



**UFSM**

**Dissertação de Mestrado**

**DERIVADOS PIRAZOLÍNICOS INÉDITOS CAUSAM  
ANTINOCICEPÇÃO EM CAMUNDONGOS  
NO TESTE DA FORMALINA**

---

**Patricia Dutra Sauzem**

**PPGBT**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2004**

**DERIVADOS PIRAZOLÍNICOS INÉDITOS CAUSAM  
ANTINOCICEPÇÃO EM CAMUNDONGOS  
NO TESTE DA FORMALINA**

---

por

**Patricia Dutra Sauzem**

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

**PPGBT**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2004**

*“SOMOS FEITOS DA MESMA MATÉRIA QUE  
COMPÕE OS NOSSOS SONHOS”.*

*(William Shakespeare)*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, causa primeira de todas as coisas, pelas oportunidades que colocou em meu caminho e por ter povoado minha vida com tantas pessoas maravilhosas.

Aos meus pais, José Antônio e Maria Neida, pelo exemplo de luta e dignidade e por terem dado condições materiais e morais para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Aos meus irmãos Rafael e Ismael, pelas risadas e brincadeiras nas horas de descontração.

À minha irmã Danusa e meu cunhado Adriano, pela convivência amiga e por terem trazido ao mundo o nosso amado João Vítor.

Ao pequeno João Vítor, que na inocência do seu sorriso e na alegria de cada descoberta, faz crescer em mim o desejo de desvendar os mistérios dessa vida.

À minha orientadora Maribel Antonello Rubin, por ter me aceito em seu grupo de pesquisa e por sempre me incentivar a prosseguir, mesmo quando tudo parecia dar errado.

Ao meu co-orientador Carlos Fernando de Mello, por dispensar um pouco do seu tempo, tão concorrido, para auxiliar na execução dos experimentos e elaboração dessa dissertação.

Aos meus alunos de iniciação científica e colegas de laboratório, sem os quais esse trabalho não seria possível. Em especial, à Gabriela da

Silva Sant'Anna, "minha escrava", que acompanhou esse trabalho do início ao fim, estando presente nos momentos bons e ruins (e, principalmente, nas festas). Ao Henrique, ao Leonardo, ao Mateus e à Sara pela disposição de trabalhar e aprender coisas novas, mesmo nas vésperas de prova. Às colegas de pós-graduação Alessandra Hübner de Souza e Julie Milano, que além de auxiliarem no trabalho, tornaram-se amigas muito queridas. À Daiane Bolzan Berlese, por iluminar o laboratório com sua alegria, pela amizade, pela ajuda nos experimentos, por estar sempre presente nos momentos difíceis, não medindo esforços para me ajudar quando foi preciso... não tenho palavras para agradecer. Aos colegas e amigos Gustavo, Jô, Nando, Michele, Ana Flávia, Mauro, Ju, Nádia, Lia e Flávia, pelos momentos de alegria, por tornarem o trabalho mais agradável com sua presença e, é claro, pelas festas no "espaço FAMA".

Ao pessoal do NUQUIMHE, responsável pela síntese das drogas, especialmente ao Pablo, pela sua dedicação ao trabalho de síntese.

Aos demais colegas do laboratório e a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho, o meu muito obrigado!

E, finalmente, aos indefesos camundongos e ratos, que com o sacrifício de suas vidas contribuem para o progresso da ciência.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xv</b>
<b>I – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
I.1 – DOR E NOCICEPÇÃO .....	2
I.2 – NOCICEPTORES – OS RECEPTORES DA DOR .....	4
I.3 – TRANSMISSÃO DA DOR NA MEDULA ESPINHAL .....	7
I.4 – MEDIADORES QUÍMICOS DA DOR E DA INFLAMAÇÃO .....	10
I.4.1 – Prostaglandinas .....	12
I.4.2 – Aminoácidos excitatórios e substância P .....	13
I.5 – TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DOR .....	15
I.5.1 – Derivados pirazolínicos .....	19
I.5.1.1 – Mecanismo de ação dos derivados pirazolínicos .....	23
I.5.1.1 – A busca de novos derivados pirazolínicos .....	28
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
II.1 – OBJETIVO GERAL .....	38
II.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	38
<b>III – MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>

III.1 – DROGAS E REAGENTES .....	40
III.2 – PREPARO DAS DROGAS E REAGENTES .....	41
III.2.1 – Soluções de NF0 e NF2 .....	41
III.2.2 – Solução de Morfina .....	41
III.2.3 – Solução de Indometacina .....	41
III.2.4 – Solução de Naloxona .....	42
III.2.5 – Solução de Formalina 1,5% .....	42
III.2.6 – Suspensão de Carragenina 1% .....	42
III.2.7 – Solução de Ácido acético 0,8% .....	42
III.3 – ANIMAIS .....	42
III.4 – TESTES COMPORTAMENTAIS .....	43
III.4.1 – Teste da formalina .....	43
III.4.2 – Teste da placa quente .....	44
III.4.3 – Teste das contorções abdominais .....	44
III.4.4- Teste da locomoção forçada em cilindro giratório (rotarod) ..	45
III.4.5- Teste da edema de pata induzido por carragenina .....	46
III.5 – Análise estatística .....	47
<b>IV. RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
IV.1 – Efeito da administração subcutânea de NF0 e NF2 sobre o comportamento nociceptivo induzido por formalina em camundongos .....	49

IV.2 – Estudo do envolvimento de mecanismo opióide na antinocicepção induzida por NF0 e NF2 no teste da formalina .....	52
IV.3 – Efeito da administração subcutânea de NF0, NF2, morfina ou veículo sobre a latência para resposta ao estímulo térmico, na placa quente .....	54
IV.4 – Efeito da administração subcutânea de NF0, NF2 ou veículo sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético, em camundongos .....	55
IV.5 – Efeito da administração subcutânea de NF0, NF2 ou veículo sobre as atividades locomotora e exploratória espontâneas de camundongos, no campo aberto .....	56
IV.6 – Efeito da administração subcutânea de NF0, NF2 ou veículo sobre a atividade locomotora forçada de camundongos, no cilindro giratório .....	57
IV.7 – Efeito da administração intraperitoneal de NF0, NF2, indometacina ou veículo (Tween a 5% em salina) sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos .....	58
<b>V – DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>VI – CONCLUSÕES .....</b>	<b>66</b>
<b>VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>68</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

AAE – aminoácido(s) excitatório(s)  
AAS – ácido acetilsalicílico  
AC – adenilato ciclase  
ANOVA – análise de variância  
ATP – adenosina trifosfato  
B50 – 2-[5-triclorometil-5-hidroxi-3-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-il]-4-(4-bromofenil)-5-metil tiazol  
BK – bradiginina(s)  
COX – ciclooxigenase  
DAINES – drogas antiinflamatórias não esteroidais  
EN – nociceptores específicos  
EP – receptor para prostaglandina E  
FAP – fibras aferentes primárias  
FNT- $\alpha$  – fator de necrose tumoral  $\alpha$   
FPCA – 3-fenil-5-hidróxi-5-triclorometil-1*H*-1-pirazolcarboxiamida  
FR140423 – 3-(difluormetil)-1-(4-metóxi-fenil)-5-[4-metilsulfinil]fenil] pirazol  
GMP<sub>C</sub> – guanosina monofosfato cíclico  
GRD – gânglio da raiz dorsal  
IL – interleucina(s)  
IP – receptor para prostaglandina I  
LC – lócus ceruleus  
L-NAME – N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina  
LPS – lipopolissacarídeo(s)  
MPCA – 3-fenil-5-hidróxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazolcarboxamida  
NAD – nicotinamida adenina difosfato  
NF0 – 4-metil-5-hidróxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazolcarboxamida  
NF2 – 4-metil-5-hidróxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazolcarboxamida  
NK – neurocinina(s)  
NMDA – N-metil-D-aspartato  
NMR – núcleo magno da rafe  
NO – óxido nítrico  
NOS – óxido nítrico sintase  
NPY – neuropeptídeo Y  
NRPG – núcleo reticular paragigantocelular  
PAG – substância cinzenta periaquedutal  
PEPS – potencial excitatório pós-sináptico  
PG – prostaglandina(s)  
PLC – fosfolipase C  
PRGC – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina  
PZ2 – 3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1*H*-1-metilpirazol  
PZ3 – 3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1*H*-1-fenilpirazol  
SNC – sistema nervoso central  
SNP – sistema nervoso periférico  
SP – substância P  
5-HT – serotonina

**LISTA DE FIGURAS**

**Figura I.1** – Aferências medulares dos nociceptores: corte transversal da medula espinhal, mostrando as sinapses das fibras C e A $\delta$  nas lâminas I, II, III e V ..... 5

**Figura I.2** – A via espinotalâmica – principal via pela qual a informação da dor é transmitida ao tálamo e ao córtex ..... 9

**Figura I.3** – Agentes algogênicos na nocicepção..... 11

**Figura I.4** – Principais locais de ação dos opióides ..... 18

**Figura I.5** – Anel pirazolínico ..... 19

**Figura I.6** – Estrutura química do FR140423 ..... 31

**Figura III.1** – Fórmula estrutural dos derivados pirazolínicos inéditos fornecidos pelo NUQUIMHE/CCNE/UFSM ..... 40

**Figura IV.1** – Efeito da administração de NF0 ou veículo sobre o comportamento de lambar a pata no teste da formalina ..... 50

**Figura IV.2** – Efeito da administração de NF2 ou veículo sobre o comportamento de lambar a pata no teste da formalina ..... 51

**Figura IV.3** – Efeito da pré-administração de naloxona ou salina sobre a duração do comportamento de lambar a pata em camundongos tratados com NF0, NF2, morfina ou veículo ..... 53

**Figura IV.4** – Efeito da administração intraperitoneal de NF0, NF2, indometacina ou veículo (Tween a 5% em salina) sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos ..... 59

**LISTA DE TABELAS**

**Tabela I.1** – Derivados pirazolínicos clássicos ..... 22

**Tabela I.2** – Derivados pirazolínicos inéditos sintetizados no NUQUIMHE..... 33

**Tabela IV.1** – Efeito da administração de NF0, NF2, morfina ou veículo sobre a latência para a resposta ao estímulo térmico, na placa quente, em camundongos ..... 54

**Tabela IV.2** – Efeito da administração de NF0, NF2 ou veículo sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8% em camundongos ..... 55

**Tabela IV.3** – Efeito da administração de NF0, NF2 ou veículo sobre as atividades locomotora e exploratória espontâneas de camundongos no campo aberto ..... 56

**Tabela IV.4** – Efeito da administração subcutânea de NF0, NF2 ou veículo sobre a atividade locomotora forçada de camundongos no cilindro giratório ..... 57

**RESUMO**

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

**DERIVADOS PIRAZOLÍNICOS INÉDITOS CAUSAM ANTINOCICEPÇÃO EM  
CAMUNDONGOS NO TESTE DA FORMALINA**

Autora: Patricia Dutra Sauzem

Orientadora: Maribel Antonello Rubin  
Co-orientador: Carlos Fernando de Mello

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 29 de julho 2004.

Os derivados pirazolínicos foram descobertos por volta de 1884 pelo químico alemão Ludwig Knorr, quando ele tentava sintetizar derivados de quinolina com atividade antipirética e, acidentalmente, obteve a antipirina, uma pirazolona com atividade analgésica, antipirética e anti-reumática. Desde então, novos compostos pirazolínicos como a fenilbutazona e a dipirona foram descobertos. O derivado pirazolínico mais estudado até o momento é a dipirona, que apresenta atividade antipirética, analgésica e pouca atividade antiinflamatória. O mecanismo de ação proposto para os compostos pirazolínicos é a inibição da síntese de prostaglandinas, tanto central quanto periféricamente. Nesse trabalho avaliou-se o potencial antinociceptivo e antiedematogênico de dois derivados pirazolínicos inéditos: 4-metil-5-hidróxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazolcarboxamida (NF0) e seu análogo 3- metil-5-hidróxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazolcarboxamida (NF2). O potencial antinociceptivo foi avaliado nos testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético, placa quente, e formalina, em camundongos. A atividade antiedematogênica foi avaliada em ratos, pelo teste de edema de pata induzido por carragenina. Também foi avaliado o efeito dessas drogas sobre a atividade locomotora e exploratória de camundongos. A administração subcutânea do NF0 (30, 100, 300 e 1000  $\mu\text{mol/kg}$ ) induziu diminuição do comportamento de lamber a pata na fase neurogênica do teste de formalina, enquanto que somente as duas maiores doses foram capazes de inibir a nocicepção na fase inflamatória desse teste. Por outro lado, o NF2 não apresentou ação na fase neurogênica e foi capaz de inibir o comportamento de lamber a pata, apenas na dose de 1000  $\mu\text{mol/kg}$ , na fase inflamatória. A pré-administração de naloxona (2,75  $\mu\text{mol/kg}$ ) não preveniu a antinocicepção induzida pelo NF0 e pelo NF2. O NF0 e o NF2 não tiveram efeito antiedematogênico no teste de edema de pata induzido por carragenina, quando administrados numa dose de 200  $\mu\text{mol/kg}$ . Esses compostos, também, não alteraram a atividade motora dos camundongos no teste do cilindro giratório e não modificaram o comportamento dos animais no campo aberto. Esses resultados sugerem que o NF0 induz antinocicepção nas fases neurogênica e inflamatória no teste da formalina, enquanto que o NF2 somente apresenta efeito na fase inflamatória, e que esse efeito não envolve mecanismos opióides. É importante ressaltar que a única diferença estrutural desses compostos reside na posição de um grupamento metila, que no NF0 encontra-se na posição 4 do anel pirazol e no NF2 está na posição 3 do anel, demonstrando uma importante relação estrutura-atividade no efeito antinociceptivo desses compostos.

**ABSTRACT**

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

**NEW PIRAZOLE DERIVATIVES INDUCED ANTINOCICEPTION IN MICE  
IN THE FORMALIN TEST**

Author: Patricia Dutra Sauzem

Advisors: Prof. Dr. Maribel Antonello Rubin  
Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello

Place and date: Santa Maria, July 29<sup>th</sup>, 2004.

The discovery of pyrazole derivatives dates back to 1884, when the German chemist Ludwig Knorr attempted to synthesize quinoline derivatives with antipyretic activity and accidentally obtained antipyrine, a pyrazolinone, which has analgesic, antipyretic and antirheumatic activity. Since then, new pyrazole compounds, like phenylbutazone and dipyron, were discovered. Dipyron, probably the most widely studied pyrazole derivative, present analgesic, antipyretic and few antiinflammatory activities. The mechanism of action of pyrazole compounds seems to involve the central and peripheral inhibition of cyclooxygenase, a key enzyme in the synthesis of prostaglandin. In this work we studied the antinociceptive and antiinflammatory effects of a novel pyrazole-derived compounds: 4-methyl-5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-1-pyrazolcarboxamide (NF0) and its related compound 3-methyl-5-hydroxy-5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1*H*-1-pyrazolcarboxamide (NF2). The antinociceptive potential was assessed using abdominal writhing, hot plate and formalin tests in adult mice. Antiinflammatory activity was assessed by paw plethysmometry in adult rats using the carrageenin-induced paw edema test. Subcutaneous administration of NF0 (30, 100, 300 and 1000  $\mu\text{mol/kg}$ ) decreased time spent licking or biting the injected paw in the neurogenic phase of the formalin test. However, only 300 and 1000  $\mu\text{mol/kg}$  NF0 decreased licking time in the inflammatory phase of the formalin test. On the other hand, subcutaneous administration of NF2 had no effect on licking time during the neurogenic phase, but decreased licking time in inflammatory phase of the formalin test at dose of 1000  $\mu\text{mol/kg}$ . Naloxone (2,75  $\mu\text{mol/kg}$ ) pre-administration did not prevent NF0 and NF2-induced antinociception, suggesting that opioid mechanisms may not underlie such effects. NF0 and NF2 were devoid of antiinflammatory activity in the paw edema test in rats, and had no effect on the spontaneous locomotor activity and motor performance of mice in the rotarod test. These results suggest that NF0 induces antinociception in the neurogenic and inflammatory phases of the formalin test, while NF2 causes antinociception only inflammatory phase. Interestingly, the only difference between these compounds is the position of a methyl group in the pyrazole ring. In NF0, the methyl group is placed at position 4 of the pyrazole ring, while NF2 has such a methyl group positioned at the position 3. These results suggest an important structure-activity relationship for the antinociceptive effect these compounds.

