$; s.c.; daily for 15 days) of the pyrazole derivatives EPFCA3 and MPFCA4 or dipyrone on serum haptoglobin

level of rats. Data are reported as mean \pm SEM; n= 3-5. *p < 0.05 compared to saline/vehicle group (SNK test).

Figure 1

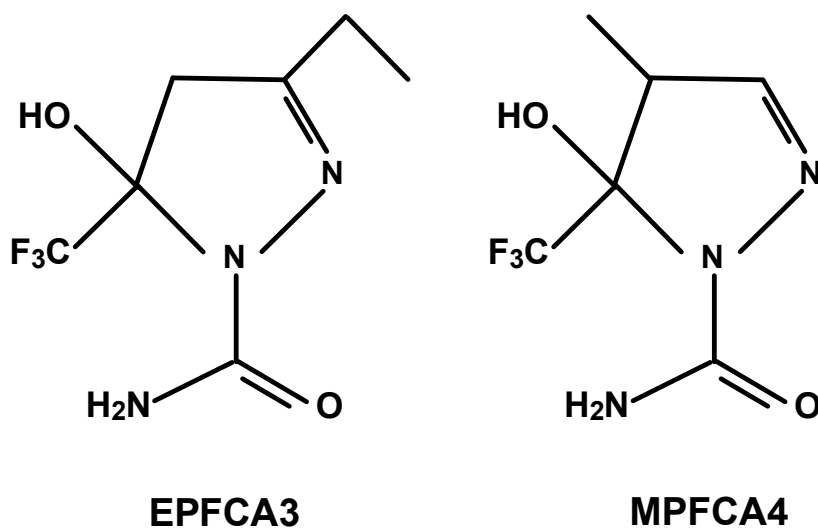


