



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

**ESTUDO DO POTENCIAL ANALGÉSICO E
ANTIINFLAMATÓRIO DO 3-(4-FLUORFENIL)-5-
TRIFLUORMETIL-1H-1-TOSILPIRAZOL EM
MODELOS DE DOR EM CAMUNDONGOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Sara Marchesan de Oliveira

Santa Maria, RS, Brasil, 2009

**ESTUDO DO POTENCIAL ANALGÉSICO E ANTIINFLAMATÓRIO DO
3-(4-FLUORFENIL)-5-TRIFLUORMETIL-1H-1-TOSILPIRAZOL EM
MODELOS DE DOR EM CAMUNDONGOS**

Por

Sara Marchesan de Oliveira

Dissertação apresentada no curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica Toxicológica.**

Orientador Juliano Ferreira

Santa Maria, RS, Brasil

2009

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

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

**ESTUDO DO POTENCIAL ANALGÉSICO E ANTIINFLAMATÓRIO DO
3-(4-FLUORFENIL)-5-TRIFLUORMETIL-1H-1-TOSILPIRAZOL EM
MODELOS DE DOR EM CAMUNDONGOS**

elaborada por

Sara Marchesan de Oliveira

como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Juliano Ferreira
(Orientador)**

Michel Otuki (UEPG)

Mauro S. Oliveira (UFSM)

Santa Maria, 17 de novembro de 2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por mais este ideal alcançado.

Aos meus pais, os maiores incentivadores para que eu seguisse este caminho, os meus mais sinceros e eternos agradecimentos.

Ao meu irmão Matias, pelo incentivo e inestimável torcida para que eu nunca desista de lutar para alcançar meus objetivos. Obrigada pela força.

Ao meu orientador Juliano Ferreira, pelos ensinamentos, atenção e incansável dedicação no desenvolvimento deste trabalho. Pelo profissionalismo demonstrado e de estar sempre disposto a orientar-me, contribuindo assim para o aperfeiçoamento de meus conhecimentos.

Aos meus amigos do “peito”, aqueles que caminham comigo e também aqueles que nem sempre podem estar perto, mas que nem por isso deixam de habitar, por vezes, os meus pensamentos, agradeço pela amizade, companheirismo, dedicação e sinceridade nas palavras.

Muitas são as pessoas as quais gostaria de agradecer. Não cito nomes para não ser injusta, pois como ser humano, posso vir a cometer o erro do esquecimento, mas saibam que sou grata pelo auxílio por vocês prestado, fato que me fez chegar até aqui...

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

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria pela possibilidade de realização deste curso, bem como a CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. O MEU MUITO OBRIGADA.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

ESTUDO DO POTENCIAL ANALGÉSICO E ANTIINFLAMATÓRIO DO 3-(4-FLUORFENIL)-5-TRIFLUORMETIL-1H-1-TOSILPIRAZOL EM MODELOS DE DOR EM CAMUNDONGOS

AUTORA: Sara Marchesan de Oliveira

ORIENTADOR: Juliano Ferreira

LOCAL E DATA DA DEFESA: Santa Maria, 17 de novembro de 2009

A dor é uma das maiores queixas na área médica e a identificação de compostos que possam tratar efetivamente os estados dolorosos, sem induzir efeitos colaterais, permanece um grande desafio na pesquisa biomédica. O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito antinociceptivo de um novo composto 3-(4-fluorfenil)-5-trifluormetil-1H-1-tosilpirazol (composto A) em diferentes modelos de dor em camundongos e comparar os seus efeitos com aqueles produzidos por um pirazol contendo trifluormetil em sua estrutura, o celecoxibe. O composto A ou o celecoxibe foram administrados por via oral (78–780 $\mu\text{mol/kg}$), intratecal (9–22,5 nmol/sítio) ou intracerebroventricular (9–22,5 nmol/sítio). A administração oral do composto A ou do celecoxibe aboliram a alodínia mecânica, mas não o edema, causado pela injeção intraplantar de carragenina. Do mesmo modo, a administração do composto A reduziu a nocicepção, mas não o edema, produzido pela bradicinina ou capsaicina. Entretanto, o composto A administrado por via oral (500 $\mu\text{mol/kg}$) não alterou a nocicepção nem o edema causados pela injeção intraplantar de prostaglandina E_2 (PGE_2) ou glutamato. Já o celecoxibe, reduziu somente a nocicepção induzida pela PGE_2 . Além disso, a administração oral ou intratecal do composto A ou celecoxibe também reduziu a nocicepção induzida por ácido acético. Quando administrados por via intracerebroventricular, somente o celecoxibe foi capaz de reduzir a nocicepção induzida por ácido acético. Finalmente, o composto A ou o celecoxibe não alteraram a nocicepção térmica aguda, a performance motora ou a temperatura corporal dos animais, nem produziram lesões gástricas quando

administrados por via oral. Consequentemente, o composto A parece ser um interessante protótipo para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas.

Palavras- chave: dor, nocicepção, inflamação, edema, pirazóis, analgésicos

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Graduate Course in Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

STUDY OF THE ANALGESIC AND ANTIINFLAMMATORY POTENTIAL OF 3-(4-FLUOROPHENYL)-5-TRIFLUOROMETHYL-1H-1-TOSYLPYRAZOLE IN PAIN MODELS IN MICE

AUTHOR: Sara Marchesan de Oliveira

ADVISOR: Juliano Ferreira

PLACE AND DATE OF THE DEFENSE: Santa Maria, November, 17nd, 2009.

Pain is the most common complaint in the medical field and the identification of compounds that can effectively treat painful states without induction of side-effects remains a major challenge in biomedical research. The aim of the present study was to investigate the antinociceptive effect of a novel compound, 3-(4-fluorophenyl)-5-trifluoromethyl-1H-1-tosylpyrazole (compound A) in several models of pain in mice and compare with those produced by the known trifluoromethyl-containing pyrazole compound celecoxib. Compound A or celecoxib were administrated by oral (78–780 $\mu\text{mol/kg}$), intrathecal (9–22.5 nmol/site) or intracerebroventricular (9–22.5 nmol/site) routes. Oral administration of either compound A or celecoxib abolished the mechanical allodynia, but not the oedema caused by intraplantar injection of carrageenan. Similarly, compound A reduced the overt nociception, but not the oedema, produced by bradykinin or capsaicin. However, compound A (500 $\mu\text{mol/kg}$, orally) did not alter nociception nor oedema caused by intraplantar injection of prostaglandin E_2 or glutamate, whereas celecoxib reduced only the nociception induced by the former. Moreover, oral and intrathecal administration of compound A or celecoxib also reduced the nociception induced by acetic acid. However, only celecoxib reduced the acetic acid-induced nociception when it was injected by the intracerebroventricular route. Finally, neither compound A nor celecoxib was able to produce antinociceptive effect in the tail-flick test or to alter the motor performance and the body temperature. Besides, compound A or celecoxib did not induce gastric

lesion. Thus, compound A seems to be an interesting prototype for the development of novel analgesic drugs.

Key words: pain, nociception, inflammation, edema, pyrazoles, analgesics

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES - Antiinflamatórios não- esteroidais

PGs - Prostaglandinas

PGI₂ - Prostaciclina

ACF- Adjuvante Completo de Freud

BK - Bradicinina

Icv - Intracerebroventricular

It - Intratecal

SNC - Sistema Nervoso Central

COX - Ciclooxigenase

5-HT - 5-hidroxitriptamina

IL- Interleucina

FNT- α - Fator de Necrose Tumoral- α

ATP - Adenosina Trifosfato

FDA - Food and Drug Administration

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ICC - Insuficiência Cardíaca Crônica

Composto A - 3-(4-fluorfenil)-5-trifluormetil-1H-1-tosilpirazol

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

MPF3 - 3-metil-5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-pirazol metil éster

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

MPCI3 - 3-metil-5-triclorometil-4,5-diidro-1H-pirazol metil éster

MPCI4 - 4-metil-5-triclorometil -4,5-diidro-1H-pirazol metil éster

PCPA - para -clorofenilalanina

EPFCA3 - 3-etil-5-hidroxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-1-carboxamidapirazol

MPFCA4 - 4-metil-5-hidroxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-1-carboxamidapirazol

B50 - 2-[5-triclorometil-5-hidroxi-3-fenil-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il]-4-(4-bromofenil)-5-metil tiazol

MPCA - 3-metil-5-hidróxi-5-triclorometil-1-H-pirazolcarboxiamida

ANOVA - Análise de Variância

DRG - Gânglio da raiz dorsal

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1 - Compostos derivados do anel central pirazol	9
Figura 2 - Estrutura química de analgésicos contendo o anel pirazol	12
Figura 3 - Compostos testados pré-clinicamente contendo o anel pirazol.....	15

Artigo

Figura 1 - Molecular structures of celecoxib and 3-(4-fluorophenyl)-5-trifluoromethyl-1H-1-tosylpyrazole (compound A).....	22
Figura 2 - Time course and dose–response curves of the antinociceptive and anti-edematogenic effects produced by oral administration of compound A in carrageenan-induced mechanical allodynia and paw edema in mice.....	23
Figura 3 - Time-course and dose–response curves of the effect produced by the oral administration of celecoxib in carrageenan-induced mechanical allodynia and paw edema in mice.....	24
Figura 4 - Effect produced by oral administration of compound A or celecoxib in capsaicin-induced or bradykinin-induced nociception and paw edema in mice.....	24
Figura 5: Effect of oral administration of compound A or celecoxib in glutamate-induced or prostaglandin E ₂ -induced nociception and paw edema in mice.....	25
Figura 6: Effect of oral, intrathecal or intracerebroventricular administration of compound A, celecoxib or vehicle in acetic acid-induced writhes in mice. Effect of oral administration of compound A, celecoxib or morphine in the tail-flick test in mice.....	25

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
APRESENTAÇÃO	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Dor	5
2.2. Analgésicos	6
2.2.1. Analgésicos Opióides	6
2.2.2. Analgésicos Antiinflamatórios Não - Esteroidais (AINEs).....	7
2.3. AINEs derivados do Pirazol.....	8
2.4. Pirazóis Pré- Clinicamente Testados	12
2.4.1. Pirazóis Sintetizados pelo NUQUIMHE	13
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. Objetivo Geral	17
3.2. Objetivos Específicos	17
4. ARTIGO CIENTÍFICO	18
5. DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÃO	35
7. PERSPECTIVAS.....	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO** está descrita uma revisão sobre os temas trabalhados nesta dissertação.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual encontra-se no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES** encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho.

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

1. INTRODUÇÃO

A dor tem importância clínica fundamental, pois é uma das queixas mais comuns dos pacientes que procuram centros de atendimento médico. No Brasil, e em outros países, de 10% a 50% dos indivíduos procuram auxílio médico por razões relacionadas à dor (Bovin et al., 1994; Teixeira et al., 1995; Teixeira, 2006). Destes, cerca de 50% buscam atendimento devido à quadros de dores agudas e outros 50% para o tratamento de quadros de dor persistente ou crônicas (Turk e Melzack, 1992).

A ocorrência de dor é freqüente em decorrência dos novos hábitos de vida, do decréscimo da tolerância ao sofrimento pelo homem moderno, do prolongamento da vida dos indivíduos em geral e dos doentes com afecções clínicas naturalmente fatais (Pimenta e Teixeira, 2001).

A dor aguda tem função biológica de preservação, da integridade e da defesa corporal, pois denota uma lesão ou iminência de lesão tecidual. Por outro lado, a dor crônica é uma das principais causas de incapacidade e afastamento do trabalho, perda da capacidade de cumprir as tarefas diárias e da qualidade de vida. Apesar dos avanços nas diversas áreas de conhecimentos relacionadas à dor, como epidemiologia, fisiopatologia e terapêuticas, os resultados dos tratamentos bem como a prevenção de queixas recorrentes ainda não são satisfatórios (Teixeira e Figueiró, 2001; Teixeira, 2006).

As duas principais classes de analgésicos utilizadas na terapia atual para o tratamento da dor são os opióides e os antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs), que embora eficazes, apresentam efeitos adversos que tornam o tratamento clínico limitado (Negus et al., 2006; Woodcock et al., 2007). Os opióides estão associados principalmente à constipação, depressão respiratória, dependência, náuseas e vômitos (Schug e Gandham, 2006), enquanto o uso de antiinflamatórios não-esteroidais clássicos pode levar a uma grande variedade de eventos adversos, como úlceras e redução da função plaquetária, aumentando o risco de sangramento (Brune, 2007).

Novos compostos contendo o núcleo pirazol têm sido sintetizados e avaliados biologicamente. Na literatura, verifica-se uma grande variedade de diferentes efeitos biológicos apresentados por pirazóis inéditos e dentre eles destaca-se o celecoxibe (Bonacorso et al., 2006; Funk e FitzGerald, 2007). O celecoxibe é um AINE que possui efeito analgésico, antiinflamatório e antipirético. Ele foi o primeiro inibidor seletivo da ciclooxigenase-2 (COX-2) desenvolvido para este fim e aprovado para o tratamento da artrite reumatóide. Além disso, o celecoxibe tem como vantagem

apresentar melhor tolerância pelo trato gastrointestinal quando comparado com os outros AINEs (Brune e Zeilhofer, 2006).

O controle eficaz e seguro da dor é de fundamental importância para proporcionar o maior grau possível de conforto e satisfação ao paciente. Apesar da existência de vários analgésicos opióides e não-opióides, muitos pacientes ainda sofrem com o controle inadequado da dor. Entretanto, inibir a COX-2 parece ser uma estratégia interessante para o tratamento de dores inflamatórias persistentes, as quais são bastante prevalentes e muitas vezes irresponsivas à terapêutica existente. Assim, torna-se cada vez maior a procura por novos agentes analgésicos que apresentem boa eficácia e poucos efeitos colaterais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Dor

A dor é uma experiência subjetiva, conceituada como “experiência sensorial e emocional desagradável associada à lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal dano” (Merskey e Bogduk, 1994).

Além de uma sensação, a dor também possui um componente emocional. Isto é importante porque as sensações possuem vias neuroanatômicas com receptores específicos que permitem a detecção e medida de um estímulo. Já as emoções incorporam componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais importantes. O componente sensorial da dor é denominado nocicepção. A nocicepção leva à dor, que por sua vez causa o sofrimento. Além disso, a nocicepção não é uma sensação uniforme, sendo formada por várias vias que ligam vários componentes do sistema nervoso central e periférico de maneira hierárquica. Os estímulos nocivos tais como calor, frio, compressão intensa ou algumas substâncias químicas ativam as terminações nervosas livres e periféricas de fibras aferentes sensoriais delgadas do tipo C e A δ , denominadas nociceptores (para revisão ver Dray e Perkins, 1997; Russo e Brose, 1998; Besson, 1999; D'Mello e Dickenson, 2008). A estimulação dos nociceptores leva os estímulos nocivos da periferia ao sistema nervoso central (SNC), onde várias respostas afetivo-emocionais e discriminatório-sensoriais são ativadas (Meyer et al., 1994).