---

## I. INTRODUÇÃO

## I.1 – DOR E NOCICEPÇÃO

Dor, segundo a IASP – International Association for the Study of Pain –, é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada à lesão tecidual real ou potencial (Tjolsen & Hole, 1997; Douglas, 1999). Sendo assim, podemos dizer que a dor é uma resposta que alerta os indivíduos para a ocorrência de alterações na integridade e na funcionalidade do organismo, permitindo que mecanismos de defesa ou de fuga sejam adotados (Millan, 1986; Traub, 1997).

Existem várias formas de classificar a dor, sendo a sua duração ao longo do tempo um dos critérios mais adotados. Assim, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda tem função de alerta, caracteriza-se por ser de curta duração (alguns segundos até poucos dias) e segue-se à lesão tecidual, desaparecendo com a resolução do processo que a originou. Como exemplo, podemos citar o contato com uma chapa quente ou a dor pós-operatória, que cessam assim que a lesão é curada (Bernard *et al.*, 1996; Loeser & Melzack, 1999). A etiologia da dor aguda é geralmente evidente e seu diagnóstico é facilmente definido. Além disso, a dor aguda é controlada com eficiência usando-se o arsenal de drogas existentes no mercado e as diversas técnicas de controle de dor (Portenoy & Lesage, 1999).

A dor crônica, por sua vez, é aquela que persiste além do tempo necessário para a cura da lesão, estendendo-se por meses ou anos



(Ashburn & Staats, 1999). Esse tipo de dor é consequência de processos patológicos, que agredem as estruturas somáticas ou viscerais, e de disfunções do sistema nervoso central (SNC) ou do sistema nervoso periférico (SNP). 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. Como exemplo de dor crônica podemos citar aquela causada por tumores metastáticos, ou aquela associada a processos inflamatórios crônicos, como a artrite (Carvalho, 1999).

A percepção de estímulos nocivos, denominada por Sherrington (1906) de nocicepção, não significa o mesmo que a sensação de dor. Assim, 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 a medula dorsal (Dubner & Bennet, 1983; Jessel & Kelly, 1992; Meyer *et al.*, 1994).

Uma vez que os animais não são capazes de verbalizar os componentes subjetivos da dor, neles não se avalia dor, mas nocicepção. 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).

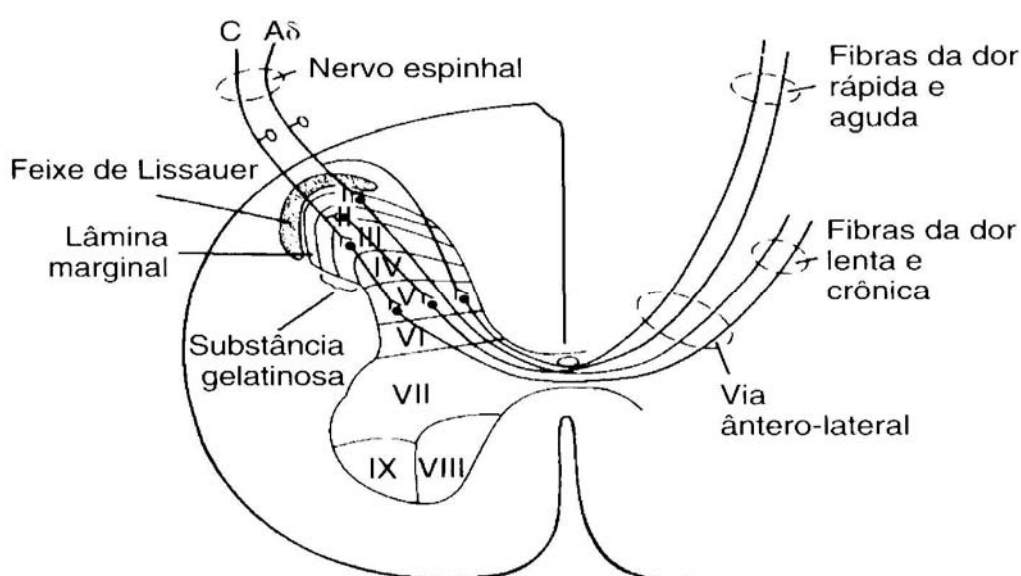
A nocicepção desencadeia no animal comportamentos típicos, como lambar ou morder a área lesada, vocalização, ou reflexo de retirar a parte do corpo agredida do contato com o estímulo nocivo. Tais comportamentos evidenciam ao experimentador a nocicepção, e são denominados comportamentos nociceptivos. Portanto, as drogas que suprimem os comportamentos nociceptivos são denominadas antinociceptivas, e aquelas que induzem o comportamento nociceptivo são chamadas de pró-nociceptivas, ou algogênicas. É importante esclarecer, contudo, que as drogas antinociceptivas não são, obrigatoriamente, analgésicas, visto que a supressão do comportamento nociceptivo pode ser desencadeada por outros fatores, como prejuízo motor e sedação, que diferem de analgesia (Douglas, 1999).

## **I.2 – NOCICEPTORES – OS RECEPTORES DA DOR**

O termo nociceptor é uma abreviatura de “nocirreceptor”, e denota um receptor para o estímulo nociceptivo (Rang & Dale, 1991). Esse termo foi introduzido por Sherrington, que definiu nociceptores como terminações livres de neurônios aferentes primários, que podem ser despolarizados por estímulos mecânicos, térmicos ou químicos (Kress & Zeilhofer, 1999).

A percepção da dor se inicia na periferia pela estimulação dos nociceptores, cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios das

raízes dorsais e projetam seus axônios até o corno dorsal da medula (Figura I.1). Os nociceptores são inervados pelas fibras A $\delta$ , que são fibras mielinizadas, de condução rápida (2,5 a 36 m/s) e pelas fibras C, que não são mielinizadas e transmitem o estímulo de forma mais lenta (0,7 a 1,5 m/s). (Smith, 1984; Guyton, 1997; Natalini, 2000; 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 (Björkman, 1995).



**Figura I.1** – Aferências medulares dos nociceptores: corte transversal da medula espinhal, mostrando as sinapses das fibras C e A $\delta$  nas lâminas I, II, III e V. Reproduzido de Guyton, 1997.

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 sensação nociceptiva) 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 ativação dos nociceptores periféricos provoca, além da sensação nociceptiva, uma resposta de defesa chamada reflexo de retirada. Esse reflexo tem o objetivo de preservar a área atingida evitando um dano tecidual maior. Quando o impulso chega ao corno dorsal, pequenos neurônios comunicam-se com o corno motor anterior. Essa comunicação permite que reflexos musculares sejam acionados de forma

a remover a parte do corpo agredida do contato com o agente agressor (Millan, 1999).

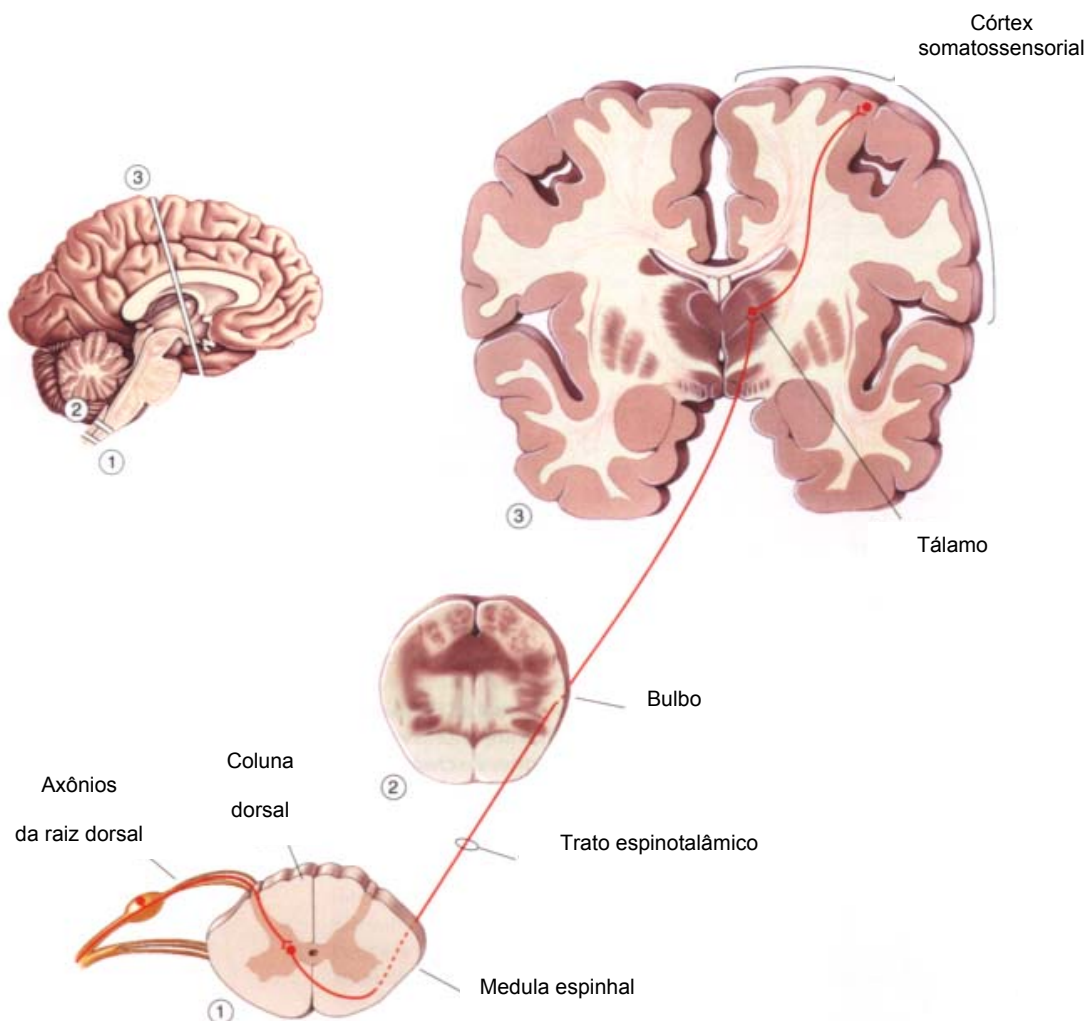
A estimulação da fibra aferente primária, além de desencadear o reflexo de retirada e a condução do estímulo nociceptivo para os centros superiores, também provoca a liberação de neuropeptídeos, e outras substâncias algogênicas, pelos terminais axonais colaterais da própria fibra aferente primária, conferindo-lhe um papel eferente na transmissão do estímulo nociceptivo. Na verdade, tais substâncias estimulam fibras aferentes vizinhas, ativam células do sistema imunológico e aumentam a permeabilidade vascular, desencadeando uma resposta inflamatória, que por ser secundária à ativação do aferente primário, é denominada inflamação neurogênica (Millan, 1999).

### **I.3 – TRANSMISSÃO DA DOR NA MEDULA ESPINHAL**

A informação nociceptiva chega ao corno dorsal da medula espinhal através das fibras aferentes primárias. A partir deste local, a informação é transmitida via fibras ascendentes aos centros supra-espinhais, onde ocorre a interpretação e localização da dor (Guyton, 1997). 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).

Os neurônios aferentes primários fazem sinapse com neurônios secundários na medula espinhal, mais especificamente nas lâminas I a V do corno dorsal (Figura 1.1) (Guyton, 1997). A liberação de neurotransmissores nociceptivos das fibras aferentes primárias provoca ativação dos neurônios secundários no corno dorsal na medula. Esses neurônios secundários, por sua vez, fazem parte das vias que transmitem o estímulo doloroso da medula para o encéfalo. A via mais importante de transmissão do estímulo nociceptivo na medula espinhal é o trato espinotalâmico ascendente (Figura 1.2), localizado na substância branca ventral contralateral ao local da estimulação (Guyton, 1997; Bester, 2000). Como o próprio nome sugere, as fibras espinotalâmicas projetam-se para o tálamo, onde se dá a percepção de que existe uma sensação nociceptiva (Guyton, 1997, Bear *et al.*, 2002).



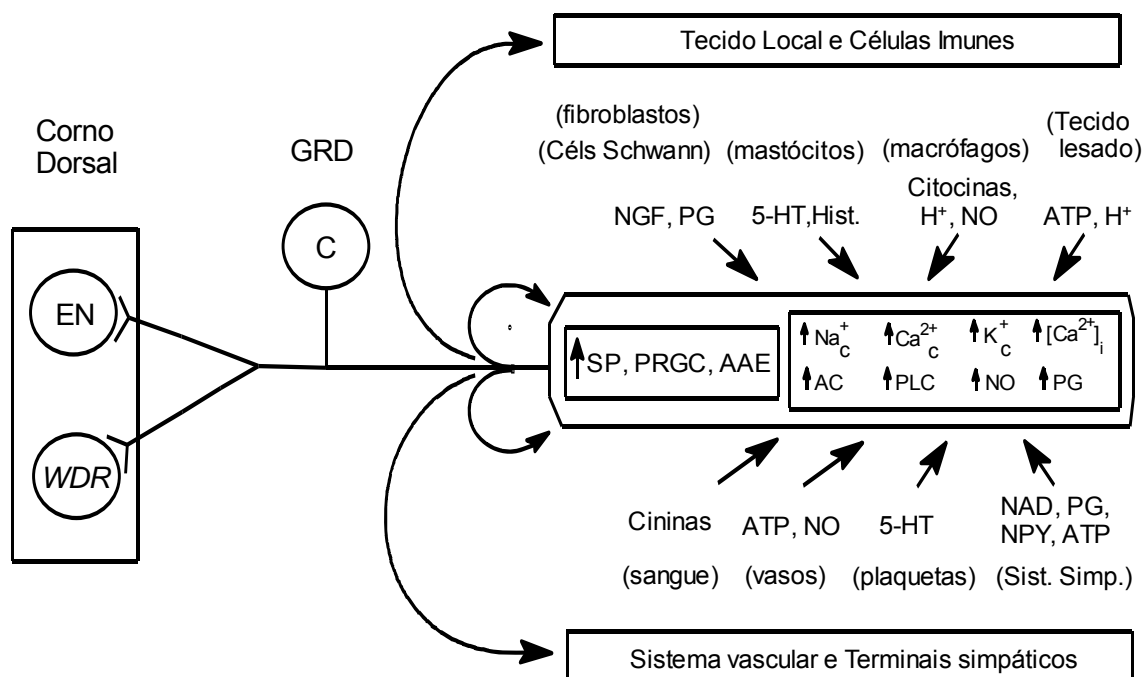
**Figura I.2** – A via espinotalâmica – principal via pela qual a informação da dor é transmitida ao tálamo e ao córtex. Adaptado de Bear *et al.*, 2002.