Figure 2

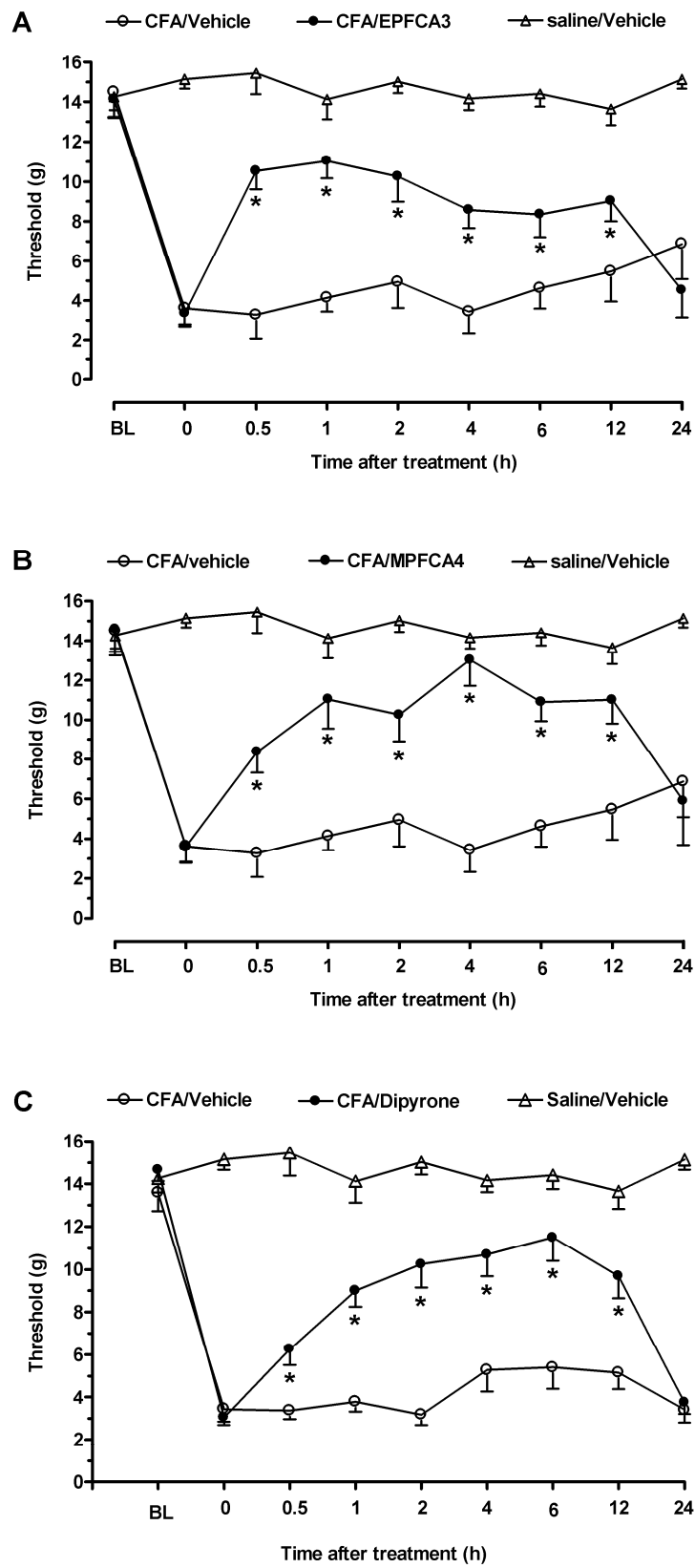


Figure 3

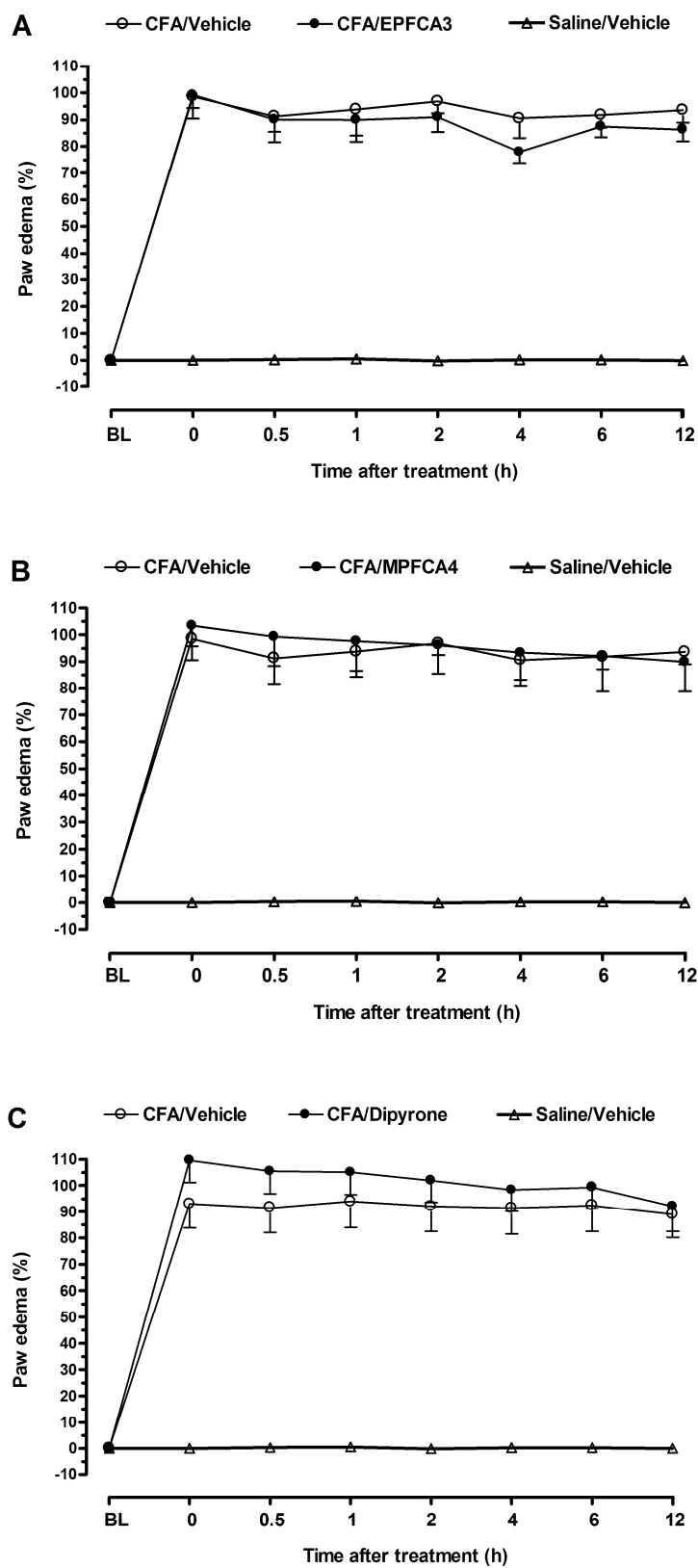


Figure 4

