

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO  
DE NOVOS 3-METIL-1*H*-1-PIRAZOL METIL  
ESTERES 5-SUBSTITUÍDOS EM CAMUNDONGOS**

---

**Carla Mirelle Giotto Mai**



**UFSM**

**Dissertação de Mestrado**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO  
DE NOVOS 3-METIL-1H-1-PIRAZOL METIL  
ESTERES 5-SUBSTITUÍDOS EM CAMUNDONGOS**

**Carla Mirelle Giotto Mai**

**PPGBT**

**SANTA MARIA – RS – BRASIL**

**2007**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO  
DE NOVOS 3-METIL-1H-1-PIRAZOL METIL  
ESTERES 5-SUBSTITUÍDOS EM CAMUNDONGOS**

---

por

**Carla Mirelle Giotto Mai**

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**

**2007**

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO DE  
NOVOS 3-METIL-1H-1-PIRAZOL METIL ESTERES 5-  
SUBSTITUÍDOS EM CAMUNDONGOS**

elaborada por

**Carla Mirelle Giotto Mai**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Maribel Antonello Rubin**  
**(Orientadora)**

---

**Michele Rechia Fighera**

---

**Nilo Zanatta**

**Santa Maria, 31 de agosto de 2007.**

*A sabedoria é saber o que se deve fazer;*

*a virtude é fazê-lo.*

(David Starr Jordan)

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, pois sem Ele não conseguimos nada. Ele nos guia e nos dá a força que precisamos para enfrentar os obstáculos.

Aos meus pais Julio e Rovená e meu marido Luciano que me deram apoio, paciência, otimismo e força para não desistir e foram meus ombros amigos quando eu mais precisava. Amo vocês.

Aos meus irmãos Caroline e Ângelo pelos momentos de descontração, alegria e companheirismo.

A minha filha Alice que participou dos experimentos nove meses comigo e depois soube entender a minha ausência.

Aos meus orientadores Maribel e Carlos, agradeço pela dedicação, orientação e oportunidade de crescimento pessoal e profissional. Em especial à professora Maribel pelo empenho e incentivo nessa fase final.

Ao professor Juliano, um incansável co-orientador, sempre disposto a me ajudar. Você tem minha admiração e respeito pela sua inteligência e trabalho.

Aos amigos Gabriela Trevisan, Carine, Mateus, Alissara, Márcia e outros que contribuíram e fizeram força para que esse trabalho desse certo, sem medir esforços. Com certeza, sem vocês, eu não conseguiria chegar ao fim.

A minha mestra e sempre amiga Alessandra de Souza, um anjo que Deus colocou no laboratório para me trazer alegria, amizade e sabedoria. Obrigada amiga.

A todos que fazem parte do Laboratório que contribuíram para meu crescimento, meu carinhoso, muito obrigada.

**SUMÁRIO**

|   |     |
|---|-----|
| LISTA DE ABREVIATURA.....                                 | VII |
| LISTA DE FIGURAS .....                                    | IX  |
| LISTA DE TABELAS .....                                    | X   |
| RESUMO .....  | XI  |
| ABSTRACT .....  | XII |
| I. INTRODUÇÃO .....                                       | 1   |
| II. OBJETIVOS .....                                       | 7   |
| II.1. OBJETIVO GERAL .....                                | 8   |
| II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                         | 8   |
| III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                          | 9   |
| III.1 – DOR E NOCICEPÇÃO .....                            | 10  |
| III. 1. 1 – CLASSIFICAÇÃO DA DOR .....                    | 11  |
| III. 1. 1. 1 – DOR AGUDA .....                            | 11  |
| III. 1. 1. 2 – DOR CRÔNICA .....                          | 13  |
| III. 2 – MECANISMOS NEURAIS DA DOR .....                  | 14  |
| III. 2. 1 – MODULAÇÃO PERIFÉRICA .....                    | 14  |
| III. 2. 2 – MODULAÇÃO CENTRAL .....                       | 15  |
| III. 3 – MEDIADORES QUÍMICOS DA DOR E DA INFLAMAÇÃO ..... | 16  |
| III. 3. 1 – NEUROTRANSMISSORES DA DOR .....               | 18  |
| III. 3. 1. 1 –SUBSTÂNCIA P (SP) .....                     | 18  |
| III. 3. 1. 2 – GLUTAMATO .....                            | 18  |
| III. 3. 1. 3 – PROSTAGLANDINAS (PGs) .....                | 20  |
| III. 4 – TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DOR .....            | 21  |
| III. 4. 1 – DERIVADOS PIRAZOLÍNICOS .....                 | 23  |
| III. 4. 1. 1 – MECANISMOS DE AÇÃO .....                   | 25  |
| IV. MÉTODOS E RESULTADOS .....                            | 31  |
| V. ARTIGO .....   | 32  |
| VI. DISCUSSÃO .....                                       | 57  |
| VII. CONCLUSÕES .....                                     | 62  |
| VIII. REFERÊNCIAS .....                                   | 64  |



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

- AAE** – Aminoácido(s) excitatórios
- AC** – Adenilatociclase
- AINEs** – Antiinflamatórios não esteróidais
- AMPA** – Ácido DL- $\alpha$ -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazole-propiónico
- ANOVA** – Análise de variância
- B50** - 2-(5-triclorometil-3-fenil-5-hidroxi-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)-4-feniltiazol
- CFA** – Adjuvante Completo de Freund
- CGRP** – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
- COX** – Ciclooxigenase
- E. V.** – Endovenosa
- EP** - Receptor para prostaglandina E
- FNT- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$
- FR 140423** – 3-(difluormetil)-1-(4-metoxifenil)-5-[4-metilsulfinil] fenil] pirazol
- GMP** – Guanosina monofosfato
- i.p.** – Intraperitoneal
- IASP** – Associação Internacional para o Estudo da Dor
- IL** – Interleucina
- IP** - Receptor para prostaglandina I
- MPCA** – 3-fenil-5-hidroxitriclorometil-1H-1-pirazolcarboxiamida
- NMDA** – n-metil-D-aspartato
- NO** – Óxido Nítrico
- PAG** – Substância cinzenta periaquedutal
- PGE<sub>2</sub>** – Prostaglandina E<sub>2</sub>
- PGI** – Prostaglandina I<sub>2</sub>
- PGs** – Prostaglandinas
- PLC** – Fosfolipase C
- SNC** – Sistema Nervoso Central

**SNK** – Student Newman Keuls

**SNP** – Sistema Nervoso Periférico

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – (A) Anel pirazolínico. (B) Estrutura química da dipirona.

**Figura 2** - FR 140423- 3-(difluormetil)-1-(4-metoxifenil)-5-[4-(metilsulfinil) fenil pirazol.

## ARTIGO

**Figure 1** - Chemical structures of novel 3-methyl-1*H*-1-pyrazol methyl ester 5-substituted

**Figure 2** – Antinociceptive effects of compounds **1**, **2**, **4**, **5** and dipyrone in the hot-plate test in mice.

**Figure 3** – Antinociceptive effects of compounds **1**, **2**, **4** and **5** compared with dipyrone in the hot-plate test in mice.

**Figure 4** - Effect of compound **2** in the mechanical allodynia and in the paw edema in the chronic inflammation induced by CFA in mice.

## **LISTA DE TABELAS**

### **Artigo**

**Table 1** – Effect of compounds **1, 2, 3, 4, 5, 6** and dipyrone on the latency for the first fall and number of falls in the rotarod test and the crossings and rearings in the open-field test.

## RESUMO

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

### **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO DE NOVOS 3-METIL-1*H*-1-PIRAZOL METIL ESTERES 5-SUBSTITUÍDOS EM CAMUNDONGOS**

Autor: Carla Mirelle Giotto Mai  
Orientadora: Maribel Antonello Rubin  
Co-orientadores: Juliano Ferreira e Carlos Fernando de Mello  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 31 de Agosto de 2007.

No presente estudo nós investigamos a atividade antinociceptiva de seis derivados 1-*H*-1-pirazol metil ester no teste da placa quente e inflamação causada por Adjuvante Completo de Freund (CFA) em camundongos. A administração de 3,5-dimetil-1-*H*-1-pirazol metil ester (**1**), 3-metil-5-triclorometil-1-*H*-1-pirazol metil ester (**2**), 5-diclorometil-5-hidroxi-3-metil-4,5-dihidro-1-*H*-1-pirazol metil ester (**4**), 5-(cloro-difluor-metil)-5-hidroxi-3-metil-4,5-dihidro-1-*H*-1-pirazol metil ester (**5**) (20 – 1000  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) produziram antinocicepção no teste da placa quente. Todos os compostos, exceto o composto **4**, não causaram alterações motoras nos testes de locomoção forçada em cilindro giratório e campo aberto. Os compostos **3** e **6** não tiveram efeito antinociceptivo no teste da placa quente. O composto **2** por apresentar boa atividade antinociceptiva no teste da placa quente e ser desprovido de efeitos motores, foi testado em um modelo de dor crônica. O composto **2** (0.6 – 20  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) efetivamente reduziu alodínia mecânica causada por CFA ( $83 \pm 8\%$ ) e edema de pata. Os resultados do presente estudo sugerem que os novos derivados 1-*H*-1-pirazol metil ester, particularmente o composto **2**, tem um bom potencial analgésico contra dores aguda e crônica.

ABSTRACT

Dissertation of Master's degree  
Post Graduation Program in Toxicology Biochemistry  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

**ASSESSMENT OF THE ANTINOCICEPTIVE POTENTIAL OF NOVEL  
3-METHYL-1*H*-1-PYRAZOL METHYL ESTERS 5-SUBSTITUTED IN  
MICE.**

Author: Carla Mirelle Giotto Mai  
Advisors: Maribel Antonello Rubin  
Juliano Ferreira  
Carlos Fernando de Mello  
Date and place of defense: Santa Maria, august 31, 2007.

In the present study the antinociceptive activity of six 1-*H*-1-pyrazol methyl ester derivatives in the hot-plate test and Complete Freund's Adjuvant (CFA)-induced inflammation in mice was investigated. The administration of 3,5-dimethyl-1*H*-1-pyrazole methyl ester (**1**), 3-methyl-5-trichloromethyl-1*H*-1-pyrazole methyl ester (**2**), 5-dichloromethyl-5-hydroxy-3-methyl-4,5-dihydro-1*H*-1-pyrazole methyl ester (**4**), 5-(chloro-difluoro-methyl)-5-hydroxy-3-methyl-4,5-dihydro-1*H*-1-pyrazole methyl ester (**5**) (20 – 1000  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) produced antinociception in the hot plate test. All compounds, except compound **4**, did not cause motor alterations in the rotarod and open field tests. The compounds **3** and **6** did not produce antinociceptive effects. Since compound **2** presented good antinociceptive activity in the hot plate test and was devoid of motor effects, we tested whether it caused antinociception in an animal model of chronic pain. Compound **2** (0.6 – 20  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) effectively reduced CFA-induced mechanical allodynia ( $83 \pm 8\%$ ) and paw edema. The results of the present study suggest that novel 1-*H*-1-pyrazol methyl ester derivatives, particularly compound **2**, have a good analgesic potential against acute and chronic pain.

---

I. INTRODUÇÃO

A dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano tecidual potencial ou de fato, ou ainda descrita em termos que sugerem tal dano (Merskey e Bogduk, 1994). A dor, além de uma sensação, é uma experiência. Isto é importante porque as sensações possuem vias neuroanatômicas, com receptores específicos que permitem a detecção e medida de um estímulo. Já as experiências incorporam componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais importantes (Millan, 1999). No entanto, clínica e experimentalmente se faz necessária à distinção entre a dor percebida e a resposta ao dano tecidual ou nocicepção.

Nocicepção é um termo aplicado aos mecanismos neurológicos que detectam o estímulo lesivo (Ferreira, 2002). Essa detecção de lesão tecidual ocorre através de transdutores especializados ligados a fibras dos nervos periféricos do tipo A delta e C. Se a estimulação dos nociceptores vai resultar ou não em dor depende de inúmeros fatores moduladores. A intensidade da dor percebida varia consideravelmente, dependendo do humor do indivíduo, da quantidade de distração com relação à dor, e das sugestões positivas ou negativas de outras pessoas, assim como de vários sistemas neurológicos periféricos e centrais que são capazes de modular a transmissão nas sinapses nas vias nociceptivas (Umphered, 1994).