O tipo de dor e o início das respostas protetoras são determinados por muitos fatores que atuam ao nível da medula espinhal e de estruturas cerebrais superiores envolvidas na integração e modulação dos sinais nociceptivos (Russo e Brose, 1998). Existem vários locais onde mediadores químicos que participam da perpetuação da resposta dolorosa são gerados, dentre os quais destacam-se os tecidos lesados e adjacentes, o sistema vascular, as células imunes, os nervos simpáticos e sensoriais. Além disso, existem mecanismos complexos através dos quais um transmissor pode agir, como receptores acoplados a múltiplos mecanismos de transdução intracelular, sendo esses receptores amplamente distribuídos através dos tecidos periféricos ou centrais (Millan, 1999).

Comumente, diferentes manifestações podem ocorrer em pacientes que experimentam a dor, como a hiperalgesia (sensibilidade exacerbada a um estímulo doloroso) e a alodínia (dor em resposta a um estímulo não doloroso) (Besson, 1999).

2.2 – Analgésicos

Alguns dos fármacos analgésicos “clássicos”, notadamente os opiáceos e os antiinflamatórios não-esteroidais têm suas origens em produtos naturais que foram usados por séculos (Dickeson e Kieffer, 2006; McQuay e Moore, 2006). Apesar de as substâncias originais, como a morfina e a aspirina estarem ainda em amplo uso, diversas substâncias sintéticas que agem pelos mesmos mecanismos tem sido sintetizadas (Rainsford, 2007; Kawai et al., 2008).

2.2.1 – Analgésicos Opióides

O termo opióide se aplica a qualquer substância, endógena ou sintética, a qual possui efeitos semelhantes à morfina, e que são bloqueados por antagonistas dos receptores opióides, como a naloxona. O termo mais antigo, opiáceo, é restrito aos fármacos sintéticos semelhantes à morfina com estruturas não-peptídicas. Existem três tipos de receptores opióides, denominados de μ , δ e κ , todos eles são receptores típicos acoplados a proteína G e medeiam os principais efeitos farmacológicos dos opióides (Fries, 1995).

Todos os receptores opióides estão ligados através da proteína G à enzima adenilato ciclase, e causam a ativação da mesma quando ativados. Eles também facilitam a abertura dos canais de potássio (causando hiperpolarização) e inibem a abertura dos canais de cálcio (inibindo a liberação de neurotransmissores) (Fries, 1995; Dickeson e Kieffer, 2006).

Os opióides continuam sendo os analgésicos mais eficazes, estando entre os fármacos mais utilizados para o tratamento de dor intensa. Embora os opióides sejam importantes ferramentas no alívio da dor, sua utilização produz alguns efeitos indesejáveis como depressão respiratória, constipação, náuseas, vômitos, euforia, entre outros (Mercadante, 1999; Dickeson e Kieffer, 2006). Os opióides também podem induzir tolerância e dependência. A tolerância desenvolve-se rapidamente e é verificada quando há necessidade de um aumento nas doses do fármaco para manter o efeito farmacológico desejado. A tolerância aos opióides possui considerável seletividade, no sentido de que o desenvolvimento de tolerância a um opióide não é necessariamente acompanhado por tolerância a outros. Já a dependência é de difícil identificação e é caracterizada por uma clara síndrome de

abstinência, causando irritabilidade, emagrecimento, e vários padrões de comportamento anormal como convulsão e sinais de agressão, quando o fármaco é retirado de uso abruptamente do paciente (Dickenson e Kieffer, 2006).

2.2.2 – Analgésicos Antiinflamatórios Não - Esteroidais (AINEs)

Os AINEs clássicos (como a aspirina, indometacina e ibuprofeno) têm propriedades analgésica, antipirética e antiinflamatória, relacionadas à inibição do sistema enzimático da cicloxigenase (COX) que converte o ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos (Hinz et al., 2007). As prostaglandinas, especialmente a PGE₂, sensibilizam o nociceptor periférico às ações de outros estímulos nocivos (Woolf and Mannion, 1999). Assim, salicilatos e outros antiinflamatórios não-esteróides mostram-se eficazes principalmente contra a dor associada à inflamação ou à lesão tecidual, visto que eles evitam a sensibilização do nociceptor (Brune e Zeilhofer, 2006).

A ação antiinflamatória se refere à redução de algumas PGs (PGE₂ e PGI₂) produzidas via COX-2, as quais conduzem a um aumento da permeabilidade vascular e edema (Rau e Knaus, 2008). Do mesmo modo, o efeito analgésico ocorre através da redução da produção de prostaglandinas pró-nociceptivas (PGE₂ e PGI₂), havendo menor sensibilização de terminações nervosas nociceptivas à vários mediadores inflamatórios, tais como a bradicinina e a 5-hidroxitriptamina (Ferreira, 1972; Besson 1999; Brune e Zeilhofer, 2006). Já o efeito antipirético deve-se em parte à diminuição das prostaglandinas PGE₁ e PGE₂ (produzidas em resposta à pirógenos inflamatórios, como a interleucina-1), que são responsáveis pela elevação do ponto de ajuste hipotalâmico, para o controle da temperatura, causando febre (Insel, 1996; Morimoto et al., 1998).

A ciclooxigenase possui duas isoformas, que são nomeadas de COX-1 e COX-2. A COX-1 é expressa constitutivamente e é distribuída na maioria dos tecidos (Funk et al., 1991; Kargman e Charleson et al., 1996) e acredita-se que medeia vários processos fisiológicos. A segunda isoforma é a COX-2 que, com poucas exceções, não é expressa sob condições fisiológicas e sim encontrada em processos inflamatórios sob a ação de certas citocinas ou lipossacarídeos, entre outros, e sua expressão é prevenida por certos agentes corticosteróides. A COX-2 é produzida localmente em sítios de dano tecidual em resposta a estímulos

inflamatórios (Fu et al., 1990; De Witt, 1991; Kujubu et al., 1991; Xie et al., 1991; Lee et al., 1992; Jones et al., 1993; Hempel et al., 1994). Além do mais, os níveis de COX-2 e prostaglandinas aumentam nos neurônios espinhais em resposta tanto aos estímulos inflamatórios periféricos quanto à ação direta de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e FNT- α) nos neurônios do corno dorsal. Isso pode resultar em hiperalgesia ou alodínia (Woolf e Salter, 2006). Esses sintomas são freqüentes em quadros de dor persistente causada por dano tecidual (Woolf e Mannion, 1999).

Recentemente foi descoberta uma variante do gene da COX-1, descrito como COX-3 (Chandrasekharan et al., 2002). Essa parece ser expressa em altos níveis no sistema nervoso central e pode ser encontrada também no coração e na aorta. Essa enzima é seletivamente inibida por AINEs como paracetamol e dipirona. Essa inibição pode representar um mecanismo primário central pelo qual essas drogas diminuem a dor e possivelmente a febre. A relevância desta isoforma ainda não está clara (Schwaba et al., 2003; Botting e Ayoub, 2005).

Dentre os efeitos adversos causados pelos AINEs clássicos, os mais comuns são dispepsia, náuseas e vômitos como também lesão gástrica em usuários crônicos, com o risco de hemorragia por anulação do efeito protetor da prostaglandinas sobre a mucosa gástrica. Pode haver insuficiência renal reversível (em indivíduos que apresentam vasoconstrição noradrenérgica ou mediada pela angiotensina) causada pela ausência de vasodilatação compensatória mediada pela PGE₂. Reações cutâneas, distúrbios hepáticos e depressão da medula óssea também podem ocorrer (Brune and Beck, 1991).

Embora os AINEs sejam bastante eficazes no tratamento de quadros dolorosos, muitas vezes o seu uso é limitado devido à ocorrência de efeitos adversos. Entretanto, um agente capaz de bloquear a COX-2, tanto periférica quanto central, seria ideal para um tratamento mais eficaz e seguro da dor.

2.3 – AINEs derivados do Pirazol

Os compostos pirazolínicos são drogas de origem sintética que possuem em sua estrutura um anel pirazol, que é um heterociclo com dois átomos de nitrogênio e três átomos de carbono, o qual possui uma dupla ligação entre o nitrogênio 2 e o carbono 3 e outra entre os carbonos 4 e 5 (Figura 1). O anel pirazolina possui

apenas uma dupla ligação, entre os carbonos 3 e 4. A pirazolidina não possui ligações duplas em sua estrutura. Já a 3,5-pirazolidinadiona não possui duplas ligações, mas substituições por oxigênios nos carbonos 3 e 5, enquanto que a 5-pirazolona possui uma dupla ligação entre os oxigênios 3 e 4 e uma substituição por um oxigênio no carbono 5. Esses compostos podem aliar atividade antiinflamatória, analgésica e antipirética (Borne, 1995; Gürsoy et al., 2000). Várias substituições nos diferentes anéis apresentados na Figura 1 podem ser utilizadas para a obtenção de novos derivados pirazolínicos com o potencial terapêutico.

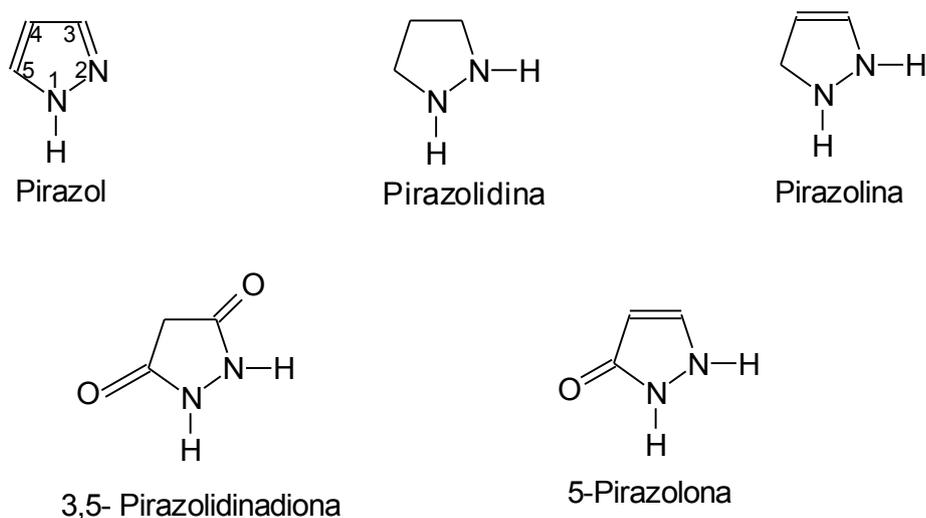


Figura 1 – Compostos derivados do anel central pirazol estando sujeitos a diversas substituições, aliando assim as atividades analgésicas, antipiréticas e antiinflamatórias.

Os derivados pirazolínicos foram descobertos por volta de 1884 pelo químico alemão Ludwig Knorr quando ele tentava sintetizar derivados da quinolona com atividade antipirética e acidentalmente obteve a antipirina (Figura 2), uma pirazolona com atividade analgésica, antipirética e anti-reumática. Mais tarde foi sintetizado um derivado 3-metilamino da antipirina, a aminopirina, um análogo mais potente da antipirina que foi amplamente utilizado como analgésico e antipirético nos Estados Unidos e Europa até que fossem relatados casos de agranulocitose fatal associados ao uso desse composto (Borne, 1995). Devido à ocorrência desse efeito colateral grave, o interesse pela pesquisa de novos compostos pirazolínicos foi pequeno até meados de 1940, quando uma série de pirazolidinodionas mais seguras foram sintetizadas (Insel, 1996). O representante mais importante dessa série é a

fenilbutazona (Figura 2), um potente antiinflamatório. Mesmo potente, é restrita em alguns países ao tratamento de espondilite anquilosante devido aos seus efeitos colaterais (Insel, 1996). Em 1921, o laboratório Hoechst obteve a dipirona (Figura 2), (uma pirazolona), pela substituição de uma das metilas do grupo amino da 5-pirazolona por metilenosulfoxilato de sódio.

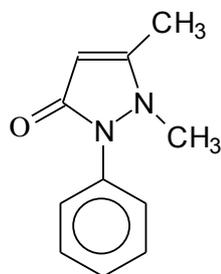
Estudos em animais e humanos revelaram que a dipirona é um antipirético eficaz, apresentando boa atividade analgésica e fraca atividade antiinflamatória (Lecannelier, 1976). Esse produto é também denominado genericamente como metamizol (Mardones, 1976). Há inúmeros estudos sobre a dipirona na literatura, devido à suas diferentes propriedades dos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) clássicos. O mecanismo de ação da dipirona não é completamente conhecido, mas há evidências do envolvimento de inúmeros mecanismos, incluindo a inibição da ciclooxigenase (COX) (Campos et al., 1999; Shimada et al., 1994), da óxido nítrico sintase (Duarte et al., 1992), da liberação de opióides endógenos (Vlaskovska et al., 1989), estimulação do canal de potássio sensível ao ATP (Alves e Duarte, 2002) e antagonismo de receptores do glutamato (Beirith et al., 1998).

Outro derivado pirazolínico estudado mais recentemente e que é usado na clínica é o celecoxibe (Figura 2), um inibidor preferencial da COX-2. Este é um agente anti-artrítico eficiente e demonstra ter eficácia analgésica no alívio da dor, como a que ocorre na dismenorréia ou após cirurgia dentária ou ortopédica. A biodisponibilidade do celecoxibe é de 20-60%, enquanto a sua meia-vida de eliminação é de aproximadamente 10 horas (Brune e Zeilhofer, 2006).