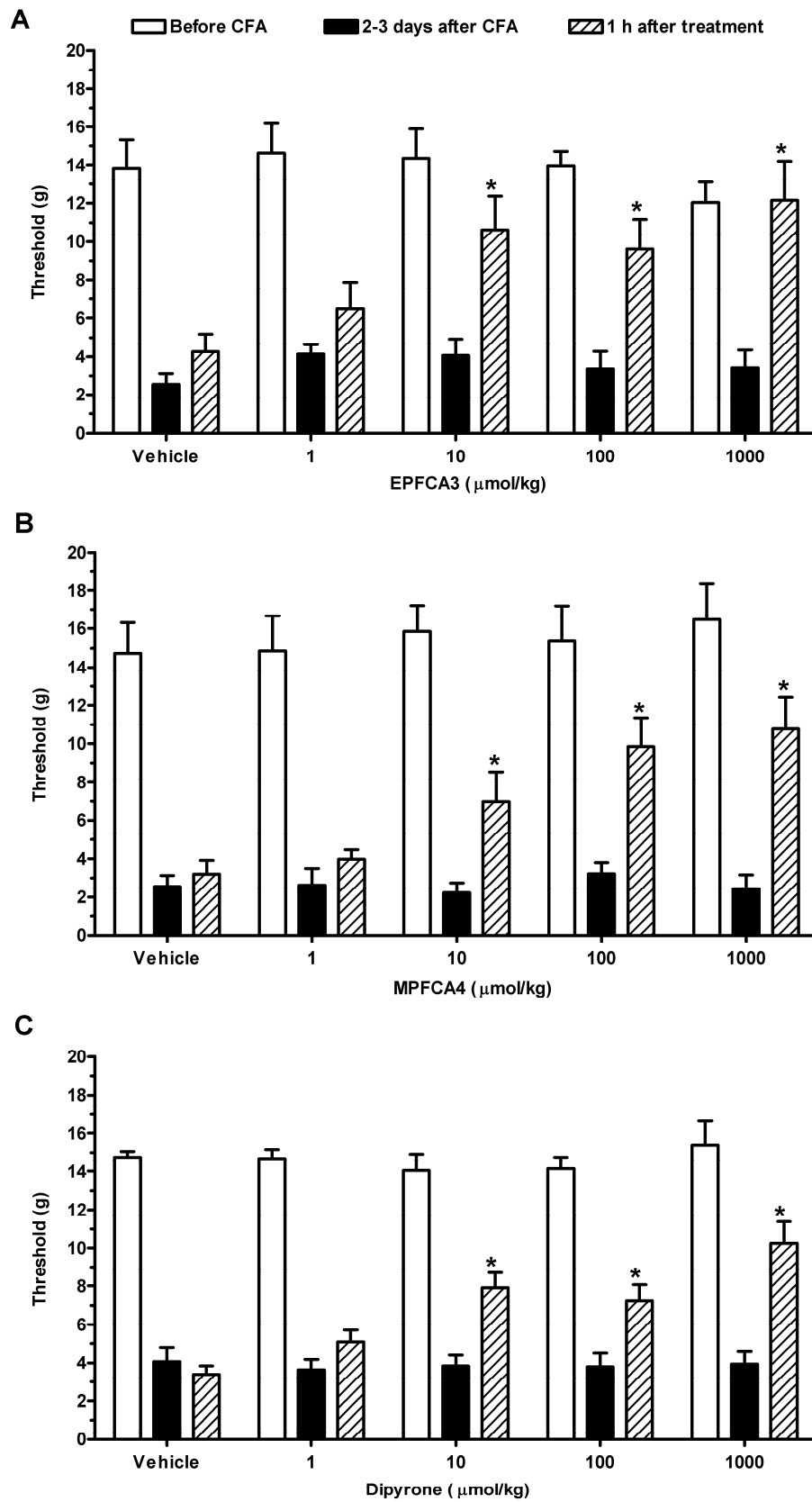


Figure 5

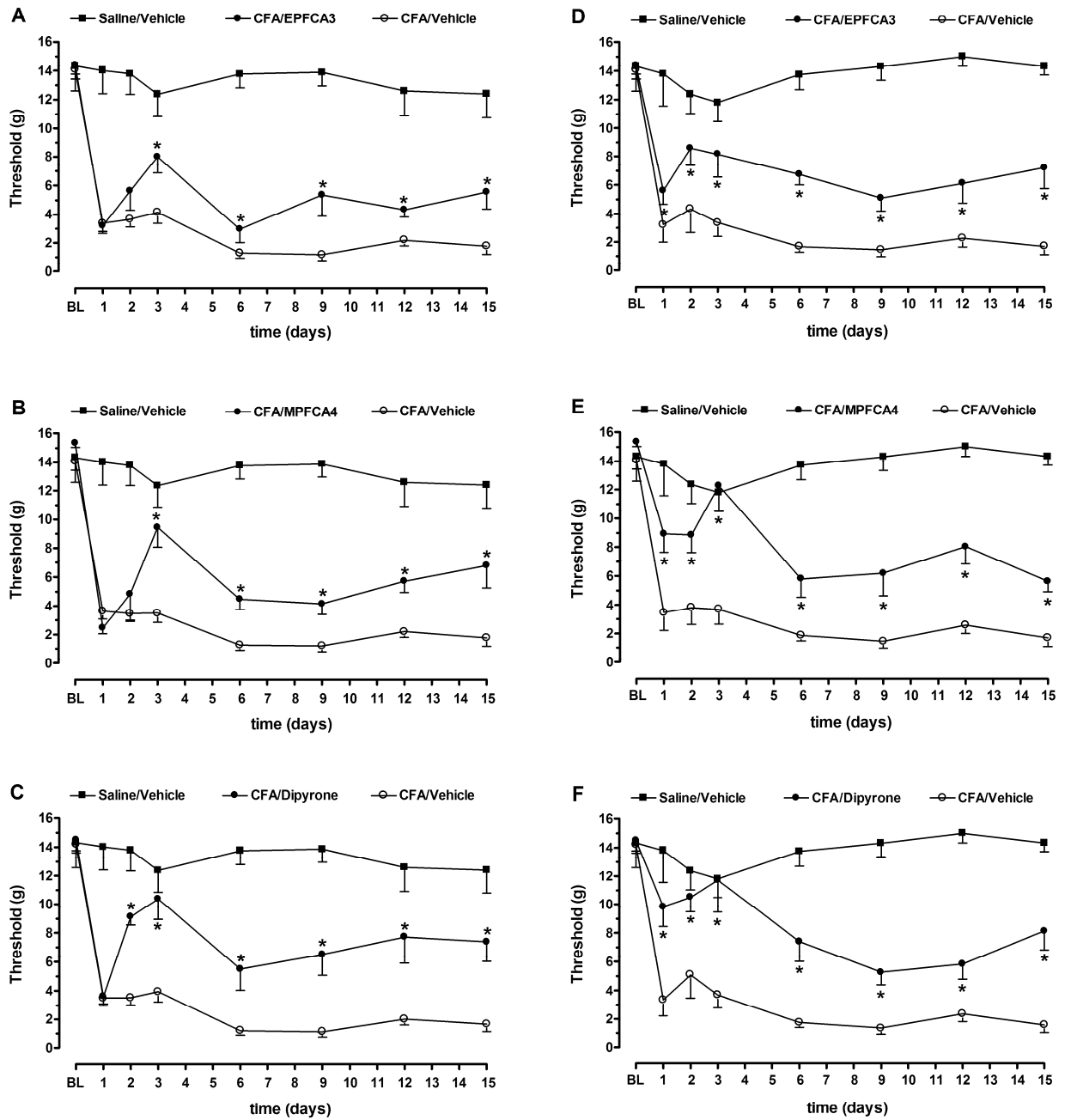


Figure 6

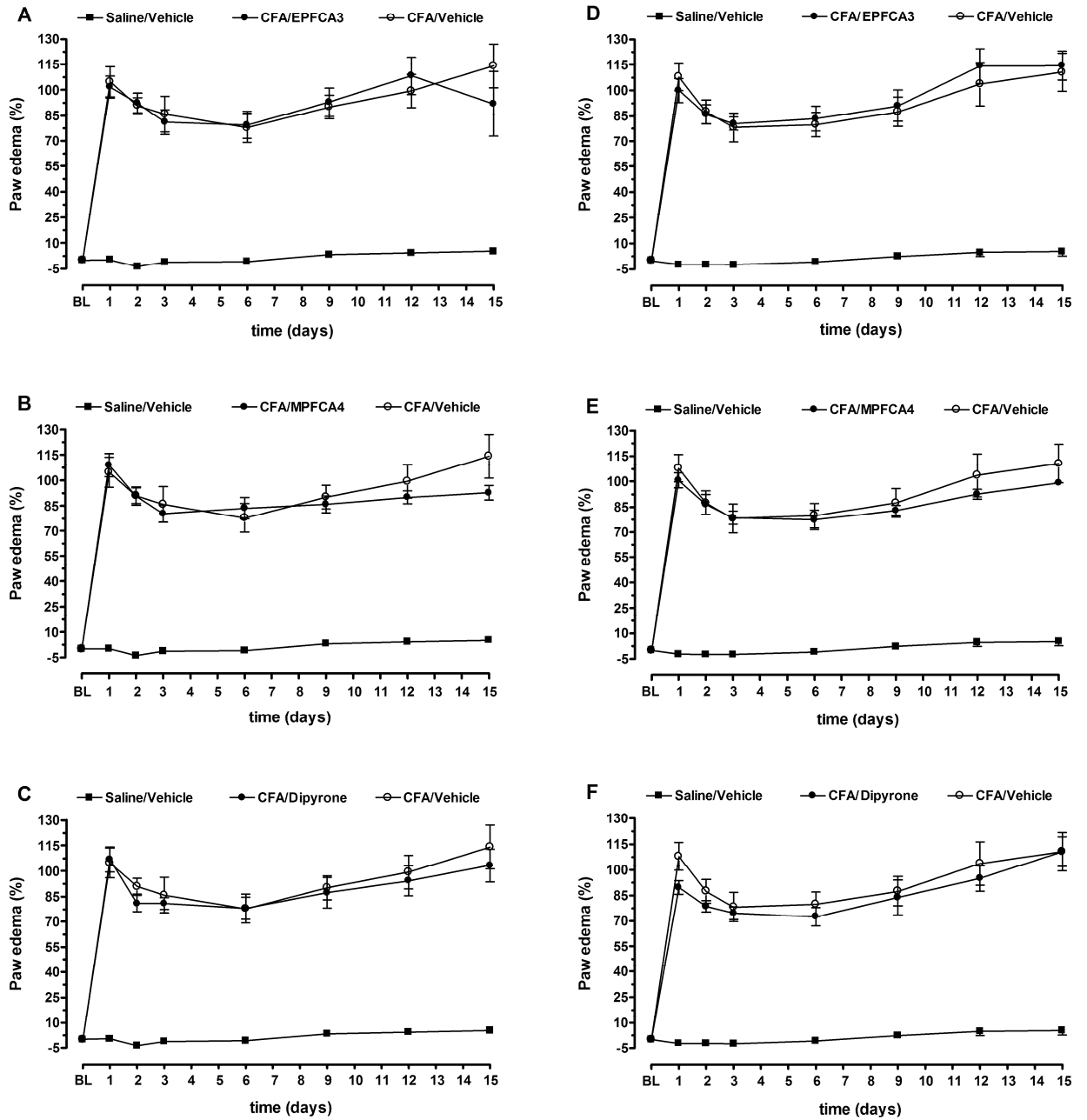