A transmissão do estímulo doloroso, assim como sua inibição, envolve múltiplos mecanismos (Lewis et al. 1980). A percepção da dor se



inicia na periferia pela estimulação dos nociceptores, que são neurônios diferenciados com função sensitiva cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios das raízes dorsais ou trigeminal, e projetam seus axônios até o corno dorsal da medula e na ponte. Os nociceptores estão presentes em todo o corpo e podem ser divididos em três subtipos: mecanoreceptores, com alto limiar, que respondem à pressão; receptores mecanotérmicos, com baixo limiar, que respondem à pressão e calor e os receptores polimodais, que respondem à pressão, calor e estímulos químicos nocivos (Natalini, 2000). Os mecanoreceptores e os receptores mecanotérmicos são compostos por terminações nervosas livres de fibras A delta, que são fibras mielinizadas e de condução rápida que se projetam nas lâminas II e III da medula. Por outro lado, os receptores polimodais são inervados pelas fibras C, que não são mielinizadas e, portanto, transmitem o estímulo de forma mais lenta. Essas fibras projetam-se nas lâminas I e II, e são estimuladas por mediadores endógenos (Natalini, 2000). Essas substâncias endógenas que são produzidas e/ou liberadas pelo tecido lesionado (prostaglandinas, neuropeptídeos, cininas, aminoácidos excitatórios e outros) estimulam os terminais nervosos sensitivos agindo em receptores presentes na membrana desses neurônios (Björkman, 1995). Além disso, os mediadores inflamatórios liberados facilitam a neurotransmissão e sensibilizam o nociceptor para o estímulo nocivo (Björkman, 1995). Mais especificamente, as prostaglandinas e os leucotrienos sensibilizam os terminais aferentes primários, tornando os

nociceptores periféricos mais sensíveis à bradicinina (Taiwo & Levine, 1988; Cohen & Perl, 1990). A ativação dos terminais periféricos resulta na liberação de mediadores nociceptivos no corno dorsal da medula espinhal.

Do ponto de vista temporal, a dor é classificada como aguda e crônica e, sob a óptica da fisiopatologia, descreve-se a dor como associada à inflamação, à neuropatia e à de influência pelo sistema nervoso simpático. A dor aguda é aquela que está relacionada à instalação de um processo patológico, seja ele de origem traumática ou inflamatória. A dor deriva normalmente do excesso de nocicepção, porém pode resultar também da sensibilização ou da hipoatividade do sistema supressor da dor ou ambos. Ela serve como sinal de alerta para a ocorrência da lesão. A resolução desse quadro normalmente acompanha a finalização do quadro doloroso. Caso a dor não se resolva com o fim do processo causal, persistindo, além da ausência da lesão, vai configurar um dos quadros possíveis de dor crônica (Cavalcanti & Maddalena, 2003). Na terapia da dor existem duas classes principais de drogas analgésicas. Os opióides abolem diretamente a transmissão nociceptiva no sistema nervosa central (SNC) (Vane, 1971; Aguirre-Banuelos e Granados-Soto, 1999). Os antiinflamatórios não esteroidais (AINES) são moléculas sintéticas que possuem ações antiinflamatórias, antipiréticas e analgésicas (Borne, 1995). No entanto, os efeitos colaterais descritos para muitos AINES, como irritação gastrointestinal e anormalidades da função

renal, têm limitado o uso dessas substâncias, especialmente no tratamento da dor crônica (Fernandez et al., 1995; Lichtenberger et al., 1995). Por isso, é interessante obter novos AINES que possuam menos efeitos colaterais. Os compostos de derivados pirazolínicos, particularmente a dipirona, ganhou popularidade por seu baixo custo e bons efeitos como analgésico e antipirético além de apresentar quantitativamente menos efeitos colaterais quando comparado com outros AINES (Arellano and Sacristan, 1990). Portanto, descobrir novos compostos (incluindo os derivados pirazolínicos) nos quais não tenham efeitos colaterais nocivos a vida e tenham atividade antiinflamatória e analgésica tem sido sistematicamente procurada ao longo desses anos (Ochi et al., 1999; Souza et al, 2001; Godoy et al., 2004; Tabarelli et al., 2004; Zhou et al., 2004; Souza et al, 2005; Prokopp et al., 2006; Sauzem et al., 2007). Embora os mecanismos dos efeitos analgésicos e antipiréticos desses novos derivados pirazolínicos ainda não estão bem esclarecidos, crescem as evidências sugerindo o envolvimento dos sistemas opióide, noradrenérgico e serotoninérgico nesses efeitos (Souza et al., 2001; Godoy et al., 2004; Prokopp et al., 2006). O primeiro relato publicado da atividade antinociceptiva de 3-metil-5-hidróxi-5-triclorometil-1*H*-1-pirazol carboxiamida (MPCA) demonstrou que esse composto induziu a antinocicepção nas fases neurogênica e inflamatória do teste da formalina e estes efeitos envolvem a participação de receptores espinhais  $\alpha_2$  e 5-HT e não tem a participação de receptores opióides (Souza et al.,

2001). Prokopp e colaboradores (2006) mostraram que o composto 2-(5-triclorometil-3-fenil-5-hidroxi-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)-4-feniltiazol (B50) apresentou a participação do sistema opióide na sua atividade antinociceptiva. Entretanto, estudos seguindo com o MPCA e seu análogo 3 – fenil – 5 – hidróxi – 5 – triclorometil – 1 H – 1 -pirazolcarboxiamida (FPCA) sugeriram que receptores serotoninérgicos e  $\alpha_2$ -adrenérgicos espinhais estavam envolvidos na antinocicepção induzida por esses compostos (Godoy et al., 2004). O MPCA e o FPCA também foram testados como antipiréticos e reverteram a febre induzida por fermento de padeiro em ratos jovens (Tomazetti et al., 2005). Considerando que uma atividade analgésica foi observada nos derivados de compostos pirazolínicos sintetizados pelo NUQUIMHE, nós decidimos avaliar se uma nova série de derivados 1-H-1-pirazol metil ester induzem a antinocicepção em modelos de dor aguda (placa quente) e crônica induzida pela administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA) em camundongos.

---

**II. OBJETIVOS**

## II. 1. OBJETIVO GERAL

Investigar a ação antinociceptiva de uma nova série de compostos 1-H-1-pirazol metil ester em camundongos.

## II. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito dos compostos **1, 2, 3, 4, 5, 6** (20-1000  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p) em modelos de dor aguda (teste da placa quente);
- Avaliar o efeito dos compostos **1, 2, 3, 4, 5, 6** nos teste da locomoção forçada em cilindro giratório;
- Avaliar o efeito dos compostos **1, 2, 3, 4, 5, 6** nos teste da locomoção espontânea no campo aberto;
- Selecionar dentre os compostos testados o que apresentou melhor desempenho em modelos de dor aguda e testa-lo em modelos de dor crônica;
- Avaliar o efeito do composto selecionado em modelos de dor crônica (induzida pelo CFA).

---

### III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA





### **III. 1 – DOR E NOCICEPÇÃO**

Conforme a definição proposta pela IASP (*International Association for the Study of Pain*), dor é uma experiência emocional, com sensação desagradável, associada à lesão tecidual presente, potencial ou descrita como tal (Cavalcanti e Maddalena, 2003). Dor é uma qualidade sensorial complexa, puramente subjetiva, difícil de ser definida, descrita ou interpretada. A dor é influenciada por ansiedade, depressão, expectativa e outras variáveis psicológicas. É um entrelaçamento das características físicas dos estímulos com as funções motivacionais, afetivas e cognitivas do indivíduo, pois desempenha o papel de alerta, comunicando ao indivíduo que algo está errado, podendo gerar estresse acentuado e incapacidade física (Souza, 2005). Em indivíduos saudáveis, a dor serve para propósitos altamente adaptativos relacionados com a sobrevivência. As sensações dolorosas induzem respostas urgentes de seu alívio, provocando comportamentos como massagear (ou lambear) a área lesada, além de raiva, grito e choro (Ganong, 1988; Agnati *et al.*, 1991). Uma vez que os animais não são capazes de verbalizar os componentes subjetivos da dor, neles não se avalia dor, mas nocicepção. Sendo assim, termos como dor e analgesia são mais adotados para humanos e nocicepção e antinocicepção para animais (Jones, 1996).

Esses transdutores podem ser alterados por mudanças neurais ou inflamatórias, tendo seu sinal amplificado ou inibido.

É importante ressaltar que o estímulo, seja ele, térmico, químico ou mecânico, deve exceder um determinado limiar para que seja interpretado pelo sistema sensorial como nociceptivo (Björkman, 1995).

### **III. 1.1 – Classificação da dor**

Do ponto de vista temporal, a dor pode ser classificada como aguda e crônica e, sob a óptica da fisiopatologia, descreve-se a dor como associada à nocicepção, à neuropatia e à de influência pelo sistema nervoso simpático (Cavalcanti & Maddalena, 2003).

#### **III. 1.1.1 – Dor aguda**

Dor aguda é um sintoma biológico de estímulo nocivo, como dano tecidual devido à doença ou trauma. Pode ser altamente localizada ou pode se irradiar. É descrita em caráter de pontadas e persiste enquanto houver patologia tecidual (Bernard *et al.*, 1996; Loeser & Melzack, 1999).

A lesão tecidual inicia desde a periferia (estimulação dos nociceptores) e vai até os centros superiores, que têm como objetivos: identificar o local da lesão; sua origem (mecânica, térmica ou química); gerar um sinal de alerta; gerar uma resposta fisiológica; ativar os mecanismos moduladores. 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. A lesão tecidual por estímulo mecânico, térmico ou químico determina a ativação dos nociceptores (Cavalcanti & Maddalena, 2003).

Os nociceptores são terminações nervosas livres que têm alto limiar de excitabilidade e que detectam e sinalizam os estímulos nocivos (Cavalcanti & Maddalena, 2003). Os nociceptores estão presentes em todo o corpo e podem ser divididos em três subtipos: mecanoreceptores, com alto limiar, que respondem à pressão; receptores mecanotérmicos, com baixo limiar, que respondem à pressão e calor, e receptores polimodais, que respondem à pressão, calor e estímulos químicos (Natalini, 2000). Os mecanoreceptores e receptores mecanotérmicos compostos por terminações nervosas livres de fibras A delta, que são fibras mielinizadas e de condução rápida que se projetam, principalmente, às laminae II e III da medula. Por outro lado, os receptores polimodais (mecânico, térmico e químico) são inervados pelas fibras C, que não são mielinizadas e, portanto, transmitem o estímulo de forma mais lenta. Essas fibras projetam-se até a camada superficial no corno dorsal da medula, mais especificamente nas lâminas I e II, e são estimuladas por mediadores inflamatórios endógenos (Natalini, 2000). Essas substâncias endógenas que são produzidas e/ou liberadas pelo tecido lesionado (prostaglandinas, neuropeptídeos, cininas, aminoácidos excitatórios, e outros) estimulam os terminais nervosos sensitivos agindo em receptores

presentes na membrana desses axônios (Björkman,1995). Além disso, os mediadores inflamatórios liberados facilitam a neurotransmissão e sensibilizam o nociceptor para o estímulo nocivo (Björkman, 1995). Mais especificamente, as prostaglandinas e os leucotrienos sensibilizam os terminais aferentes primários, tornando os nociceptores periféricos mais sensíveis à bradicinina (Taiwo & Levine, 1988; Cohen & Perl, 1990). A ativação dos terminais periféricos resulta na liberação de mediadores nociceptivos no corno dorsal da medula.

### **III. 1. 1. 2 – Dor crônica**

A dor torna-se crônica quando o controle da patologia não é satisfatório, persistindo além do tempo necessário para a cura da lesão (Ashburn & Staats, 1999). Esse tipo de dor é resultante de processos patológicos, que agredem as estruturas somáticas ou viscerais, e de disfunções do sistema nervoso central (SNC), ou do sistema nervoso periférico (SNP). Contudo, a dor crônica gera estresse, reduz a imunidade, diminui a produção de endorfinas e causa alterações do sono, causando depressão (Carvalho, 1999). As dores crônicas mais comuns incluem a neuralgia do trigêmeo, fibromialgia, as síndromes dolorosas complexas regionais, a dor associada com artrite, a dor do membro fantasma e as síndromes dolorosas centrais (Ashburn & Staats, 1999). Durante essas síndromes, o processamento sensorial é anormal. Estímulos ambientais que normalmente são inócuos, tais como leve toque

ou pequenas alterações na temperatura ambiente, produzem a sensação de dor, isto é, alodínea. Estímulos que normalmente são percebidos como dolorosos produzem percepção exagerada de dor, isto é, hiperalgesia (Ferreira, 2004). A dor crônica difere substancialmente da dor aguda não somente em relação ao seu caráter persistente, mas está principalmente associada com alterações adaptativas, tais como a neuroplasticidade em vários níveis do sistema nervoso, sendo de difícil tratamento (Besson, 1999; Woolf e Mannion, 1999).

## **III. 2 – MECANISMOS NEURAIS DA DOR**

### **III. 2.1 – Modulação Periférica**

Os nociceptores são receptores encontrados nos tecidos superficiais, profundos e vísceras que se apresentam como terminações nervosas livres com alto limiar de excitabilidade. Eles conduzem as informações nociceptivas ao sistema nervoso central, e seus corpos celulares encontram-se dentro dos gânglios das raízes dorsais, adjacente à medula espinhal (Russo & Brose, 1998; Besson, 1999; Grubb, 1999; Millan, 1999). Quando um estímulo intenso provoca lesão tecidual, há desencadeamento de um processo inflamatório seguido de reparação. As células lesadas liberam enzimas que agem sobre os cininogênios, formando cininas. A partir da membrana celular, pela ação da fosfolipase A<sub>2</sub>, libera-se ácido araquidônico que, por ação da cicloxigenase e da

lipoxigenase, origina prostaciclina, prostaglandinas, tromboxano, leucotrienos e lipoxinas.