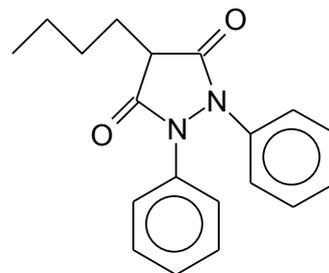
O primeiro AINE a ser vendido no mercado como um inibidor seletivo da COX-2, foi o celecoxibe. Subseqüentemente, vários inibidores seletivos da COX-2, foram desenvolvidos. O rofecoxibe foi desenvolvido como um inibidor altamente potente e seletivo da COX-2 e foi muito utilizado no tratamento da artrite reumatóide, sendo posteriormente retirado do mercado (Dieppe et al., 2004; Funk e FitzGerald, 2007). Após o celecoxibe e o rofecoxibe, vários coxibes foram desenvolvidos com seletividade superior sobre a COX-2, em relação ao celecoxibe. Dentre eles destaca-se valdecoxibe, etoricoxibe, parecoxibe (pró-droga do valdecoxibe) e lumiracoxibe. O valdecoxibe apresentou-se eficaz na terapêutica da artrite reumatóide, osteo-artrite e dor menstrual e foi aprovado para o uso nos Estados Unidos em 2003, sendo posteriormente retirado do mercado. Mais tarde, o Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos e a ANVISA (Agência Nacional de

Vigilância Sanitária), no Brasil, proibiram a venda do etoricoxibe (Funk e FitzGerald, 2007; ANVISA). A retirada destes fármacos do mercado deveu-se principalmente devido ao risco de doenças cardiovasculares, como infarto cardíaco e morte cardíaca repentina (Dieppe et al., 2004; Saraiva, 2007). Da mesma forma, o mais recente coxibe retirado do mercado foi o lumiracoxibe, sendo que sua retirada deveu-se principalmente à sua toxicidade hepática (Rao e Knaus, 2008). Até o presente momento, no entanto, não há evidências que estes sejam efeitos apresentados por todos os coxibes, mas sem dúvida, são efeitos que devem ser levados em consideração.

Mamdani e colaboradores (2004), compararam a relação entre o uso de celecoxibe, rofecoxibe ou AINEs não seletivos, em relação a controles (não usuários de AINEs) e a hospitalização por insuficiência cardíaca crônica (ICC). Pacientes em uso de rofecoxibe e AINEs não seletivos apresentaram risco aumentado de admissão hospitalar por ICC. O celecoxibe não apresentou tal risco. A diferença de toxicidade do celecoxibe em relação aos outros coxibs pode ser explicada pela taxa de seletividade COX-2/ COX-1 desses fármacos (Krötz et al., 2005; Shi e Klotz, 2008). Entre os coxibes, incluindo o rofecoxibe e o valdecoxibe, o celecoxibe tem a menor seletividade sobre a COX-2, enquanto o lumiracoxibe é o mais seletivo. A seletividade do celecoxibe em inibir a COX-2 em relação à COX-1 está entre 5 e 50 vezes em ensaios de sangue total, enquanto rofecoxibe, valdecoxibe, etoricoxibe e lumiracoxibe inibem mais de 50 vezes a COX-2 em relação à COX-1 (Warner et al., 1999; Shi e Klotz, 2008).



Antipirina
(Fenazona)



Fenilbutazona

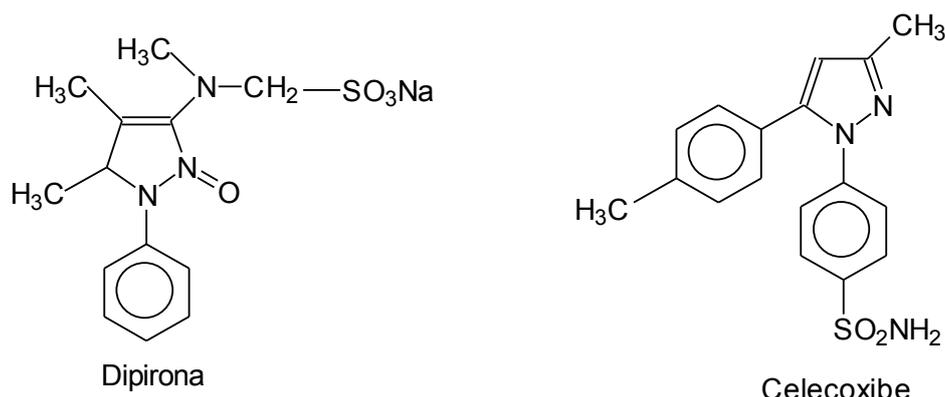


Figura 2 – Estrutura química de analgésicos contendo o anel pirazol

2.4 – Pirazóis Pré- Clinicamente Testados

A busca por novos pirazóis fez com que muitos outros compostos fossem estudados. Em 1959, Oshima e colaboradores estudaram a atividade farmacológica do 1-(4-metoxi-6-metil-2-pirimidinil)-3-metil-5-metoxipirazol e uma série de 43 análogos desse composto. Após a triagem desses compostos em relação ao efeito analgésico, os autores verificaram que seis eram promissores e investigaram o potencial antipirético e antiinflamatório, bem como a toxicidade desses derivados pirazolínicos. Eles concluíram que compostos contendo um grupo metóxi na posição 5 do anel pirazol apresentam ação analgésica, antipirética e antiinflamatória mais pronunciadas do que os compostos análogos com outros substituintes nesta posição (Oshima et al., 1969).

O pirazol FR140423 {3-(difluormetil)-1-(4-metoxifenil)-5-[4-(metilsulfinil) fenil pirazol]} (Figura 3) foi sintetizado em 1997 durante a triagem de novos compostos com potencial antiinflamatório (Tsuji et al., 1997). Esse composto apresenta ação antinociceptiva e antiinflamatória, inibindo seletivamente a COX-2 (Ochi et al., 1999a). Além disso, o FR140423 tem efeito antinociceptivo em um modelo de dor induzida por estímulo térmico (retirada da cauda), sendo este antagonizado por naloxona, um antagonista dos receptores opióides (Ochi et al., 1999b). Os autores consideram que o FR140423 é uma droga que tem por ação dois mecanismos distintos, ou seja, inibição da COX-2 em tecidos inflamados e interação com o sistema opióide (Ochi et al., 1999c).

2.4.1 - Pirazóis Sintetizados pelo NUQUIMHE

Na procura por compostos com bons efeitos farmacológicos e baixo índice de efeitos indesejáveis é que nosso grupo pesquisa em conjunto com o Núcleo de Química de Heterociclos (NUQUIMHE) da UFSM busca desenvolver compostos com atividade antinociceptiva e antiinflamatória. A Figura 3 representa as estruturas químicas de alguns compostos sintetizados pelo NUQUIMHE e testados em nosso laboratório.

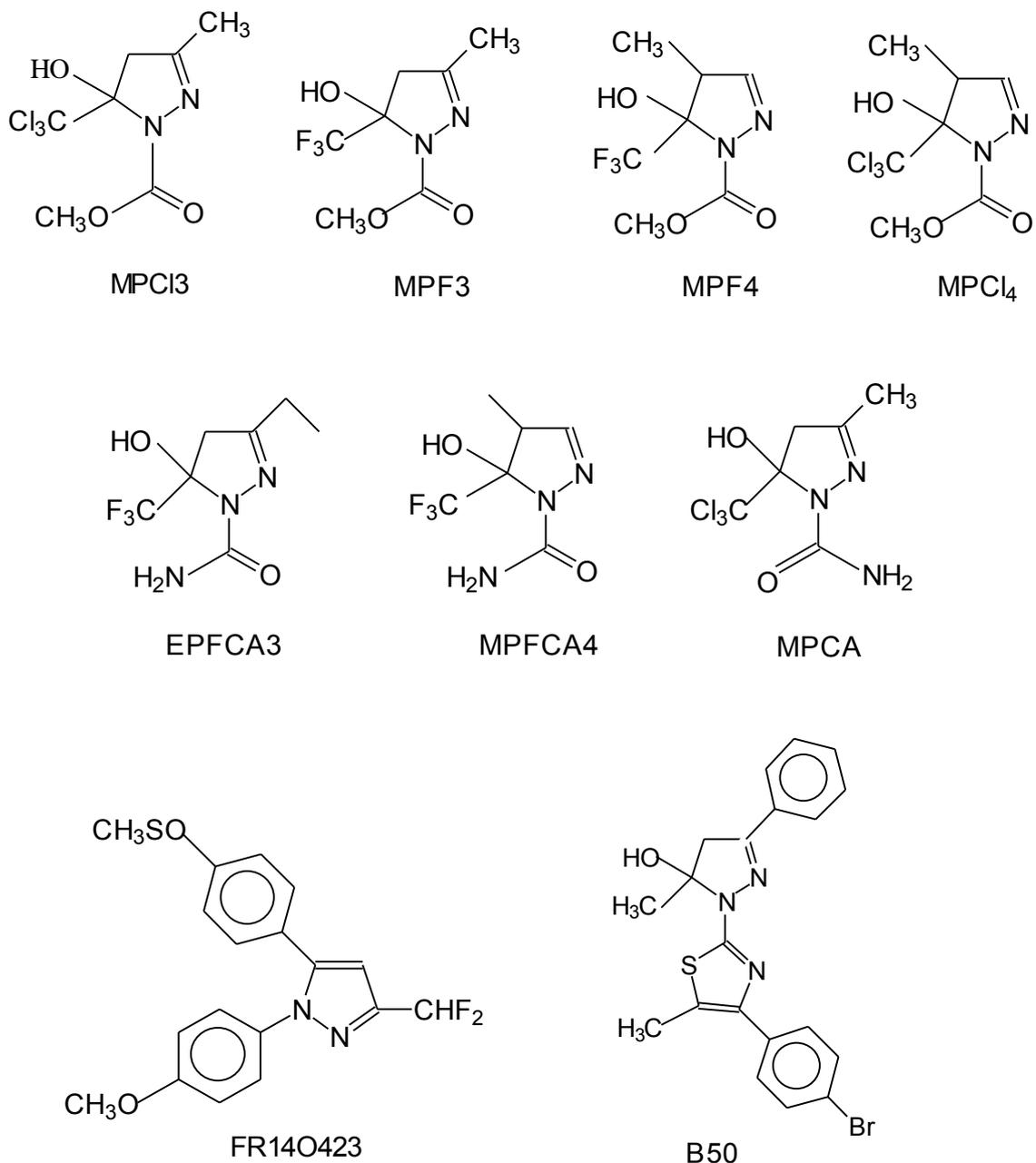


Figura 3 – Novos compostos contendo o anel pirazol, testados pré-clinicamente.

Os seguintes compostos 5-trialometilados-4,5-diidro-1H-pirazol metil ésteres foram testados: 3-metil-5-trifluormetil-(MPF3), 4-metil-5-trifluormetil-(MPF4), 3-metil-5-triclorometil-(MPCI3) e 4-metil-5-triclorometil-(MPCI4). Os compostos MPF3, MPF4, MPCI3 e MPCI4 administrados por via intraperitoneal reduziram as fases nociceptivas, neurogênica e inflamatória, no teste da formalina, e, assim como a dipirona, eles também produziram efeito antinociceptivo dose-dependente no teste da placa quente sem causar alteração da coordenação motora dos animais no teste do cilindro giratório ou da locomoção espontânea no teste do campo aberto. O efeito antinociceptivo do MPF4 foi revertido pelo antagonista do receptor opióide naloxona, mas não pelo antagonista α 2-adrenérgico ioimbina ou pelo tratamento com o inibidor da síntese de serotonina p-clorofenilalanina etil éster (PCPA). O tratamento repetido com o MPF4 não causou tolerância em relação ao seu efeito antinociceptivo, mas reduziu o trânsito gastrointestinal dos camundongos, quando comparado com a morfina (Milano et al., 2008a). Milano e colaboradores (2008b) também verificaram que o pirazol MPF4 administrado por via intraperitoneal e MPF4, dipirona e morfina administrados por via oral produziram forte ação antinociceptiva, mas não anti-edematogênica na alodínia inflamatória causada por adjuvante completo de Freud (ACF), sendo o efeito antinociceptivo do MPF4 revertido com o pré-tratamento dos animais com naloxona ou naltrindol. Além disso, MPF4, dipirona e morfina também produziram efeito anti-alodínico no modelo de dor incisional.

Sauzem e colaboradores (2007) verificaram as propriedades analgésicas e antiinflamatórias de novos 3- ou 4-substituídos-5- trifluormetil-5-hidróxi-4,5-diidro-1H-1-carboxamidpirazóis. A administração subcutânea dos 5-trifluormetil-5-hidroxi-4,5-diidro-1H-1-pirazóis reduziu a nocicepção dos camundongos em modelo de dor aguda, sendo que o composto mais efetivo reduziu o edema de pata causado por carragenina. Na continuidade deste trabalho, Sauzem e colaboradores (2009) avaliaram o efeito antinociceptivo e anti-edematogênico, bem como alguns parâmetros de toxicidade dos derivados pirazólicos 5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-pirazol EPFCA3 e MPFCA4 após administração aguda ou crônica (tratamento por 15 dias) em ratos submetidos a um modelo de artrite induzida por ACF. Foi verificado que a administração subcutânea aguda ou crônica de EPFCA3 e MPFCA4 produziu efeito antinociceptivo, mas não anti-edematogênico, sendo que nenhum sinal de toxicidade foi observado nos animais tratados cronicamente com EPFCA3 ou MPFCA4.

Prokopp e colaboradores (2006) testaram o efeito do pirazol 2-[5-triclorometil-5-hidroxi-3-fenil-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il]-4-(4-bromofenil)-5-metil tiazol (B50), o qual apresentou ação antinociceptiva em modelo de dor aguda (teste das contorções abdominais), a qual foi prevenida pela administração de naloxona. Sugerindo-se assim, a participação do sistema opióide no seu mecanismo de ação.

Também foi testado o derivado pirazolinico 3-metil-5-hidróxi-5-triclorometil-1-H-pirazolcarboxiamida (MPCA) (Figura 3) em modelo de dor aguda. O MPCA reduziu o comportamento nociceptivo da fase neurogênica e inflamatória no teste da formalina. Esta atividade antinociceptiva do MPCA foi prevenida pela pré-administração de naloxona, um antagonista não seletivo dos receptores opióides. No entanto, ainda são necessários mais estudos para elucidar seu mecanismo de ação (Souza et al., 2001).

Os resultados acima descritos sugerem que estes novos pirazóis são bons candidatos para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas para o tratamento da dor.

Recentemente, o NUQUIMHE sintetizou, utilizando o método de substituição régio-específica, uma série de pirazolinil sulfonas contendo trifluormetil na posição 5 e com substituições aril nas posições 1 e 3 no anel central pirazol (Bonacorso et al., 2006), os quais apresentaram discreta atividade antimicrobiana e baixo efeito citotóxico. Classicamente, trifluormetil pirazóis com substituições aril nas posições 1 e 5 no anel central, como o celecoxibe, inibem seletivamente a COX-2 (Penning et al., 1997). Porém, estudos recentes demonstram que compostos com substituições aril nas posições 1 e 3 também podem inibir a COX-2 (Sui et al., 2000). Desta forma, o objetivo do presente estudo foi verificar se uma nova pirazolinil sulfona com substituições aril nas posições 1,3 (3-(4-fluorfenil)-5-trifluormetil-1H-1-tosilpirazol ou composto A) possui atividade antinociceptiva em modelos de dor em camundongos.

3. OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Avaliar o potencial antinociceptivo do novo composto 3-(4-fluorfenil)-5-trifluormetil-1H-1-tosilpirazol (composto A) em camundongos.