#### I.4 – MEDIADORES QUÍMICOS DA DOR E DA INFLAMAÇÃO

A injúria tecidual provoca aumento da vascularização para os tecidos lesados, ativação do sistema simpático e aparecimento de vários agentes algogênicos. Tais agentes algogênicos, originados de células lesadas, células do sistema imunológico, de terminais simpáticos e do sistema vascular, induzem despolarização do aferente primário. Substâncias como íons  $K^+$ , adenosina trifosfato, glutamato, substância P e radicais livres participam do mecanismo da nocicepção (Dray & Perkins, 1993; Dray, 1995, 1997a, 1997b). Os debris celulares resultantes de lesão tecidual são capazes de desencadear uma reação inflamatória local, atraindo eosinófilos, macrófagos e linfócitos. Essas células liberam mediadores inflamatórios como: cininas (bradicinina e calidina); produtos das células da imunidade (citocinas, como as interleucinas IL e o fator de necrose tumoral); aminas (serotonina, histamina); e prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina e leucotrienos). Assim, a injúria celular e a reação inflamatória que advém de tal injúria, expõem o aferente primário a um grande número de substâncias capazes de estimular e sensibilizar o nociceptor. O aferente primário, por sua vez, transfere o impulso nociceptivo a neurônios específicos para a nocicepção (EN) ou a neurônios que também transmitem outras sensações (WDR) no corno dorsal da medula (Taiwo & Levine, 1991; Guieu *et al.*, 1996; Millan, 1997, 1999; Calixto *et al.*, 2000, 2001).



Na figura I.3 observa-se a influência de mediadores da inflamação pró-nociceptivos sobre a atividade das fibras nociceptivas polimodais C (nociceptores específicos-EN) e as fibras WDR (fibras envolvidas com outras sensações). Há uma relação facilitatória recíproca entre as FAP (fibras aferentes primárias) e os vários mediadores da resposta inflamatória. Podemos ver que existe retroalimentação positiva dos aminoácidos excitatórios (AAE) e a substância P (SP) nas FAP.



**Figura I.3** – Agentes algogênicos na nocicepção. Adaptado de Millan, 1999.

#### I.4.1 – Prostaglandinas

A enzima ciclooxigenase (COX) catalisa a síntese de prostaglandinas (PG) a partir do ácido araquidônico, um componente ubíquo da membrana celular (Millan, 1999).

O ácido araquidônico é formado a partir de fosfolipídios de membrana, pela ação da fosfolipase A<sub>2</sub>, e pode ser transformado em prostaglandinas por duas isoformas de ciclooxigenases, denominadas constitutiva (COX-1) e induzível (COX-2). Embora todas as células possam sintetizar prostaglandinas, sob condições de inflamação tecidual e lesão nervosa, a maior parte das prostaglandinas é sintetizada pelas células do sistema imunológico e pelos terminais nervosos simpáticos, que expressam a isoenzima COX-2 em maior abundância (Levine *et al.*, 1986b; Taiwo & Levine, 1988; Levine & Taiwo, 1994; Miao *et al.*, 1996). Os mediadores da resposta inflamatória, como NO e citocinas derivadas de células do sistema imunológico (interleucina IL-1 $\beta$  e fator de necrose tumoral FNT- $\alpha$ ) são indutores potentes da COX-2 nestas células (Coleman, 2001).

É importante ressaltar que a aplicação de prostaglandinas na pele, normalmente, não desencadeia uma resposta dolorosa. Contudo, altos níveis de PG E<sub>2</sub> e PG I<sub>2</sub> podem excitar as fibras C aferentes, uma vez que elas diminuem a permeabilidade ao K<sup>+</sup> e aumentam condutância ao Na<sup>+</sup> e ao Ca<sup>2+</sup>, culminando na liberação de neuropeptídeos pelos terminais destas fibras (Birrell *et al.*, 1991; Puttick, 1992; Schepelmann *et*

*al.*, 1992; Nicol *et al.*, 1992; Rueff & Dray, 1993; Wang *et al.*, 1996; Nicol *et al.*, 1997). Os mecanismos celulares exatos e os subtipos de receptores envolvidos nesta ação das prostaglandinas ainda não estão definidos, mas há evidências de que a ativação de receptores EP e IP, assim como o aumento nas atividades da fosfolipase C (PLC), adenilato ciclase (AC) e nos níveis de  $[Ca^{2+}]_i$  sejam importantes para tal efeito (Coleman, 1994). Esses mesmos receptores também medeiam a sensibilização das FAP às BK, assim como a vários outros estímulos, resultando em um efeito algogênico pronunciado (Millan, 1999).

Além de dar origem às PG, o ácido araquidônico pode gerar leucotrienos, tromboxanos e derivados do ácido hidróxi-eicosotetranóico, quando metabolizado por outro grupo de enzimas denominadas lipooxigenases. Contudo, pouco se sabe sobre as ações pró-nociceptivas dessas substâncias, exceto que o leucotrieno B<sub>4</sub>, acumula-se no tecido inflamado e parece desencadear a liberação de 8R,15S,-diHETE de leucócitos polimorfonucleares. Esse leucotrieno interage com terminais cutâneos de fibras C e causa hiperalgesia, por um mecanismo, até agora, desconhecido (Levine *et al.*, 1984, 1986a; Bisgaard & Kristensen, 1985; White *et al.*, 1990; Amann *et al.*, 1996).

#### **I.4.2 – Aminoácidos excitatórios e substância P**

A modulação da nocicepção pelos aminoácidos excitatórios (AAE) no corno dorsal reflete não somente efeitos nos neurônios intrínsecos do

cornos dorsais, mas também ações nos terminais das FAP, a partir dos quais eles são liberados. (Ferreira & Lorenzetti, 1996). Um aumento nos níveis de glutamato derivado dos terminais das FAP e, talvez, das células do sistema imunológico tem sido observado nos tecidos inflamados (Jeftinija *et al.*, 1991; Piani *et al.*, 1991; Westlund *et al.*, 1992; Wood & Docherty, 1997). Existem vários relatos de que o glutamato causa hiperalgesia pela estimulação direta dos terminais das FAP (Carlton *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996). Warncke e colaboradores (1997a, 1997b) mostraram que a administração local do bloqueador do receptor n-metil-D-aspartato (NMDA), cetamina, inibe a hiperalgesia primária e secundária na pele, sugerindo que os receptores NMDA periféricos podem participar nos processos pró-nociceptivos. Uma ação excitatória direta, do tipo retroalimentação positiva, do glutamato nas FAP, seria consistente com a evidência de que a ativação dos receptores NMDA causa a liberação de substância P por seus terminais centrais (Liu *et al.*, 1994, 1997). Esta ação envolvendo o receptor NMDA pode ser mediada via óxido nítrico dos terminais das FAP, e o NO poderia também interferir nas ações periféricas, mediadas pelas FAP (Jackson *et al.*, 1995; Lawand *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997).

Além disso, o glutamato induz a liberação de substância P das FAP e de terminais simpáticos, de tal forma que este peptídeo também pode estar envolvido na nocicepção induzida por glutamato. De fato, da mesma forma que o glutamato, a substância P pode ativar as FAP em vários

tecidos pela ativação receptores do tipo NK<sub>1</sub> (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 1989; Inoue *et al.*, 1995; Hu & Li, 1996; Carlton *et al.*, 1996; Heppelmann & Pawlak, 1997). Os receptores NK<sub>2</sub> e PRGC<sub>1</sub> podem também ser ativados nas FAP e, conseqüentemente, causar dor (Edvinsson *et al.*, 1997; Weinreich *et al.*, 1997).

Os aminoácidos excitatórios, taquicininas e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (PRGC) agem cooperativamente e sinergicamente, causando potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPS) nos neurônios do corno dorsal. Entretanto, seus padrões temporais são contrastantes e seus respectivos papéis dependem da natureza e duração do estímulo nociceptivo (Millan, 1999).

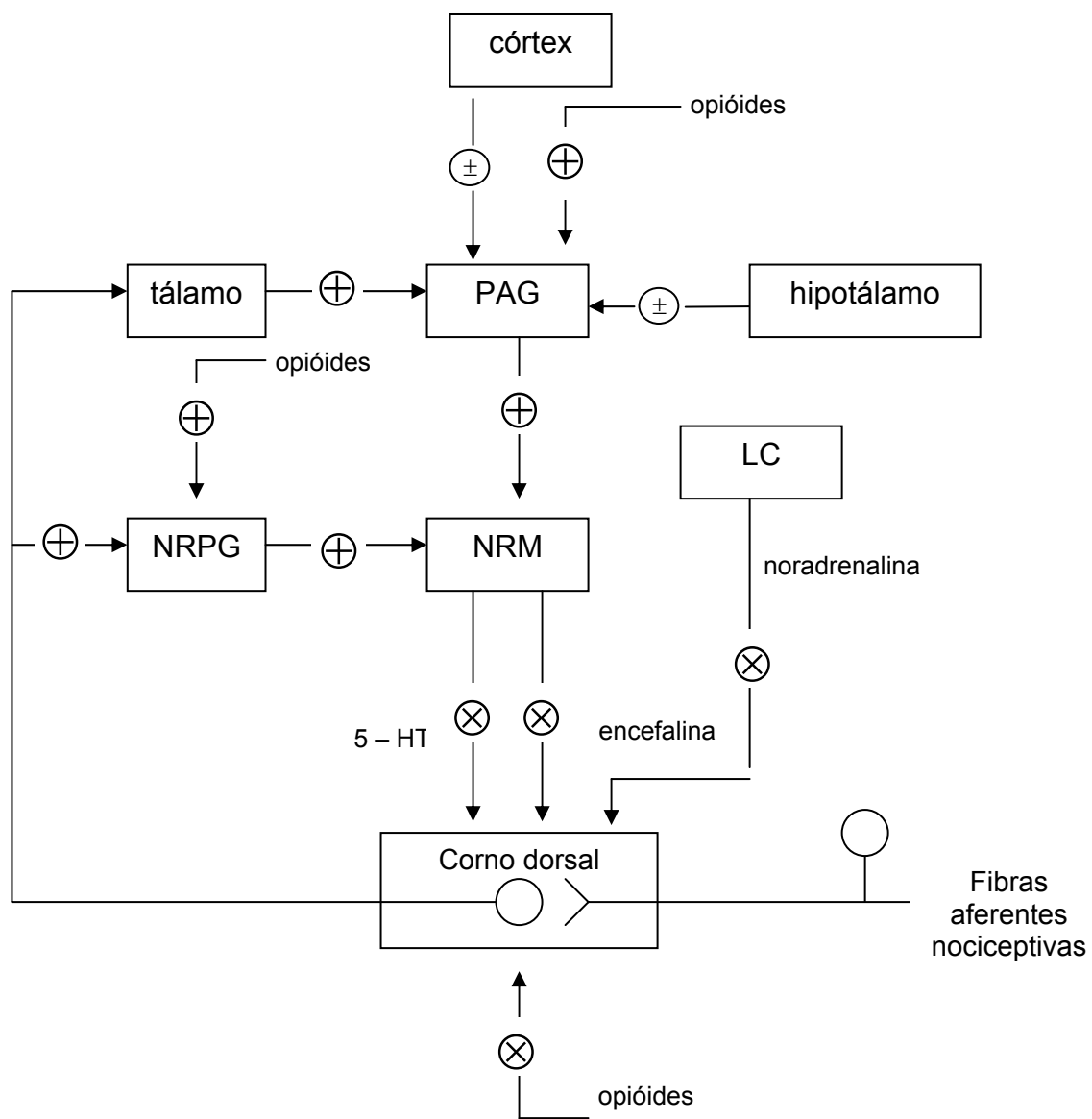
## **I.5 – TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DOR**

O arsenal farmacológico para o tratamento da dor é composto, basicamente, por dois grandes grupos de drogas analgésicas: os opióides, que são drogas derivadas do ópio e incluem a morfina, a codeína e uma ampla variedade de congêneres semi-sintéticos derivados deles, e as drogas antiinflamatórias não esteroidais – DAINES. (Rainsford & Velo, 1992; Reisine & Pasternack, 1996). Embora os opióides sejam muito efetivos, principalmente no tratamento da dor aguda, sua utilização é limitada pelo fato dessas drogas apresentarem muitos efeitos indesejados, como constipação, náuseas, vômitos, broncoconstrição,

hipotensão, bradicardia e depressão respiratória (McQueen, 1983; Hoskin & Hanks, 1991). Além disso, a tolerância aos opióides instala-se rapidamente, sendo identificada dentro de 12-24 após administração de morfina, e a dependência física é visível após poucos dias de tratamento (Martin & Sloan, 1977; Nestler, 1993). Sendo assim, as DAINES têm vantagens sobre os analgésicos opióides por não provocarem tolerância e dependência com o uso crônico (Nuki, 1983; Rainsford & Velo, 1992). No entanto, as DAINES também podem produzir efeitos indesejáveis como hemorragias, úlcera gástrica, falência renal e hepática, reações cutâneas, agranulocitose e crises asmáticas (Larregina et al., 1994; Borne, 1995).

As DAINES 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 naproxeno e o ibuprofeno; ácidos acéticos, como a indometacina; fenamatos, como o ácido mefenâmico; oxicans, como o piroxicam; pirazolonas, como a dipirona e a fenilbutazona; entre outras). A maioria das DAINES possui atividade antiinflamatória, analgésica e antipirética (Rang *et al.*, 1995). O principal mecanismo de ação das DAINES é a inibição da COX, que culmina na diminuição da síntese de prostaglandinas (Vane, 1971; Vane & Botting, 1987; Vane, 1994). Dentre as DAINES, 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.

Na figura I.4 estão representados os possíveis alvos da ação dos opióides na via nociceptiva. Os opióides excitam neurônios na PAG (substância cinzenta periaquedutal) e no NRPG (núcleo reticular paragigantocelular), que, por sua vez, se projetam para o bulbo rostroventral, que inclui o NMR (núcleo magno da rafe). A partir do NMR, os neurônios que contem 5-HT e encefalina dirigem-se para o corno dorsal e inibem a transmissão da dor. O LC (locus ceruleus) envia neurônios noradrenérgicos para o corno dorsal, que também inibem a dor.

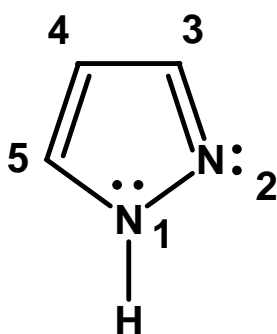


**Figura I.4** – Principais locais de ação dos opióides. Adaptado de Rang *et al.*, 1995.



### I.5.1 – Derivados pirazolínicos

Os pirazolínicos, ou pirazóis, são drogas de origem sintética que possuem em sua estrutura um anel pirazolínico, que é um heterociclo de cinco membros, contendo dois átomos de nitrogênio nas posições 1 e 2 do anel (Figura I.5). Esses compostos aliam atividade antiinflamatória, analgésica e antipirética (Borne, 1995; Gürsoy *et al.*, 2000) e, por isso, são eficazes no controle da dor.