Além dessa resposta inflamatória tecidual, há uma resposta neurogênica, com produção de vasodilatação, extravasamento de proteínas plasmáticas e ação sobre as células inflamatórias com a liberação de mediadores químicos. Os mediadores inflamatórios agem aumentando a sensibilidade dos nociceptores, reduzindo assim seu limiar de excitabilidade. Além do fenômeno de sensibilização, que ocorre devido à reação inflamatória, existe a modulação inibitória, mediada por receptores opióides periféricos. Os ligantes endógenos dos receptores são a endorfina, as encefalinas e as dinorfinas, que se encontram em células relacionadas à imunidade. Quando há persistência de reação inflamatória, o número de receptores opióides aumenta, indicando que a inflamação estimula o transporte axonal de receptores para a periferia (Cavalcanti, 2003).

### **III. 2. 2 – Modulação Central**

Os neurônios primários aferentes fazem sinapse com os neurônios secundários na medula espinhal (lâmina I) e a liberação dos neurotransmissores nociceptivos das fibras aferentes primárias ativam os neurônios secundários no corno dorsal na medula (Castro e Silva, 1998).

A via mais importante de transmissão do estímulo doloroso é o trato espinotalâmico ascendente na medula espinhal, localizado na

substância branca ventral ao local da estimulação. A ativação destes neurônios resulta na resposta reflexa espinhal, assim como na ativação de tratos ascendentes, os quais transmitem informação nociceptiva às estruturas supraespinhais para completar a via nociceptiva (Guyton, 1997).

Os neurônios secundários cruzam a medula espinhal para ascender ao trato espinotalâmico, projetando seus corpos celulares ao tálamo. No tálamo ocorre a somatização do estímulo nocivo onde existe o componente emocional da dor (Russo e Brose, 1998). O tálamo e o córtex são regiões finais da projeção das vias de nocicepção. O tálamo informa que existe sensação nociceptiva, e o córtex discrimina o tipo de sensação nociceptiva.

Além dos sistemas ascendentes, há um descendente que passa pelo funículo dorso lateral e faz sinapse com os neurônios da lamina II na medula espinhal. Esse é um sistema com função inibitória (Cavalcanti, 2003).

### **III. 3 – Mediadores químicos da dor e da inflamação**

A ação direta ou indireta de mediadores químicos, tais como metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), aminoácidos ou seus derivados (glutamato, noradrenalina, serotonina, dopamina e óxido nítrico), peptídeos (cininas, taquicininas, CGRP,

galanina, colecistocinina, peptídeo intestinal vasoativo), proteínas (citocinas, fator de crescimento do nervo), entre outros, são responsáveis pela multiplicidade de eventos que ocorrem durante a transmissão dolorosa, tanto no sistema nervoso periférico quanto no central (Besson, 1999; Fürst, 1999; Millan, 1999; Calixto et al., 2000).

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

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

Muitos mediadores provêm de tecidos lesionados e adjacentes como o sistema vascular, células do sistema imunológico, nervos simpáticos e sensoriais, entre outros (Millan, 1999).



### **III. 3.1 – Neurotransmissores da dor**

#### **III. 3.1.1 - Substância P (SP)**

A substância P é uma taquicinina que pode mediar a sinapse entre as fibras aferentes primárias e o neurônio do corno dorsal da medula, importantes para a sensibilização da dor ou nocicepção, e são liberados durante a inflamação (Li & Zhuo, 2001).

Substância P é encontrada em altas concentrações nas terminações aferentes da medula espinal, sendo o mediador da primeira sinapse da dor. Embora o mecanismo de ação da substância P no controle da dor ainda não esteja bem determinado, sabe-se que ela pode produzir tanto analgesia como reduzir o limiar da dor (Velázquez et al., 1997). A infusão intratecal de substância P produz, em animais, o comportamento de coçar, morder e lamber, indicando nocicepção, e sugerindo que a substância P possa ter papel estimulatório importante na via nociceptiva (Björkman, 1995).

#### **III. 3.1.2 – Glutamato**

Existem evidências do envolvimento do glutamato, aspartato e alguns peptídeos na transmissão do estímulo nociceptivo no corno dorsal da medula espinal (Besson & Chaouch, 1987; Battaglia & Rustioni, 1988; Headley & Grillner, 1990; Dray et al., 1994). Cerca de 75% da transmissão

excitatória no sistema nervoso central é feita pelo glutamato e secundariamente pelo aspartato.

O glutamato é um aminoácido excitatório (AAE), podendo ser encontrado na medula espinhal, originado de fibras aferentes primárias mielinizadas e não-mielinizadas, em adição a interneurônios intrínsecos e projeção de neurônios (Besson & Chaouch, 1987; Battaglia & Rustioni, 1988; Headley & Grillner, 1990). Três tipos de receptores de glutamato foram identificados: N-metil-D-aspartato (NMDA), cainato e ácido DL- $\alpha$ -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazole-propiónico (AMPA). Estes dois últimos são canais iônicos que permitem o influxo de  $\text{Na}^+$  e o efluxo de  $\text{K}^{2+}$  (Björkman, 1995). Em muitas sinapses a liberação de glutamato é conjunta, com a liberação de substância P e neurocininas, que são chamadas de neuromoduladores.

Os potenciais excitatórios pós-sinápticos rápidos são mediados pela ação excitatória do glutamato sobre os receptores ionotrópicos conhecidos como AMPA. Os potenciais excitatórios pós-sinápticos lentos exibem três componentes (Cavalcanti, 2003). Um deles desencadeado pela ação do glutamato sobre os receptores AMPA, durando cerca de milissegundos; um segundo componente que é sensível aos antagonistas do receptor NMDA e dura 5 segundos. O terceiro, mais prolongado, é resistente aos antagonistas do receptor NMDA e parece ser mediado por taquicininas como substância P ou neurocinina A (Umphered, 1994).

A transmissão de fibras C, depois de estímulos agudos mecânicos ou térmicos, parece envolver somente o receptor AMPA para produzir excitações curtas e constantes. Os estímulos são mantidos e/ou sua frequência é aumentada pela liberação de transmissores que contribuem para a transmissão nociceptiva quando o receptor NMDA é ativado, aumentando resposta de hiperalgesia (Dickenson, 1995). Uma ação excitatória direta, do tipo retroalimentação positiva, do glutamato nas fibras aferentes primárias, seria consistente com a evidência que a ativação dos receptores NMDA causa liberação de substância P por seus terminais centrais (Liu et al., 1994, 1997).

### **III. 3. 1. 3 - Prostaglandinas (PGs)**

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

Todas as células possam sintetizar as PGs em condições inflamatórias teciduais e lesão nervosa, porém 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., 1986; Taiwo & Levine, 1988)

As principais PGs envolvidas no fenômeno de hiperalgesia, PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> (prostaciclina) podem retrogradamente, aumentar a atividade da COX-2 pela ativação de receptores EP e IP, respectivamente (Bakle & Botting, 1996; Appleton, 1997; Bóie et al., 1997).

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).

Os mecanismos celulares exatos e os subtipos de receptores envolvidos nessa ação das prostaglandinas ainda não estão definidos, mas há evidências de que a avaliação de receptores EP e IP, assim como o aumento nas atividades da fosfolipase C (PLC), adenilato ciclase (AC) e nos níveis de [Ca<sup>2+</sup>], sejam importantes para tal efeito (Coleman, 1994).

### **III. 4 – TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DOR**

O arsenal farmacológico para o tratamento da dor é composto por opióides, os quais abolem diretamente a transmissão nociceptiva no sistema nervoso central pela ligação em receptores opióides (Hoskin & Hanks, 1991), e por fármacos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs)

que previnem a sensibilização de receptores periféricos e centrais da dor inibindo a ciclooxigenase (Cashman, 1996).

Analgésicos opióides como a morfina e codeína são indicados no tratamento de dores agudas, moderadas ou intensas, que não respondam a analgésicos menos potentes. 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).

Os AINEs têm vantagens sobre os analgésicos opióides por não provocarem tolerância e dependência com o uso crônico (Nuki, 1983; Rainsford & Velo, 1992). Trabalhos recentes demonstram que as AINEs atuam no sistema nervoso central, inibindo a hipersensibilidade espinhal e ativando mecanismos inibitórios descendentes da nocicepção, por mecanismos dependentes de prostaglandinas (Oliveira, 2003).

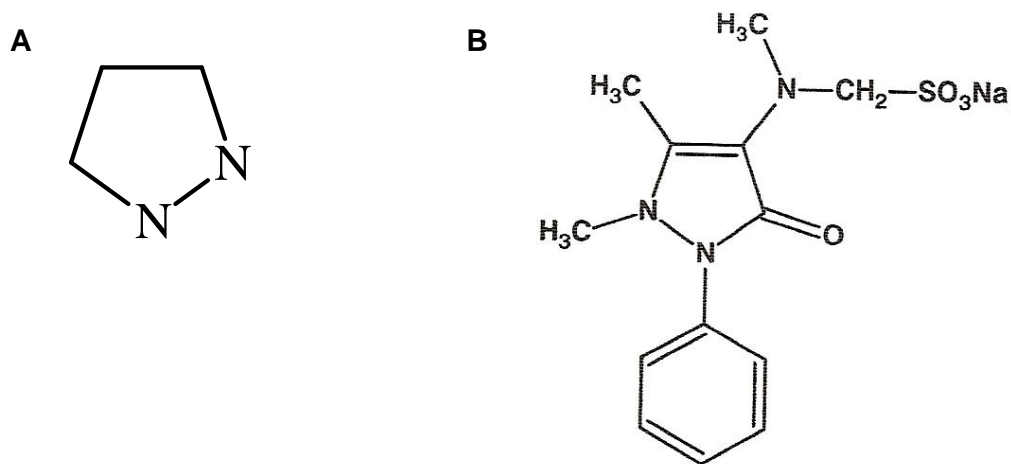
Os AINEs têm um perfil farmacodinâmico, terapêutico e toxicológico semelhantes que pode levar à lesão da mucosa duodenal e sangramento digestivo, à lesão renal, leucopenia, confusão mental, insuficiência hepática e prurido (Oliveira, 2003).

A maioria dos AINES possui atividade antiinflamatória, analgésica e antipirética (Rang et al., 1995). O principal mecanismo de ação dos AINES é a inibição da COX, que culmina na diminuição da síntese de prostaglandinas (Vane & Botting, 1987).

Dentre os AINEs, daremos maior ênfase aos estudos realizados com os derivados pirazolínicos, em especial a dipirona, já que os compostos pesquisados nesse trabalho pertencem a essa classe química.

### III. 4. 1 – DERIVADOS PIRAZOLINICOS

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



**Figura 1** – (A) Anel pirazolínico. (B) Estrutura química da dipirona.

As propriedades antiinflamatórias dos compostos pirazolínicos estão associadas com a presença de carbonos nas posições 3 e 5 do anel pirazolínico (Borne, 1995). Quando a carbonila não está presente, estes compostos possuem pouca ação antiinflamatória, mas possuem um grande efeito antinociceptivo (Kuo et al., 1984; Beirith et al., 1998; Souza et al., 2001)

A descoberta dos derivados pirazolínicos, data de aproximadamente 1884, quando o químico alemão Ludwig Knorr tentava sintetizar derivados quinolínicos e obteve, acidentalmente, a antipirina que é um analgésico com atividade antipirética e antireumática, porém muito tóxico (Borne, 1995). Em consequência desse efeito indesejável, o interesse pelos pirazolínicos diminuiu. Em 1940 houve o aparecimento da fenilbutazona, um composto com boa atividade antiinflamatória, porém de uso restrito ao tratamento da espondilite anquilisante, devido seus efeitos colaterais (Rang et al., 1995). Em 1921, o laboratório Hoechst obteve a dipirona, pela substituição de uma das metilas do grupo amino da 5-pirazolona por metilenosulfoxilato de sódio. Estudos em animais e humanos revelam que a dipirona é um antipirético potente, tem boa atividade analgésica e fraca atividade antiinflamatória (Lecannelier, 1976). Esse produto tem como nome comercial Novalgina<sup>®</sup>, sendo denominado genericamente de metamizol (Mardones, 1976). A dipirona ganhou popularidade devido ao seu baixo custo e alta eficácia (Arellano & Sacristan, 1990), porém seu uso clínico foi proibido nos EUA e alguns

países da Europa por estar relacionado a casos de agranulocitose (Insel, 1996). Entretanto, estudos mostram que a incidência de agranulocitose em usuários de dipirona é baixa (3-19 casos por milhão), cerca de duas vezes maior que a incidência na população em geral (Laporte & Carné, 1987). Outros analgésicos com popularidade como o paracetamol e o ácido acetilsalicílico (AAS), também causam efeitos indesejáveis 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 esta associada à agranulocitose.

Apesar de existir muitas controvérsias em relação à segurança do uso clínico da dipirona, esse é um derivado pirazolínico muito usado no tratamento da dor e possui boa tolerabilidade gástrica. Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de desvendar o mecanismo de ação da dipirona.