3.2 - Objetivos Específicos

- 1 - Avaliar a atividade antinociceptiva e anti-edematogênica do composto A em modelos de dor aguda e persistente;
- 2 - Investigar alguns dos possíveis efeitos adversos do composto A;
- 3 - Comparar os efeitos do composto A com aqueles causados pelo celecoxibe.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados na forma de artigo científico. Os itens Materiais e Métodos, Resultados e Discussão dos Resultados encontram-se no próprio artigo. O artigo está disposto na forma em que foi publicado na revista científica **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**.

Antinociceptive Effect of a Novel Tosylpyrazole Compound in Mice

Oliveira SM, Gewehr C, Dalmolin GD, Cechinel CA, Wentz A, Lourega RV, Sehnem RC, Zanatta N, Martins MA, Rubin MA, Bonacorso HG, Ferreira J

Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 104 (2): 122-9, 2008

Antinociceptive Effect of a Novel Tosylpyrazole Compound in Mice

Sara M. Oliveira¹, Camila Gewehr¹, Gerusa D. Dalmolin¹, Cleber A. Cechinel², Alexandre Wentz², Rogério V. Lourega², Ronan C. Sehnem², Nilo Zanatta², Marcos A. P. Martins², Maribel A. Rubin¹, Helio G. Bonacorso² and Juliano Ferreira¹

¹Laboratory of Neurotoxicity and Psychopharmacology and ²Nuclei of Heterocyclic Chemistry, Department of Chemistry, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

(Received June 6, 2008; Accepted September 1, 2008)

Abstract: Pain is the most common complaint in the medical field and the identification of compounds that can effectively treat painful states without induction of side-effects remains a major challenge in biomedical research. The aim of the present study was to investigate the antinociceptive effect of a novel compound, 3-(4-fluorophenyl)-5-trifluoromethyl-1*H*-1-tosylpyrazole (compound A) in several models of pain in mice and compare with those produced by the known trifluoromethyl-containing pyrazole compound celecoxib. Compound A or celecoxib were administered by oral (78–780 µmol/kg), intrathecal (9–22.5 nmol/site) or intracerebroventricular (9–22.5 nmol/site) routes. Oral administration of either compound A or celecoxib abolished the mechanical allodynia, but not the oedema caused by intraplantar injection of carrageenan. Similarly, compound A reduced the overt nociception, but not the oedema, produced by bradykinin or capsaicin. However, compound A (500 µmol/kg, orally) did not alter nociception nor oedema caused by intraplantar injection of prostaglandin E₂ or glutamate, whereas celecoxib reduced only the nociception induced by the former. Moreover, oral and intrathecal administration of compound A or celecoxib also reduced the nociception induced by acetic acid. However, only celecoxib reduced the acetic acid-induced nociception when it was injected by the intracerebroventricular route. Finally, neither compound A nor celecoxib was able to produce antinociceptive effect in the tail-flick test or to alter the motor performance and the body temperature. Besides, compound A or celecoxib did not induce gastric lesion. Thus, compound A seems to be an interesting prototype for the development of novel analgesic drugs.

Pain is the most common complaint in the medical field; however, the arsenal of effective and safe analgesics is still relatively small [1]. Thus, pain continues to produce severe distress for many patients, dominating and disrupting their quality of life. Many of the currently available clinical treatments are only partially effective and may be accompanied by distressing side-effects or have abuse potential [2].

The identification of compounds that can effectively treat painful states without induction of side-effects remains a major challenge in biomedical research [3]. Pyrazoles and their derivatives are widely known for their excellent effectiveness as analgesics and antipyretics [1]. Dipyron is a well-documented and commercially available example of pyrazole compound with great analgesic action and weak anti-inflammatory effect [1,4]. Another well-known pyrazole compound, celecoxib, was the first designed selective cyclooxygenase-2 inhibitor. Celecoxib is a 1,5-diaryl-substituted trifluoromethyl-pyrazole compound that presents analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects [5–7]. Our group has been investigating the possible pharmacological potential of new molecules that contain a pyrazole scaffold in animal models of inflammation, fever and pain [8–13].

We have recently synthesized some trifluoromethyl-containing pyrazolonyl sulfones with substitutions in 1,3 positions of the central pyrazole ring, using a regioselective substitution method [14]. The aim of the present study was to investigate the antinociceptive effect of one of these compounds [3-(4-fluorophenyl)-5-trifluoromethyl-1*H*-1-tosylpyrazole or compound A], in several models of pain in mice, and compare its effects with those produced by the trifluoromethyl-containing pyrazole compound celecoxib.

Materials and Methods

Drugs. The novel pyrazole [3-(4-fluorophenyl)-5-trifluoromethyl-1*H*-1-tosylpyrazole] (fig. 1), named here compound A, was synthesized according to Bonacorso *et al.* [14]. Analyses of ¹H NMR and ¹³C NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with the assigned structure. Morphine sulphate (Cristália, São Paulo, Brazil), sodium diclofenac, capsaicin, glutamate, bradykinin, prostaglandin E₂ and celecoxib (fig. 1) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) were also used. All compounds (compound A, celecoxib and sodium diclofenac) were diluted in dimethyl sulfoxide (10%), Tween 80 (10%) and saline (0.9% NaCl, 80%) for the oral route or in dimethyl sulfoxide (15%) and saline (85%) for the intrathecal and intracerebroventricular routes. The compounds were administered at the maximal possible dose in accordance with their solubility in vehicle.

Animals. Male and female Swiss mice (25–40 g) were kept in a temperature-controlled room (22 ± 2°) under a 12-hr light:dark cycle. Food and water were freely available, except in gastric lesion assessment where mice were fasted for 18 hr prior to drug exposure. Animals were acclimatized to the laboratory for at least 2 hr before

Authors for correspondence: Juliano Ferreira and Helio G. Bonacorso, Department of Chemistry, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, University City, Camobi 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil (fax +55 55 3220 8978/8756, e-mail ferreiraj99@gmail.com, heliogb@base.ufsm.br).

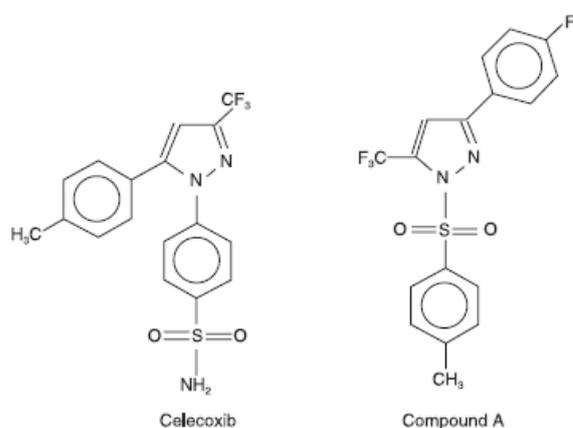


Fig. 1. Molecular structures of celecoxib and 3-(4-fluorophenyl)-5-trifluoromethyl-1*H*-1-tosylpyrazole (compound A).

experiments and were used only once. Data reported in this study were carried out in accordance with current ethical guidelines for the investigation of experimental pain in conscious animals [15]. The number of animals and intensities of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the drug treatments.

Drug treatment. Compound A (100–500 $\mu\text{mol/kg}$), celecoxib (78–780 $\mu\text{mol/kg}$), sodium diclofenac (130 $\mu\text{mol/kg}$), morphine (150 $\mu\text{mol/kg}$) or their vehicles were usually administered orally 30 min. or 2 hr before nociceptive stimuli. In different groups of animals, compound A (9.0 nmol/site) or celecoxib (22.5 nmol/site) were also administered by intrathecal or intracerebroventricular routes 10 min. before nociceptive stimuli. The intrathecal and the intracerebroventricular injections were performed as previously described by Hylden & Wilcox [16] and by Laursen & Belknap [17], respectively.

Carrageenan-induced inflammatory pain. Compound A (100–500 $\mu\text{mol/kg}$), celecoxib (78–780 $\mu\text{mol/kg}$) or vehicle were given orally 30 min. before intraplantar injection of carrageenan (20 μl of a 1.5% suspension in saline) under the skin of the dorsal surface of the right hind paw according to the method of Kassuya *et al.* [18]. Mechanical allodynia (painful response to non-noxious mechanical stimuli) was measured as a nociception index. Allodynia was measured as the withdrawal response frequency to 10 applications of 0.06 g von Frey hair (Stoelting, Chicago, IL, USA), as described previously [19]. Mice were placed individually in clear plexiglass boxes 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 percentage of paw withdrawal was determined before and after intraplantar injection of carrageenan. The variation in the thickness paw was assessed as an oedema index. It was measured with a calliper immediately prior to the injection of carrageenan and thereafter at hourly intervals for 6 hr. Paw oedema was expressed as the increase in paw volume (mm) after carrageenan injection relative to the pre-injection value for each animal.

Nociception and oedema induced by capsaicin, bradykinin, prostaglandin E₂ or glutamate. Compound A (500 $\mu\text{mol/kg}$, orally), celecoxib (260 $\mu\text{mol/kg}$, orally) or vehicle were given orally 2 hr before injection of capsaicin (1 nmol/paw, [20]), glutamate (10 $\mu\text{mol/paw}$, [21]), bradykinin (10 nmol/paw, [20]) or prostaglandin E₂ (3 nmol/paw, [18]) under the skin of the dorsal surface of the right hind paw. The observation period started immediately after the algogen injection and lasted for 5 min. for capsaicin, glutamate and bradykinin or 20 min. for prostaglandin E₂. The overt nociception was evaluated

as the time the animals spent licking or lifting the injected paw using a stopwatch. The paw thickness was assessed as an oedema index and was measured with a calliper immediately prior to the algogen injection and thereafter nociception measurement.

Writhing test. The pretreatments (compound A, celecoxib or vehicle) were carried out 10 min. (for the intrathecal or intracerebroventricular routes) or 2 hr (for the oral route) prior to intraperitoneal injection of acetic acid (0.6%, 10 ml/kg), which caused a typical writhing response. The number of writhing responses was counted for 20 min. by observers who were blinded to the treatment [22].

Tail-flick test. The warm-water tail-flick test was performed using a water bath with temperature at $48 \pm 0.2^\circ$ [23]. Before injection, baseline latency was determined. The test latency after drug treatment was assessed at the appropriate time, and a 25 sec. maximum cut-off time was imposed to prevent tissue damage.

Gastric lesion assessment. To evaluate the gastric tolerability of animals after oral administration of compound A, mice were fasted for 18 hr prior to drug exposure. The animals were killed with CO₂ 4 hr after the administration of the drugs. Stomachs were opened by cutting along the greater curvature, washed with saline at 4 $^\circ$ and immediately the lesion index was assessed with support of a magnifying glass. The quantification of gastric mucosal lesions was carried out by assigning a score according to the number and size of lesions on a scale from 0 up to 6 points [24].

Body temperature measurement. Rectal temperature was measured with a digital thermometer. Baseline temperatures were recorded before the test drug administration and were approximately $37.3 \pm 0.2^\circ$ [25]. The body temperature was recorded again after the administration of each test drug and was used to calculate the change in body temperature: $\Delta T = \text{test temperature} - \text{baseline temperature}$.

Locomotor activity. The effect of the compounds on locomotor performance was tested on the rota-rod apparatus as described previously [10], to distinguish analgesia from drug-induced motor changes. Before the experiments, all animals were trained in the rota-rod (3.7 cm in diameter, 8 r.p.m.) until they could remain in the apparatus for 60 sec. without falling. Each animal was tested in the rota-rod 30, 90, 180 and 360 min. after oral administration of the drugs. The latency to fall and the number of falls from the apparatus were recorded for up to 240 sec.

Data analysis. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean, except ID₅₀ values (i.e. compound dose that reduces nociceptive responses to the order of 50% related to the control value), which are reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits and gastric lesion scores, which are reported as medians followed by their 25th and 75th percentiles. Time-response data from carrageenan and tail-immersion tests were analysed by two-way (time and treatment as factors) analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test. In this case, F values presented in the text are demonstrated by treatment versus time interaction. The F values demonstrated in the text Lesion scores were analysed by Mann–Whitney test. All other data were analysed by one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test. P values less than 0.05 ($P < 0.05$) were considered as indicative of significance and F values are presented in the text only when $P < 0.05$.

Results

Antinociceptive effect of compound A.

Antinociceptive effects of compound A and celecoxib were evaluated initially in the mechanical allodynia and the paw

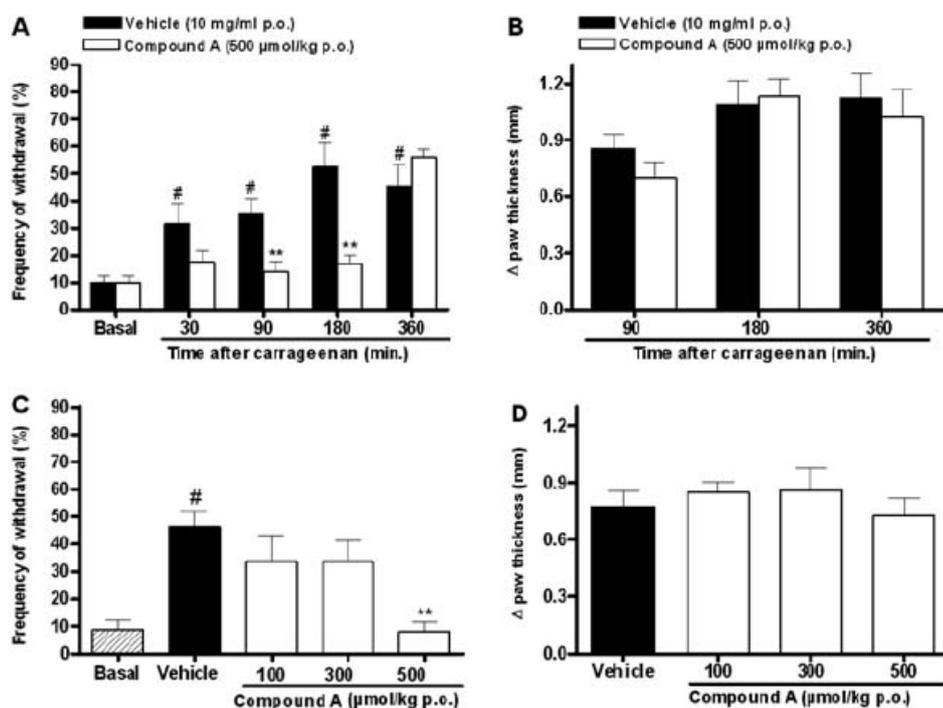


Fig. 2. Time course (A and B) and dose–response curves (C and D) of the antinociceptive and anti-oedematogenic effect produced by oral administration of compound A in carrageenan-induced (300 µg/paw) mechanical allodynia (A and C) and paw oedema (B and D) in mice. Dose–response curves were obtained 90 min. after the injection of carrageenan. Vertical bars represent the mean of 8–12 animals + S.E.M. ** $P < 0.01$ when compared with vehicle group, [#] $P < 0.05$ when compared with baseline (basal) group.

oedema induced by carrageenan. Our results indicate that the oral treatment with either compound A [$F(4,33) = 13.98$, $P < 0.0001$] or celecoxib [$F(4,33) = 8.82$, $P < 0.0001$] reduced mechanical allodynia, with calculated ID_{50} values of 240 (72–802) and 93 (42–206) µmol/kg, respectively (figs 2A and 3A). The maximal inhibition caused by compound A was 100% (with 500 µmol/kg, 90 min. after carrageenan injection) and by celecoxib was 88 ± 9% (with 780 µmol/kg, 180 min. after carrageenan). On the other hand, compound A was not capable of altering carrageenan-induced paw oedema in any dose or time tested (fig. 2B and D). However, celecoxib (780 µmol/kg) partially reduced paw oedema [$F(3,12) = 3.42$, $P < 0.05$] in a dose of 780 µmol/kg with an inhibition of 39 ± 13% (fig. 3D).