**Figura I.5** – Anel pirazolínico

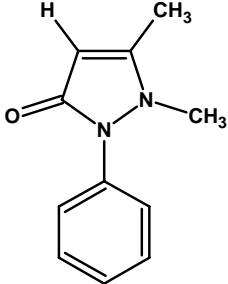
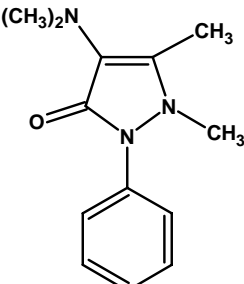
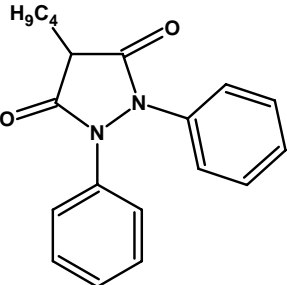
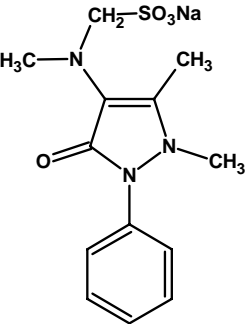
A descoberta dos derivados pirazolínicos como agentes antipiréticos data de 1884, quando o químico alemão Ludwig Knorr tentava sintetizar derivados quinolínicos com atividade antipirética e, acidentalmente, obteve a antipirina (Tabela I.1). Esse composto possui atividade analgésica, antipirética e anti-reumática, porém é muito tóxico. Mais tarde foi sintetizado um derivado 3-metilamino da antipirina, a aminopirina (Tabela I.1), 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 desse composto (Borne, 1995). Devido ao esse grave efeito colateral, o interesse pela pesquisa de novos compostos pirazolínicos foi pequeno até meados de 1940, quando uma série de pirazolidinodionas mais seguras foi sintetizada (Insel, 1996). O representante mais importante dessa série é a fenilbutazona (Tabela I.1), um antiinflamatório muito potente, embora seu uso em alguns países seja restrito ao tratamento da espondilite anquilosante, devido aos seus efeitos colaterais.(Rang *et al.*, 1995). 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 (Tabela I.1), um outro derivado pirazolínico, pela substituição de uma das metilas do grupo amino da 5-pirazolona por metileno-sulfoxilato de sódio. Estudos em animais e humanos revelaram que a dipirona é um antipirético potente, tem boa atividade analgésica e fraca atividade antiinflamatória (Lecannelier, 1976). Esse produto foi introduzido no comércio com o nome de Novalgina<sup>®</sup>, sendo também denominado genericamente de metamizol (Mardones, 1976). A dipirona ganhou popularidade nos países em desenvolvimento e em alguns países da Europa, especialmente devido ao

seu baixo custo e alta eficácia (Arellano & Sacristan, 1990). Porém, o uso clínico da dipirona foi proibido nos Estados Unidos, onde seu uso foi relacionado a casos de agranulocitose (Insel, 1996). Entretanto, estudos mostram que incidência de agranulocitose em usuários de dipirona é muito baixa (3-19 casos por milhão), cerca de duas vezes maior que a incidência na população em geral (The international agranulocytosis and aplastic anemia study, 1986; Laporte & Carné, 1987). Além disso, outros analgésicos que gozam de popularidade no meio médico e acadêmico, como paracetamol e ácido acetilsalicílico (AAS), também causam efeitos indesejados graves, como necrose hepática (Rumack *et al.*, 1982; Dickenson, 1997) e Síndrome de Reye (Benedetti & Butler, 1990), em uma proporção muito maior do que a dipirona está associada a agranulocitose.

Tabela I.1 – Derivados pirazolínicos clássicos

Estrutura química	Nomenclatura	Nome genérico
	2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin-5-ona	Antipirina
	4-dimetilamino-2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin-5-ona	Aminopirina
	4-butil-1,2-difenil-3,5-pirazolidinodiona	Fenilbutazona
	sal sódico monoidratado do ácido [(2,3-diidro-1,5-dimetil-3-oxo-2-fenil-1H-pirazol-4-il)metilamino]metanossulfônico	Dipirona

Apesar de existir, ainda, muita controvérsia em relação à segurança do uso clínico da dipirona, esse é um derivado pirazolínico muito utilizado no tratamento farmacológico da dor. Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de elucidar completamente o mecanismo de ação da dipirona.

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

#### **I.5.1.1 – Mecanismo de ação dos derivados pirazolínicos**

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

Estudos têm demonstrado que a administração de DAINES pirazolínicas no sistema nervoso central (particularmente na medula espinhal), produz antinocicepção. (Yaksh & Hammond, 1982; Taiwo & Levine, 1988; Björkman, 1995; Tortorici *et al.*, 1996; Ochi & Goto, 2001; Hernandez & Vanegas, 2001). Em 1986, Carlsson *et al.*, na tentativa de demonstrar que o mecanismo de ação da dipirona poderia envolver o SNC, mostraram que a administração de dipirona intratecal, intraperitoneal ou diretamente na PAG diminui a excitabilidade das fibras C, e prolonga o tempo de latência para a retirada da cauda de um

estímulo térmico aversivo. Estes autores demonstraram, no mesmo estudo, que a dipirona, administrada endovenosamente, aumenta a atividade dos neurônios da PAG. Mais tarde, Carlsson & Jurna (1987) verificaram que o aumento da latência de retirada da cauda de um banho térmico, provocado pela dipirona é reduzido pela administração de procaína na PAG, sugerindo que o efeito da dipirona envolve a ativação de vias inibitórias descendentes. Posteriormente, foi demonstrado que a dipirona (e.v.) aumenta a atividade de neurônios da PAG e altera a excitabilidade das células *on-off* da medula ventro medial rostral (Tortorici & Vanegas, 1994), constituindo evidência experimental adicional de que a dipirona ativa as vias descendentes inibitórias.

Akman *et al.* (1996) demonstraram que a dipirona, administrada pelas vias subcutânea, intratecal ou intracerebroventricular, produz antinocicepção no teste das contorções abdominais e que a naloxona reverte essa ação, demonstrando o envolvimento de mecanismos opióides na antinocicepção produzida pela dipirona. No mesmo ano, Tortorici *et al.* (1996) também evidenciaram o envolvimento dos receptores opióides na antinocicepção induzida pela dipirona, uma vez que a injeção de naloxona diretamente na PAG revertia parcialmente os efeitos da dipirona no teste de retirada da cauda de ratos. Assim, o efeito antinociceptivo da dipirona pode ser mediado por receptores opióides na medula ventromedial (ligação entre PAG e medula espinhal) ou, então, na

própria medula espinhal (Hernandez & Vanegas, 2001) já que nesses estudos a naloxona reverteu o efeito da dipirona.

Marquez & Ferreira (1987) demonstraram que infusões repetidas e controladas 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 (um corticóide) e da indometacina, e evidenciaram 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.

A dipirona inibe o edema produzido pela aplicação de capsaicina na pele (inflamação neurogênica) (Schmeltz *et al.*, 2000). Ela é mais potente em inibir a hiperalgesia induzida pela prostaglandina E<sub>2</sub>, pela isoprenalina, por cloreto de cálcio e pela carragenina do que a indometacina, o paracetamol e o AAS. Isso indica que, ao contrário de outras DAINES clássicas, a dipirona bloqueia diretamente a hiperalgesia inflamatória e a inflamação neurogênica, que é secundária à estimulação do aferente primário, provocada por esses agentes (Lorenzetti & Ferreira, 1985). Em 1996, Lorenzetti & Ferreira observaram que administração de dipirona por via intratecal, intraperitoneal ou intraplantar inibe a nocicepção produzida por injeção de prostaglandinas, de maneira dose-dependente.

Neugebauer e colaboradores (1994), ao observar que a atividade espontânea dos neurônios da medula espinhal de cães e gatos era reduzida pela dipirona, concluíram que a atividade dos neurônios aferentes poderia estar sendo inibida diretamente pela pirazolona. 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 importante mecanismo sugerido para a antinocicepção provocada pela dipirona é a via L-arginina-óxido nítrico-GMP, já que o N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina (L-NAME), inibidor da enzima óxido nítrico sintase



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

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

- Diminuição da estimulação das fibras C e A $\delta$  (Neugebauer *et al.*, 1994; Carlsson *et al.*, 1986; Beirith *et al.*, 1998).
- Inibição da síntese de prostaglandinas no sistema nervoso central e periférico por inibição da COX (Lorenzetti & Ferreira, 1996; Campos *et al.*, 1998; Campos *et al.*, 1999).
- Estimulação da via óxido nítrico-GMP<sub>c</sub> (Duarte *et al.*, 1992; Aguirre-Bañuelos & Granados Soto, 1999).
- Aumento da liberação de endorfinas (Akman *et al.*, 1996; Tortorici *et al.*, 1996; Vasquez & Vanegas, 2000).
- Inibição de respostas em áreas do encéfalo, como o NMR (Jones, 1996) e a PAG (Carlsson & Jurna, 1987; Tortorici & Vanegas, 1994; Tortorici *et al.*, 1996; Vasquez & Vanegas, 2000; Hernandez & Vanegas, 2001).

### **I.5.1.2 – A busca de novos derivados pirazolínicos**

Desde o surgimento da dipirona, muitos outros compostos, contendo o anel pirazol, têm sido estudados. Em 1969, Oshima *et al* estudaram a atividade farmacológica do 1-(4-metoxi-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 pirazolínicos 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).

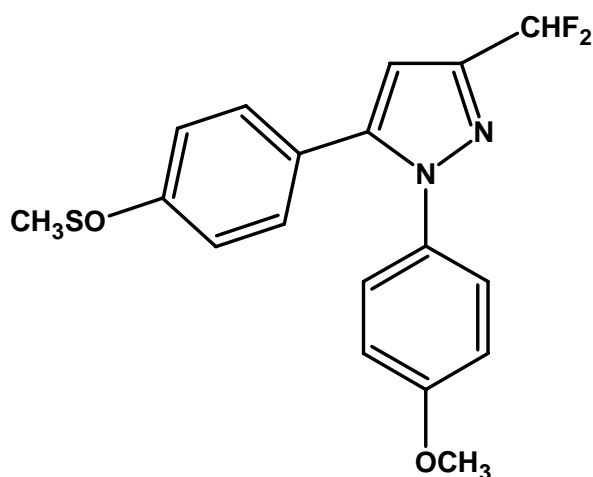
Matheus *et al.* (1991) demonstraram a ação antinociceptiva de uma série de pirazol 4-acil-arilhidrazonas, quando administradas por via oral e

avaliadas frente ao teste de contorções abdominais induzidas por acetilcolina em camundongos. Os compostos dessa série que possuem um substituinte *p*-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ou *m*-OH e *p*-OCH<sub>3</sub> no anel aromático acil-hidrazona são dez vezes mais potentes do que a dipirona, usada como droga de referência (Matheus *et al.*, 1991).

Dentre os demais pirazolínicos relatados na literatura, destacamos o 3-(difluormetil)-1-(4-metoxifenil)-5-[4-(metilsulfinil)fenil] pirazol (FR140423 – Figura I.6), já que esse composto possui estrutura química bastante similar a dos compostos que foram estudados no presente trabalho. O FR140423, sintetizado em 1997 por um grupo de pesquisadores japoneses, é um derivado pirazolínico descoberto durante a triagem de novos compostos com potencial antiinflamatório (Tsuji *et al.*, 1997). Esse composto apresenta ação antinociceptica e antiinflamatória, inibindo seletivamente a COX-2 (Ochi *et al.*, 1999a). Além disso, o FR140423 tem efeito antinociceptivo em um modelo de dor induzida por estímulo térmico (“tail-flick”), um teste geralmente usado para avaliar a ação de drogas que agem no SNC, e esse efeito é antagonizado por naloxona, um antagonista do receptor opióide (Ochi *et al.*, 1999b). Os autores consideram que o FR140423 é uma droga que tem ação por dois mecanismos distintos, ou seja, inibição da COX-2 em tecidos inflamados e interação com o sistema opióide (Ochi *et al.*, 1999c). A administração por via oral ou intratecal, mas não intracerebroventricular, do FR140423 também induz antinocicepção em um modelo de dor provocada por

estímulo mecânico (“tail-pinch”), sendo essa ação mediada por receptores opióides do subtipo  $\delta$ , mas não pelos receptores  $\mu$  e  $\kappa$ . O fato de a administração i.t., mas não i.c.v., de FR140423 causar antinocicepção indica que o sítio de ação desse composto é espinhal e não supra-espinhal (Ochi *et al.*, 1999b). Em estudos de ligação, realizados com membranas preparadas a partir da medula espinhal de camundongos, o FR140423 inibiu muito pouco a ligação de [ $^3$ H] DPDPE ao receptor opióide do subtipo  $\delta$ , 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  $\delta$ -opióides, mas de mecanismos indiretos. (Ochi *et al.*, 1999b). A ação desse composto envolve, além do sistema opióide, os sistemas noradrenérgico e serotoninérgico descendentes, uma vez que o efeito antinociceptivo do FR140423, injetado intratecalmente, é antagonizado pela fentolamina (antagonista adrenérgico) e pela metisergida (antagonista serotoninérgico) (Takehiro & Goto, 2000a, 2000b). A ação antinociceptiva do FR140423 é revertida pela administração intratecal, mas não intracerebroventricular, de um antagonista do receptor para kitorfina, sugerindo o envolvimento desses receptores, a nível espinhal, na antinocicepção causada pelo FR140423 (Takehiro *et al.*, 2000). Além de sua comprovada ação antinociceptiva, esse composto possui ação antiinflamatória duas vezes maior do que a indometacina, um antiinflamatório clássico, no modelo de artrite induzida por colágeno tipo II

em ratos. Diferentemente da indometacina, o FR140423 não causa lesão gástrica em ratos, mostrando-se, portanto, mais seguro do que a droga de referência (Takehiro & Goto, 2001).



**Figura I.6** – Estrutura química do FR140423

Tendo em vista o bom perfil analgésico e antipirético da dipirona, muitos pesquisadores têm investido na síntese e avaliação da atividade biológica de novos derivados pirazolínicos, que aliem boa ação farmacológica e baixo índice de efeitos indesejáveis. É nesse sentido que nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo um trabalho conjunto com o Núcleo de Química de Heterocíclicos (NUQUIMHE) da UFSM, buscando sintetizar compostos com atividade antinociceptiva, antipirética e antiinflamatória. Na tabela I.2 estão representadas as estruturas químicas de alguns compostos sintetizados no NUQUIMHE já testados pelo nosso grupo.

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. A pré-administração de naloxona não previne a antinocicepção causada pelo MPCA, sugerindo que a ação desse composto não envolve os receptores opióides. O MPCA não tem efeito antinociceptivo no teste de imersão da cauda em água a 55°C, e não tem ação antiinflamatória (não diminui o edema induzido por carragenina) (Souza *et al.*, 2001).

Em 2004, Godoy *et al.* mostraram que o MPCA 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. A antinocicepção induzida pelo MPCA e pelo 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  $\alpha_2$ -adrenérgicos espinhais estão envolvidos na antinocicepção induzida por MPCA e FPCA, mas não naquela induzida por dipirona.

Além disso, o MPCA e o FPCA (0,15 mmol/kg) revertem a febre induzida por lipopolissacarídeo, quando administrados subcutaneamente (s.c.) ou intracerebroventricularmente (i.c.v.) a camundongos. Curiosamente, a administração sistêmica desses compostos reverte a febre dentro de 1 h, enquanto que a administração central apresenta efeito antipirético duas horas mais tarde. Esses resultados sugerem que o efeito

antipirético destes pirazóis requer metabolização prévia, e que eles são lentamente convertidos no metabólito ativo pelo cérebro (Souza *et al.*, 2002).

Sabe-se, ainda, que a administração do MPCA e do FPCA (0,15 mmol/kg, s.c.) quatro horas após a indução de febre por suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* em ratos jovens, é capaz de reverter a febre a partir de uma hora após a injeção (Tomazetti, 2004).

