

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA – PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS

DISSERTAÇÃO

Avaliação do Potencial Analgésico e
Anti-inflamatório do Composto Pirazólico
1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) - DHP

Raphael Andrade de Castro

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA –
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS

Avaliação do Potencial Analgésico e
Anti-inflamatório do Composto Pirazólico
1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) - DHP

RAPHAEL ANDRADE DE CASTRO

Sob a orientação do Professor

Frederico Argollo Vanderlinde

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia.

Seropédica, RJ
Maio de 2011

636.08920157

C355a

T

Castro, Raphael Andrade de, 1982-

Avaliação do potencial analgésico e anti-inflamatório do composto pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) - DHP / Raphael Andrade de Castro - 2011.

93 f.: il.

Orientador: Frederico Argollo Vanderlinde.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária.

Bibliografia: f. 61-82.

1. Drogas veterinárias - Teses. 2. Analgésicos - Teses. 3. Agentes anti-inflamatórios - Teses. I. Vanderlinde, Frederico Argollo. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA –
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS

RAPHAEL ANDRADE DE CASTRO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Patologia.

Dissertação aprovada em 18/02/2011

Prof. Frederico Argollo Vanderlinde. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Thereza Christina Monteiro de Lima. Dra. UFSC

Prof. Paulo César Ghedini. Dr. UFGO

A Maria Clara, pelo estímulo, incentivo e pela paciência.

A minha família, que apesar da distância, estão sempre próximos em meus pensamentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por manter-me determinado em meus sonhos.

A minha família, por entender e aceitar minha ausência ao longo de mais uma conquista.

A Maria Clara, por estar sempre ao meu lado e por compreender o quanto esta etapa da minha caminhada é importante.

Ao meu orientador, Professor Dr. Frederico Argollo Vanderlinde, por sua orientação e ensinamentos que muito significaram para meu amadurecimento; pela sua compreensão diante das minhas dificuldades e pelo trabalho abordado nesta dissertação que me possibilitou tamanho conhecimento.

Ao amigo e Professor, Dr. André Luis da Silva Mendes, pelas oportunidades, conselhos e ensinamentos.

Aos professores, pós-graduandos, alunos de iniciação científica e estagiários do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ, pelo convívio e divisão de conhecimentos.

Aos Professores Dr. Antônio Carlos Carreira Freitas e João Carlos Martins Mafra, da Universidade Federal Fluminense pela síntese e fornecimento do composto utilizado nesta dissertação.

Aos pós-graduandos David do Carmo Malvar (FCFRP/USP) e Raquel Teixeira Ferreira (CPGMV/UFRRJ), pela contribuição na realização dos experimentos.

Aos pós-graduandos e professores do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária - CPMV, pelas discussões e ensinamentos durante o curso.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por me proporcionar a cada dia um novo conhecimento.

RESUMO

CASTRO, Raphael Andrade. **Avaliação do potencial analgésico e anti-inflamatório do composto pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) - DHP**. 2011. 82f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