When administered orally, compound A (500 µmol/kg) or celecoxib (260 µmol/kg) also reduced the overt nociception, but not the paw oedema, caused by capsaicin (1 nmol/paw) and bradykinin (10 nmol/paw) (fig. 4). The nociception inhibition was 37 ± 8% or 51 ± 6% in capsaicin test [$F(3,43) = 29.27$, $P < 0.0001$] and 38 ± 16% and 77 ± 8% in bradykinin test [$F(3,26) = 13.57$, $P < 0.0001$] for compound A or celecoxib, respectively. On the other hand, neither compound A (500 µmol/kg) nor celecoxib (260 µmol/kg) was able to reduce overt nociception or paw oedema caused by glutamate (10 µmol/paw) (fig. 5A and B), as well as paw oedema induced by prostaglandin E_2 (3 nmol/paw) (fig. 5D). However, celecoxib reduced prostaglandin E_2 -mediated nociception [$F(3,26) = 13.57$, $P < 0.0001$] (fig. 5C).

Next, we assessed the effect of compound A in the writhing test. Compound A (500 µmol/kg) or celecoxib (260 µmol/kg) administered orally in mice reduced the writhing response induced by acetic acid [$F(2,21) = 5.58$, $P < 0.011$], with 52 ± 9% and 42 ± 10% of inhibition, respectively (fig. 6A). When compound A (22.5 nmol/site) or celecoxib (9.0 nmol/site) were administered by the intrathecal route both drugs reduced the writhing response induced by acetic acid [$F(2,20) = 4.73$, $P < 0.021$], with 62 ± 10 and 45 ± 12% of inhibition, respectively (fig. 6B). On the other hand, when drugs were administered through the intracerebroventricular route, only celecoxib was able to reduce by 45 ± 10% the writhing responses induced by acetic acid [$F(2,20) = 3.87$, $P < 0.040$] (fig. 6C).

Figure 6D demonstrates the effect of compound A or celecoxib on a thermal model of pain. Morphine was included in this experiment as an internal standard. The oral treatment with morphine (150 µmol/kg) increased tail withdrawal latencies 30, 90 and 180 min. after its administration [$F(12,30) = 12.97$, $P < 0.001$], while compound A (500 µmol/kg) and celecoxib (260 µmol/kg) did not alter tail flick latencies at any tested time.

Side-effect assessment.

Gastric lesion formation was investigated in mice with a single oral dose of the compounds. Neither compound A (500 µmol/kg) nor celecoxib (260 µmol/kg) produced gastric

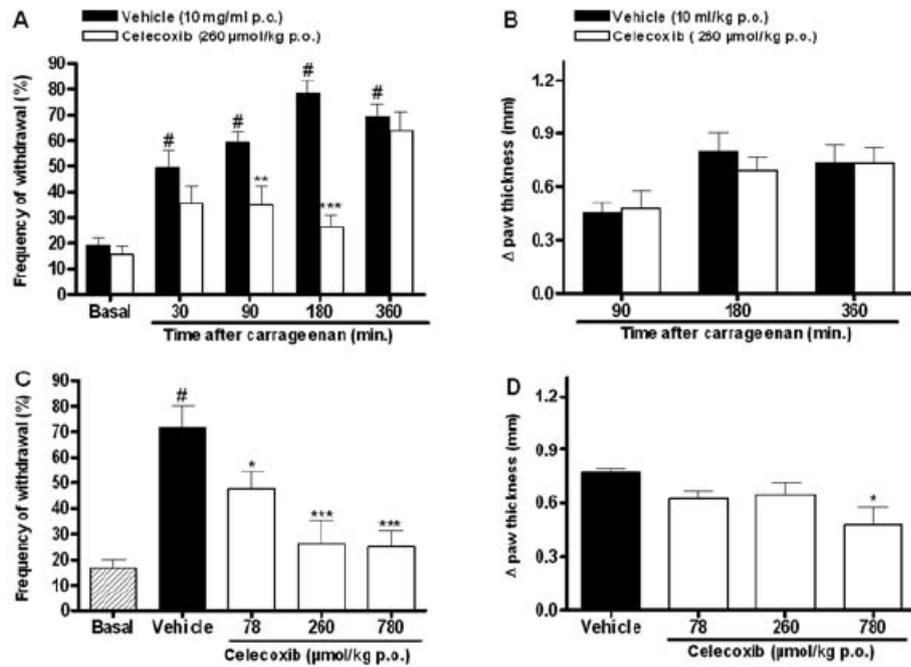


Fig. 3. Time-course (A and B) and dose-response curves (C and D) of the effect produced by the oral administration of celecoxib in carrageenan-induced (300 μ g/paw) mechanical allodynia (A and C) and paw oedema (B and D) in mice. Dose-response curves were obtained 180 min. after the injection of carrageenan. Vertical bars represent the mean of 8–12 animals + S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ when compared with vehicle group, # $P < 0.05$ when compared with baseline (basal) group.

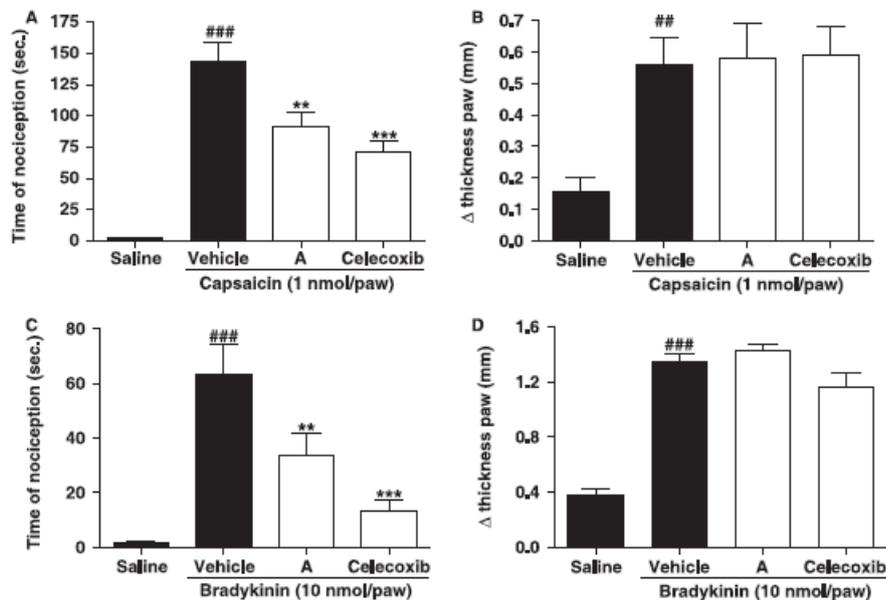


Fig. 4. Effect produced by oral administration of compound A or celecoxib in capsaicin-induced (1 nmol/paw) or bradykinin-induced (10 nmol/paw) nociception (A and C) and paw oedema (B and D) in mice. Capsaicin and bradykinin were injected 2 hr after injection of compounds. Vertical bars represent the mean of 7–12 animals + S.E.M. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ when compared with vehicle group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, when compared with saline group, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test.

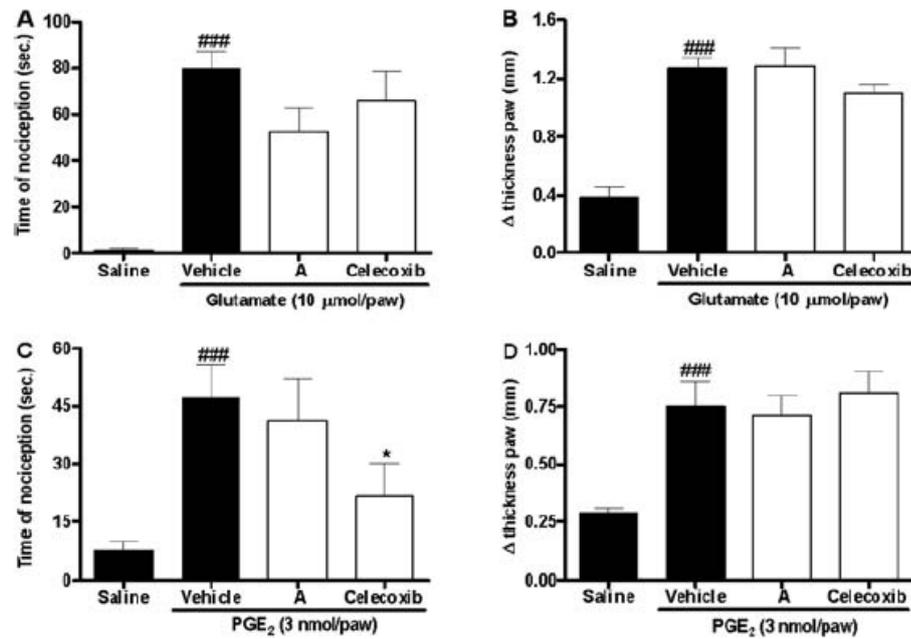


Fig. 5. Effect of oral administration with compound A or celecoxib in glutamate-induced (10 μmol/paw) or prostaglandin E₂-induced (3 nmol/paw) nociception (A and C) and paw oedema (B and D) in mice. Glutamate and prostaglandin E₂ were injected 2 hr after the injection of compounds. Vertical bars represent the mean of 7–12 animals + S.E.M. *P < 0.05 when compared with vehicle group, ^{###}P < 0.001, when compared with saline group, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test.

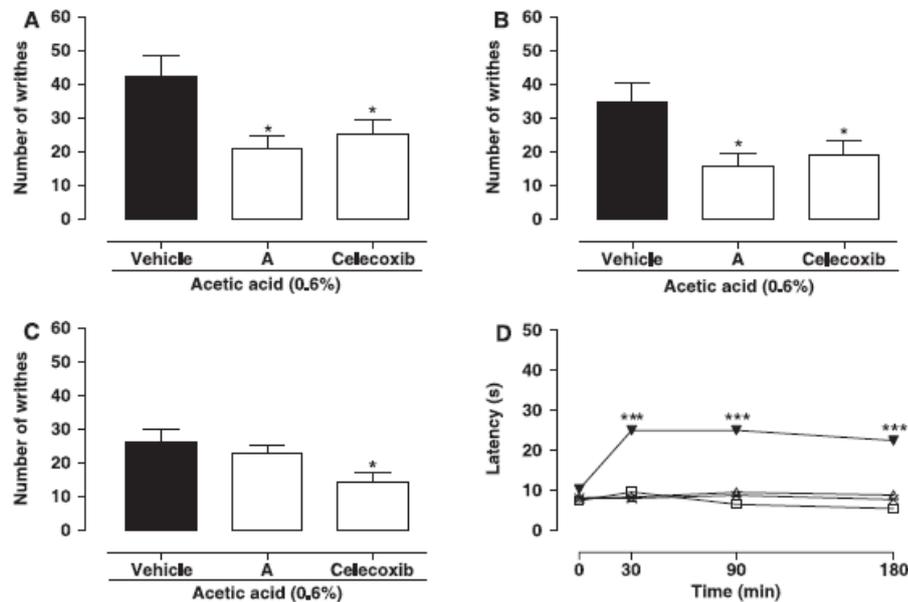


Fig. 6. (A) Effect of oral administration of compound A (500 μmol/kg), celecoxib (260 μmol/kg) or vehicle (10 ml/kg) in acetic acid-induced writhes in mice. (b–c) Effect of intrathecal (B) or intracerebroventricular (C) administration of compound A (22.5 nmol/site), celecoxib (9 nmol/site) or vehicle (5 μl/site) in acetic acid-induced writhes in mice. (D) Effect of oral administration of compound A (500 μmol/kg), celecoxib (260 μmol/kg) or morphine (150 μmol/kg) in the tail-flick test in mice. Data are expressed as the mean ± S.E.M. (N = 7–8). *P < 0.05, one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test (A–C) and ^{***}P < 0.001; two-way ANOVA followed by the Bonferroni test (D).

lesions (the medians (25th–75th percentiles) of lesion scores were 1 (0–1.5), 1 (0–1) and 0.5 (0–1.5) for vehicle, compound A and celecoxib, respectively). In contrast, oral administration of the non-selective cyclooxygenase inhibitor sodium diclofenac (130 $\mu\text{mol/kg}$) induced extensive lesion (lesion scores were 1 (0.5–1) and 9.5 (6.5–12.5) for vehicle and diclofenac, respectively, $P < 0.0022$).

Neither compound A (500 $\mu\text{mol/kg}$) nor celecoxib (260 $\mu\text{mol/kg}$) was able to modify body temperature in mice (data not shown). In the same conditions, morphine-treated (150 $\mu\text{mol/kg}$) mice showed significant [$F(12,30) = 12.97$, $P < 0.001$] hypothermia (decrease in body temperature from $-0.21 \pm 0.14^\circ$ in vehicle-treated animals to $-2.58 \pm 0.49^\circ$ 1 hr after morphine administration).

Neither compound A (500 $\mu\text{mol/kg}$) nor celecoxib (260 $\mu\text{mol/kg}$) altered the fall latency or number of falls in the rota-rod test when compared with the vehicle group, 30, 90, 180 e 360 min. after oral administration (data not shown). In contrast, morphine treatment (150 $\mu\text{mol/kg}$) reduced the locomotor activity of the mice (the number of falls was 2.18 ± 0.60 in vehicle group and 7.27 ± 3.07 in morphine-treated group [$F(2,9) = 4.68$, $P < 0.04$]).

Discussion

There is a wide interest from academic and pharmaceutical companies in developing safer and more effective drugs to treat pain. Our findings show that the novel compound 3-(4-fluorophenyl)-5-trifluoromethyl-1*H*-1-tosylpyrazole (compound A) produced antinociceptive action in models of inflammatory pain, without inducing gastric lesions, hypothermia or motor deficits. Such observations suggest that this compound may be worthy of further exploration as a potential novel analgesic.