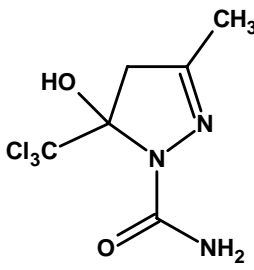
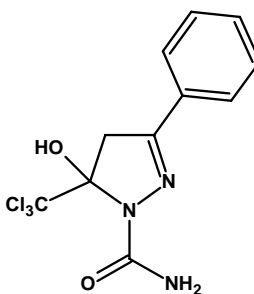
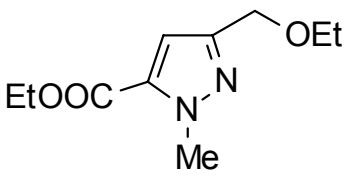
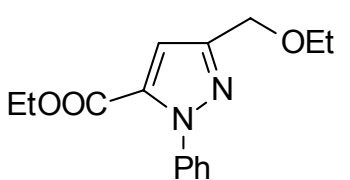
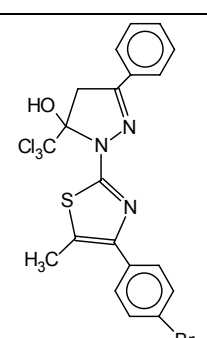
O 3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1*H*-1-metilpirazol (PZ 2) e seu análogo 3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1*H*-1-fenilpirazol (PZ 3), ao contrário do MPCA e do FPCA, apresentam ação antinociceptiva num teste que emprega estímulo nocivo térmico. O PZ 2 (0,5 e 1,5 mmol/kg, s.c.) e o Pz 3 (1,5 mmol/kg, s.c.) administrados 30 minutos antes do teste de imersão da cauda em água à 55°C, causaram antinocicepção. 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 por nosso grupo 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 pirazol-tiazol. O B50 apresenta ação antinociceptiva de maneira dose dependente (0,008; 0,023; 0,08 mmol/kg, s.c.) 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 (1 mg/kg, s.c.), um antagonista

não seletivo dos receptores opióides, mas não por nor-binaltorfimina (1 e 3 mg/kg, s.c.), antagonista do receptor  $\kappa$ -opióide. Estes resultados sugerem que os receptores do subtipo  $\kappa$ -opióide não estão envolvidos no mecanismo de ação do B50, embora exista uma participação do sistema opióide (Prokopp, 2004). A administração do B50, por via intratecal (i.t.) também causa antinocicepção em camundongos submetidos ao teste de contorções abdominais, mas somente quando os animais recebem a droga duas horas antes do teste. O fato de o efeito antinociceptivo do B50 somente ser detectado 2 h após sua administração i.t., sugere que esse composto, da mesma forma que o MPCA, exerce seu efeito via formação de um segundo metabólito (dados não publicados).



Tabela I.2 – Derivados pirazolínicos sintetizados no NUQUIMHE

Estrutura	Nomenclatura	Abreviatura
	3-metil-5-hidróxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1 <i>H</i> -1-pirazolcarboxamida	MPCA
	3-fenil-5-hidróxi-5-triclorometil-4,5diidro-1 <i>H</i> -1-pirazolcarboxamida	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-dihidro-1 <i>H</i> -pirazol-1-il]-4-(4-bromofenil)-5-metiltiazol	B50

Devido à necessidade de analgésicos e antiinflamatórios mais efetivos e com menor incidência de efeitos colaterais, muitos de compostos heterocíclicos tem sido sintetizados e avaliados quanto à sua atividade biológica (Goel & Madan, 1995; Bonacorso *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2001). No presente trabalho avaliaremos a atividade biológica de dois derivados pirazolínicos inéditos recentemente sintetizados no NUQUIMHE/CCNE/UFSM.

---

## **II. OBJETIVOS**

## **II.1 – OBJETIVO GERAL**

Avaliar o possível efeito antinociceptivo do 4-metil-5-hidróxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazolcarboxamida (NF0) e do seu análogo 3-metil-5-hidróxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazolcarboxamida (NF2), utilizando modelos de dor fásica, tônica e neurogênica/inflamatória, bem como o potencial antiedematogênico desses compostos.

## **II.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1 – Avaliar a atividade antinociceptiva e antiedematogênica do NF0 e do NF2.

2 – Investigar se o NF0 e o NF2 alteram as atividades locomotora e exploratória espontâneas de camundongos.

3 – Investigar se o NF0 e o NF2 causam ataxia nos camundongos.

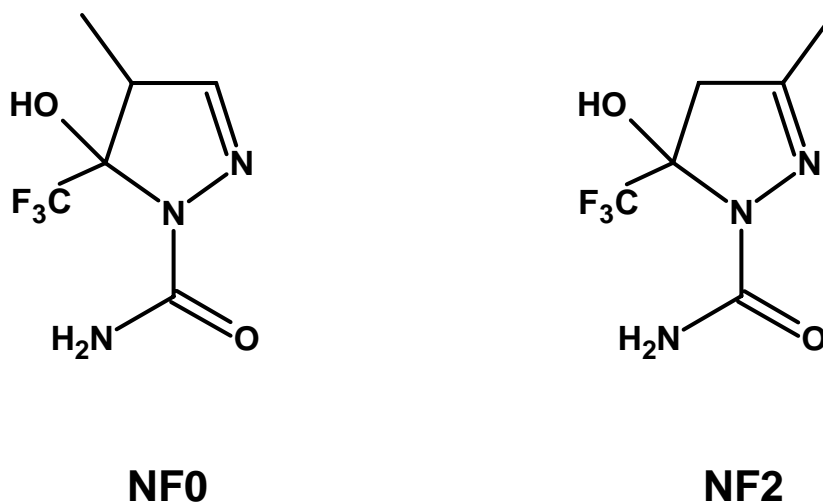
4 – Pesquisar o envolvimento de receptores opióides na possível antinocicepção causada pelo NF0 e pelo NF2.

---

### **III. MATERIAL E MÉTODOS**

### III.1 – DROGAS E REAGENTES

- 4-metil-5-hidróxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazolcarboxamida (NF0) e 3-metil-5-hidróxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazolcarboxamida (NF2), sintetizados no Núcleo de Química de Heterociclos (NUQUIMHE) do Departamento de Química/CCNE/UFSM (Figura III.1).



**Figura III.1** – Fórmula estrutural dos derivados pirazolínicos inéditos fornecidos pelo NUQUIMHE/CCNE/UFSM.

- Indometacina, Tween 80, carragenina e naloxona foram adquiridos da Sigma.
- Sulfato de morfina, formaldeído e ácido acético, foram adquiridos de fornecedores locais.

### **III.2 – PREPARO DAS DROGAS E REAGENTES**

Todas as drogas foram preparadas no mesmo dia da realização do experimento. O volume administrado para camundongos obedeceu a relação de 10 ml/ kg de peso corporal e para ratos de 2 ml/kg.

#### **III.2.1 – Soluções de NF0 e NF2**

O NF0 e o NF2 foram solubilizados em tween 80 5% em salina. Foram preparadas soluções nas concentrações de 3, 10, 30 e 100 mM de ambas as drogas. O pH das soluções foi analisado com auxílio de fitas para medida de pH, não necessitando de ajuste, pois permaneceu em torno de 7,4.

#### **III.2.2 – Solução de Morfina**

Foram preparadas soluções nas concentrações de 650  $\mu$ M (usada no teste da formalina) e 1300  $\mu$ M (usada no teste da placa quente), em tween 80 5% em salina.

#### **III.2.3 – Solução de Indometacina**

Foi preparada uma solução aquosa de bicarbonado a 5%, na qual a indometacina foi dissolvida numa concentração de 7 mM.

### **III.2.4 – Solução de Naloxona**

A naloxona foi dissolvida em solução de cloreto de sódio 0,9%, na concentração de 275  $\mu$ M.

### **III.2.5 – Solução de Formalina 1,5%**

A solução de formalina 1,5% foi preparada a partir de uma solução de formaldeído 37% P. A., utilizando-se água ultrapurificada como veículo. O formaldeído 37% foi previamente filtrado em papel filtro analítico e a solução de formalina 1,5% foi preparada a partir desse filtrado.

### **III.2.6 – Suspensão de Carragenina 1%**

Foi feita uma suspensão a 1% de carragenina tipo IV em solução de cloreto de sódio 0,9%.

### **III.2.7 – Solução de ácido acético 0,8%**

O ácido acético 0,8 % foi preparado em água destilada, a partir de uma solução de ácido acético glacial P.A.

## **III.3 – ANIMAIS**

Foram utilizados camundongos albinos machos adultos (30-40 g) e ratos Wistar machos adultos (180-220 g), fornecidos pelo Biotério Central



da UFSM, mantidos em ciclo claro-escuro natural, em temperatura de 22 ± 1°C, com alimento e água *ad libitum*.

### III.4 – TESTES COMPORTAMENTAIS

#### III.4.1 – Teste da formalina

O experimento foi conduzido de acordo com Hunskaar & Hole (1987). Os camundongos receberam NF0 (30, 100, 300 e 1000 µmol/kg), NF2 (30, 100, 300 e 1000 µmol/kg) ou veículo por via subcutânea. Vinte minutos após, injetou-se subcutaneamente 20 µl formalina 1,5% na pata traseira direita dos animais. Imediatamente após a injeção de formalina, os animais foram transferidos para um campo aberto e foi observada a duração do comportamento de lambe a pata injetada, durante 30 minutos, em intervalos de 5 minutos. O intervalo de 0–5 minutos foi considerado como fase neurogênica, e o intervalo de 5–30 minutos foi adotado como fase inflamatória.

A fim de verificar o possível envolvimento do sistema opióide na antinocicepção induzida pelo NF0 e pelo NF2, os animais foram pré-administrados (i.p.) com naloxona (2,75 µmol/kg) ou salina, 15 minutos antes da injeção (s.c.) de NF0 (1000 µmol/kg), NF2 (1000 µmol/kg), morfina (6,5 µmol/kg) ou veículo. Vinte minutos depois, os animais receberam a injeção de formalina e observou-se o comportamento de

lamber a pata injetada. Nesse experimento, a morfina foi utilizada como um controle positivo (Shibata *et al.*, 1989).

#### **III.4.2 – Teste da placa quente**

Os camundongos foram submetidos ao teste da placa quente trinta minutos após a administração do NF0 (1000  $\mu\text{mol/kg}$ ), NF2 (1000  $\mu\text{mol/kg}$ ), morfina (13  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou veículo. A morfina foi utilizada como um controle positivo, já que esse teste é bastante sensível a analgésicos opióides.

O teste consistia em colocar o animal sobre uma superfície metálica uniformemente aquecida a  $52,5 \pm 0,1$  °C e observar a latência (em segundos) para lambar as patas traseiras ou saltar (Hunskaar *et al.*, 1986). Para evitar lesão tecidual, foi estabelecido um teto de 60 s. Quando o animal não apresentava nenhum dos comportamentos acima citados, ele era removido do aparelho pelo experimentador.

#### **III.4.3 – Teste das contorções abdominais**

Trinta minutos após a administração do NF0 (1000  $\mu\text{mol/kg}$ ), NF2 (1000  $\mu\text{mol/kg}$ ) ou veículo, os camundongos foram submetidos ao teste das contorções abdominais, realizado conforme Hayashi & Takemori (1971). Os animais receberam injeção intraperitoneal de ácido acético a 0,8%, e cinco minutos após foram transferidos para um campo aberto

(arena retangular medindo 28 x 18 x 12 cm, dividida em 15 quadrados de igual tamanho). Durante 10 minutos observou-se o número de contorções abdominais, de cruzamentos e de respostas de levantar apoiando-se nas patas traseiras. As contorções abdominais são consideradas como indicativo de dor, enquanto que o número de cruzamentos e de respostas de levantar reflete as atividades locomotora e exploratória, respectivamente. A contorção era considerada quando havia contração dos músculos abdominais, seguida de alongamento do corpo e estiramento das patas traseiras.

#### **III.4.4 – 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, vinte e cinco minutos após receberem NF0 (1000 µmol/kg), NF2 (1000 µmol/kg) ou veículo (tween 80 5% em salina), 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; Tabarelli *et al.*, 2003). Os mesmos animais utilizados

nesse teste foram posteriormente avaliados no teste de contorções abdominais, descrito acima.

#### III.4.5 – Teste da edema de pata induzido por carragenina

Ratos Wistar machos adultos receberam injeção subcutânea de veículo, NF0 (200  $\mu\text{mol/kg}$ ), NF2 (200  $\mu\text{mol/kg}$ ), ou indometacina (14  $\mu\text{mol/kg}$ ). Trinta minutos após, injetou-se intraplantarmente 60  $\mu\text{l}$  de carragenina 1% na pata traseira direita dos animais. O mesmo volume de salina foi injetado na pata contralateral. Imediatamente após as injeções de carragenina (pata direita) e salina (pata esquerda), mediu-se o volume das patas no Pletismômetro. A seguir, o volume das patas foi medido 1, 2, 3, 4 e 5 horas após a injeção de carragenina e a percentagem de edema foi calculada de acordo com a equação abaixo (Winter *et al.*, 1962).

$$\% \text{ de edema} = \frac{V_1 \text{ pata traseira direita} - V_0 \text{ pata traseira direita}}{V_0 \text{ pata traseira direita}} - \frac{V_1 \text{ pata traseira esquerda} - V_0 \text{ pata traseira esquerda}}{V_0 \text{ pata traseira esquerda}} \times 100\%$$

Onde:  $V_0$  é o volume inicial da pata, medido imediatamente após a injeção de carragenina ou salina.

$V_1$  é o volume final da pata.

### **III.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.

---

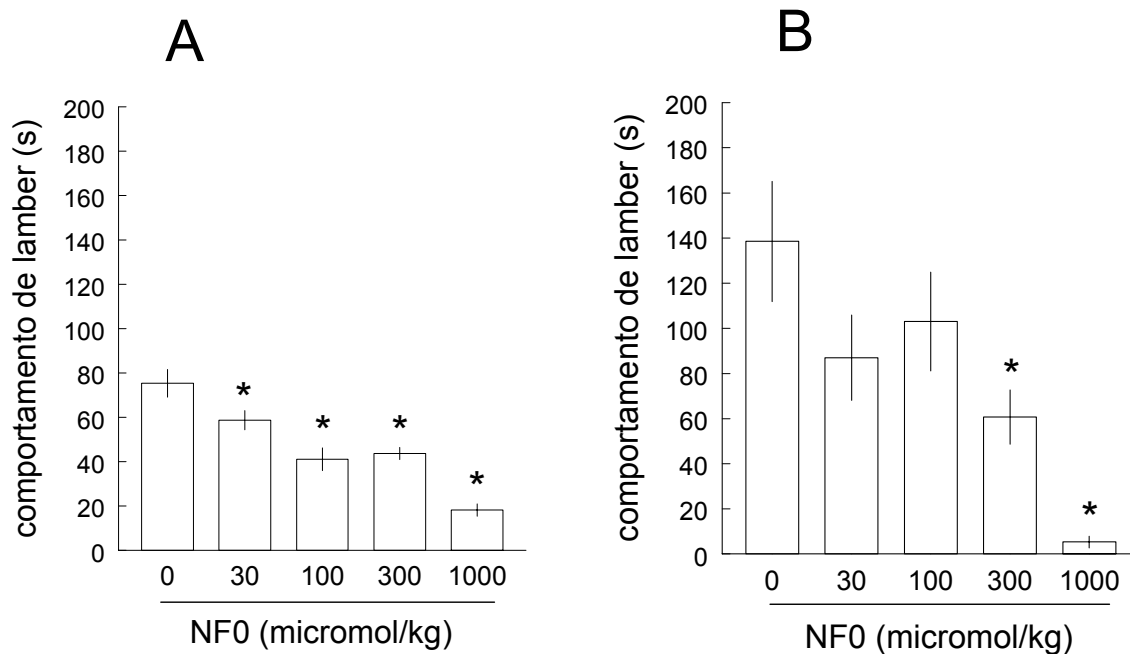
## **IV. RESULTADOS**

#### **IV.1 – Efeito da administração subcutânea de NF0 e NF2 sobre o comportamento nociceptivo induzido por formalina em camundongos**

A figura IV.1A mostra que a administração de NF0 (30, 100, 300 e 1000  $\mu\text{mol/kg}$ ), diminuiu a duração do comportamento de lamber a pata injetada com formalina, durante a fase neurogênica do teste da formalina [ $F(4,46)=22,71$ ;  $p<0,05$ ]. Na figura IV.1B está ilustrado o efeito do NF0 sobre o comportamento nociceptivo na fase inflamatória do teste da formalina. Durante essa fase, apenas as doses de 300 e 1000  $\mu\text{mol/kg}$  foram capazes de inibir significativamente o comportamento de lamber a pata injetada com formalina [ $F(4,46) =11,43$ ;  $p<0,05$ ].