A inflamação é um processo fisiológico de resposta orgânica diante de lesão tissular ou infecção, gerando a dor como característica constante. Os compostos pirazólicos são drogas de origem sintética com um anel pirazolinico na sua estrutura química, com os quais diversos estudos demonstram a eficácia no controle da dor, da febre e da inflamação. A necessidade do desenvolvimento de novos fármacos com propriedades analgésicas e anti-inflamatórias, de baixo custo e que apresentem poucas reações adversas, tem estimulado a síntese e o estudo das atividades farmacológicas dos compostos pirazólicos. Com esse objetivo, foi estudado o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do composto pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) (DHP), administrado pela via oral, nos modelos farmacológicos das contorções abdominais pelo ácido acético, *tail-flick*, formalina, edema de orelha induzido pelo óleo de cróton e peritonite induzida pela carragenina em camundongos; e na alodinia mecânica (*von Frey*) e hiperalgesia térmica (*Hargreaves*) em ratos. A administração do DHP (1, 3 e 10mg/kg) diminuiu de maneira dose-dependente (41,3, 62,7 e 76%) o número de contorções abdominais (ID₅₀=1,3mg/kg). No teste de *tail-flick*, DHP (10mg/kg) não foi efetivo e a aplicação do controle positivo fentanil (200µg/kg, s.c.) ampliou a latência ao estímulo térmico em até 138%. Sem alterarem a 1ª fase de nocicepção (dor neurogênica) do teste da formalina, o DHP (10mg/kg) e o controle positivo indometacina (10mg/kg, p.o.) inibiram a reatividade na 2ª fase (dor inflamatória) em 40,9 e 48,7% respectivamente. Essa mesma dose do DHP reduziu em 54% o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, assim como o controle positivo dexametasona (2mg/kg, s.c.) em 55,3%. Também de forma dose-dependente o DHP (3, 10 e 30 mg/kg) inibiu em 11,8, 39 e 53,7% respectivamente, a migração de leucócitos no teste da peritonite induzida pela carragenina (ID₅₀=22,9mg/kg). Na avaliação da alodinia mecânica o grupo incisado tratado com o DHP (GIDHP - 10mg/kg) apresentou significativas reversões da alodinia (RA) após uma hora da administração, com RA máxima na leitura de 12 horas (28,2%) na segunda etapa, mantendo-se na terceira etapa com RA de 26,9, 43,4 e 60,4% nos 7º, 10º e 14º dias de experimentação, comparados com o grupo incisado veículo (GIV). Na hiperalgesia térmica o GIDHP também produziu reversão da hiperalgesia (RH) uma hora após o tratamento, com RH máximo na leitura de 3 horas (68,9%) na segunda etapa, mantendo-se na terceira etapa com RH de 43,4, 32,1 e 64% nos 7º, 10º e 14º dias de experimentação, quando comparados ao GIV e obtendo valores semelhantes ao grupo não incisado veículo (GNIV) no 14º dia. No *von Frey* e no *Hargreaves* o GNIV apresentou leituras semelhantes nas três etapas do experimento. O DHP (10mg/kg) não alterou a atividade motora de camundongos no teste do *rota-rod*. Considerando que o composto DHP apresentou atividade antinociceptiva no teste das contorções, antiedematogênica no edema de orelha, inibiu a 2ª fase de nocicepção (dor inflamatória) do teste da formalina e a migração leucocitária, promovendo ainda reversão da hipernocicepção nos modelos de hiperalgesia térmica e alodinia mecânica; esses resultados indicam que a efetividade do DHP envolve a participação de mecanismos anti-inflamatórios e criam perspectivas favoráveis para sua futura utilização com esse objetivo terapêutico.

Palavras-chave: *Composto Pirazólico; antinocicepção; anti-inflamatório, von Frey, Hargreaves.*