Figure 7

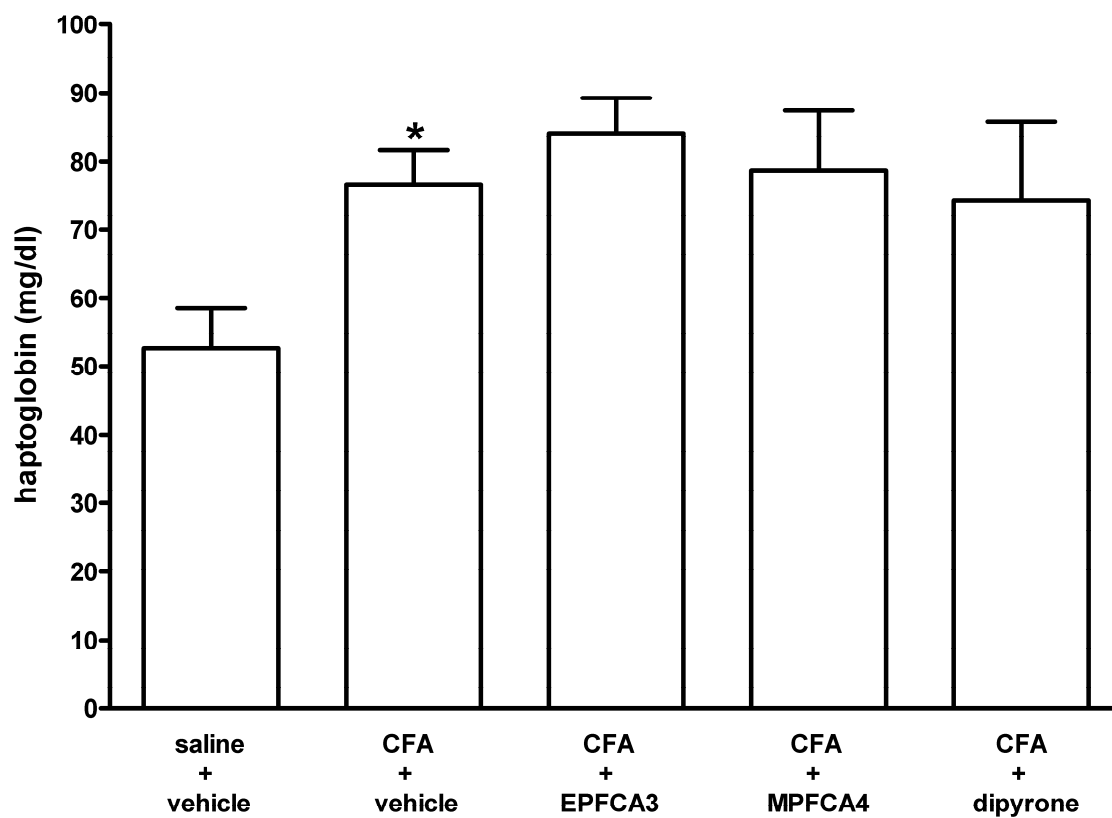


Figure 8

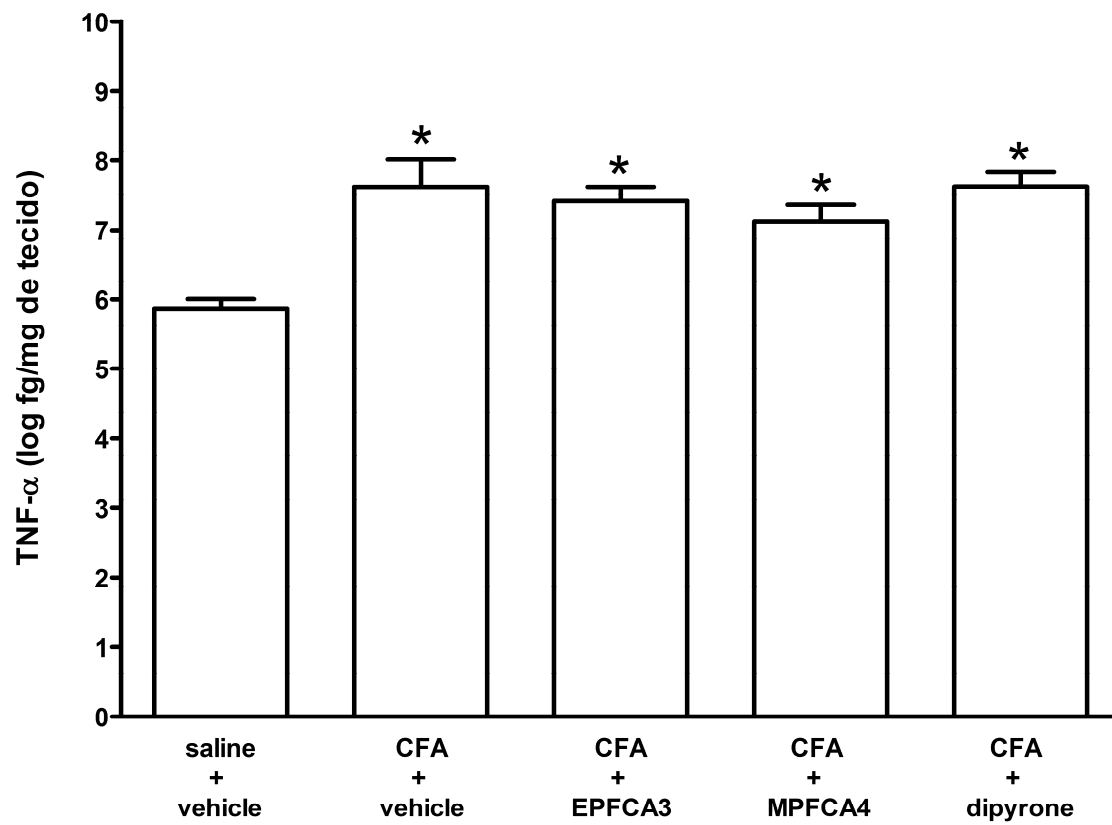


Table 1 – Effect of the 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles EPFCA3, MPFCA4 and dipyrone on spontaneous locomotor activity of rats.