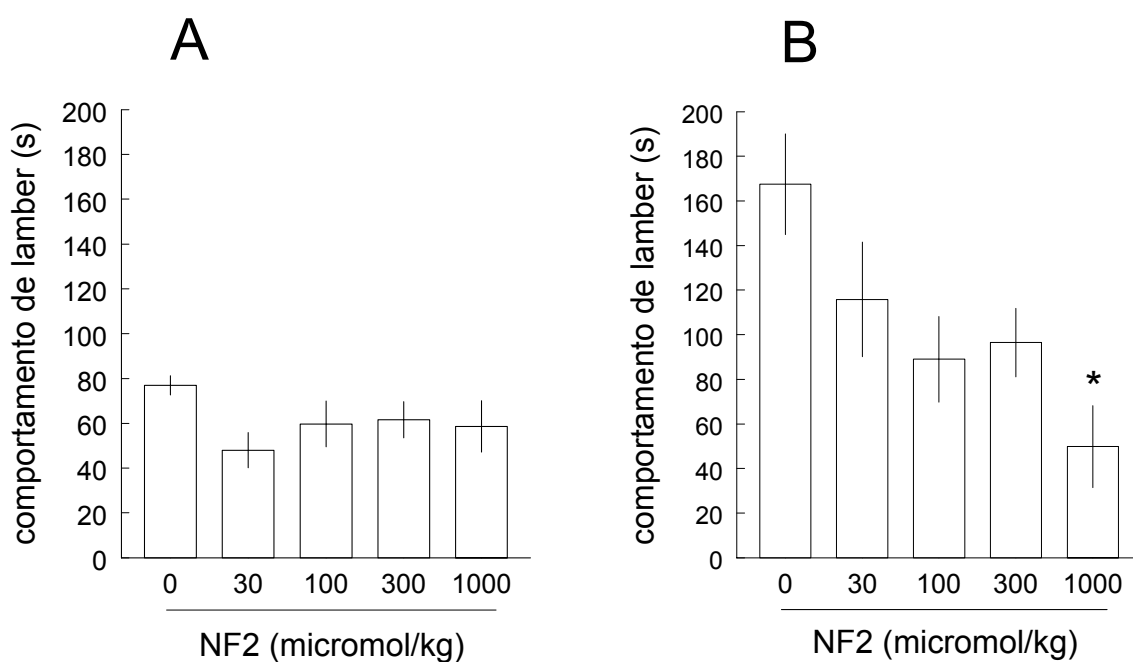
A administração de NF2 (figura IV.2A), em todas as doses testadas, não foi capaz de reduzir a duração do comportamento de lamber a pata, durante a fase neurogênica do teste da formalina [ $F(4,35)=1,66$ ;  $p> 0,05$ ]. Na segunda fase do teste, apenas a dose de 1000  $\mu\text{mol/kg}$  diminuiu significativamente o comportamento de lamber a pata injetada com formalina (figura IV.2B) [ $F(4,35)=4,80$ ;  $p<0,05$ ].

Comparando-se os resultados obtidos para o NF0 e para o NF2, pode-se perceber que o NF0 foi capaz de diminuir o tempo que o animal permanecia lambendo a pata injetada nas fases neurogênica e inflamatória do teste da formalina, enquanto que o NF2 somente mostrou efeito na fase inflamatória.



**Figura IV. 1** – Efeito da administração de NF0 ou veículo (tween 80 5% em salina) sobre o comportamento de lamber a pata (em segundos), no teste da formalina. **(A)** Fase Neurogênica e **(B)** Fase Inflamatória. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média;  $n = 10-11$  animais por grupo. \* indica  $p < 0,05$  em relação ao veículo (teste de Student-Newman-Keuls).

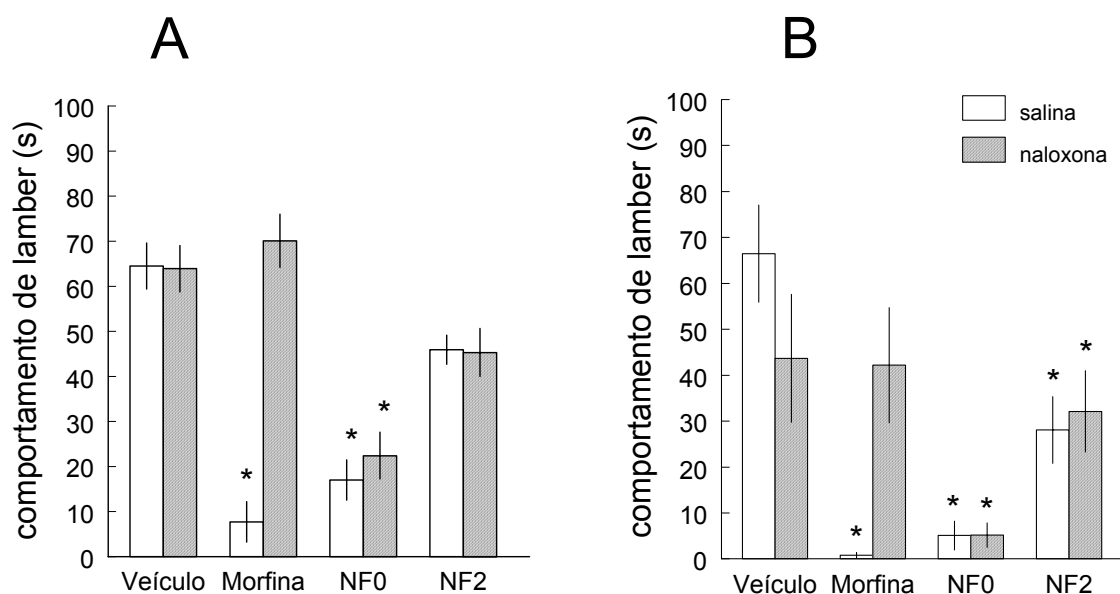




**Figura IV.2** – Efeito da administração de NF2 ou veículo (tween 80 5% em salina) sobre o comportamento de lamber a pata (em segundos), no teste da formalina. **(A)** Fase Neurogênica e **(B)** Fase Inflamatória. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média;  $n = 7-10$  animais por grupo. \* indica  $p < 0,05$  em relação ao veículo (teste de Student-Newman-Keuls).

#### **IV.2 – Estudo do envolvimento de mecanismo opióide na antinocicepção induzida por NF0 e NF2 no teste da formalina**

O envolvimento de mecanismo opióide no efeito antinociceptivo do NF0 e do NF2 foi avaliado pela pré-administração de naloxona. A morfina, um agonista dos receptores opióides, foi usada como controle positivo. A ANOVA de 2 vias mostrou que existe interação significativa entre o pré-tratamento (naloxone ou salina) e o tratamento (morfina, NF0 ou NF2) na fase neurogênica [ $F(3,73)=23,90$ ;  $p<0,05$ ] e na fase inflamatória [ $F(3,73)=5,12$ ;  $p<0,05$ ]. O teste *post hoc* SNK, mostrou que o naloxone preveniu o efeito da morfina, mas não do NF0 e do NF2 (figura IV.3).



**Figura IV.3** – Efeito da pré-administração de naloxona ( $2,75 \mu\text{mol /kg}$ ) ou salina sobre a duração do comportamento de lamber a pata (em segundos), em camundongos tratados com NF0 ( $1000 \mu\text{mol/kg}$ ), NF2 ( $1000 \mu\text{mol/kg}$ ), morfina ( $6,5 \mu\text{mol/kg}$ ) ou veículo (tween 80 5% em salina). (A) Fase neurogênica, (B) Fase inflamatória do teste da formalina. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média,  $n = 9-12$  animais por grupo. \* indica  $p < 0,05$  em relação ao grupo salina + veículo, pelo teste de Student-Newman-keuls.

### IV.3 – Efeito da administração subcutânea de NF0, NF2, morfina ou veículo sobre a latência para resposta ao estímulo térmico, na placa quente

A tabela IV.1 mostra que a morfina, mas não o NF0 e o NF2 aumenta a latência para a resposta ao estímulo térmico, quando comparado com o veículo [ $F(3,25)=24,75$ ;  $p<0,05$ ].

**Tabela IV.1** – Efeito da administração de NF0, NF2, morfina ou veículo (tween 80 5% em salina) sobre a latência para a resposta ao estímulo térmico, na placa quente, em camundongos.

Tratamento	Latência (s)
Veículo	17,01 ± 1,49
NF0 (1000 µmol/kg)	14,76 ± 1,72
NF2 (1000 µmol/kg)	12,50 ± 2,20
Morfina (13 µmol/kg)	49,77 ± 6,46 *

Dados mostrados como média ± erro padrão da média. N = 7–8 animais por grupo.

\* indica  $p < 0,05$  em relação ao veículo

---

**IV.4 – Efeito da administração subcutânea de NF0, NF2 ou veículo sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético, em camundongos**

A tabela IV.2 mostra que NF0 e NF2, na dose de 1000  $\mu\text{mol/kg}$ , não alteraram o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético, quando comparado com o veículo [ $F(2,30)=0,29$ ;  $p>0,05$ ].

**Tabela IV.2** – Efeito da administração de NF0, NF2 ou veículo (tween 80 5% em salina) sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8% , em camundongos.

Tratamento	Número de contorções
veículo	28,17 $\pm$ 2,64
NF0 (1000 $\mu\text{mol/kg}$ )	28,36 $\pm$ 5,29
NF2 (1000 $\mu\text{mol/kg}$ )	29,6 $\pm$ 5,29

Dados mostrados como média  $\pm$  erro padrão da média. N = 10–12 animais por grupo.

#### IV.5 – Efeito da administração subcutânea de NF0, NF2 ou veículo sobre as atividades locomotora e exploratória espontâneas de camundongos, no campo aberto

A tabela IV.3 mostra o efeito da administração de NF0, NF2 ou veículo sobre o número de cruzamentos e o número de respostas de levantar de camundongos no campo aberto. Observa-se que tanto o número de cruzamentos, quanto o número de respostas de levantar não foram alterados pelo tratamento com NF0 ou NF2, quando comparado com os animais tratados com veículo ( $[F(2,30)=2,85; p>0,05]$  e  $[F(2,30)=0,50; p>0,05]$ , respectivamente).

**Tabela IV.3** – Efeito da administração de NF0, NF2 ou veículo (tween 80 5% em salina) sobre as atividades locomotora e exploratória espontâneas de camundongos no campo aberto.

Tratamento	Número de cruzamentos	Número de respostas de levantar
veículo	23,50 ± 3,26	0,83 ± 0,34
NF0 (1000 µmol/kg)	58,27 ± 13,01	2,91 ± 2,42
NF2 (1000 µmol/kg)	38,50 ± 7,04	2,10 ± 1,04

Dados mostrados como média ± erro padrão da média. N = 10–12 animais por grupo.

#### IV.6 – Efeito da administração subcutânea de NF0, NF2 ou veículo sobre a atividade locomotora forçada de camundongos, no cilindro giratório

A tabela IV.4 mostra o efeito da administração de NF0, NF2 ou veículo sobre a latência para a primeira queda e o número de quedas do cilindro giratório. O NF0 e o NF2, na dose de 1000  $\mu\text{mol/kg}$ , não alteraram a latência para a primeira queda [ $F(2,30)=1,12$ ;  $p>0,05$ ], nem o número de quedas [ $F(2,30)=2,05$ ;  $p>0,05$ ], sugerindo que esses compostos não causam ataxia ou prejuízo motor nos camundongos.

**Tabela IV.4** – Efeito da administração de NF0, NF2 ou veículo (tween 80 5% em salina) sobre a atividade locomotora forçada de camundongos no cilindro giratório.

Tratamento	Latência para 1 <sup>a</sup> queda (s)	Número de quedas
Veículo	173,75 $\pm$ 26,08	1,67 $\pm$ 0,51
NF0 (1000 $\mu\text{mol/kg}$ )	114,10 $\pm$ 30,93	3,91 $\pm$ 1,80
NF2 (1000 $\mu\text{mol/kg}$ )	139,20 $\pm$ 30,39	1,20 $\pm$ 0,33

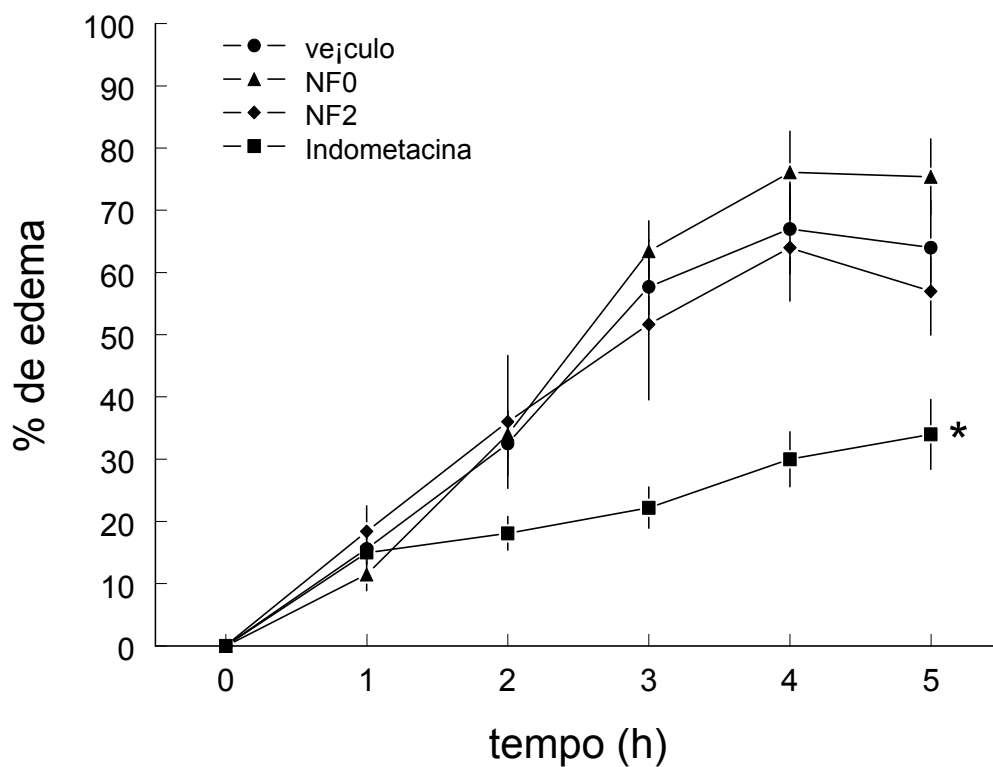
Dados mostrados como média  $\pm$  erro padrão da média. N = 10–12 animais por grupo.

#### **IV.7 – Efeito da administração intraperitoneal de NF0, NF2, indometacina ou veículo (Tween a 5% em salina) sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos**

O efeito do NF0, NF2 e da indometacina sobre o edema de pata induzido por carragenina é mostrado na figura IV.4. A análise estatística revelou uma interação significativa entre tratamento e tempo [F(12,96)=5,14; p<0,05]. Posteriormente foi realizado o teste F de efeito simples, o qual revelou que a indometacina reduziu a formação edema de pata induzido por carragenina ao longo do tempo [F(4,96)=1,38; p<0,05]. Por outro lado o NF0 e o NF2 não apresentaram ação antiedematogênica ([F(4,96)=0,25; p>0,05] e [F(4,96)=0,13; p>0,05, respectivamente).

Em virtude da indometacina ser dissolvida em solução aquosa de bicarbonato a 5% e o NF0 e NF2 serem preparados em Tween 80 a 5% em salina, realizamos a comparação entre os dois veículos. Os animais que receberam solução aquosa de bicarbonato a 5% não diferiram dos que receberam Tween 80 a 5% em salina (dados não mostrados).