ABSTRACT

CASTRO, Raphael Andrade. **Assessment of the potential analgesic and anti-inflammatory compound 1,5-diphenyl-pyrazole-3-hidrazinopirazol (a) - DHP.** 2011. 82f. Dissertation (Master of Veterinary Medicine, Pathology). Institute of Veterinary, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Inflammation is a physiological process of organic response before tissue injury or infection, causing pain as a constant feature. The pyrazole compounds are the drugs of synthetic origin in their chemical structure consisting of a ring pirazolínico, with which several studies show the effectiveness in controlling of pain, fever and inflammation. The need to develop new drugs with analgesic and anti-inflammatory, low cost and which have few adverse reactions, has stimulated the synthesis and study of pharmacological activities of pyrazole compounds. With this objective, we studied the antinociceptive and anti-inflammatory potential of compound 1.5-diphenyl-pyrazole-3-hidrazinopirazol(a) (DHP), administered orally in pharmacological models of the acetic acid writhing, *tail-flick*, formalin, ear edema induced by croton oil and carrageenan-induced peritonitis in mice, and mechanical allodynia (*von Frey*) and thermal hyperalgesia (*Hargreaves*) in rats. The administration of DHP (1, 3 and 10mg/kg) decreased in a dose-dependent (41.3, 62.7 and 76%) number of writhing (ID50 = 1.3mg/kg). In the *tail-flick* test, DHP (10mg/kg) was ineffective and the application of positive control fentanyl (200µg/kg, *sc*) increased the latency to thermal stimulation in up to 138%. Without changing the first phase of nociception (neurogenic pain) of the formalin test, DHP (10mg/kg) and the positive control indomethacin (10mg/kg, *p.o.*) inhibited the reactivity in the 2nd phase (inflammatory pain) in 40.9 and 48.7% respectively. This same dose of DHP reduced by 54% the ear edema induced by croton oil, as well as the positive control, dexamethasone (2mg/kg, *sc*) at 55.3%. Also in a dose-dependent DHP (3, 10 and 30 mg / kg) inhibited by 11.8, 39 and 53.7%, respectively, leukocyte migration in peritonitis induced by carrageenan test (ID50 = 22.9mg/kg). In the assessment of mechanical allodynia incision group treated with DHP (GIDHP - 10mg/kg) showed a significant reversal of allodynia (RA) after one hour of administration, with maximum reading RA for 12 hours (28.2%) in the second stage of the experiment, remaining in the third stage with RA of 26.9, 43.4 and 60.4% in the 7th, 10th and 14th days of evaluations, when compared with the vehicle group incised (GIV). In thermal hyperalgesia GIDHP (10mg/kg) also significantly reversed the hyperalgesia (RH) after one hour of treatment, with RH maximum of three hours in reading (68.9%) in the second stage, obtaining in the third stage RA of 43.4, 32,1 and 64% in 7th, 10th and 14th days of evaluations, when compared to the GIV and obtaining similar values of the group not incised vehicle (GNIV) on 14th day. In the *von Frey* and *Hargreaves* GNIV showed similar readings in the three stages of the experiment. The DHP (10mg/kg) did not alter the motor activity of mice in *rota-rod* test. Whereas the compound DHP showed antinociceptive activity in writhing test, antiedematogenic in ear edema, inhibited the 2nd phase of nociception (inflammatory pain) in formalin test and leukocyte migration, promoting reversal of hypernociception in models of thermal hyperalgesia and allodynia mechanics, these results indicate that the effectiveness of DHP involves the participation of anti-inflammatory mechanisms and create favorable outlook for its future use with this therapeutic goal.

Keywords: *Composite pyrazole; antinociception, anti-inflammatory, von Frey, Hargreaves.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA: Ácido araquidônico
ADP: Difosfato de adenosina
Ag: Antígeno
AINES: Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPc: Adenosinamonofosfato cíclico
A β : Fibra nervosa do tipo A-beta
A δ : Fibra nervosa do tipo A-delta
B50: Composto 2-[5-triclorometil-5-hidróxi-3-fenil-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il]-4-(4-bromofenil)-5-metiltiazol
C: Fibra nervosa do tipo C
Ca⁺²: Cálcio
CINC-1: Quimiocina de ratos análoga a IL-8 em humanos
Cg: Carragenina
CGRP: Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
cm: Centímetro
COX: Cicloxigenase
COX I: Cicloxigenase I
COX II: Cicloxigenase II
DHP: Composto 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a)
DL50: Dose letal 50%
FPCA: Composto 3-phenyl-5-hidroxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1H-1-piraxolcarboxi-amida
FR140423: Composto 3-(difluormetil)-1-(4-metoxifenil)-5-[4-(metilsulfinil) fenil] pirazol
g: Grama
GDHP: Grupo incisado tratado com DHP
GIV: Grupo incisado tratado veículo
GLU: Glutamato
GNIV: Grupo não incisado tratado veículo
GRD: Gânglio da raiz dorsal
h: Hora
IASP: Associação Internacional para o Estudo da Dor
ID50: Dose inibitória 50%
IgE: Imunoglobulina E
IL: Interleucina
IL-1: Interleucina 1
IL-1 β : Interleucina 1 Beta
IL-2: Interleucina 2
IL-4: Interleucina 4
IL-6: Interleucina 6
IL-8: Interleucina 8
IL-10: Interleucina 10
IL-13: Interleucina 13
INF: Interferon
INF- α : Interferon alfa
INF- β : Interferon beta
INF- γ : Interferon gama
i.p.: Intra-peritoneal
K⁺: Potássio