Treatment	Crossings
Vehicle	31.1 ± 3.8
EPFCA3 1000 µmol/kg	30.1 ± 8.8
MPFCA4 1000 µmol/kg	33.6 ± 6.0
Dipyrone 1000 µmol/kg	30.0 ± 5.1

Data are reported as mean ± SEM for n=8-16 animals per group.

Table 2 – Effect of chronic administration of the new pyrazole derivatives EPFCA3, MPFCA4 and dipyron (100 μ mol/kg) on the variation of the corporal weight in rats with chronic inflammation CFA-induced.

	Saline/ vehicle	CFA/ vehicle	CFA/ EPFCA3	CFA/ MPFCA4	CFA/ Dipyron
Day 1	4.0 \pm 0.9	-2.9 \pm 0.9*	-1.8 \pm 1.2*	-2.9 \pm 0.9*	-0.4 \pm 0.9*
Day 2	7.6 \pm 1.8	0.5 \pm 1.1*	1.3 \pm 1.2*	1.6 \pm 1.1*	2.6 \pm 1.2*
Day 3	7.0 \pm 1.5	2.8 \pm 1.2	1.3 \pm 1.2	0.7 \pm 1.7	4.1 \pm 2.1
Day 4	9.2 \pm 1.5	3.9 \pm 1.7	3.6 \pm 1.6	3.6 \pm 1.5	5.3 \pm 0.9
Day 5	11.1 \pm 0.8	4.6 \pm 2.9	5.9 \pm 1.5	5.4 \pm 1.7	6.7 \pm 0.9
Day 6	13.0 \pm 1.4	6.1 \pm 3.3	7.7 \pm 1.8	5.9 \pm 3.2	8.3 \pm 1.0
Day 7	13.8 \pm 2.0	6.8 \pm 3.9	8.7 \pm 1.6	9.2 \pm 1.8	9.6 \pm 0.9
Day 8	17.3 \pm 2.1	9.5 \pm 4.3	11.7 \pm 1.7	12.1 \pm 1.2	11.7 \pm 1.1
Day 9	17.0 \pm 2.1	10.2 \pm 4.1	14.2 \pm 1.8	12.6 \pm 1.8	12.6 \pm 1.5
Day10	20.9 \pm 2.9	13.6 \pm 4.2	16.1 \pm 1.8	15.9 \pm 2.0	15.5 \pm 2.2
Day11	22.9 \pm 2.5	14.5 \pm 3.8	18.8 \pm 2.6	17.0 \pm 1.7	16.5 \pm 1.6
Day12	23.0 \pm 3.1	15.2 \pm 4.0	16.5 \pm 2.4	17.8 \pm 2.3	17.18 \pm 2.2
Day13	25.2 \pm 2.8	16.4 \pm 3.8	17.3 \pm 2.7	18.5 \pm 2.8	18.5 \pm 2.0
Day14	26.4 \pm 3.0	18.0 \pm 3.3	17.6 \pm 3.0	19.0 \pm 3.3	19.9 \pm 2.0
Day15	28.7 \pm 3.1	19.6 \pm 3.4	17.9 \pm 3.4	21.8 \pm 3.6	20.2 \pm 3.0

Data are reported as mean \pm SEM (% in relationship to initial weight, before CFA or saline injection) for n=5-6 animals per group; * p < 0.05 compared with saline/vehicle group.

Table 3 – Effect of chronic administration of the new pyrazole derivatives EPFCA3, MPFCA4 or dipyrrone on percentage of organs weight in relationship the body weight of the rats.

	Saline/ vehicle	CFA/ vehicle	CFA/ EPFCA3	CFA/ MPFCA4	CFA/ dipyrrone
Liver	3.8 ± 0.1	3.9 ± 0.1	4.0 ± 0.1	4.0 ± 0.3	4.1 ± 0.2
Spleen	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1
Kidney	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1
Stomach	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1

Data are reported as mean ± SEM.

Table 4 – Effect of chronic administration of the new pyrazole derivatives EPFCA3, MPFCA4 or dipyrrone on gastric mucosa of rats.