**Figura IV.4** – Efeito da indometacina ( $14 \mu\text{mol/kg}$ ), NF0 ( $200 \mu\text{mol/kg}$ ), NF2 ( $200 \mu\text{mol/kg}$ ) ou veículo (Tween 80 a 5% em salina) no edema de pata induzido por carragenina 1% ( $60 \mu\text{l}$ , intraplantar). Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média;  $n = 7$  animais por grupo.

\* indica  $p < 0,05$ , comparado com o veículo (*post hoc* teste F de efeito simples).

---

## V. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou a atividade antinociceptiva do 4-metil-5-hidróxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazolcarboxamida (NF0) e do seu análogo 3-metil-5-hidróxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazolcarboxamida (NF2) no teste da formalina. Esses dois compostos mostraram diferentes perfis de ação no referido teste. Enquanto o NF0 apresentou efeito antinociceptivo tanto na fase neurogênica quanto na fase inflamatória do teste da formalina, o NF2 foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo apenas na fase inflamatória. Essa diferença na atividade do NF0 e do NF2 poderia ser atribuída a farmacocinética desses compostos. Porém, como ambos possuem estrutura química muito similar, diferindo apenas na posição de um grupamento metila, e características físico-químicas, como pH e solubilidade, muito parecidas, é pouco provável que as características farmacocinéticas desses compostos sejam distintas.

Apesar da atividade antinociceptiva de derivados pirazolínicos ser em grande parte atribuída à inibição da ciclooxigenase, esse assunto é ainda discutido e muito controverso (Malmberg & Yaksh, 1994). Existem evidências que os pirazolínicos possam ter sítios centrais de ação, tanto na medula espinhal como no tronco cerebral, que podem contribuir para sua atividade analgésica (Carlsson *et al.*, 1986; Carlsson & Jurna, 1987; Malmberg & Yaksh, 1992; Neugebauer *et al.*, 1994; Tortorici & Vanegas, 1994; Bannwarth *et al.*, 1995; Tortorici *et al.*, 1996). Dentro desses sítios centrais de ação, o mecanismo opióide pode ser o responsável, pelo

menos em parte, pela atividade antinociceptiva de alguns pirazolínicos, como, por exemplo, a dipirona (Akman *et al.*, 1996; Tortorici *et al.*, 1996). De fato, previamente, nosso demonstrou que o mecanismo de ação de alguns derivados pirazolínicos pode envolver o sistema opióide (Tabarelli *et al.*, 2004; Prokopp, 2004). Uma vez que a analgesia produzida por agonistas de receptores opióides, como a morfina, pode ser inibida pela naloxona (antagonista dos receptores opióides), decidimos utilizar esse antagonista para investigar a participação do mecanismo opióide no efeito antinociceptivo do NF0 e do NF2 (Suh & Tseng, 1990). Os animais foram pré-tratados com naloxona, 15 minutos antes da administração dos pirazóis. O efeito antinociceptivo de ambos os compostos não foi prevenido pela administração de naloxona, sugerindo que não há envolvimento de receptores opióides na antinocicepção induzida pelo NF0 e pelo NF2.

O MPCA, um pirazol estudado por Godoy *et al.* (2004), apresenta efeito antinociceptivo mediado por receptores serotoninérgicos e  $\alpha_2$ -noradrenérgicos espinhais. Uma vez que o NF0 e o NF2 são análogos estruturais do MPCA, onde o grupamento  $\text{CCl}_3$  deste último foi substituído por um grupamento  $\text{CF}_3$ , na posição 5 do anel pirazol, é possível que a ação do NF0 e o NF2 também envolva mecanismos serotoninérgicos e/ou noradrenérgicos. Entretanto, essas são meras especulações, já que tais vias ainda não foram investigadas para os compostos em estudo no presente trabalho.

No presente trabalho, também foi demonstrado que o NF0 e o NF2 não apresentam ação antinociceptiva no teste da placa quente, o qual emprega o calor como estímulo nocivo. Esse resultado está de acordo com dados anteriores de nosso grupo, os quais mostram que derivados pirazolínicos, em geral, não exibem atividade antinociceptiva em testes térmicos (Souza *et al.*, 2001; Prokopp, 2004). Além disso, quando se avaliou a ação destes compostos no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, também não foi encontrada atividade antinociceptiva, ao contrário do que ocorre para o MPCA e para a dipirona (Godoy *et al.*, 2004)

A fim de eliminar a possibilidade de que esses pirazóis estivessem provocando prejuízo motor ou alteração do comportamento exploratório, confundindo efeitos músculo-relaxantes e/ou sedativos com antinocicepção, foi avaliado o comportamento motor e exploratório dos animais. Camundongos que receberam NF0 ou NF2 não apresentaram qualquer sinal de ataxia, quando avaliados no teste da locomoção forçada em cilindro giratório (*rotarod*). Da mesma forma, a atividade locomotora e exploratória não foi modificada pelo tratamento com estes compostos.

No presente trabalho foi demonstrado, ainda, que o NF0 e o NF2 não apresentam atividade antiedematogênica no teste do edema de pata induzido por carragenina. É importante ressaltar, porém, que a dose administrada aos animais para investigação do efeito antiedematogênico (200 $\mu$ mol/kg) foi cinco vezes menor do que a maior dose que causou

antinocicepção (1000  $\mu\text{mol/kg}$ ) no teste da formalina. Essa diferença nas doses administradas aos animais nos dois testes ocorreu porque para camundongos (utilizados no teste da formalina) é possível administrar um volume de até 10 ml/kg, enquanto que para ratos (utilizados no teste do edema de pata), o volume administrado é, em geral, de 1 a 2 ml/kg. Assim, a solubilidade do NF0 e do NF2 tornou-se um fator limitante para decidirmos a dose a ser administrada aos ratos submetidos ao teste do edema de pata, uma vez que a maior concentração possível das soluções de NF0 e NF2 foi de 100 mM (Tween 80 5% em salina). Entretanto, a dose de 200  $\mu\text{mol/kg}$ , não pode ser considerada uma dose tão baixa a ponto de representar uma sub-dose (e, por isso, não mostrar efeito antiedematogênico), uma vez que a dose de 14  $\mu\text{mol/kg}$  de indometacina já é capaz de inibir significativamente a formação do edema induzido por carragenina.

O NF0 e o NF2 apresentam em comum com a dipirona, um composto pirazolínico clássico, o anel pirazol. As propriedades antiinflamatórias dos derivados pirazolínicos estão associadas com a presença de carbonilas nas posições 3 e/ou 5 do anel pirazol (Ferreira & Vane, 1974). Por outro lado, compostos pirazolínicos que não apresentam esses grupos carbonila têm pouca ou nenhuma atividade antiinflamatória, mas muitos deles possuem um efeito antinociceptivo importante (Kuo *et al.*, 1984; Beirith *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 2001; Tabarelli *et al.*, 2004). Como pode ser visto na Figura III.1, o NF0 e o NF2 não apresentam

carbonilas nas posições 3 e/ou 5 do anel pirazol. Sendo assim, já era esperado que esses compostos tivessem pouca ou nenhuma atividade antiinflamatória, o que foi confirmado pela ausência de efeito antiedematogênico do NF0 e do NF2 no teste do edema de pata.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o NF0 e o NF2 podem ser promissores como novas drogas analgésicas, porém mais estudos são necessários para esclarecer o mecanismo de ação desses compostos. É importante, também, avaliar os possíveis efeitos tóxicos do NF0 e do NF2 após administração a curto e a longo prazo, já que existe grande interesse dos pesquisadores em descobrir compostos que aliem bom efeito analgésico e baixa ocorrência de efeitos colaterais.

---

## **VI. CONCLUSÕES**



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

- 1 – O derivado pirazolínico NF0 apresenta efeito antinociceptivo nas fases neurogênica e inflamatória do teste da formalina, enquanto que o NF2 causa antinocicepção apenas na fase inflamatória.
- 2 – O efeito antinociceptivo do NF0 e do NF2 no teste da formalina não envolve mecanismos opióides.
- 3 – O NF0 e o NF2 não têm efeito antinociceptivo no teste da placa quente e no teste das contorções abdominais.
- 4 – A atividade locomotora e exploratória de camundongos no campo aberto não foi alterada pela administração de NF0 e NF2.
- 5 – O NF0 e o NF2 não causaram ataxia nos camundongos submetidos ao teste de locomoção forçada em cilindro giratório.
- 6 – A administração de NF0 e NF2 não tem efeito sobre o edema de pata induzido por carragenina, em ratos.

---

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE-BAÑUELOS, P & GRANADOS-SOTO, V. Evidence for a peripheral mechanism of action for the potentiation of the antinociceptive effect of morphine by dipyron. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods** 42:70–85, 1999.

AKMAN, H; AKSU, F; GULTEKIN, I; ORAL, U; DORAN, F; BAYSAL, F. A possible central antinociceptive effect of dypirone in mice. **Pharmacology** 53:71–78, 1996.

AMANN, R; SCHULIGOI, R; LANZ, I; PESKAR, B A. Effect of a 5-lipoxygenase inhibitor on nerve growth factor-induced thermal hyperalgesia in the rat. **European Journal of Pharmacology** 306:89–91,1996.

ARELLANO, R & SACRISTAN, S A. Metamizole: reassessment of its therapeutic role. **European Journal of Clinical Pharmacology** 38:617–619, 1990.

ASHBURN, M A & STAATS, P S. Management of chronic pain. **Lancet** 353: 1865–1869, 1999.

BANNWARTH, B; DEMOTES-MAINARD, F; SCHAEVERBEKE, T; LABAT L; DEHAIS J I. Central analgesic effects of aspirin-like drugs. **Fundamental & Clinical Pharmacology** 19:1–7, 1995.

BEAR, M F; CONNORS, B W; PARADISO, M A. **Neurociência – Desvendando o Sistema Nervoso** 2ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 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. **European Journal of Pharmacology** 345 (3):223–245, 1998.

BENEDETTI, C & BUTLER, S H. Systemic analgesics. In: Bonica, K; Loeser, J D; Chapman, C R; Fordyce, W E. **The Management of Pain** 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia-London: Lea & Febiger, 1990.

BERNARD, J F; BESTER, H; BESSON, J M. Involvement of the spinobarabrachio-amygdaloid and hypothalamic pathways in the autonomic and effective emotional aspects of pain. **Progress in Brain Research** 107:243–255, 1996.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, 353:1610–15, 1999.

BESTER, H; CHAPMAN, V; BESSON, J M. Physiological properties of the lamina I spinoparabrachial neurons in the rat. **Journal of Neurophysiology** 83:2239–2259, 2000.

BEVAN, S & GEPPETTI, P. Protons: small stimulants of capsaicin-sensory nerves. **Trends in Neuroscience** 17:504–512, 1994.

BIRREL, G J; MCQUEEN, D S; IGGO, A; COLEMAN, R A; GRUBB, B R. PGI<sub>2</sub>-induced activation and sensitization of articular mechanonociceptors. **Neuroscience Letters** 124:5–8, 1991.

BISGAARD, H & KRISTENSEN, J K. Leukotriene B<sub>4</sub> produces hyperalgesia in humans. **Prostaglandins** 30:791–797, 1985.

BJÖRKMAN, R. Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica** 39 (supplement 103):1–44, 1995.

BONACORSO, H; OLIVEIRA, M R; WENTZ, A P; WASTOWSKY, A D; OLIVEIRA A B; HÖERNER, M; ZANATTA N; MARTINS M A P. Haloacetylated enol ethers: 12 [18]. Region specific synthesis and structural determination of stable 5-hydroxy-1*H*-pyrazolynes.

**Tetrahedron** 55:345–352, 1999.

BONICA, J J. Anatomic and physiologic basis of nociception and pain. In: Bonica K, Loeser JD, Chapman CR, Fordyce WE. **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.

CALIXTO, J B; CABRINI, D A; FERREIRA, J; CAMPOS, M M. Inflammatory pain: kinins and antagonists. **Current Opinion in Anesthesiology** 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. **European Journal of Pharmacology** 378: 339–347, 1999.

CAMPOS, D I; CUNHA, F Q; FERREIRA, S H. A new mechanism of action

of dipyrrone: blockade of the release of a nociceptive factor from macrophages. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 21:565–568, 1998.

CARLSSON, K H & JURNA, I. The role of descending inhibition in the and antinociceptive effects of the pyrazolone derivatives, metamizol (dypirone) aminophenazone (“Pyramidon”). **Naunyn-Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology** 335:154–159, 1987.

CARLSSON, K H; HELMREICH, J; JURNA, I. Activation of inhibition from the periaqueductal grey matter mediates central analgesic effect of metamizol (dipyrrone). **Pain** 27(3):373–390, 1986.

CARLTON, S M; CHUNG, K; DING, Z; COGGESHALL, R E. Glutamate receptors on postganglionic sympathetic axons. **Neuroscience** 83:601–605, 1998.

CARLTON, S M; HARGETT, G L; COGGESHALL, R E. Localization and activation of glutamate receptors in unmyelinated axons of rat gabrous skin. **Neuroscience Letters** 197:25–28, 1995.

CARLTON, S M; ZHOU, S; COGGESHALL, R E. Localization and

activation of substance P receptors in unmyelinated axons of rat glabrous skin. **Brain Research** 734:103–108, 1996.

CARVALHO, M M J. **Dor, um estudo Multidisciplinar**. São Paulo, Summus Editorial, 1999.

COHEN, R D & PERL, E R. Contributions of arachidonic acid derivatives and substance P to the sensitization of cutaneous nociceptors. **Journal of Neurophysiology** 64:457–464, 1990.

COLEMAN, J.W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International Immunopharmacology** 1:1397–1406, 2001.

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.

DOUGLAS, C R. **Tratado de Fisiologia Aplicado à Ciência da Saúde**. São Paulo: Robe Editorial, 1999.

DRAY, A & PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends in**



**Neurosciences** 16:99–104, 1993.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia** 75:125–131, 1995.

DRAY, A. Kinins and their receptors in hyperalgesia. **The Canadian Journal of Clinical Pharmacology** 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, 1997 b.

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. **European Journal of Pharmacology** 217(2):225–227, 1992.

DUBNER, R & BENNETT, G J. Spinal mechanisms of nociception. **Annual Review of Neuroscience** 6:11–14, 1983.

EDVINSSON, L; CANTERA, L; JANSEN-OLENSEN, I; UDDMAN, R. Expression of calcitonin gene-related peptide<sub>1</sub> receptor mRNA in human

trigeminal ganglia and cerebral arteries. **Neuroscience Letters** 229:209–211, 1997.

FERREIRA, S H & LORENZETTI, B B. Intrathecal administration of prostaglandin E<sub>2</sub> causes sensitization of primary afferent neurons via the spinal release of glutamate. **Inflammation Research** 45:499–502, 1996.

FERREIRA, S H & VANE, J R. New aspects of the mode of action nonsteroid anti-inflammatory drugs. **Annual Review Pharmacology** 14:57–73, 1974.

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.  $\alpha_2$ -Adrenoceptors and 5-HT receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazolines, but not of dipyron. **European Journal of Pharmacology** 496:93-97, 2004.

GOEL, A & MADAN, A K. Structure-activity study on antiinflammatory pyrazole carboxylic acid hydrazide analogs using molecular connectivity indices. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences** 35(3):510–524, 1995.

GUIEU, R; PERAGUT, J C; ROUSSEL, P; HASSANI, H; SAMPIERI, F; BECHIS, G; GOLLA, 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. **European Journal of Medicinal Chemistry** 35:359–364, 2000.

GUYTON, E H. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1997.

HAYASHI, G & TAKEMORI, A E. The type of analgesic-receptor interaction involved in certain analgesic assays. **European Journal of Pharmacology**, 16:63–66, 1971.

HEPPELMANN, B & PAWLAK, M. Sensitization of articular afferents in normal and inflamed knee joints by substance P in the rat. **Neuroscience Letters** 223:97–100, 1997.