Carrageenan-induced inflammation is widely used to investigate the mechanisms of action of steroids and non-steroidal anti-inflammatory drugs, as well as to screen novel anti-inflammatory/analgesic compounds. The acute inflammatory response induced by carrageenan is characterized by mechanical allodynia and thermal hyperalgesia, accompanied by an increase in vascular permeability leading to oedema formation [26]. It has previously been demonstrated that celecoxib reduced the painful hypersensitivity caused by carrageenan in rats [5,27]. Our data confirm these previous findings and demonstrate that orally administered celecoxib also reduced carrageenan-related nociception in mice. Similarly, oral treatment with compound A also reduced inflammatory pain in carrageenan test. When compared with celecoxib, compound A was about 2.5 times less potent than celecoxib, but presented the same time-course for its antinociceptive effect. Carrageenan-induced oedema in mice was not altered by compound A, but was partially reduced by celecoxib. Our data are in accordance with previous findings where orally administered celecoxib partially reduced (about 30–40%) carrageenan-induced oedema in rats [28,29]. Thus, compound A seems not to present the same profile as celecoxib (and other cyclooxygenase-2 inhibitors) in the carrageenan test, since it shows antinociceptive but not

anti-oedematogenic action. However, studies on cyclooxygenase activity must be carried out to elucidate whether compound A is a cyclooxygenase inhibitor.

Carrageenan-induced nociception and oedema are known to be mediated by the release or production of several inflammatory mediators, including prostaglandins, kinins and glutamate [26,30,31]. We examined the effects of celecoxib and compound A in the nociceptive and oedematogenic responses induced by these mediators separately.

As previously described [20,32], we observed that intraplantar injection of bradykinin in mice produces nociceptive and oedematogenic actions. Both compound A and celecoxib reduced the nociception, but not the oedema triggered by bradykinin. We have previously demonstrated that peripheral cyclooxygenase did not mediate bradykinin-induced nociception [20], suggesting that the observed antinociceptive effect caused by systemic treatment with celecoxib is not peripheral. An interesting finding was the lack of anti-oedematogenic effect of celecoxib in bradykinin-induced oedema, at a dose where it reduced the oedema caused by carrageenan. It has been extensively demonstrated that non-selective cyclooxygenase inhibitors reduce the oedema caused by bradykinin [33]. Our results suggest that such effect is mediated by cyclooxygenase-1, but not by cyclooxygenase-2, since celecoxib was devoid of effect in bradykinin-induced oedema. As nociceptive effects mediated by bradykinin are mediated by the stimulation of the vanilloid receptor [20,34], we also examined the effect of compound A and celecoxib on the nociceptive and oedematogenic actions produced by capsaicin, an activator of the vanilloid receptor. Similarly, both compound A and celecoxib reduced the nociception, but not the oedema triggered by capsaicin. Our results in mice differ from those obtained with rats, where celecoxib did not alter capsaicin-induced overt nociception [35]. This discrepancy might be explained not only by different species used, but also by the lower dose of capsaicin used to induce nociception in our study (1 nmol/paw) compared with Joshi *et al.* (8 nmol/paw) [35].

Several studies have demonstrated that glutamate is an important mediator of pain not only in the central nervous system, but also in the periphery [36]. Neither compound A nor celecoxib altered nociception or oedema caused by peripheral injection of glutamate. In other studies, it has been shown that cyclooxygenase is important for glutamate-induced nociception at the spinal cord level [37]. Another important proinflammatory mediator is prostaglandin E_2 . A great number of *in vivo* studies have shown that peripherally injected prostaglandin E_2 produces nociception both in experimental animals and in man [18,34]. We have found that compound A did not alter nociception and oedema caused by prostaglandin E_2 , but celecoxib treatment reduced the nociceptive effect. This result reinforces the idea that the antinociceptive effect produced by cyclooxygenase-2 inhibitors is dependent on the reduction of prostaglandin E_2 levels in the central nervous system, but not necessarily in inflamed tissue [27]. In fact, we observed that the spinal administration of compound A or celecoxib reduced writhing

responses induced by acetic acid, with similar antinociceptive pattern obtained through oral delivery of these compounds. At the supraspinal level, however, only celecoxib was able to reduce the nociception induced by acetic acid. This result supports the idea that prostaglandins mediate nociception at the supraspinal site [38,39] and emphasize the different pattern of action of celecoxib and compound A. These data also suggest that compound A and celecoxib acted, at least in part, in the central nervous system to produce antinociception.

We also investigated the possible antinociceptive effect of compound A in the tail-immersion test. We did not detect any antinociceptive effect produced by orally administered celecoxib or compound A in mice in the tail-flick test. As expected, orally administered morphine was able to produce antinociception in the tail-flick test. In accordance with our data, there is another report showing that celecoxib did not produce antinociceptive action in the tail-flick test when intrathecally injected in rats [40]. Thus, compound A seems only to reduce nociception related with a pathological (inflammatory) process, but not with a physiological (thermal) of noxious stimuli.

The major side-effect of non-steroidal antiinflammatory drug use is gastrointestinal toxicity. The discovery of cyclooxygenase-2 and the development of cyclooxygenase-2 selective inhibitors provided a strategy to circumvent this toxicity that was hailed as a major therapeutic advance [41]. Similarly to celecoxib and differently from sodium diclofenac, compound A did not produce gastric lesions. A major concern in experiments designed to evaluate the analgesic action of new agents is whether pharmacological treatment causes other behavioural alterations, such as altering motor coordination, which could be misinterpreted as analgesia [11]. It is relevant to mention that neither compound A nor celecoxib altered locomotor performance. In the same experimental conditions, we have observed that morphine impaired motor activity. In fact, it has been well demonstrated that opioids produce locomotor alterations in rodents [42]. Finally, we investigated the effect of compound A in body temperature. Literature data have shown that some opioids and cyclooxygenase-3 inhibitors (such as dipyron or acetaminophen) produce hypothermia in rodents [42,43]. Accordingly, we have detected that morphine produced hypothermia in orally treated mice. However, neither compound A nor celecoxib altered body temperature in the treated mice. In agreement, Pessini *et al.* [44] also demonstrated that celecoxib did not change body temperature in rats. Thus, compound A seems not to behave as an opioid nor as a cyclooxygenase-3 inhibitor.

Taken together, our results demonstrate that compound A has antinociceptive action against inflammatory nociception. Moreover, it is devoid of ulcerogenic, hypothermic or hypolocomotor potential. Further studies are necessary to elucidate the exact mechanism of compound A action, but it seems to be different from classical analgesic drugs, such as opioids and selective or non-selective cyclooxygenase inhibitors.

Acknowledgements

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

References

- Williams M, Kowaluk EA, Arneric SP. Emerging molecular approaches to pain therapy. *J Med Chem* 1999;**42**:1481–500.
- Scholz J, Woolf CJ. Can we conquer pain? *Nat Neurosci* 2002;**5**:1062–7.
- Whittle, BJT. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Fundam Clin Pharmacol* 2003;**17**:301–13.
- Brodgen RN. Pyrazolone derivatives. *Drugs* 1986;**32**:60–70.
- Penning TD, Talley JJ, Bertenshaw SR, Carter JS, Collins PW, Docter S *et al.* Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl] benzenesulfonamide (SC-58635, celecoxib). *J Med Chem* 1997;**40**:1347–65.
- Isakson P, Zweifel B, Masferrer J, Koboldt C, Seibert K, Hubbard R *et al.* Specific COX-2 inhibitors: from bench to bedside. In: Vane J, Botting J (eds). *Selective COX-2 Inhibitors: Pharmacology, Clinical Effects and Therapeutic Potential*. Kluwer Academic Publishers and William Harvey Press, London, UK, 1998;127–33.
- Okumura T, Murata Y, Hizue M, Matsuura T, Nagano R, Kanai Y *et al.* Pharmacological separation between peripheral and central functions of cyclooxygenase-2 with CIAA, a novel cyclooxygenase-2 inhibitor. *Eur J Pharmacol* 2006;**539**:125–30.
- De Souza FR, Figuera MR, Lima TTF, Bastiani J, Barcellos IB, Almeida CE *et al.* 3-Methyl 5-hydroxy 5-trichloromethyl-1H-1-pyrazolcarboxamide (MPCA) induces antinociception. *Pharmacol Biochem Behav* 2001;**68**:525–30.
- Souza FR, Souza VT, Ratzlaff V, Borges LP, Oliveira MR, Bonacorso HG *et al.* Hypothermic and antipyretic effects of 3-methyl and 3-phenyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazole-1-carboxamides. *Eur J Pharmacol* 2002;**451**:141–7.
- Godoy MCM, Figuera MR, Flores AE, Rubin MA, Oliveira MR, Zanatta N *et al.* α_2 -Adrenoceptors and 5-HT receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazoles, but not of dipyron. *Eur J Pharmacol* 2004;**496**:93–7.
- Tabarelli Z, Rubin MA, Berlese DB, Sauzem PD, Missio TP, Teixeira MV *et al.* Antinociceptive effect of novel pyrazolines in mice. *Braz J Med Biol Res* 2004;**37**:1531–40.
- Milano J, Oliveira SM, Rossato MF, Sauzem PD, Machado P, Beck P *et al.* Antinociceptive effect of novel trihalomethyl-substituted pyrazoline methyl esters in formalin and hot-plate tests in mice. *Eur J Pharmacol* 2008;**581**:86–96.
- Sauzem PD, Machado P, Rubin MA, da S Sant'anna G, Faber HB, de Souza AH *et al.* Design and microwave-assisted synthesis of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles: novel agents with analgesic and anti-inflammatory properties. *Eur J Med Chem* 2008;**43**:1237–47.
- Bonacorso HG, Wentz A, Lourega VR, Cechinel CA, Moraes TS, Coelho HS *et al.* Trifluoromethyl-containing pyrazolonyl (p-tolyl) sulfones: The synthesis and structure of promising antimicrobial agents. *J Fluor Chem* 2006;**127**:1066–72.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;**16**:109–10.
- Hylden JL, Wilcox GL. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur J Pharmacol* 1980;**67**:313–16.

- 17 Laursen SE, Belknap JK. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. *J Pharmacol Methods* 1986;**16**:355–57.
- 18 Kassuya CAL, Ferreira J, Claudino RF, Calixto JB. Intraplantar PGE2 causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. *Br J Pharmacol* 2007;**150**:727–37.
- 19 Ferreira J, Beirith A, Mori MA, Araujo RC, Bader M, Pesquero JB *et al.* Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B₁ receptor Knock-out mice. *J Neurosci* 2005;**25**:2405–12.
- 20 Ferreira J, Silva GL, Calixto JB. Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B₂ kinin receptor activation in mice. *Br J Pharmacol* 2004;**141**:787–94.
- 21 Beirith A, Santos ARS, Calixto JB. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res* 2002;**924**:219–28.
- 22 Koster R, Anderson M, DeBeer EJ. Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc* 1959;**18**:412.
- 23 Dalmolin GD, Silva CR, Bellé NA, Rubin MA, Mello CF, Calixto JB *et al.* Bradykinin into amygdala induces thermal hyperalgesia in rats. *Neuropeptides* 2007;**41**:263–70.
- 24 Magistretti MJ, Conti M, Cristoni A. Antiulcer activity of an anthocyanidin from *Vaccinium myrtillus*. *Drug Res* 1988;**38**:686–90.
- 25 Otuki MF, Lima FV, Malheiros A, Cechinel-Filho V, Delle Monache F, Yunes RA *et al.* Evaluation of the antinociceptive action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleinii*. *Life Sci* 2001;**69**:2225–36.
- 26 Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautelin L *et al.* Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol* 2004;**142**:331–8.
- 27 Smith CJ, Zhang Y, Koboldt CM, Muhammad J, Zweifel BS, Shaffer A *et al.* Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;**95**:13313–18.
- 28 Abdel-Salam OM, Baiuomy AR, El-Shenawy SM, Arbid MS. The anti-inflammatory effects of the phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline in the rat. *Pharmacol Res* 2005;**47**:331–40.
- 29 Yin LL, Zhang WY, Li MH, Shen JK, Zhu XZ. CC 05, a novel anti-inflammatory compound, exerts its effect by inhibition of cyclooxygenase-2 activity. *Eur J Pharmacol* 2005;**520**:172–8.
- 30 Hargreaves KM, Troullos ES, Dionne RA, Schmidt EA, Schafer SC, Joris JL. Bradykinin is increased during acute and chronic inflammation: therapeutic implications. *Clin Pharmacol Ther* 1988;**44**:613–21.
- 31 Jackson DL, Graff CB, Richardson JD, Hargreaves KM. Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol* 1995;**284**:321–25.
- 32 De Campos RO, Alves RV, Ferreira J, Kyle DJ, Chakravarty S, Mavunkel BJ *et al.* Oral antinociception and oedema inhibition produced by NPC 18884, a non-peptidic bradykinin B₂ receptor antagonist. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999;**360**:278–86.
- 33 Nepll H, Neuhof H, Afflerbach F, Llach Puig Nepll J, Berghöfer A. Bradykinin-induced oedema formation proceeds from B₂ receptor stimulation and is potentiated by concomitantly released prostaglandins. *Acta Physiol Scand* 1991;**142**:141–7.
- 34 Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI *et al.* Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature* 2001;**411**:957–62.
- 35 Joshi SK, Hernandez G, Mikusa JP, Zhu CZ, Zhong C, Salyers A *et al.* Comparison of antinociceptive actions of standard analgesics in attenuating capsaicin and nerve-injury-induced mechanical hypersensitivity. *Neuroscience* 2006;**143**:587–96.
- 36 Neugebauer V. Glutamate receptor ligands. *Handb Exp Pharmacol* 2007;**177**:217–49.
- 37 Svensson CI, Yaksh TL. The spinal phospholipase-cyclooxygenase-prostanoid cascade in nociceptive processing. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002;**42**:553–83.
- 38 Heinricher MM, Martenson ME, Neubert MJ. Prostaglandin E₂ in the midbrain periaqueductal gray produces hyperalgesia and activates pain-modulating circuitry in the rostral ventromedial medulla. *Pain* 2004;**110**:419–26.
- 39 Oliva or Okiva P, Berrino L, de Novellis V, Palazzo E, Marabese I, Siniscalco D *et al.* Role of periaqueductal grey prostaglandin receptors in formalin-induced hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* 2006;**530**:40–7.
- 40 Nishiyama T. Analgesic effects of intrathecally administered celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in the tail flick test and the formalin test in rats. *Acta Anaesthesiol Scand* 2006;**50**:228–33.
- 41 Brune K. Persistence of NSAIDs at effect sites and rapid disappearance from side-effect compartments contributes to tolerability. *Curr Med Res Opin* 2007;**23**:2985–95.
- 42 Hayes AG, Tyers MB. Determination of receptors that mediate opiate side effects in the mouse. *Br J Pharmacol* 1983;**79**:731–6.
- 43 Tomazetti J, Avila DS, Ferreira AP, Martins JS, Souza FR, Royer C *et al.* Baker yeast-induced fever in young rats: characterization and validation of an animal model for antipyretics screening. *J Neurosci Methods* 2005;**147**:29–35.
- 44 Pessini AC, Santos DR, Arantes EC, Souza GE. Mediators involved in the febrile response induced by *Tityus serrulatus* scorpion venom in rats. *Toxicon* 2006;**48**:556–66.