### **III. 4. 1. 1 – Mecanismo de ação dos derivados pirazolínicos**

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

Estudos têm demonstrado que a administração de AINES pirazolínicos no sistema nervoso central produz antinocicepção (Taiwo &



Levine, 1988; Björkman, 1995; Hammond, 1997; Tortorici et al., 1996; Yaksh, 1999; Hernandez & Vanegas, 2001; Ochi & Goto, 2001). Em 1986, Carlsson e colaboradores 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 substância cinzenta pariaquedutal (PAG) diminui a excitabilidade das fibras C, e prolongou a latência para a retirada da cauda de um estímulo térmico aversivo. Mais tarde, Carlsson & Jurna (1987) verificaram que o aumento da latência de retirada da cauda de um banho térmico, provocado pela dipirona foi 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 medula ventro medial rostral (Tortorici & Vanegas, 1994), constituindo evidência experimental adicional de que a dipirona ativa as vias descendentes inibitórias.

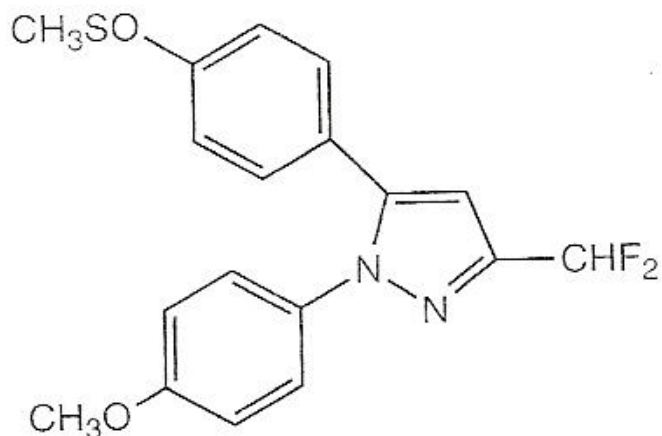
O mecanismo de ação da dipirona não é completamente conhecido, mas há evidências de que sua atividade analgésica esteja relacionada tanto à inibição da síntese de prostaglandinas no sistema nervoso periférico, como no sistema nervoso central pela inibição da ciclooxigenases (Campos et al., 1998; 1999), podendo atuar, também, na modulação da liberação de endorfinas (Akman et al., 1996; Vasquez & Vanegas, 2000) e de óxido nítrico (NO) (Duarte et al., 1992). Assim, a dipirona potencializa o efeito da morfina e essa potencialização é

antagonizada pela naloxona e por inibidores da enzima óxido nítrico sintase, sugerindo a participação da via da óxido nítrico-GMP cíclico na ação das duas drogas (Aguirre-Bañuelos & Granados-Soto, 1999).

O efeito analgésico e antiinflamatório da dipirona também foi estudado por Tatsuo e colaboradores (1994), que compararam a atividade da dipirona, indometacina e dexametasona num modelo de inflamação crônica em ratos. A dipirona apresenta efeito antinociceptivo mais pronunciado do que o efeito anti-edematogênico, ao contrário da indometacina e da dexametasona, que têm tanto efeito antinociceptivo quanto anti-edematogênico. Assim, os autores concluíram que a dipirona tem um mecanismo de ação diferente, não relacionado com a inibição da ciclooxigenase, para reduzir a hiperalgesia e o edema nesse modelo. Também foi descrito que a dipirona não inibe a ciclooxigenase-1 em células intactas em concentrações terapêuticas. Nessas mesmas concentrações a dipirona é capaz de inibir seletivamente a ciclooxigenase-2, que poderia ter um papel importante no efeito analgésico da dipirona (Campos et al., 1999). Isso indica que, ao contrário de outros AINEs clássicos, 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).

Desde o surgimento da dipirona, outros tantos compostos pirazolínicos têm sido estudados. Dentre os demais pirazolínicos

relatados na literatura, destacamos o 3-(difluormetil)-1-(4-metoxifenil)-5-[4-(metilsulfonil)fenil] pirazol (FR140423, Figura 2), já que esse composto possui estrutura química bastante similar a dos compostos que foram estudados em nosso laboratório. O FR140423, sintetizado em 1997 por um grupo de pesquisadores japoneses é um derivado pirazólico descoberto durante a triagem de novos compostos com potencial antiinflamatório (Tsuji et al., 1997). Esse composto apresenta ação antinociceptiva e antiinflamatória, inibindo seletivamente a COX-2 (Ochi et al., 1999). Além disso, o FR 140423 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. Os autores consideram que o FR 140423 é uma droga que tem ação por dois mecanismos distintos, que são inibição da COX-2 em tecidos inflamados e interação com o sistema opióide (Ochi & Goto, 2001).



**Figura 2** – FR 140423 – 3-(difluormetil)-1-(4-metoxifenil)-5-[4-(metilsulfinil)fenil] pirazol.

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 pirazolinicos, que aliem boa ação farmacológica e baixo índice de efeitos indesejáveis (Goel & Madan, 1995; Bonacorso et al., 1999).

Desde que dor e febre são um dos sintomas mais comuns na prática clínica e o arsenal de compostos analgésicos e antipiréticos é relativamente pequeno, nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo um trabalho em conjunto com o Núcleo de Química de Heterocíclicos (NUQUINHE) da UFSM, investigando os efeitos antinociceptivos e o potencial antipirético de novos derivados pirazolinicos (Souza et al., 2001; 2002; Godoy et al., 2004; Tabarelli et al., 2004; Tomazetti et al., 2005; Prokop et al., 2006; Sauzem et al., 2007). O primeiro relato da atividade antinociceptiva de 5-trialometil-4,5-diidro-1H-pirazóis demonstrou que a administração subcutânea induzia a antinocicepção nas fases neurogênica e inflamatória do Teste da Formalina (Souza et al., 2001). A boa atividade antinociceptiva de dois 5-trifluorometil-4,5-diidro-1H-pirazóis também foi comprovada por Sauzem e colaboradores (2007). O MPCA e o FPCA foram testados como antipiréticos e reverteram a febre induzida por fermento de padeiro em ratos jovens (Souza et al., 2001; Tomazetti et al., 2005).

Recentemente estudos mostraram a ação antinociceptiva do derivado pirazolínico 2-(5-triclorometil-3-fenil-5-hidroxi-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)-4-feniltiazol (B50) administrado por via sistêmica. O B50 apresentou ação antinociceptiva de maneira dose-dependente no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, mas não apresentou efeito no teste da imersão da cauda em água à 55° C (Prokopp et al., 2006).

Levando-se em consideração a importância da descoberta de novos fármacos com propriedades analgésicas e antiinflamatórias com menos efeitos colaterais e custos mais acessíveis para a população, se faz necessário o estudo dos mecanismos de ação da dor. Isso será fundamental para que se desenvolvam drogas para o tratamento de processos dolorosos, especialmente os quadros de dor crônica.

## **IV. Métodos e Resultados**

Os métodos e resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados na forma de manuscrito que será submetido para publicação em revista especializada da área.

## **Assessment of the antinociceptive potential of novel**

### **3-methyl-1*H*-1-pyrazol methyl esters 5-substituted in mice.**

Carla G. Mai<sup>1</sup>, Gabriela T. Santos<sup>1</sup>, Carine C. Drewes<sup>1</sup>, Alessandra H. de Souza<sup>1</sup>, Marcia Noriega<sup>1</sup>, Alissara Teles<sup>1</sup>, Pablo Machado<sup>3</sup>, Marcos A. P. Martins<sup>3</sup>, Nilo Zanatta<sup>3</sup>, Helio G. Bonacorso<sup>3</sup>, Carlos F. Mello<sup>2</sup>; Juliano Ferreira<sup>1</sup>; Maribel A. Rubin<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia,

<sup>1</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas,

<sup>2</sup>Departamento de Fisiologia, Centro de Ciências da Saúde

<sup>3</sup>Núcleo de Química de Heterociclos (NUQUIMHE),

Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas

Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

**\*Corresponding author: Maribel A. Rubin, Departamento de Química,  
Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima nº 1000,  
Bairro Camobi, Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +5555-32208053; Fax:  
+5555-32208031**

E-mail: maribel.rubin@gmail.com

Sources of support: CNPq, PRONEX, FAPERGS (Brazil).

## ABSTRACT

In the present study the antinociceptive activity of six 1-*H*-1-pyrazol methyl esters derivatives in the hot plate test and Complete Freund's Adjuvant (CFA)-induced inflammation in mice was investigated. The administration of 3,5-dimethyl-1-*H*-1-pyrazole methyl ester (**1**), 3-methyl-5-trichloromethyl-1-*H*-1-pyrazole methyl ester (**2**), 5-dichloromethyl-5-hydroxy-3-methyl-4,5-dihydro-1-*H*-1-pyrazole methyl ester (**4**), 5-(chloro-difluoro-methyl)-5-hydroxy-3-methyl-4,5-dihydro-1-*H*-1-pyrazole methyl ester (**5**) (20 – 1000  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) produced antinociception in the hot-plate test. All compounds, except compound **4**, did not cause motor alterations in the rotarod and open field tests. The compounds **3** and **6** did not produce antinociceptive effects. Since compound **2** presented good antinociceptive activity in the hot-plate test and was devoid of motor effects, we tested whether it caused antinociception in an animal model of chronic pain. Compound **2** (0.6 – 20  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) effectively reduced CFA-induced mechanical allodynia ( $83 \pm 8 \%$ ) and paw edema. The results of the present study suggest that novel 1-*H*-1-pyrazol methyl esters derivatives, particularly compound **2**, have a good analgesic potential against acute and chronic pain.



*Key words:* **Antinociception, pyrazole, hot-plate test, open-field test, non-steroidal anti-inflammatory drugs, intraperitoneal.**

## **1. Introduction**

In pain therapy, there are two main classes of analgesic drugs, namely opiates, which directly abolish the nociceptive transmission in the central nervous system (CNS) by binding to opioid receptors, and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), which reduce prostanoid formation as a result of cyclooxygenase inhibition (Vane, 1971; Aguirre, 1999). NSAIDs are synthetic molecules that usually possess anti-inflammatory, antipyretic and analgesic actions (Borne, 1995). However, side effects ascribed to several NSAIDs, such as gastrointestinal irritation and renal abnormalities function, have arisen in clinical trials and have limited the use this substances, especially in chronic treatment (Fernandez et al., 1995; Lichtenberger et al., 1995). Therefore, it is interesting to obtain new NSAIDs with less side effects. Pyrazole-derived compounds, particularly dipyrone, gained popularity in Europe due to their low cost and good effectiveness as analgesics and antipyretics and because they presented quantitatively less side effects compared with others NSAIDs (Arellano and Sacristan, 1990). However, the side effects associated to the use of these compounds presented were life threatening, in such a way that new compounds (including pyrazole derivatives) with analgesic

and antipyretic activities have been systematically searched in the last years (Ochi et al., 1999; Souza et al., 2002; Godoy et al., 2004; Tabarelli et al., 2004; Zhou et al., 2004; Prokopp et al., 2006). While the mechanisms underlying the analgesic and antipyretic effect (Souza et al., 2001; Souza et al., 2002) of these new pyrazole derivatives are still to be determined, growing evidence suggests the involvement of noradrenergic, serotonergic and opioid systems in such effects (Godoy et al., 2004). Considering that a good analgesic activity was observed for new pyrazole derivatives (Souza et al., 2001; Souza et al., 2002; Godoy et al., 2004) we decided to evaluate whether a new series of 1-*H*-1-pyrazol methyl esters derivatives induce antinociception in an animal model of acute and chronic pain.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Animals**

Three month-old male (acute model) and male and female (chronic model) albino Swiss mice (30-40g) bred in our animal house were used. The animals were housed in groups of 20 to a cage at controlled temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) under a 12 h light/ dark cycle and with standard lab chow and tap water *ad libitum*. The animals were transferred to the experimental room 24 h before the experiments for habituation to the environment and handling. Each animal was used only once. The experiments were carried out in accordance with current guidelines for investigations of experiments in conscious animals approved by the Committee on the Use and Care of Laboratory Animals of our University (process 23081.018371/2006-94).

The number of animals and intensity of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate consistent effects of drug treatments.

## 2.2 Drugs

Tween 80 and CFA were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and dipyrone from Ariston (São Paulo, Brazil). Figure 1 shows the synthesis of 3,5-dimethyl-1*H*-1-pyrazole methyl ester (**1**), 3-methyl-5-trichloromethyl-1*H*-1-pyrazole methyl ester (**2**), 3-methyl-5-trifluoromethyl-1*H*-1-pyrazole methyl ester (**3**), 5-dichloromethyl-5-hydroxy-3-methyl-4,5-dihydro-1*H*-1-pyrazole methyl ester (**4**), 5-(chloro-difluoro-methyl)-5-hydroxy-3-methyl-4,5-dihydro-1*H*-1-pyrazole methyl ester (**5**) and 5-hydroxy-3-methyl-5-pentafluoroethyl-4,5-dihydro-1*H*-1-pyrazole methyl

ester (6), which resulted from cyclocondensation of pentane-2,4-dione (compound 1) or a properly substituted 1-haloalkyl-4-alkoxy-3-alken-2-one (compounds 2-6) with methyl hydrazino carboxylate by microwave induced-techniques (Martins et al., 2006). The 1-pyrazole methyl esters 1-6 were obtained in analytical purity with elemental analysis within about 0.4 % of the theoretical values (C, H, N). Before administration, compounds were suspended in 5% Tween 80 in 0.9% NaCl (vehicle). All other reagents were of analytical grade and were purchased from local suppliers.