KC: Queratinócitos
LOX: Lipoxigenase
LPS: Lipopolissacarídeo
LTs: Leucotrienos
LTA₄: Leucotrieno A4
LTB₄: Leucotrieno B4
LTC₄: Leucotrieno C4
LTD₄: Leucotrieno D4
LTE₄: Leucotrieno E4
m: Metro
mg: Miligrama
mg/kg: Miligrama por quilo
min: Minuto(s)
mL: Mililitro
mL/kg: Mililitro por quilograma
mm: Milímetro
mm²: Milímetro quadrado
MPCA: Composto 3-metil-5-hidróxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1*H*-1-piraxolcarboxi-amida
m/s: Metro por segundo
µg/kg: Micrograma por quilograma
µL: Microlitro
µL/grama: Microlitro por grama
Na⁺: Sódio
NF0: Composto 4-metil-5-hidroxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazolcarboxamida
NF2: Composto 3-metil-5-hidroxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazolcarboxamida
NO: Óxido Nítrico
NSP: Nociceptor sensitivo primário
PAF: Fator de ativação plaquetária
PGs: Prostaglandinas
PGD₂: Prostaglandina D2
PGE₂: Prostaglandina E2
PGF_{2α}: Prostaglandina F2 alfa
PGH₂: Prostaglandina H2
PGI₂: Prostaglandina I2
PIs: Prostaciclinas
PKA: Proteinocinases A
PKC: Proteinocinases C
PLA₂: Fosfolipase A2
PZ2: Composto 3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1*H*-1-metilpirazol
PZ3: Composto 3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1*H*-1-fenilpirazol
RA: Reversão da alodinia
RH: Reversão da hiperalgesia
%RH: Porcentagem de reversão da hiperalgesia
%RA: Porcentagem de reversão da alodinia
s: Segundo(s)
s.c.: Subcutâneo
TNF: Fator de Necrose Tumoral
TNFα: Fator de Necrose Tumoral Alfa
TNFR1: Receptor de TNF Tipo 1
TNFR2: Receptor de TNF Tipo 2

TRPA1: Receptores de potencial transitório tipo anquirina 1

TTX-r: Tetrodotoxina resistente

TXs: Tromboxanos

TXA₂: Tromboxano A2

TXB₂: Tromboxano B2

WDR: Neurônios de variação dinâmica ampla

Δ: Diferença entre o peso das orelhas direita e esquerda

5-HPETE: Ácido 5- hidroperoxieicosatetraenoico

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 2 |
| 2.1 Fisiologia da Inflamação | 2 |
| 2.2 O Ácido Araquidônico e os Eicosanóides | 4 |
| 2.3 Via das Cicloxigenases e das Lipoxigenases | 5 |
| 2.4 Citocinas e Quimiocinas no Processo Inflamatório..... | 9 |
| 2.5 Aminas Simpáticas | 11 |
| 2.6 Neurotransmissores | 12 |
| 2.7 Dor Inflamatória | 14 |
| 2.8 Compostos Pirazólicos | 21 |
| 3 OBJETIVOS..... | 26 |
| 4 JUSTIFICATIVAS..... | 27 |
| 5 MATERIAL E MÉTODOS..... | 28 |
| 5.1 Animais..... | 28 |
| 5.2 Drogas, Reagentes, Solventes e Sais | 28 |
| 5.3 Avaliação da Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória em Camundongos | 29 |
| 5.3.1 Teste das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético | 29 |
| 5.3.2 Teste do <i>rota-rod</i> | 30 |
| 5.3.3 Teste de <i>Tail-flick</i> | 31 |
| 5.3.4 Teste da Formalina | 31 |
| 5.3.5 Teste do Edema de Orelha Induzido por Óleo de Cróton..... | 32 |
| 5.3.6 Teste da Peritonite Induzida por Carragenina | 32 |
| 5.4 Determinação da Nocicepção Relacionada ao Modelo de Indução em Ratos | 33 |
| 5.4.1 Delineamento Experimental | 33 |
| 5.4.2 Procedimento Cirúrgico..... | 34 |
| 5.4.3 Avaliação da Alodinia Mecânica..... | 35 |
| 5.4.4 Avaliação da Hiperalgisia Térmica..... | 36 |
| 5.5 Análise Estatística | 36 |
| 6 RESULTADOS | 37 |
| 6.1 Avaliação da Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória em Camundongos | 37 |
| 6.1.1 Teste das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético | 37 |
| 6.1.2 Teste do <i>rota-rod</i> | 38 |