5. DISCUSSÃO

Há um amplo interesse de acadêmicos e companhias farmacêuticas em desenvolver fármacos seguros e mais efetivos para o tratamento da dor. Nossos resultados mostram que o novo composto 3-(4-fluorfenil)-5-trifluormetil-1H-1-tosilpirazol (composto A) produziu ações antinociceptivas em modelos de dor inflamatória, sem induzir lesões gástricas, hipotermia ou déficits motores. Assim, nossos resultados sugerem que este composto pode ser um valioso analgésico.

A inflamação induzida por carragenina tem sido amplamente usada para investigar os mecanismos de ação de AINEs e esteróides, assim como para o triagem de novos compostos anti-inflamatórios/analgésicos. A resposta inflamatória aguda induzida por carragenina é caracterizada pela alodínia mecânica e hiperalgesia térmica, acompanhada por um aumento na permeabilidade vascular, conduzindo à formação do edema (Posadas et al., 2004). Já foi previamente demonstrado que o celecoxibe reduziu a hipersensibilidade dolorosa causada pela carragenina em ratos (Penning et al., 1997; Smith et al., 1998). Nossos dados confirmam os achados prévios e demonstraram que o celecoxibe quando administrado por via oral também reduz a nocicepção relacionada à administração de carragenina em camundongos. Similarmente, o tratamento oral com o composto A também reduziu a dor inflamatória no teste da carragenina. Quando comparado com celecoxibe, o composto A foi aproximadamente 2,5 vezes menos potente do que o celecoxibe, mas apresentou o mesmo decurso temporal para o desenvolvimento do seu efeito antinociceptivo. O edema induzido por carragenina em camundongos não foi alterado pelo composto A, mas foi parcialmente reduzido pelo celecoxibe. Nossos dados estão de acordo com resultados prévios da literatura onde celecoxibe administrado oralmente reduziu parcialmente (aproximadamente 30-40%) o edema induzido por carragenina em ratos (Abdel-Salam et al., 2005; Yin et al., 2005). Por outro lado, o composto A parece não apresentar o mesmo perfil do celecoxibe (e outros inibidos da COX-2) no teste da carragenina, sendo que ele apresenta ação antinociceptiva, mas não anti-edematogênica. Entretanto, estudos sobre a atividade da COX-2 devem ser realizados para elucidar se o composto A é realmente um inibidor da ciclooxigenase.

A nocicepção e o edema induzidos pela carragenina são conhecidos por envolver a liberação ou a produção de vários mediadores inflamatórios, incluindo prostaglandinas, cininas e glutamato (Hargreaves et al., 1988; Jackson et al., 1995; Posadas et al., 2004). Por isso, avaliamos o efeito do celecoxibe e do composto A

na resposta nociceptiva e edematogênica induzida por esses mediadores separadamente.

Como descrito previamente (De Campos et al., 1999; Ferreira et al., 2004), observamos que a injeção intraplantar de bradicinina em camundongos produz nocicepção e edema. Tanto o composto A, quanto o celecoxibe reduziram a nocicepção, mas não o edema induzido pela bradicinina. Demonstramos previamente que a ciclooxigenase periférica não medeia a nocicepção induzida por bradicinina (Ferreira et al., 2004), sugerindo que os efeitos antinociceptivos causados pelo tratamento sistêmico com celecoxibe não é periférico. Um interessante achado foi a falta de efeito anti-edematogênico do celecoxibe no edema induzido pela bradicinina na dose onde ele reduziu o edema causado pela carragenina. Há relatos de que inibidores seletivos da ciclooxigenase reduzem o edema causado pela bradicinina (Neppl et al., 1991). Nossos resultados sugerem que os efeitos observados são causados pela inibição da COX-1, mas não da COX-2 já que o celecoxibe foi isento de efeito no edema induzido pela bradicinina.

Como o efeito nociceptivo mediado pela bradicinina é mediado indiretamente pela estimulação de receptores vanilóides (Chuang et al., 2001; Ferreira et al., 2004), verificamos se o efeito do composto A e do celecoxibe se devem à estimulação de receptores TRPV1, através da administração de capsaicina, um ativador do receptor vanilóide. De maneira similar, ambos o composto A e o celecoxibe, reduziram a nocicepção, mas não o edema resultante da administração da capsaicina. Nossos resultados observados em camundongos diferem daqueles obtidos com ratos, onde o celecoxibe não altera a nocicepção induzida pela capsaicina (Joshi et al., 2006). Esta discrepância pode ser explicada pelas diferentes espécies usadas ou pela dose mais baixa de capsaicina usada para induzir a nocicepção em nosso estudo (1 nmol/pata), comparada com o estudo de Joshi e colaboradores (8 nmol/pata) (Joshi et al., 2006).

Vários estudos demonstram que o glutamato é um importante mediador da dor, não somente no sistema nervoso central, mas também no periférico (Neugebauer et al., 2007). Nem o composto A, nem o celecoxibe alterou a nocicepção ou o edema causados pela injeção periférica de glutamato. Em outros estudos, tem sido mostrado que a COX é importante para a nocicepção induzida por glutamato ao nível da medula espinhal (Svensson et al., 2002). Outro importante mediador pró-inflamatório é a prostaglandina E₂. Um grande número de estudos mostra que a

prostaglandina E₂ injetada perifericamente produz nocicepção tanto em animais experimentais quanto em humanos (Chuang et al., 2001; Kassuya et al., 2007). Observamos que o composto A não altera a nocicepção e edema caudado pela prostaglandina E₂, mas o tratamento com celecoxibe reduz o efeito nociceptivo causado por este prostanóide. Estes resultados reforçam a idéia de que o efeito antinociceptivo produzido pelos inibidores da COX-2 é dependente da redução do nível de PGE₂ no sistema nervoso central, mas não necessariamente no tecido inflamado (Smith et al., 1998). De fato, a ação antinociceptiva do composto A ou celecoxibe quando administrados por via i.t. foi semelhante àqueles obtidos por via oral nas respostas de contorções induzidas por ácido acético. Ao nível supra-espinhal, entretanto, somente celecoxibe foi capaz de reduzir a nocicepção induzida por ácido acético. Estes resultados suportam a idéia que prostaglandinas medeiam a nocicepção ao nível supra-espinhal (Heinricher et al., 2004; Oliva et al., 2006) e enfatizam a diferença padrão da ação do celecoxibe e do composto A. Estes dados também sugerem que o composto A e o celecoxibe agem ao menos em parte, no sistema nervoso central para produzir antinocicepção.

Investigamos também, o possível efeito antinociceptivo do composto A no teste da imersão da cauda. Não foi detectado nenhum efeito antinociceptivo produzido pela administração oral do celecoxibe ou do composto A neste teste. Como esperado, a administração oral de morfina foi capaz de produzir antinocicepção no teste de retirada de cauda. De acordo com Nishiyama e colaboradores (2006) o celecoxibe não produz ação antinociceptiva no teste de retirada de cauda, quando injetado intratecalmente em ratos. Conseqüentemente o composto A parece somente reduzir a nocicepção relacionada com um processo patológico (inflamação), mas não com um estímulo nocivo fisiológico (térmico).

O maior efeito adverso local dos AINEs é a toxicidade gastrointestinal. A descoberta da COX-2 e o desenvolvimento de inibidores seletivos desta, conduz a uma estratégia para evitar esta toxicidade, sendo considerada como grande avanço terapêutico (Brune, 2007). De maneira similar ao celecoxibe e diferentemente do diclofenaco de sódio, o composto A não produz lesões gástricas. Um maior interesse em experimentos designados para avaliar a ação analgésica de novos agentes é se o tratamento farmacológico causa outras alterações comportamentais, assim como a alteração da coordenação motora, que poderia ser falsamente interpretada como analgesia (Tabarelli et al., 2004). É relevante mencionar que nem o composto A,

nem o celecoxibe alteram a performance motora. Nas mesmas condições experimentais, nós temos observado que a morfina enfraquece a atividade motora. De fato, tem sido demonstrado que opióides produzem alterações motoras em roedores (Tomazetti et al., 2005). Finalmente, investigamos o efeito do composto A na temperatura corporal. Dados da literatura têm mostrado que alguns opióides e inibidores da COX-3 (assim como dipirona e acetaminofeno) produzem hipotermia em roedores (Hayes et al., 1983; Tomazetti et al., 2005). Em concordância, detectamos que a morfina produziu hipotermia em camundongos tratados por via oral. Entretanto, nem o composto A, nem o celecoxibe alteraram a temperatura corporal de camundongos tratados. De acordo, Pessini e colaboradores (2006) também demonstraram que celecoxibe não muda a temperatura corporal em ratos. Consequentemente, o composto A parece não comporta-se como um opióide ou como um inibidor da COX-3.

Dados prévios realizados em nosso laboratório, também realizados em camundongos, demonstram efeitos antinociceptivos do composto A nos modelos de dor incisional e neuropática (dados não publicados). Estes dados sugerem mais uma vez que o composto A é um interessante protótipo de analgésico.

Inibidores muito seletivos para a COX-2, embora apresentem reduzida toxicidade gastrointestinal (GI) podem ser prejudiciais sobre o sistema cardiovascular. Isto deve-se possivelmente pela distribuição homogênea dos inibidores por todo o corpo (quando o ideal seria seu direcionamento para o tecido inflamado e para o SNC) e inibição da COX-2 na camada endotelial dos vasos sanguíneos (Brune e Fürst, 2007). A COX-2 está associada com a modulação da resposta vascular, devido principalmente à produção de PGI_2 nas células endoteliais, a qual produz vasodilatação e inibição da agregação plaquetária. Entretanto, o TXA_2 sintetizado em plaquetas, principalmente através da atividade da COX-1, causa agregação plaquetária e vasoconstrição. Assim, inibidores COX-2 suprimem a síntese de PGI_2 , sem inibição concomitante da produção de TXA_2 . Com este desequilíbrio na produção de TXA_2 e PGI_2 , explica-se o aumento nos eventos cardiovasculares (Graham et al., 2005; Salinas et al., 2007). Assim, iremos verificar na continuidade do nosso estudo a ação do composto A sobre estes parâmetros. Além disso, iremos verificar o índice de seletividade do composto A sobre a inibição da COX-1 e da COX-2 in vitro e a capacidade deste composto em reduzir os níveis periféricos e central de prostanoídes em processos dolorosos.

Em conjunto, nossos resultados demonstram que o composto A tem ação antinociceptiva em modelos de dor inflamatória. Além disso, ele é isento de efeitos ulcerogênicos, hipotérmicos ou hipolocomotor. Entretanto, estudos são necessários para elucidar o mecanismo exato de ação do composto A, pois ele parece ser diferente de drogas analgésicas clássicas, assim como opióides e inibidores não seletivos da COX.

6. CONCLUSÃO

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

- O derivado pirazolínico composto A apresenta efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção aguda e persistente em camundongos.
- O composto A não foi efetivo em reduzir o edema de pata causado por carragenina, do mesmo modo que não causou efeito antinociceptivo no teste térmico de imersão da cauda.
- A atividade antinociceptiva do composto A não está relacionada com o efeito inespecífico sobre a atividade locomotora. Além disso, não houve alteração significativa na temperatura corporal nem o aparecimento de lesão gástrica dos animais após a administração do composto A.

7. PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos nesta dissertação, os conhecimentos relacionados ao pirazol testado podem ser aprofundados ainda mais, seguindo as perspectivas abaixo:

- Medida da atividade da COX *in vitro*, para verificar a possível inibição e seletividade do composto A sobre as enzimas COX-1 e COX-2;
- Dosagem da prostaglandina E₂ *ex vivo* para verificar se o efeito antinociceptivo obtido *in vivo* está relacionado com a redução da produção de prostanóides nos tecidos;
- Verificar o efeito do composto A sobre a agregação plaquetária e a função endotelial;
- Avaliar o efeito do composto A em outros modelos de dor clinicamente relevantes (modelo de artrite, dor pós-cirúrgica e neuropatia).

8. REFERÊNCIAS

ABDEL-SALAM, O.M. et al. **The anti-inflammatory effects of the phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline in the rat.** Pharmacol. Res. 47:331-40, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA/Brasil). Informe SNVS/Anvisa/GFARM nº 8, de 17 de agosto de 2007. http://www.anvisa.gov.br/farmacovigilancia/informes/2007/informe_8.htm.

ALVES, P.D.; DUARTE, D.G. **Involvement of ATP-sensitive K⁺ channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyron.** Eur. J. Pharmacol. 444:47-52, 2002.

BEIRITH, A. et al. **Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyron in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action.** Eur. J. Pharmacol. 345:233-45, 1998.

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

BONACORSO, H.G. et al. **Trifluoromethyl-containing pyrazolinyl (p-tolyl) sulfones: The synthesis and structure of promising antimicrobial agents.** J. Fluor. Chem. 127:1066–72, 2006.

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

BOVIN, G.; SCHRADER, H.; SAND, T. **Neck Pain in the General Population.** Spine 19:1307-1309, 1994.

BOTTING, R.; AYOUB, S.S. **COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen.** Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 72:85–87, 2005.

BRUNE, K.; BECK, W.S. **Towards safer nonsteroidal anti-inflammatory drugs.** Agents Actions Suppl. 32:13-25, 1991.

BRUNE, K.; ZEILHOFER, H.U. **Antipyretic analgesics: basic aspects.** In: McMahon SB and Klotzenburg M. (Eds). Wall and Melzack's. Textbook of pain. 5a Ed. Endinburg: Churchill Livingstone, cap. 29, p. 459-469, 2006.