### 2.3. Hot-plate test

The hot-plate test was used to measure acute thermal pain according to the method described by Ankier (1974). Adult male mice were placed on a metal plate maintained at  $50 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ . The latency for the nociceptive response (hind paw licking or jumping) was measured with a manual chronometer 15, 30 and 60 min after the injection of vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 10 ml/kg, i.p.), 1-H-1-pyrazol methyl esters (20-1000  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) or dipyrone (1500  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.).

### 2.4. Rotarod and open field tests

The rotarod test was carried out according to Dunham and Miya (1957). Twenty-four hours before the experiments, all animals were trained in the rotarod (3.7cm in diameter, 8 rpm) until they could remain in the apparatus for

60 s without falling. On the day of the experiment, they were injected with vehicle (5% Tween 80 in 0.9% NaCl, 10 ml/kg, i.p.) or with 1-*H*-1-pyrazol methyl esters compounds (20-1000  $\mu\text{mol/kg}$  i.p.) and subjected to the rotarod test 10 minutes thereafter. The number of falls and latency to fall from the apparatus was recorded up to 240 s.

The effect of the compounds on spontaneous locomotor activity and exploratory behaviour was assessed by the open-field test, as previously reported by Tabarelli et al., (2004). The apparatus consisted of a box measuring (28 x 18 x 12 cm) with a floor divided into 15 identical areas. Immediately after rotarod evaluation (17 min after i.p. injection of vehicle or dipyrone or 1-*H*-1-pyrazol methyl esters), each animal was transferred to the apparatus and observed for 5 min. The number of areas crossed with all paws (crossings) and the number of rearing responses were recorded.

## **2.5. Complete Freund's Adjuvant (CFA)-induced inflammation**

To produce a chronic inflammatory response, male and female mice were lightly anaesthetized with halotane and subjected to an intraplantar injection by CFA (20  $\mu\text{l}$ , 1 mg/ml heat-inactivated *Mycobacterium tuberculosis*; Sigma, St. Louis, MO, USA) in the right hindpaw (i.pl.) (Bortalanza et al., 2002). This dose of CFA produced significant hindpaw swelling and allodynia in mice. Paw edema was measured 60, 120, 240 and 360 min after CFA administration by measuring paw thickness with a caliper.

Mechanical allodynia were measured as the withdrawal response frequency to 10 applications of von Frey hairs (0.05g). Mice were placed

individually in clear plexiglas boxes (9 x 7 x 11cm) on elevated wire mesh platforms to allow access to the ventral surface of the hind paws. They were further acclimatized to the testing chambers and the mechanical withdrawal frequency was determined 60, 120, 240 and 360 min after CFA administration.

## **2.6. Statistical analysis**

Data were analysed by one or two way analysis of variance (ANOVA) when appropriate. The number of crossing, rearing, latency for the first fall and number of the falls scores were statistically analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Student-Newman-Keuls (SNK) test. Dose-response curves in the hot-plate test were analyzed by a two-way ANOVA with time treated as a within–subject factor. Post hoc tests (Student-Newman-Keuls test-SNK) were carried out when appropriate. The level of significance was set at  $p < 0.05$  and F values are presented in the text only when  $p < 0.05$ . To verify whether the antinociceptive effect of the tested compounds was dose-dependent, we partitioned the sum of squares into trend components (linear, quadratic or cubic). Total analgesic effect in the hot plate test was expressed as the sum of the latencies obtained 15, 30 and 60 min after drug injection. Efficacy in the hot-plate test was calculated as the percentage of latency increase when compared with control group. Allodynia and paw edema were statistically analyzed by a one-way or a two-way analysis of variance

(ANOVA) followed by the SNK test, depending on the experimental design. All data expressed as mean  $\pm$  S.E.M. and the level of significance was set as  $P < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Effects of the 1-H-1-pyrazol methyl esters on the hot plate

Figure 2 shows the antinociceptive effect of the compounds 1H-1-pyrazol methyl esters **1**, **2**, **4** and **5** (20-1000  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) on the withdrawal latency along time in the hot-plate test. Statistical analysis (two-way ANOVA followed by SNK) revealed a significant effect of treatment with compound **1** (300  $\mu\text{mol/kg}$ ) [ $F(3,36) = 3.35$ ;  $P=0.003$ ], compound **2** (200  $\mu\text{mol/kg}$ ) [ $F(4,88)=5.72$ ;  $P<0.001$ ], compound **4** (1000  $\mu\text{mol/kg}$ ) [ $F(8,104) = 2.05$ ;  $P=0.047$ ] and compound **5** (1000  $\mu\text{mol/kg}$ ) [ $F(3,29) = 6.32$ ;  $P=0.002$ ]. All of these compounds (**1**, **2**, **4** and **5**) presented antinociceptive effect in this test. Compounds 3 and 6 did not alter the withdrawal latency along time in the hot-plate test.

The analysis of pooled latencies (Figure 2B, D, F and H) showed that compounds **1** (300  $\mu\text{mol/kg}$ ), **2** (200  $\mu\text{mol/kg}$ ), **4** (1000  $\mu\text{mol/kg}$ ) and **5** (1000  $\mu\text{mol/kg}$ ) increased latency in  $77 \pm 10\%$ ,  $103 \pm 8\%$ ,  $95 \pm 10\%$  and  $81 \pm 8\%$  when compared to vehicle-treated group, respectively. Statistical analysis (one-way ANOVA) revealed a significant effect of pharmacological treatment with compound **1** [ $F(3,36)=3.35$ ,  $P=0.03$ ], **2**

[F(3,52)=5.68,  $P=0.002$ ], **4** [F(3,42)=4.93,  $P=0.005$ ], and **5** [F(3,29)=6.32,  $P=0.002$ ].

The paw withdrawal latencies increased linearly with the dose of compound **1** [F(1,36)=5.47;  $P=0.025$ ], **2** [F(1,52)=13.51;  $P<0.001$ ], **4** [F(1,42)=14.51;  $P<0.001$ ] and **5** [F(1,29)=17.65;  $P<0.001$ ]. Partition of the total sum of squares into trends revealed a significant quadratic relationship for compound **1** [F(1,36)=4.18;  $P=0.048$ ], since the dose-effect curve tended to an inverted “U” shape.

Figure 3 shows the latencies sum obtained from 15 to 60 minutes after treatments of the compounds **1** (300  $\mu\text{mol/kg}$ ), **2** (200  $\mu\text{mol/kg}$ ), **4** (1000  $\mu\text{mol/kg}$ ) and **5** (1000  $\mu\text{mol/kg}$ ) compared with dipyrone (1500  $\mu\text{mg/kg}$ , i.p.) in the hot-plate test. The antinociceptive effects of the compounds *1H-1-pyrazol* methyl esters seems dipyrone, a pyrazolinic derivative with improved effects.

### **3.2. Effects of 1-*H*-1-pyrazol methyl esters on the rotarod and open field tests**

Treatment with compound **4** (1000  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) decreased the latency of the first fall in the rotarod (Table 1) and compound **2** decreased the number of rearings in the open field test without altering locomotor activity in the open field and rotarod tests. Compounds **1**, **3**, **5** and **6** did not produce any alteration in both tests when compared with control animals (Table 1).



### 3.3. Effects of compound 2 on the chronic pain model

We have further assessed the antinociceptive effect of compound 2 in an animal model of chronic pain, since it presented the highest efficacy in the acute pain model among the tested compounds. Figure 4A and B show the anti-allodynic effect of compound 2 in CFA-induced chronic nociception. Statistical analysis (two-way ANOVA followed by SNK test) showed a significant effect of treatment along time [F (4,88) = 5,72;  $p < 0.001$ ] (Figure 4A). Compound 2 reduced  $83 \pm 8\%$  of the allodynia, when assessed 2 hours after its administration. The antinociceptive effect was observed 1 hour after administration, peaked at 2 hours and lasted up to 6 hours (Figure 4A). Furthermore, compound 2 reduced nociception at all doses tested (Figure 3B).

Compound 2 (20  $\mu\text{mol/kg}$ ) also decreased CFA-induced paw edema along time [F(1,15)=5.83,  $P=0.029$ ; Figure 4C]. In fact, compound 2 reduced paw edema at all doses tested [F(5,45) = 8,48;  $p < 0.001$ ; Figure 4D].

## 4. Discussion

In this study we showed that the compounds 1, 2, 4 and 5 caused antinociception in the hot plate test. Among the significant doses of the compounds tested, all obtained antinociceptive effects when compared with dipyrone, a pirazolylic derivated of the comproved efficacy. The

compound **2** was selected for further investigation because it caused the highest increase of withdrawal latencies. Accordingly, compound **2** significantly reduced CFA-induced mechanical allodynia and paw edema in an animal model of chronic pain. Typical NSAIDs (such as aspirin and indomethacin) are widely used as anti-inflammatory, antipyretic and analgesic drugs. However, side effects, such as gastrointestinal irritation and renal function abnormalities, have arisen in clinical trials and have limited the use of these substances, especially in chronic treatments (Fernandez et al., 1995; Lichtenberger et al., 1995). Therefore, it is interesting from the pharmacological and economical point of view to develop new NSAIDs. Therefore, we tested the antinociceptive potential of six novel 1-H-1-pyrazol methyl esters in animal models of acute and chronic pain. The hot-plate test, first described by Woolfe and MacDonald (1944) is one of the most commonly used tests for nociception in rodents, and is suitable for screening analgesics. It is a simple, fast and affordable test, which is practically not harmful to the animal. Other advantage of the test is that repeated measures can be obtained from the same animal along time after the injection of test substance. This allows inferring about the duration of the antinociceptive effect. Originally, the hot plate temperature was set between 55 and 70° C, and only opioid analgesics, such as morphine and other narcotics, could be easily identified and quantified. Various modifications have been introduced to the method in order to detect the antinociceptive activity of mild analgesics, including the

reduction of the temperature to 50° C (Ankier, 1974). Accordingly, to better assess the antinociceptive effect of the novel 1-H-1-pyrazol methyl esters, the temperature of the hot-plate was set to 50° C in our experiments. The model proved to be adequate, and due to its activity, compound **2** was tested in an animal model of chronic pain. Chronic pain conditions are caused by ongoing disease states or tissue damage that result in sensitization of primary afferent and spinal cord neurons. This sensitization results in an increased sensitivity to both noxious (hyperalgesia) and non-noxious (allodynia) stimulus that are frequently difficult to treat with current pharmacological or surgical approaches (Arner et al., 1998). Compound **2** significantly reduced CFA-induced mechanical allodynia and paw edema, suggesting that it also has anti-inflammatory activity. The antinociceptive effect of compound **2** lasted up to 4 hours. Increased severity of postoperative pain is associated with increased morbidity (Carli and Bennett, 2001) and with increased risk of development of chronic pain (Perkins and Kehlet, 2000). Despite educational, organizational, and pharmacological development, postoperative pain remains poorly treated, with nearly half of patients experiencing severe pain in the postoperative period, and there has been little improvement in this incidence over the last three decades (Apfelbaum et al., 2003). Therefore, is particularly remarkable that one of the tested compounds reduced installed nociception, having a curative effect in a nearly clinical situation. All tested compounds possess a pyrazole ring, a heterocycle containing two

contiguous nitrogen and three carbon atoms, and are substituted at position three with methyl group and at position five with a halohalkyl or methyl moiety. It is interesting that compound **3**, a 5-trifluoromethyl substituted substance, did not have antinociceptive effect in the hot-plate test while their trichloromethylated analogues, compound **2** present antinociceptive effect in the same test. Therefore, the substitution of a 5-trifluoromethyl for a 5-trichloromethyl group at the five position seems to promote antinociceptive activity. These finding suggest that the improvement of lipophilicity of compounds may be linked with the antinociceptive effect. Since the trichloromethylated compound possess added lipophilicity compared to the trifluormethylated compound, this may facilitate the absorption and transportation of the trichloromethylated molecule within biological systems, and improve the overall pharmacokinetic properties leading to an early and more efficient analgesic action (Lin and Jiang, 2000).

The mechanism of action involved in compound **2** antinociceptive effects is still unknown. The MPCA is a compound **2** analogue that induced antinociception through spinal  $\alpha_2$  and 5-HT receptors (Godoy *et al.*, 2004). The exact mechanism of action of compound **2** is currently under investigation. The results of the present study suggest that the novel 1-H-1-pyrazol methyl esters, compound **2**, have a good potential analgesic activity, in acute and chronic pain models and may be useful prototype of mild analgesic drugs.

## 5. References

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

ANKIER, S. New hot plate tests to quantify antinociceptive and narcotic antagonist activities. **European Journal Clinical Pharmacology**, **27**: 1-4, 1974.