HERNANDEZ, N & VANEGAS, H. Antinociception induced by PAG-

microinjected dipyrone (metamizol) in rats: involvement of spinal endogenous opioids. **Brain Research** 896:175–178, 2001.

HOSKIN, P J; HANKS, G W. Opioid agonist-antagonist drugs in acute and chronic pain states. **Drugs** 41:326–344, 1991.

HU, H Z & LI, Z W. Substance P potentiates ATP-activated currents in rat primary sensory neurons. **Brain Research** 739:163–168, 1996.

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. **Behavioural Brain Research** 21:101–108, 1986

INOUE, K; NAKASAWA, K.; INOUE, K; FUJIMORI, K. Nonselective cation channels coupled with tachykinin receptors in rat sensory neurons. **Journal of Neurophysiology** 73:736–742, 1995.

INSEL, P A. Analgesic – antipyretic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: Hardman, J G; Limbird, L E; Molinoff, P B; Ruddon, R W; Goodman Gilman, A. **Pharmacological**

- JACKSON, D L; GRAFF, C B.; RICHARDSON, J D; HARGREAVES, K M.  
Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats. **European Journal of Pharmacology** 284:321–325, 1995.
- JEFTINIJA, S; JEFTINIJA, K; LIU, F; SKILLING, S R; SMULLIN, D H; LARSON, A A. Excitatory amino acids are released from primary afferent neurons in vitro. **Neuroscience Letters** 125:191–192, 1991.
- JESSEL, T M & KELLY, D D. Pain and Analgesia. In: New York: Kandel, E R; Schwartz, J H; Jessel, T M. **Principles of Neuroscience** 3<sup>a</sup> ed. Elsevier, 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.
- JONES, S L. Dipyrone into the nucleus raphe magnus inhibits the rat nociceptive tail-flick reflex. **European Journal of Pharmacology** 318:37–40, 1996.

JULIUS, D & BASBAUM, A L. Molecular Mechanisms of nociception. **Nature** 431:203–109, 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. **Neuroscience Letters** 231:33–36, 1997.

KRESS, M & ZEILHOFER, H U. Capsaicin, protons and heat: new excitement about receptors. **Trends Pharmacological Sciences** 20:112–118, 1999.

KUO, S; HUANG, L-J; NAKAMURA, H. Studies on heterocyclic compounds. <sup>6</sup>1Synthesis and analgesic and anti-inflammatory activities of 3,4-dimethylpyrano[2,3-c]pyrazol-6-one derivatives. **Journal Medical Chemistry** 27:539–544, 1984.

LAPORTE, J R; CARNÉ, X. Blood dyscrasias and the relative safety of non-narcotic analgesics. **Lancet** 329:809, 1987.

LARREGINA, A; AGGIO, M C; ALVAREZ, R V. Incidence and probable etiology of toxic agranulocytosis in definite population in the province of Buenos Aires (1963-1973), **Medicina** 54:13–16, 1994.

- LAWAND, N B; WILLIS, W D; WESTLUND, K N. Excitatory amino acid receptor involvement in peripheral nociceptive transmission in rats. **European Journal of Pharmacology** 324:169–177, 1997.
- LECANNELIER, S. Antiinflamatorios no esteroideos. In: Marcondes, J. **Farmacología**. Buenos Aires: Intermédica, 1976.
- LEVINE, J D & TAIWO, Y. Inflammatory Pain. In: Wall, P D & Melzack, R. **Textbook of Pain** 3<sup>rd</sup> ed. Edinburgh: Churchill-Livingstone, 1994.
- LEVINE, J D; LAM, D; TAIWO, Y. O; DONATONI, P; GOETZL; E J. Hyperalgesics properties of 15-lipoxygenase products of arachidonic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 83:5331–5334, 1986 a.
- LEVINE, J D; LAU, W; KWAIT, G; GOETZL, E J. Leukotriene B4 produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leucocytes. **Science** 225:743–745, 1984.
- LEVINE, J D; TAIWO, Y O; COLLINS, S D; TAM, J K. Noadrenaline hyperalgesia is mediated through interaction with sympathetic postganglionic neurone terminals rather than activation of primary

afferent nociceptors. **Nature** 323:158–160, 1986 b.

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

LIU, H; WANG, H; SHENG, M; JAN, L Y; JAN, Y N; BASBAUM, A I. Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsal horn. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 91:8383–8387, 1994.

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 dipyron-induced spinal and peripheral analgesia. **Inflammation Research** 45:308–311, 1996.

LORENZETTI, B B & FERREIRA, S H. Mode of analgesic action of dipyron: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. **European Journal of Pharmacology** 114:375–381, 1985.



MALMBERG, A B & YAKSH, T L. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 263:136–141, 1992.

MALMBERG, A B & YAKSH, T L. Capsaicin evoked prostaglandin E<sub>2</sub> release in spinal cord slices: relative effects of cyclooxygenase inhibitors. **European Journal of Pharmacology** 271:293–299, 1994.

MARDONES, J. **Farmacologia**. Buenos Aires: Interamericana, 1976.

MARQUEZ, J O & FERREIRA, S H. Regional dipyrrone nociceptor blockade: a pilot study. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 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.

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. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 24:1219–1222, 1991.

MCQUEEN, D S. Opioid peptide interactions with respiratory and circulatory systems. **British Medical Bulletin** 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.

MIAO, F J; JÄNIG, W; LEVINE, J D. Role of sympathetic postganglionic neurons in synovial plasma extravasation induced by bradykinin. **Journal of Neurophysiology** 75:715–724, 1996.

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. Multiple opioid systems and pain: a review. **Pain** 26:303–349, 1986.

MILLAN, M. J. The induction of Pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology** 57:1–164, 1999.

NATALINI, C. C. **Comparative evaluation of the effects of epidural morphine, alfentanil, butorphanol, tramadol and U-50488H in horses**. Tese (doutorado) University of Minnesota, 2000.

NESTLER, E J. Cellular responses to chronic treatment with drugs of abuse. **Critical Reviews in Neurobiology** 7:23–39, 1993.

NEUGEBAUER, V; Schaible, H G; HE, X; LUCKE, T; GUNDLING, P; SCHMIDT, R F. Eletrophysiological evidence for a spinal antinociceptive action of dipyrrone. **Agents Actions** 41:62–70, 1994.

NICOL, G D; KLINGBERG, D K; VASKO, M R. Prostaglandin E<sub>2</sub> increases calcium conductance and stimulates release of substance P in avian sensory neurons. **Journal of Neuroscience** 12:1917–1927, 1992.

NICOL, G D; VASKO, M R; EVANS, A R. Prostaglandins suppress an outward potassium current in embryonic rat sensory neurons. **Journal of Neurophysiology** 77:167–176, 1997.

NUKI, G. Nonsteroid analgesic and inflammatory agents. **British Medical Journal** 287:39–42, 1983.

OCHI, T & GOTO, T. The spinal antinociceptive effect of FR 140423 in mice. Involvement of the descending noradrenergic and serotonergic systems. **Life Science** 69:2257–2264, 2001.

OCHI, T; FUJII, T; MOTOYAMA, Y; GOTO, T. Antinociceptive properties of FR140423 mediated through spinal  $\delta$ -, but not  $\mu$ -and  $\kappa$ -, opioid receptors. **European Journal of Pharmacology** 380:73–79, 1999.

OCHI, T; FUJII, T; MOTOYAMA, Y; GOTO, T. The profile of FR140423, a novel anti-inflammatory compound, in yeast-induced rat hyperalgesia. **Japanase Journal of Pharmacology** 81(1):94–98, 1999.

OCHI, T; JOBO-MAGARI, K; YONEZAWA, A; MATSUMORI, K; FUJII, T. Anti-inflammatory and analgesic effects of a novel pyrazole derivative, FR140423. **European Journal of Pharmacology** 365:259–266, 1999.

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. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin** 17(7):1492–1497, 1969.

PEDERSEN-BJERGAARD, U; Nielsen, L B; JENSEN, K; EDVINSSON, L; JANSEN, I; OLESEN, J. Algesia and local responses induced by neurokinin A and substance P in human skin and temporal muscle. **Peptides** 10:1147–1152, 1989.

PIANI, D; FREI, K; DO, K Q; CUENOD, M; FONTANA, A. Murine brain macrophages induce NMDA receptor mediated neurotoxicity in vitro by secreting glutamate. **Neuroscience Letters** 133:159–162, 1991.

PORTENOY, R K & LESAGE, P. Management of cancer pain. **Lancet** 353:1695–1700, 1999.

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

PUTTICK, R M. Excitatory action of prostaglandin E<sub>2</sub> on rat neonatal cultured dorsal root ganglion cells. **British Journal of Pharmacology**

105:133–137, 1992.

RAINSFORD, K D & VELO, G P. **Side effects of anti-inflammatory/analgesic drugs**. Lancaster: Kluver academic Publishers, 1992.

RANG, H P & DALE, M M. Drugs used to suppress inflammatory and immune reactions. In: Rang, H P; Dale, M M. **Pharmacology**. Edinburgh, London, Melbourne and New York: Churchill-Livingstone, 1991:

RANG, H P; DALE, M M; RITTER, J M. **Pharmacology** 3<sup>a</sup> ed. Edinburgh, London, Melbourne and New York:Churchill-Livingstone, 1995.

REISINE, T & PASTERNAK, G. Opioid analgesics opioides and antagonists. In: Hardman, J G; Limbird, L E; Molinoff, P B; Ruddon, R W; Goodman Gilman, A. **Pharmacological Basis of Therapeutics**. Atlampa: Mc Graw Hill Interamericana, 1996.

RUEFF, A & DRAY, A. Sensitization of peripheral afferent-fibers in the in vitro neonatal rat spinal-cord tail by bradykinin and prostaglandins. **Neuroscience** 54: 527–535, 1993.

RUMACK, B H; PETERSON, R C; Koch, G G; AMARA, I A. Acetaminophen over-dose. 662 cases with evaluation of oral acetylcysteine treatment.

**Archives Internal Medicine** 141:380–385, 1982.

SCHEPELMANN, K; MEBLINGER, K; SCHAIBLE, H G; SCHMIDT, R F.

Inflammatory mediators and nociception in the joint: excitation and sensitization of slowly conducting afferent fibers of cat's knee by prostaglandin I<sub>2</sub>. **Neuroscience** 50:237–247, 1992.

SCHMELTZ, M; WEBER, S; KRESS, M. Topical acetyl salicylate and dipyronne attenuated neurogenic protein extravasation in rat skin in vitro.

**Neuroscience Letters** 290:57–60, 2000.

SHERRINGTON, C S. **The integrative action of the nervous system.**

Scribner, New York, 1906.

SHIBATA, M; OHKUBO, T; TAKAHASHI, H; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic response. **Pain** 38:347–352, 1989.

SMITH, T. W. The mechanisms of pain and opioid-induced analgesia.

**Molecular Aspects Medical** 7:509–545, 1984.

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. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 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. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 451:141–147, 2002.

SUH, H H & TSENG, L F. Different types of opioid receptors mediating analgesia induced by morphine, DAMGO, DPDPE, DADLE and  $\beta$ -endorphin in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology** 342: 67–71, 1990.

TABARELLI, Z; BERLESE, D B; SAUZEM, P D; MELLO, C F; RUBIN, M A . Antinociceptive effects of Cremophor EL orally administered to mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 36(1):119–23, 2003.



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. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 37:*in press*, 2004.

TAIWO, Y & LEVINE, J D. Characterization of the arachidonic acid metabolites mediating bradikinin and noradrenaline hyperalgesia. **Brain Research** 458:402–406, 1988.

TAIWO, Y O & LEVINE, J D. Further confirmation of the role of adenylyl-cyclase and of  $\epsilon$ 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 Research** 492:397–399, 1989.

TAKEHIRO, O; GOTO T. Anti-inflammatory activity of a novel selective cyclooxygenase-2 inhibitor, FR140423, on type II collagen-induced arthritis in Lewis rats. **Prostaglandins & other Lipid Mediators** 66:317–327, 2001.

TAKEHIRO, O; GOTO T. The antinociceptive effect induced by FR140423 is mediated through spinal 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors. **European Journal of Pharmacology** 409:167–172, 2000 b.

TAKEHIRO, O; GOTO T. The antinociceptive effect of FR140423 in mice: involvement of spinal  $\alpha_2$ -adrenoceptors. **European Journal of Pharmacology** 400:199–203, 2000 a.

TAKEHIRO, O; MOTOYAMA, Y; GOTO T. The spinal antinociceptive effect of FR140423 is mediated through kyotorphin receptors. **Life Science** 66(23):2239–2245, 2000.

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

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

TJOLSEN, A & HOLE, K. Animal Models of Analgesia. In: Dickenson, A &

Besson, J M. **The Pharmacology of Pain**, Germany: Ed Springer, 1997.

TOMAZETTI, J. **Padronização e validação do modelo de febre induzida por suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* em ratos jovens**.  
Dissertação de mestrado apresentado ao PPGBT/CCNE/UFSM, 2004.

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

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

TRAUB, R J. The spinal contribution of the induction of central sensibilization. **Brain Research** 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. **European Journal of Pharmacology** 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. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin** 45:1475–1481, 1997.

VANE, J & BOTTING, R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **FASEB Journal** 1:89–96, 1987.

VANE, J. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biology** 231:232–239, 1971.

VANE, J. Towards a better aspirin. **Nature** 367:215–216, 1994.

VASQUEZ, E & VANEGAS, H. The antinociception effect of PAG-microinjected dipyrone in rats is mediated by endogenous opioids of the rostral ventromedial medulla. **Brain Research**, 854:249–252, 2000.

WANG, H; LIU, R J; ZHANG, R X; QIAO, J T. Peripheral NMDA receptors contribute to activation of nociceptors: a c-fos expression study in rats. **Neuroscience Letters** 221:101–104, 1997.

WANG, J F; KHAZAR, S G; AHLGREN, S C; LEVINE, J D. Sensitization of C-fibres by prostaglandin E<sub>2</sub> in the rat is inhibited by guanosine 5'-O-(2-thiodiphosphate). 2'.5'-dideoxyadenosine and walsh inhibitor peptide. **Neuroscience** 71:259–263, 1996.

WARNCKE, T; JORUM, E; STUBHAUG, A. Local treatment with the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. Ketamine inhibits development of secondary hyperalgesia. **Neuroscience Letters** 227:1–4, 1997 b.

WARNCKE, T; STUBHAUG, A.; JORUM, E. Ketamine an NMDA receptor antagonist, supresses spatial and temporal properties of burn-induced secondary hyperalgesia in man: a double-blind cross-over comparison with morphine and placebo. **Pain** 72:99–106, 1997 a.

WEINREICH, D; MOORE, K A; TAYLOR, G E. Allergic inflammation in isolated vagal sensory ganglia unmasks silent NK-2 tachykinin receptors. **Journal of Neuroscience** 17:7683–7693, 1997.

WESTLUND, K N; SUN, Y C; SLUKA, K A; DOUGHERTY, P M; SORKIN, L S; WILLIS, W D. Neuronal changes in acute arthritis in monkeys. II Increased glutamate immunoreactivity in the medial articular nerve. **Brain Research Reviews** 17:15–27, 1992.

WHITE, D M; BASBAUM, A L; GOETZL, E J; LEVINE, J D. The 15-lipoxygenase product, SR 15S-diHEPE, stereo-specifically sensitizes C-fiber mechanoheat nociceptors in hairy skin of rat. **Journal of Neurophysiology** 63:966–970, 1990.

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. **Proceedings of the Society Experimental Biology and Medicine** 111:544–547, 1962.

WOOD, J N & Docherty, R J. Chemical activators of sensory neurons. **Annual Review of Physiology** 59:457–482, 1997.

YAKSH, T L & HAMMOND, D L. Peripheral and central substrates involved in the rostral transmissions of nociceptive information. **Pain** 13:1–85, 1982.