- BRUNE, K. **Persistence of NSAIDs at effect sites and rapid disappearance from side-effect compartments contributes to tolerability.** *Curr. Med. Res. Opin.* 23:2985-95, 2007.
- BRUNE, K.; FURST, D.E. **Combining enzyme specificity and tissue selectivity of cyclooxygenase inhibitors: towards better tolerability?** *Rheumatology* 46:911–919, 2007.
- CAMPOS, C. et al. **Regulation of cyclooxygenase activity by metamizol.** *Eur. J. Pharmacol.* 378:339-347, 1999.
- CHANDRASEKHARAN, N.V. et al. **COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:13926-31, 2002.
- CHUANG, H.H. et al. **Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition.** *Nature* 411:957–62, 2001.
- DE CAMPOS, R.O. et al. **Oral antinociception and oedema inhibition produced by NPC 18884, a non-peptidic bradykinin B2 receptor antagonist.** *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 360:278-86, 1999.
- DE WITT, D.L. **Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression.** *Biochem. Biophys. Acta.* 1083:121-34, 1991.
- DICKESON, A.H.; KIEFFER, B. **Opiates: basic mechanism.** In: McMahon SB and Klotzenburg M. (Eds). *Wall and Melzack's. Textbook of pain.* 5a Ed. Endinburg: Churchill Livingstone, cap. 27, p. 427-457, 2006.
- DIEPPE, P.A. et al. **Lessons from the withdrawal of rofecoxib.** *Br. Med. J.* 329:867-8, 2004.
- D'MELLO R., DICKENSON, A.H. **Spinal cord mechanisms of pain.** *Br. J. Anaesth.* 101:8-16, 2008.
- DRAY, A.; PERKINS, M.N. **Kinins and pain.** In: Farmer SG (Ed.). *The Kinin System.* Academic Press, San Diego, CA, 157-172, 1997.
- DUARTE, F.S. et al. **Evidence for the involvement of the monoaminergic system in the antidepressant-like action of two 4-amine derivatives of 10,11-dihydro-5H-dibenzo [a,d] cycloheptane in mice evaluated in the tail**

- suspension test.** Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 32:368-74, 2008.
- FERREIRA, S.H. **Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia.** Nat. New Biol. 13, 240:200-3, 1972.
- FERREIRA, J.; SILVA, G.L.; CALIXTO, J.B. **Contribution of vanilloid receptors to the overt nociception induced by B2 kinin receptor activation in mice.** Br. J. Pharmacol. 141:787-94, 2004.
- FRIES, D.S. **Analgesics.** In: Foye, WO; Lemke, TL; Williams, DA. Eds. Medicinal Chemistry. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 247-269, 1995.
- FU, J.Y. et al. **The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase: (cyclooxygenase) in human monocytes.** J. Biol. Chem. 65:16737-40, 1990.
- FUNK C.D. et al. **Human platelet/erythrocyte cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment.** FASEB J. 5:2304-12, 1991.
- FUNK, C.D.; FITZGERALD, G.A. **COX-2 inhibitors and cardiovascular risk.** J. Cardiovasc. Pharmacol. 50:470-479, 2007.
- GRAHAM, D.J. et al. **Risk of acute myocardial infarction and sudden cardiac death in patients treated with cyclooxygenase e selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs: nested case-control study.** Lancet 365:475-481, 2005.
- GÜRSOY, A. et al. **Synthesis and preliminary evaluation of new 5-pyrazolinone derivatives as analgesics agents.** Eur. J. Med. Chem. 35:359-364, 2000.
- HARGREAVES, K.M. et al. **Bradykinin is increased during acute and chronic inflammation: therapeutic implications.** Clin. Pharmacol. Ther. 44:613-21, 1988.
- HAYES, A.G.; TYERS, M.B. **Determination of receptors that mediate opiate side effects in the mouse.** Br. J. Pharmacol. 79:731-6, 1983.

- HEMPEL, S.L.; MONICK, M.M.; HUNNINGHAKE, G.W. **Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes.** J. Clin. Invest. 93:391- 6, 1994.
- HEINRICHER, M.M.; MARTENSON, M.E.; NEUBERT, M.J. **Prostaglandin E2 in the midbrain periaqueductal gray produces hyperalgesia and activates pain-modulating circuitry in the rostral ventromedial medulla.** Pain 110:419-26, 2004.
- HINZ, B.; RENNER, B.; BRUNE, K. **Drug Insight: cyclo-oxygenase-2 inhibitors— a critical appraisal.** Nature, 3:552- 560, 2007.
- INSEL, P.A. **Analgesic – antipyretic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout.** In: Hardman, J.G.; Limbird, L.E.; Molinoff, P.B.; Ruddon, R.W. (Eds.) Goodman and Gilmans. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9^a Ed. New York: Mc Graw Hill, p. 617-657, 1996.
- JACKSON, D.L. et al. **Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats.** Eur. J. Pharmacol. 284:321-25, 1995.
- JOSHI, S.K. et al. **Comparison of antinociceptive actions of standard analgesics in attenuating capsaicin and nerve-injury-induced mechanical hypersensitivity.** Neuroscience 143:587-96, 2006.
- JONES, D.A. et al. **Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines.** J. Biol. Chem. 268:9049- 54, 1993.
- KARGMAN, S. et al. **Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts.** Gastroenterology 111: 445-54, 1996.
- KASSUYA, C.A.L. et al. **Intraplantar PGE₂ causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases.** Br. J. Pharmacol. 150:727–37, 2007.
- KAWAI, K. et al. **Design, synthesis, and structure-activity relationship of novel opioid kappa-agonists.** Bioorg. Med. Chem. 16:9188-201, 2008.

KRÖTZ, F. et al. **Selective COX-2 Inhibitors and Risk of Myocardial Infarction.** J. Vasc. Res. 42:312–324, 2005.

KUJUBU, D.A. et al. **TIS 10 a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3t3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue.** J. Biol. Chem. 266:12866-72, 1991.

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

LEE, S.H. et al. **Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide.** J. Biol. Chem. 267:25934-8, 1992.

MAMDANI, M. et al. **Cyclooxygenase-2 inhibitors versus non selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs and congestive heart failure outcomes in elderly patients: a population-based cohort study.** Lancet 363:1751-6, 2004.

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

McQUAY, H.J. AND MOORE, R.A. **NSAIDS and Coxibs: clinical use.** In: McMahon SB, Klotzenburg M. (Eds). Wall and Melzack's. Textbook of pain. 5a Ed. Endinburg: Churchill Livingstone, cap. 30, p. 471-480, 2006.

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

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

MEYER, R.A.; CAMPBELL, J.N.; RAJA, S.N. **Peripheral mechanisms of pain.** In: Wall PD e Melzack R. Textbook of pain. 5ª Ed. Endinburg: Churchill Livingstone, 1994.

MORIMOTO, A. et al. **Pattern differences in experimental fevers induced by endotoxin, endogenous pyrogen, and prostaglandins.** Am. J. Physiol. 254: R633–R640, 1998.

- MILLAN, M.J. **The role of monoamines in the actions of established and "novel" antidepressant agents: a critical review.** Eur. J. Pharmacol. 500:371-84, 2004.
- MILANO, J. et al. **Antinociceptive effect of novel trihalomethyl-substituted pyrazoline methyl esters in formalin and hot-plate tests in mice.** Eur. J. Pharmacol. 581:86-96, 2008a.
- MILANO, J. et al. **Antinociceptive action of 4-methyl-trifluoromethyl-hydroxy-dihydro-pyrazole methyl ester in models of inflammatory pain in mice.** Life Sci. 83:739-46, 2008b.
- NEGUS, S.S. et al. **Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: Recent advances and future challenges.** J. Pharmacol. Exp. Ther. 319:507-514, 2006.
- NEPPL, H. et al. **Bradykinin-induced oedema formation proceeds from B2 receptor stimulation and is potentiated by concomitantly released prostaglandins.** Acta Physiol. Scand. 142:141-7, 1991.
- NEUGEBAUER, V. **Glutamate receptor ligands.** Handb. Exp. Pharmacol. 77:217-49, 2007.
- NISHIYAMA, T. **Analgesic effects of intrathecally administered celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in the tail flick test and the formalin test in rats.** Acta Anaesthesiol. Scand. 50:228-33, 2006.
- OCHI, T. et al. **The profile of FR140423, a novel anti-inflammatory compound, in yeast-induced rat hyperalgesia.** Jpn. J. Pharmacol. 81:94-98, 1999a.
- OCHI, T. et al. **Anti-inflammatory and analgesic effects of a novel pyrazole derivative, FR140423.** Eur. J. Pharmacol. 365:259-266, 1999b.
- OCHI T. et al. **Antinociceptive properties of FR140423 mediated through spinal δ -, but not μ - and κ -, opioid receptors.** Eur. J. Pharmacol. 380:73-79, 1999c.
- OLIVA, P. et al. **Role of periaqueductal grey prostaglandin receptors in formalin-induced hyperalgesia.** Eur. J. Pharmacol. 530:40-7, 2006.
- OSHIMA, Y. et al. **Studies on pyrimidinylpyrazoles. IV. Pharmacological activities of 1- (4-methoxy-6-methyl-2-pyrimidinyl)-3-methyl-5-**

- methoxy pyrazole and its related compounds.** Chem. & Pharmac. Bull. 17: 1492-1497, 1969.
- PENNING, T.D. et al. **Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl] benze nesulfonamide (SC-58635, celecoxib).** J. Med. Chem. 40:1347-65, 1997.
- PESSINI, A.C. et al. **Mediators involved in the febrile response induced by Tityus serrulatus scorpion venom in rats.** Toxicon. 48:556-66, 2006.
- PIMENTA, C.A.M.; TEIXEIRA, M.J. **Dor no idoso.** In: Duarte YAO, Diogo MJE. Atendimento domiciliar um enfoque gerontológico. São Paulo: Atheneu. p.373-87, 2000.
- POSADAS, I. et al. **Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression.** Br. J. Pharmacol. 142: 331-8, 2004.
- PROKOPP, C.R. et al. **A pyrazolyl-thiazole derivative causes antinociception in mice.** Braz. J. Med. Biol. Res. 39:795-9, 2006.
- RAINSFORD, K.D. **Anti-inflammatory drugs in the 21st century.** Subcell. Biochem. 42:3-27, 2007.
- RAO, P.N.P.; KNAUS, E.E. **Evolution of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond.** J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 11:81s-110s, 2008.
- RUSSO, C.M.; BROSE, W.G. **Chronic Pain.** Ann. Rev. Med. 49: 123-133, 1998.
- SALINAS, G. et al. **The cyclooxygenase 2 (COX-2) story: It's time to explain, not inflame.** J Cardiovasc. Pharmacol. Ther. 2:98-111, 2007.
- SARAIVA, J.F.K. **COX-2 Risco Cardiovascular: efeito molécula ou classe dependente?** Phaoenix Comunicação Integrada, São Paulo: 1-5, 2007.
- SAUZEM, P.D. et al. **Design and microwave-assisted synthesis of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles: Novel agents with analgesic and anti-inflammatory properties.** Eur. J. Med. Chem. 43:1237-47, 2007.

- SCHUG, S.A. AND GANDHAM, N. **Opiates: clinical use**. In: McMahon SB and Klotzenburg M. (Eds). Wall and Melzack's. Textbook of pain. 5^a Ed. Endinburg: Churchill Livingstone, cap. 43, p. 653-667, 2006.
- SCHWAB, J.M. et al. **COX-3 the enzyme and the concept: steps towards highly specialized pathways and precision therapeutics?** Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. 69:339–343, 2003.
- SHI, S.; KLOTZ, U. **Clinical use and pharmacological properties of selective COX-2 inhibitors**. Eur. J. Clin. Pharmacol. 64:233-52, 2007.
- SHIMADA, S.G.; OTTERNESS, I.G.; STITT, J.T. **A study of the mechanism of action of the mild analgesic dipyrone**. Agents actions. 41:188-192, 1994.
- SMITH, C.J. et al. **Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:13313-8, 1998.
- SOUZA, F.R. et al. **3-Methyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl-1H-1-pyrazolcarboxamide induces antinociception**. Pharmacol. Biochem. Behav. 68:525-530, 2001.
- SUI, Z. et al. **1,3-Diarylcycloalkanopyrazoles and Diphenil Hydrazides as Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2**. Bioorg. Med. Chem. Lett. 10:601-604, 2000.
- SVENSSON, C.I.; YAKSH, T.L. **The spinal phospholipase-cyclooxygenase-prostanoid cascade in nociceptive processing**. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 42:553-83, 2002.
- TABARELLI, Z. et al. **Antinociceptive effect of novel pyrazolines in mice**. Braz. J. Med. Biol. Res. 37:1531-40, 2004.
- TEIXEIRA, M.J. et al. **Dor no Brasil: Estado Atual e Perspectivas**. São Paulo, Limay, 196, 1995.
- TEIXEIRA, M. J.; FIGUEIRÓ, J. A. B. **Dor - Epidemiologia e evolução histórica da dor**. São Paulo, Moreira Jr.,1, 2001.

- TEIXEIRA, M.J. **Dor, Manual para o Clínico**. 1ª ed. São Paulo, Atheneu, 1: 562, 2006.
- TOMAZETTI, J. et al. **Baker yeast-induced fever in young rats: characterization and validation of an animal model for antipyretics screening**. J. Neurosci. Methods. 147:29-35, 2005.
- TSUJI, K. et al. **Studies on anti-inflammatory agents. V. Synthesis and pharmacological properties of 3-(difluoromethyl)-1-(4-methoxyphenyl)-5-[4-(methylsulfinyl)-phenyl] pyrazole and related compounds**. Chem. & Pharmac. Bull. 45:1475-1481, 1997.
- TURK, D.C.; MELZACK, R. **The measurement of pain and the assessment of people experiencing pain**. Handbook of pain assessment. New York. The Guilford press, pp. 3-12, 1992.
- VLASKOVSKA, M.; SURCHEVA, S.; OVCHAROV, R. **Importance of endogenous opioids and prostaglandins in the action of analgin (metazole) and verapamil**. Farmakol. Toksikol. 52:25-29, 1989.
- WOODCOCK, J.; WITTER, J.; DIONNE, R.A. **Stimulating the development of mechanism-based, individualized pain therapies**. Nat. Rev. Drug Disc. 6:703-710, 2007.
- XIE, W. et al. **Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2692-6, 1991.
- YIN, L.L. et al. **CC 05, a novel anti-inflammatory compound, exerts its effect by inhibition of cyclooxygenase-2 activity**. Eur. J. Pharmacol. 520:172-8, 2005.
- WARNER, T.D. et al. **Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full *in vitro* analysis**. Proc. Natl. Acad. Sci. 96:7563–7568, 1999.
- WOOLF, C.J.; MANNION, R.J. **Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management**. Lancet 353:1959, 1999.
- WOOLF, C.J.; SALTER, M.W. **Plasticity and pain: Role of the dorsal horn**. In: McMahon SB, Klotzenburg M. (Eds). Wall and Melzacks. Textbook of pain. 5ª Ed. Endinburg: Churchill Livingstone, cap. 5, p. 91-105, 2006.