APFELBAUM, JL; CHEN, C; MEHTA SS; GAN TJ. Postoperative pain experience: results from a national survey suggest postoperative pain continues to be undermanaged. **Anaesthesiology and Analgesia**, **97**: 534 – 40, 2003.

ARRELLANO, F.; SACRISTAN, S. A. Metamizole: reassessment of its therapeutic role. **European Journal Clinical Pharmacology**, **38** : 617-619, 1990.

ARNER S., MEYERSON B.A. Pain 33, 11 (1988); FIELDS, H.L., ROWBOTHAM, M., BARON, R. **Neurobiology of Disease** **5**, 209, 1998.

BORTALANZA, L B; FERREIRA, J; HESS, S C et al. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. **European Journal Pharmacology**. 453:203-8, 2002.

BORNE, R. F. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: Foye, W. O.; Lemke, T. L., Williams, D. A. (Eds.), **Medicinal Chemistry**. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 535-580, 1995.

CARLI, F; BENNETT, GJ. Pain and postoperative recovery. **Anaesthesiology**; **95** : 573 - 4, 2001.

DUNHAM, N W; MIYA T S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmacists Association** **46** : 208-9, 1957.

FERNANDEZ, A G, SALCEDO, C, PALACIOS, J M. Aspirin, salicylate and gastrointestinal injury. **Nature Medicine** **1**: 602-603, 1995.

GODOY, M C M; FIGHERA, M R; SOUZA, F R; et al. **European Journal Pharmacology** **93** : 496, 2004.

LICHTENBERGER, L M, WANG, Z, ROMERO, J J; et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) associate with zwitterionic phospholipids: insight into the mechanism and reversal of NSAIDs-induced gastrointestinal injury. **Nature Medicine** 1, 154-158, 1995.

Lin, P.; Jiang, J. **Tetrahedron** 56 : 3635-3671, 2000.

MARTINS M A P; BECH, P; MACHADO, P; et al. Microwave-assisted synthesis of novel 5-trichloromethyl-4,5-dihydro-1H-1-pyrazole methyl esters under solvent free conditions. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 17: 408-411, 2006.

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.

PERKINS, FM; KEHLET, H. Chronic pain as an outcome of surgery – a review of predictive factors. **Anaesthesiology** 93: 1123 – 33, 2000.

PROKOPP, C R; RUBIN, M A; SAUZEM, P D; et al. Pyrazolyl-Thiazole derivative causes antinociception in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 39 : 795-799, 2006.

SOUZA, F R; FIGHERA, M R; LIMA, T T F; et al. 3-Methyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-1H-1-pyrazolcarboxamide induces antinociception. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** **68**: 525 - 530, 2001.

SOUZA, F R; SOUZA, V T; RATZLAFF, V; et al. Hypothermic and antipyretic effects of 3-methyl and 3-phenyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl - 4 , 5 - dihydro - 1 H - 1- pyrazolcarboxamide induces antinociception in mice . **European Journal Pharmacology** **451**: 141-147,2002.

TABARELLI, Z; RUBIN, M A.; BERLEZE, D B; et al. Antinociceptive, effect of novel pyrazolines in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** **37**: 1531-1540, 2004.

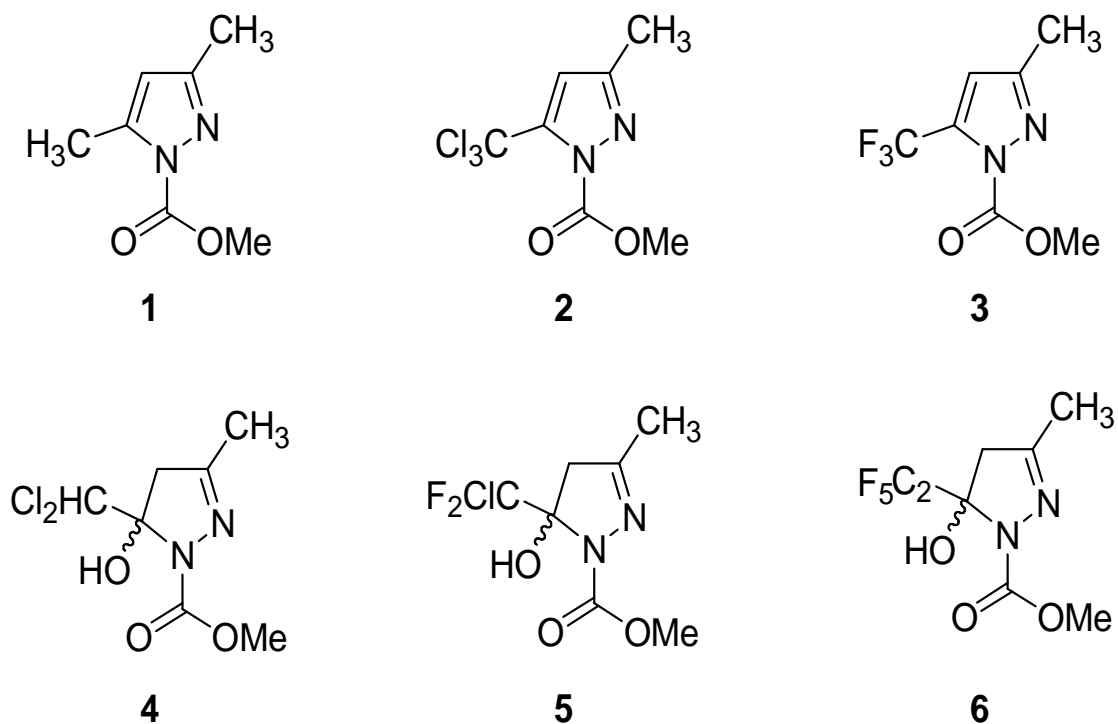
TOMAZETTI, J; ÁVILA, P S; FERREIRA, A P O; et al. Baker yeast – induced fever in young rats: characterization and validation of an animal model for antipyretics screening. **Journal of Neuroscience Methods** **147**: 29-35, 2005.

VANE, J R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biology** **231** : 232 - 235, 1971.

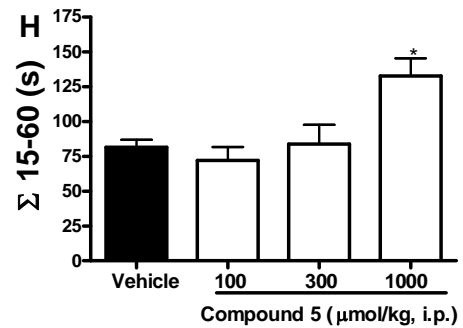
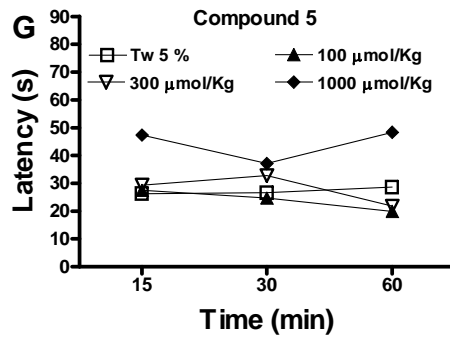
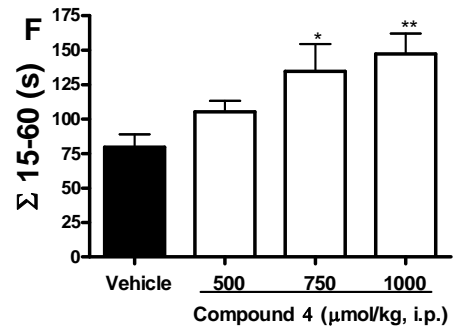
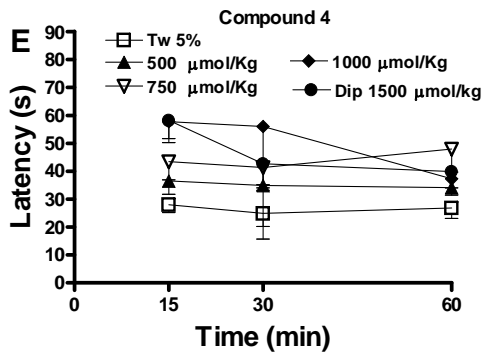
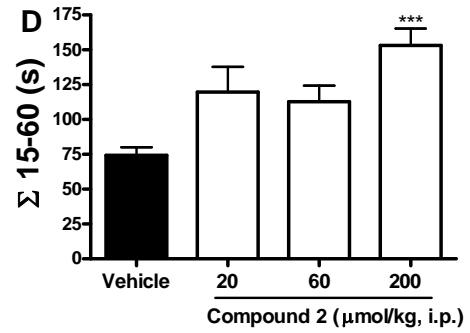
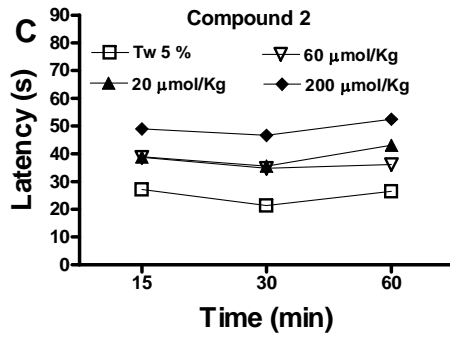
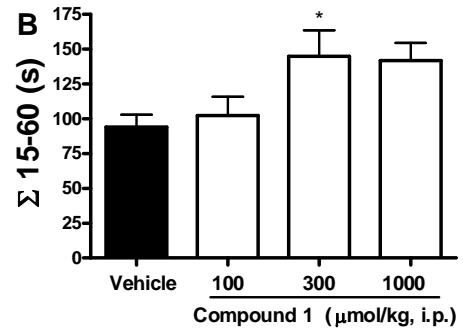
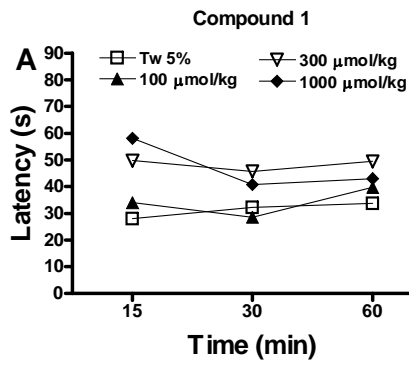


ZHOU, X; REN, A-M; FENG, J-K, LIU; et al. One-and two-photon absorption properties of a series of derived pyrazolines. **Optical Materials**, 2004.

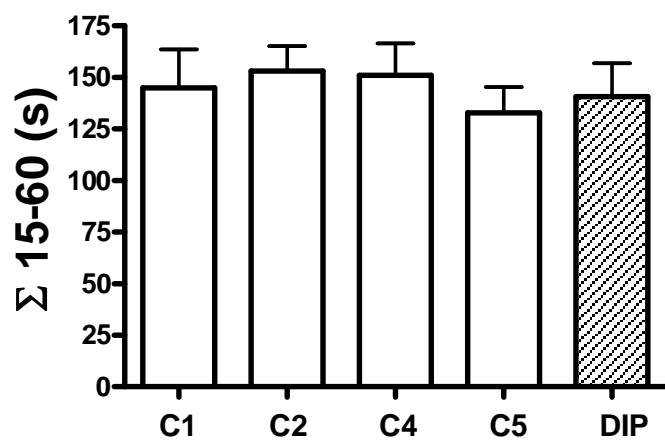
WOOLFE, G; MACDONALD, A D. The evaluation of analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). **Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics 80**: 300-307,1944.