	LI ^a	NU ^b	N
Saline/ vehicle	0.75 ± 0.25	0	4
CFA/vehicle	0.71 ± 0.18	0	7
CFA/EPFCA3	1.00 ± 0.26	0.67 ± 0.67	6
CFA /MPFCA4	1.00 ± 0.36	0	6
CFA/ dipyrrone	1.40 ± 0.25	0.40 ± 0.40	5
Saline ^c	0.67 ± 0.33	0	4
Indomethacin ^d	6.25 ± 0.83*	32.00 ± 7.82*	3

^a lesion index; ^b number of ulcers; ^{c, d} single dose

N is the number of animals for group; * p < 0.05 compared with saline group.

Table 5 – Effect of chronic administration of the new pyrazoles derivatives EPFCA3 and MPFCA4 or dipyrone (100 $\mu\text{mol/kg}$) on hematological parameters of rats submitted to chronic inflammation induced by CFA intraplantar injection.

	Saline/ vehicle	CFA/ vehicle	CFA/ EPFCA3	CFA / MPFCA4	CFA/ dipyrone
Leukocytes ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	8.2 \pm 1.3	10.7 \pm 0.9	16.2 \pm 1.4*	15.3 \pm 3.1*	14.3 \pm 2.1*
Erythrocytes ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	7.7 \pm 0.2	7.4 \pm 0.2	7.7 \pm 0.4	7.4 \pm 0.1	7.1 \pm 0.4
Hemoglobin (g/dl)	14.1 \pm 0.1	13.1 \pm 0.3	14.1 \pm 0.8	13.6 \pm 0.2	13.0 \pm 0.4
Hematocrit (%)	41.8 \pm 0.7	39.3 \pm 0.4	41.2 \pm 2.1	40.4 \pm 0.8	38.8 \pm 1.6
Platelet ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	863.0 \pm 126.2	993.8 \pm 121.1	1,050.7 \pm 152.6	962.0 \pm 118.8	1,051.3 \pm 151.12
Lymphocytes (%)	86.9 \pm 3.9	74.4 \pm 7.9	67.5 \pm 8.4	72.5 \pm 8.0	69.5 \pm 7.8
Monocytes (%)	2.2 \pm 0.5	1.9 \pm 0.3	2.3 \pm 0.3	2.4 \pm 0.3	2.0 \pm 0.7

Data are reported as mean \pm SEM for n=5-6 animals per group. * p < 0.05 compared with saline/vehicle group.

Table 6 – Effect of chronic administration of the new pyrazoles derivatives EPFCA3 and MPFCA4 or dipyrone (100 μ mol/kg) on indicator parameters of injury hepatic and renal in rats submitted to chronic inflammation induced by CFA intraplantar injection.

	Saline/ Vehicle	CFA/ Vehicle	CFA/ MPFCA4	CFA/ EPFCA3	CFA/ dipyrone
AST (U/l)	154.0 \pm 9.9	153.0 \pm 9.4	175.2 \pm 11.4	180.7 \pm 16.3	154.7 \pm 7.9
ALT (U/l)	57.2 \pm 2.7	52.5 \pm 4.1	57.5 \pm 3.7	53.3 \pm 3.7	53.2 \pm 3.1
Urea (mg/dl)	35.7 \pm 3.1	36.7 \pm 2.5	39.4 \pm 1.7	38.3 \pm 1.9	39.83 \pm 1.7
Creatinine (mg/dl)	0.36 \pm 0.02	0.35 \pm 0.02	0.40 \pm 0.04	0.40 \pm 0.04	0.38 \pm 0.03

Data are reported as mean \pm SEM for n=5-6 animals per group

Table 7 – Effect of chronic administration of the new pyrazoles derivatives EPFCA3 and MPFCA4 or dipyrrone (100 μ mol/kg) in the TNF- α tissue level of paw rat from animals submitted to chronic inflammation induced by CFA intraplantar injection.

	MPO^a (absorbance/ mg protein)	NAG^b (absorbance/ mg protein)	EPO^c (absorbance/ mg protein)
Saline/vehicle	0.02 \pm 0.03	0.14 \pm 0.13	0.14 \pm 0.10
CFA/vehicle	0.40 \pm 0.21*	0.14 \pm 0.08	0.42 \pm 0.24
CFA/EPFCA3	0.61 \pm 0.24*	0.16 \pm 0.12	0.45 \pm 0.17
CFA/MPFCA4	0.43 \pm 0.13*	0.15 \pm 0.08	0.51 \pm 0.34
CFA/dipyrrone	0.23 \pm 0.05*	0.11 \pm 0.04	0.32 \pm 0.20

^a myeloperoxidase; ^b N-acetyl- β -D-glucosaminidase; ^c eosinophil peroxidase

Data are reported as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ compared with saline/vehicle group.