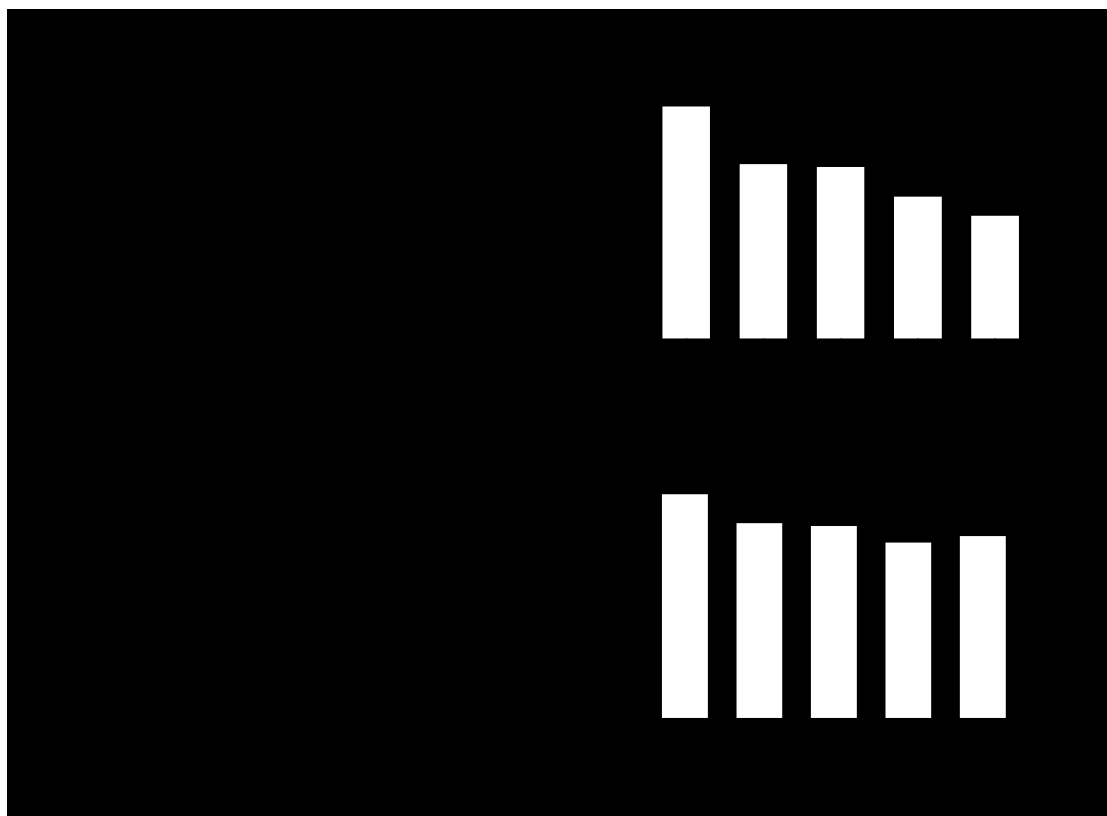
**Figure 1.** Chemical structures of novel 3-methyl-1*H*-1-pyrazol methyl esters 5-substituted. The 3,5-dimethyl-1*H*-1-pyrazole methyl ester (**1**), 3-methyl-5-trichloromethyl-1*H*-1-pyrazole methyl ester (**2**), 3-methyl-5-trifluoromethyl-1*H*-1-pyrazole methyl ester (**3**), 5-dichloromethyl-5-hydroxy-3-methyl-4,5-dihydro-1*H*-1-pyrazole methyl ester (**4**), 5-(chloro-difluoro-methyl)-5-hydroxy-3-methyl-4,5-dihydro-1*H*-1-pyrazole methyl ester (**5**) and 5-hydroxy-3-methyl-5-pentafluoroethyl-4,5-dihydro-1*H*-1-pyrazole methyl ester (**6**)



**Figure 2.** Antinociceptive effects of compounds **1** (A and B), **2** (C and D), **4** (E and F), dipyrone (E and F) and **5** (G and H) in the hot-plate test in mice. The left graphics (A, C, E and G) show the time-courses and the right graphics (B, D, F and H) show the latencies sum obtained from 15 to 60 minutes after treatments ( $\Sigma 15-60$ ). Data are reported as mean  $\pm$  S.E.M., n=11-16 per group. \*p<0.05; \*\*p<0.01; compared with vehicle. Statistical analysis (one way ANOVA and two way ANOVA) followed by SNK test. *F* values are given in the text.



**Figure 3** – Antinociceptive effects of compounds **1** (C1, 300  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), **2** (C2, 200  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), **4** (C4, 1000  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) and **5** (C5, 1000  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) compared with dipyrone (DIP, 1500  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) in the hot-plate test in mice. The graphic show the latencies sum obtained from 15 to 60 minutes after treatments ( $\Sigma 15-60$ ).



**Figure 4** – Effect of the injection with compound **2** (indicated by an arrow) on the mechanical allodynia (A and B) and on paw edema (C and D) induced by CFA in mice. A and C are time course of effects and B and D represent the dose-response curves 2 hours after the injection. n=14-16. Statistical analysis (one way ANOVA and two way ANOVA) followed by SNK test. *F* values are given in the text. \*  $p < 0.01$  compared with vehicle.

**Table 1** – Effect of compounds **1, 2, 3, 4, 5, 6** on the latency for the first fall and number of falls in the rotarod test and the crossing and rearing in the open-field test.

|                                   | Latency for<br>the first fall (s) | Number of fall | Crossing    | Rearing    | n  |
|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------|-------------|------------|----|
| Vehicle                           | 99.8 ± 35.1                       | 1.5 ± 0.5      | 56 ± 14.2   | 19.8 ± 4.7 | 09 |
| Compound <b>1</b><br>300 µmol/kg  | 38.1 ± 7.7                        | 3.5 ± 0.8      | 57.4 ± 6.6  | 19.2 ± 2.4 | 10 |
| Vehicle                           | 151.8 ± 27.4                      | 2.2 ± 0.7      | 42.7 ± 5.8  | 16.5 ± 2.0 | 12 |
| Compound <b>2</b><br>200 µmol/kg  | 93.0 ± 27.6                       | 2.9 ± 0.7      | 26.6 ± 3.0  | 5.0 ± 1.0* | 16 |
| Vehicle                           | 78.0 ± 30.1                       | 1.7 ± 0.5      | 47.1 ± 8.4  | 13.1 ± 2.4 | 09 |
| Compound <b>3</b><br>300 µmol/kg  | 79.2 ± 29.5                       | 2.2 ± 0.6      | 50.0 ± 6.4  | 15.0 ± 2.0 | 10 |
| Vehicle                           | 151.8 ± 27.4                      | 1.3 ± 0.6      | 36.1 ± 5.4  | 13.4 ± 3.0 | 12 |
| Compound <b>4</b><br>1000 µmol/kg | 32.7 ± 8.7*                       | 3.3 ± 0.8      | 72.2 ± 16.6 | 5.0 ± 2.6  | 11 |
| Vehicle                           | 26.0 ± 9.0                        | 3 ± 0.5        | 35.5 ± 4.7  | 10.1 ± 1.3 | 08 |
| Compound <b>5</b><br>1000 µmol/kg | 79.2 ± 26.6                       | 2.6 ± 0.5      | 57.6 ± 6.8  | 7.6 ± 1.3  | 11 |
| Vehicle                           | 81.8 ± 40.4                       | 2.4 ± 0.6      | 39.4 ± 11.5 | 6.4 ± 2.8  | 05 |
| Compound <b>6</b><br>150 µmol/kg  | 152.4 ± 40.3                      | 2.6 ± 1.8      | 48.6 ± 12.2 | 10.4 ± 4.2 | 08 |

Data are expressed as mean ± SEM. Vehicle (10 ml/kg). All compounds were administered i.p. \* p<0.05 compared to respective vehicle.

---

## **VI. DISCUSSÃO**



Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) (como a aspirina e a indometacina) são amplamente usados como drogas antiinflamatórias, antipiréticas e analgésicas. No entanto, o problema dos efeitos colaterais, como irritação gastrintestinal e anormalidades na função renal, tem aparecido na clínica e limitado o uso dessas substâncias especialmente no tratamento da dor crônica (Fernandez et al., 1995; Lichtenberger et al., 1995).

A dipirona é um AINE do grupo dos derivados pirazolínicos que ganhou popularidade por seu baixo custo e baixos efeitos colaterais com melhor tolerabilidade gástrica quando comparado com outros AINEs. No entanto, o desenvolvimento de novos AINEs com essas características tem sido aguardado. Assim, nós testamos o potencial de seis novos compostos 1-H-1-pirazol metil ester em modelos de dor aguda e crônica em camundongos. O teste da placa quente descrito por Woolfe e MacDonald (1944) é um dos testes mais comumente usado para testar nocicepção em roedores, por ser rápido, preciso, simples e com baixo custo, não provocando danos teciduais nos animais. Outra facilidade do teste é que o mesmo animal pode ser usado para medidas repetidas em diferentes tempos após injeção da droga. Originalmente o teste mede a resposta nociceptiva dos camundongos colocados na placa quente com temperatura variando entre 55 a 70° C, onde somente os efeitos analgésicos da morfina e outros analgésicos opióides podem ser facilmente identificados e quantificados. Portanto, nessa temperatura,

analgésicos não-narcóticos não tem nenhum efeito antinociceptivo. Assim, para avaliar os melhores efeitos da dipirona e do potencial analgésico dos novos compostos 1-metil pirazol foi usada temperatura de 50° C para o teste da placa quente. Os compostos 3,5-dimetil-1*H*-1-pirazol metil ester (1), 5-diclorometil-5-hidroxi-3-metil-4,5-dihidro-1*H*-1-pirazol metil ester (4), 5-(cloro-difluor-metil)-5-hidroxi-3-metil-4,5-dihidro-1*H*-1-pirazol metil ester (5) apresentaram eficácia analgésica intermediária, quando comparado com o composto 2. Todos os compostos possuem um anel pirazolinico, que é um heterociclo contendo dois átomos de nitrogênio e três átomos de carbono, com diferentes substituintes nas posições 3 e 5. O composto 3-metil-5-trifluormetil-1*H*-1-pirazol metil ester (3), tendo 5-trifluormetil como substituinte, não apresentou eficácia quando comparado ao análogo 3-metil-5-triclorometil-1*H*-1-pirazol metil ester (2). Esse achado sugere que o aumento da lipofilicidade dos compostos pode estar associado com o efeito antinociceptivo dos compostos, uma vez que os compostos triclorometilados são mais lipofílicos do que os trifluorometilados e possuem mais efeito antinociceptivo. Isto pode estar acontecendo porque os compostos mais lipofílicos são mais facilmente absorvidos e transportados para o interior das células (Lin and Jiang, 2000).

A proposta dos testes de locomoção forçada em cilindro giratório e campo aberto foi a de avaliar a coordenação sensoriomotora dos camundongos. O teste é sensível para detectar danos nos gânglios

basais, no cerebelo e drogas que afetam a função motora. Nenhuma alteração na atividade de locomoção forçada e espontânea foi verificada em ambos os testes para os compostos **1**, **3**, **5** e **6**. O composto **2** diminuiu o número de respostas de levantar (rearings) sem alterar a atividade locomotora e o composto **4** produziu diminuição da latência para a primeira queda no teste da locomoção forçada em cilindro giratório. Esses testes são fundamentais quando se avalia nocicepção, pois o animal precisa estar em seu estado normal em relação à atividade locomotora para não demonstrar sinais falso-positivos no teste de nocicepção.

No teste da placa quente somente os compostos **3** e **6** não apresentaram atividade antinociceptiva. Após avaliação dos compostos no modelo de dor aguda e atividade locomotora, o composto **2** foi escolhido para ser testado em um modelo de dor crônica por apresentar a melhor eficácia antinociceptiva dentre os compostos testados.

Processos dolorosos crônicos são causados por lesões que danificam os neurônios eferentes primários ou medula espinhal. Essas lesões resultam em um aumento da sensibilidade como hiperalgesia ou alodínia, estímulos que são frequentemente difíceis de tratar com fármacos tradicionais ou processos cirúrgicos (Arner *et al.*, 1998).

O composto **2** reduziu a alodínea mecânica induzida por CFA nas quatro doses testadas. O efeito antinociceptivo do composto **2** permaneceu por até 6 horas, sendo que a inibição máxima ocorreu 2h após a administração dos compostos. O composto **2** também apresentou atividade anti-edematogênica nas quatro doses testadas no tempo de 2h e ao longo do tempo para maior dose testada, sugerindo ter atividade antiinflamatória.

O 3-metil-5-hidroxi-5-triclorometil-1H-1-pirazolcarboxiamida (MPCA) induz antinocicepção através de receptores espinhais  $\alpha 2$  e 5-HT. Testes sugerem que o MPCA induz antinocicepção nas fases neurogênica e inflamatória com o teste da formalina e não tem a participação de receptores opióides (Souza *et al.*, 2001; Godoy *et al.*, 2004).

O mecanismo de ação envolvendo o efeito antinociceptivo do composto **2**, que é um análogo do MPCA, ainda é desconhecido e está sob investigação.

Os resultados do presente estudo sugerem que os novos compostos 1-H-1-pirazol metil ester tem um bom potencial de atividade analgésica, principalmente o composto **2**, nos modelos de dor aguda e crônica. O mecanismo de ação e a toxicidade desse composto devem ser analisados em futuras pesquisas. Assim, o composto **2** parece ser um bom protótipo de composto analgésico.

---

## **VII. CONCLUSÕES**

- Os compostos **1, 2, 4 e 5** (20-1000  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) apresentaram efeito antinociceptivo no teste da placa quente e os compostos **3 e 6** não apresentaram efeitos antinociceptivos nesse mesmo teste;
- Os compostos **1, 2, 3, 5 e 6** não alteraram a atividade locomotora forçada dos animais nos testes de locomoção forçada em cilindro giratório, exceto o composto **4**, que diminuiu a latência para primeira queda;
- Os compostos **1, 3, 4, 5 e 6** não alteraram a atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto, exceto o composto **2**, que diminuiu a resposta de levantar dos animais, mas não afetou a atividade locomotora dos mesmos.
- Dentre todos os compostos avaliados, o composto **2** obteve melhor desempenho em modelo de dor aguda;
- O composto **2** apresentou boa atividade anti-alodínica e anti-edematogênica em modelo de dor crônica.

---

## VIII. REFERÊNCIAS

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.

AGNATI, L F; TIENGO, M; FERRAGUTI, F *et al.* Pain, analgesia and stress: an integrated view. **Clinical Journal Pain**, **7** (Suppl): S 23- S 37, 1991.

AKMAN, H; AHSU, F; GULTEKIN, I *et al.* A possible central antinociceptive effect of dipyron in mice. **Pharmacology**, **53**: 71-78, 1996.

APPLETON, I. Non - steroidal anti – inflammatory drugs and pain. **In the Pharmacology of Pain**. Besson: Springer-Verlag, 130: 43-60, 1997.

ARRELLANO, F ; SACRISTAN, S A. Metamizole : reassessment of its therapeutic role. **European Journal Clinical Pharmacology** **38**: 617-619, 1990.

ARNER S, MEYERSON B A. **Pain** **33**: 11, 1988; FIELDS, H.L., ROWBOTHAM, M, BARON, R. **Neurobiology of Disease** **5** : 209, 1998.

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

AXELROD J; BURCH R M; JELSEMA C L. Receptor-mediated activation of Phospholipase A<sub>2</sub> via GTP - binding proteins:



arachidonic acid and its metabolites as second messengers. **Trends in Neuroscience**, **11**: 117-123, 1988.

BAKHLE, Y S; BOTTING, R M. Cyclooxygenase - 2 and its regulation in inflammation. **Mediators of Inflammation**, **5**: 305-323, 1996.

BATTAGLIA, G; RUSTIONI, A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion cells of the rat and monkey. **Journal of Comparative Neurology**, **277** : 302-312, 1988.

BEIRITH, A; SANTOS, A R S; RODRIGUES, A L S et al. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyron in formalin, capsaicin and glutamate tests. **European Journal of Pharmacology** **345 (3)**: 223-245, 1998.

BENEDETTI, C; BUTLER, S H. Systemic analgesics. In: BONICA, K; LOESER, J D; CHAPMAN, C R; FORDYCE, W E. **The Management of Pain** 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; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiology Reviews**, **67**: 67-186, 1987.

BESSON, J M. The neurobiology of pain. **Lancet** **353** : 1610-1615, 1999.

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

BOIE, Y; STOCCO, R; SAWYER, N et al. Molecular cloning and Characterization of the four rat prostaglandin E<sub>2</sub> prostanoid receptor subtypes. **European Journal of Pharmacology**, **340**: 227-241, 1997.

BONACORSO, H; OLIVEIRA, M R; WENTZ, A P et al. Haloacetylated enol ethers: 12[18]. Region specific synthesis and structural determination of stable 5-hydroxy - 1H-pyrazolynes. **Tetrahedron**, **55**: 345 - 352, 1999.

BORNE, R F. Nonsteroidal anti - inflammatory drugs. In: Foye, W O; Lemke, T L, Williams, D A. (Eds.), **Medicinal Chemistry**. Williams and Wilkins, Baltimore, 535-580, 1995.

CALIXTO, J B; CABRINI, D A; FERREIRA, J; CAMPOS, M M. Kinins in pain and inflammation. **Pain** **87**: 15, 2000.

CAMPBELL, W B; HALUSHKA, P V. Lipid-derived autacoids eicosanoids and Platelet - activating factor. In: Hardman, J G; Limbird, L E; Molinoff, P B; Ruddon, R W; Gilman, A G. (Eds.), Goodman and Gilman's **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. McGraw - Hill. New York, 601-616, 1996.

CAMPOS, D I; CUNHA, F Q; FERREIRA, S H. A new mechanism of action of dipyron: blockade of the release of a nociception factor from macrophages. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **21**: 565 - 568, 1998.

- CAMPOS, C ; GREGÓRIO, R ; GARCIA NIETO, R. et al. Regulation of Cyclooxygenase activity by metamizol. **European Journal of Pharmacology**, **378**: 339-347, 1999.
- CARLSSON K H; HELMREICH, J; JURNA, I. Activation of inhibition from the periaqueductal grey matter mediates central analgesic effect of metamizol (dipyrone). **Pain** **27**: 373-390, 1986.
- CARLSSON K H & JURNA, I. The role of descending inhibition in the antinociceptive effects of the pyrazolone derivatives, metamizol (dipyrone) aminophenazone ("Pyramidon"). **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, **335**: 154-159, 1987.
- CARVALHO, M M J. **Dor, um estudo multidisciplinar**. São Paulo: Summus Editorial, 1999.
- CASHMAN, J N. The mechanisms of action of NSAIDS in analgesia. **Drugs**, **52**: 13-23, 1996.
- CASTRO E SILVA, E. Neurotransmissão aminérgica central. In: Silva, P. **Farmacologia**. 5 ed., Rio de Janeiro : Guanabara Koogan S. A., 253 - 268, 1998.
- CAVALCANTI, I L; MADDALENA, M L. **Dor**. Rio de Janeiro: SAERJ, 2003.
- 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. **Internacional Immunopharmacology** **1**: 1397-1406, 2001.

COTRAN, C; KUMAR, T; ROBBINS, A. **Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro : Guanabara-Koogan, 35-71, 1994.

DICKENSON, A H. Central acute pain mechanisms. **Annals of Medicine**, **27**: 223-227, 1995.

DICKENSON, A H. Mechanisms of central hypersensitivity: excitatory amino acid mechanisms and their control. In: DICKENSON, A; BESSON, J-M. **The Pharmacology of Pain**. Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin: Springer-verlag, 1997.

DRAY, A; URBAN, L; DECKENSON, A H. Pharmacology of chronic pain. **Trends in Pharmacological Sciences**, **15**: 190-197, 1994.

DUARTE, I D; SANTOS I R; LORENZETTI, B B et al. Analgesia by direct antagonismo f nociceptor sensitization involves the arginine - nitric oxide-cGMP pathway. **European Journal of Pharmacology**, **217**: 225-227, 1992.

FERREIRA, S H. Entre a compreensão e a confusão: alodínia e hiperalgesia. Dor on line ([www.dol.inf.br/HTML](http://www.dol.inf.br/HTML)), 2002.

FERREIRA, J. Participação de receptores B1 e B2 para as cininas em modelos experimentais de dor crônica, **Tese de Doutorado** em Farmacologia. Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

FERNANDEZ, A G, SALCEDO, C, PALACIOS, J M. Aspirin, salicylate and gastrointestinal injury. **Nature Medicine** **1**: 602-603, 1995.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin 48** : 129-141, 1999.

GANONG, W. The stress response: a dynamic overview. **Hospital Practice, 23**: 155-190, 1988.

GODOY, M C, FIGHERA, M R, SOUZA, FR, et al.  $\alpha$ 2-Adrenoceptores and 5- HT receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazolines, but not of dipyrone. **European Journal of Pharmacology, 496**: 93-97, 2004.

GOEL, A ; MADAN, A K. Structure-activity study on anti-inflammatory pyrazole carboxylic acid hydrazide analogs using molecular connectivity indices. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences, 35**: 510-524, 1995.

GUYTON, E H. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Ed Guanabara-Koogan, p. 551-561, 1997.

GÜRSOY, A, DEMIRAYAK, S; CAPAN, G; et al. Synthesis and Preliminary evaluation of new 5- pyrazolinone derivatives as analgesics agents. **European Journal of Medicinal Chemistry 35**: 359-364, 2000.

GRUBB, B D. Peripheral and central mechanisms of pain. **Brithish Journal of Anaesthesia, 81**: 8-11, 1999.

HAMMOND, D L. Inhibitory Neurotransmitters and Nociception; role of GABA and Glicine. In: Dickenson, A & Besson, J-M. **The pharmacology of pain**. Germany: Ed. Springer, 1997.

HEADLEY, P M., GRILLNER S. Excitatory amino - acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. **Trends in Pharmacological Sciences**, **11**: 205-211, 1990.

HERNANDEZ, N; VANEGAS,H. Antinociception induced by PAG-microinjected dipyron (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.

INSEL, P A. Analgesic - antipyretic and anti- inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: HARDMEN, J G; LIMBIRD, L E; MOLINOFF, P B; RUDDON, R W. **Pharmacological Basis of Therapeutics**. Atlampa: Mc Graw Hill Interamericana, 1996.

JONES, S L. Dypirone into the nucleous raphe magnus inhibits the rat nociceptive tail-flick reflex. **European Journal of Pharmacology**, **318**: 37-40, 1996.

KUO, S; HUANG, L J; NAKAMURA, H. Studies on heterocyclic compounds. 6<sup>1</sup> Synthesis and analgesic and anti- inflammatory activities of 3, 4- dimethylpyrano [2,3-c pyrazole – 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.

LEWIS, J W; CANNON, J T; LIEBESKIND, J C. Opioid and non - opioid mechanisms of stress analgesia. **Science**, **208** : 623-625, 1980.

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

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

LICHTENBERGER, L M, WANG, Z, ROMERO, J J, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) associate with zwitterionic phospholipids: insight into the mechanism and reversal of NSAIDs - induced gastrointestinal injury. **Nature Medicine** **1**, 154-158, 1995.

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

LIN, P.; JIANG, J. **Synthesis of Monotrifluoromethyl-Substituted Saturated CyclesTetrahedron** **56** : 3635-3671, 2000.

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

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

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

LORENZETTI, B B; FERREIRA, S H. Mode of analgesic action of dipyrone: direct antagonismo inflammatory hyperalgesia. **European Journal of Phamacology**, **114**: 375-381, 1985.

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

MCQUEEN, D S. Opioid peptide interactions with respiratory and circulatory systems. **British Medical Bulletin**, **39**: 77-82, 1983.

MERSKY, H; BOGDUK, N. Classification of chronic pain: description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Seattle: IASP Press, 1994.

MILLAN, M J. The induction of pain: an integrative review: **Prog Neurobiol** **57**, 1-164, 1999.

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

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

OCHI, T, FUJII, T. MATSUMORI, K, et al. 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; GOTO, T. The spinal antinociceptive effect of FR 140423 in mice. Involvement of the descending noradrenergic and serotonergic systems. **Life Science**, **69**: 2257-2264, 2001.

OLIVEIRA, L F. In: CAVALCANTE I L; MADDALENA, M L. **Dor**. Rio de Janeiro: FARJ. p. 37-38, 2003.

PROKOPP, C R; RUBIN, M A; SAUZEM, P D; et al. 2-[5- triclórometil- 5- hidroxi-3-fenil-4,5-dihidro – 1 H- pirazol- 1-I L] 4- (4 bromofenil) - 5 metiltiazol (B50) provoca antinociceção em camundongos. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** **39** : 795, 2006.

RAINDSFORD, K D; VELO,G P. Side effects of anti – inflammatory/analgesic drugs. Lancaster: Kluwer academic Publishers, 1992.

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

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

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

SAUZEM, P.D; MACHADO, P; RUBIN, M.A et al. Design and microwave-assisted synthesis of 5-trifluoromethyl- 4, 5- dihidro- 1H-

pyrazoles: novel agents with analgesic and anti-inflammatory properties. **European Journal of Medicinal Chemistry, In Press**, 2007.

SOUZA, F R; FIGHERA, M R; LIMA, T T F; BASTIANI, J; et al. 3-Methyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-1H-1-pyrazolcarboxamide induces antinociception. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** **68**: 525 - 530, 2001.

SOUZA, F R; SOUZA, V T; RATZLAFF, V; 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 in mice. **European Journal Pharmacology** **451**: 141-147,2002.

SOUZA, A H. **Avaliação do Potencial Antinociceptivo e Mecanismo de ação do 2-[5-triclorometil-5-hidroxi-3-fenil-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-IL] 4-(4 bromofenil)-5 metiltiazol (B50) em camundongos.** Dissertação de Mestrado apresentado ao PPGBT/CCNE/UFSM, 2005.

TATSUO, M A; CARVALHO, W M; SILVA, C V. et al. Analgesic and anti-inflammatory effects of dipyron in rat adjuvant arthritis model. **Inflammation**, **18**: 399-405, 1994.

TABARELLI, Z; RUBIN, M A; BERLEZE, D B. et al. Antinociceptive, effect or novel pyrazolines in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **37**: 1531-1540, 2004.

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

TOMAZETTI, J; ÁVILA, P S; FERREIRA, A P O. et al. Baker yeast – induced fever in young rats: characterization and validation of an animal model for antipyretics screening. **Journal of Neuroscience Methods** **147**: 29-35, 2005.

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

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

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

UMPHRED, D A. **Fisioterapia Neurológica**. 2ª ed. Ed. Manole, 1994.

VANE, J R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biology** **231**: 232-235, 1971.

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

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

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.

VELÁZQUEZ, R A; KITTO, K F; LARSON, A A. CP-96, 345, which inhibits [<sup>3</sup>H] substance P binding, selectively inhibits the behavioral response to intrathecally administered NMDA, but not substance P, in the mouse. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **281**: 1231-1237, 1997.

WOOLF, C J; MANNION, R J. Neuropathic pain : aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet** **353**: 1959-1964, 1999.

WOOLFE, G; MACDONALD, A D. The evaluation of analgesic action of Pethidine hydrochloride (demerol). **Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics** **80**: 300-307, 1944.

YAKSH, T L. Spinal systems and pain processing: development of novel Analgesic drugs with mechanistically defined models . **Trends Pharmacology Science**, **20**: 239 - 247, 1999.

ZHOU, X.; REN, A-M.; FENG, J-K., LIU, X-J.; YANG, G-B.; TIAN, W-J.

One-and two-photon absorption properties of a series of derived pyrazolines. **Optical Materials**, 2004.