| | |
|--|----|
| 6.1.3 Teste de <i>Tail-flick</i> | 39 |
| 6.1.4 Teste da Formalina | 40 |
| 6.1.5 Teste do Edema de Orelha Induzido pelo Óleo de Cróton | 41 |
| 6.1.6 Teste da Peritonite Induzida por Carragenina | 42 |
| 6.2 Determinação da Nocicepção Relacionada ao Modelo de Indução em Ratos | 43 |
| 6.2.1 Avaliação da Alodinia Mecânica pelo Método <i>von Frey</i> | 43 |
| 6.2.2 Avaliação da Hiperalgesia Térmica pelo Método <i>Hargreaves</i> | 46 |
| 7 DISCUSSÃO | 49 |
| 8 CONCLUSÕES | 59 |
| 9 PERSPECTIVA | 60 |
| 10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 61 |

1 INTRODUÇÃO

A inflamação consiste em um evento fisiológico, atuando como um mecanismo de defesa em resposta à uma agressão tissular frente a qualquer tipo de agente, resultando, dentre inúmeros eventos, na formação de ácido araquidônico (AA) a partir de fosfolípidos de membranas celulares sob a atuação da enzima denominada fosfolipase A₂ (PLA₂). Este AA dará origem a mediadores inflamatórios por duas vias: a primeira via, das cicloxigenases (COX), produzindo prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PIs) e tromboxanos (TXs), e a segunda via, das lipoxigenases (LOX), levando a formação de leucotrienos (LTs). As PGs, PIs, TXs e LTs são importantes mediadores responsáveis pela resposta inflamatória, sendo denominados, em conjunto, de prostanóides.

Estes prostanóides, bem como as citocinas que são liberadas com a lesão tecidual atuarão tanto no desenvolvimento do processo inflamatório, quanto no sinal hipernociceptivo. O fator de necrose tumoral (TNF α) induz a liberação de interleucina 1-Beta (IL-1 β) e interleucina 8 (IL-8), promovendo, respectivamente, a ativação da enzima cicloxigenase (COX) e a liberação de aminas simpatomiméticas, atuando assim direta e indiretamente em receptores nociceptivos.

Neste sentido, sistema nervoso periférico, a endotelina, a substância P, a histamina e a bradicinina sensibilizam os nociceptores, sendo estes hipersensibilizados pelas prostaglandinas, principalmente a PGE₂ e a PGI₂. A PGI₂ está relacionada com a hiperalgesia imediata e de curta duração, enquanto a PGE₂ se relaciona com a hiperalgesia prolongada. Por outro lado, na alodinia, transformações no sistema nervoso central permitem que neurônios responsáveis por estímulos inócuos realizem comunicações com neurônios nociceptivos, garantindo que seus impulsos elétricos sejam informados como nociceptivos.

Uma parte dos fármacos anti-inflamatórios atuam promovendo a inibição da enzima cicloxigenase, impedindo a formação de prostanóides. No entanto, esses mediadores são responsáveis não só pela produção do processo inflamatório, mas também são importantes na modulação de eventos fisiológicos como a secreção ácida gástrica, desempenhando papéis fundamentais na homeostase do organismo. Deste modo, os efeitos secundários indesejáveis promovidos por esses agentes terapêuticos, tem direcionado a busca de novos compostos, cujo potencial anti-inflamatório seja acompanhado de um mínimo de efeitos colaterais e que apresentem um baixo custo de produção.

Compostos pirazólicos são substâncias químicas de origem sintética que podem apresentar atividade analgésica, anti-inflamatória e antipirética, justificando, por isso, o desenvolvimento de estudos que investiguem o potencial terapêutico desses novos compostos no controle da dor e no tratamento de doenças inflamatórias, bem como na produção de efeitos colaterais.

Assim, utilizando modelos farmacológicos validados em ratos e camundongos, essa dissertação avalia o potencial analgésico e antiinflamatório do composto pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiologia da Inflamação

A inflamação é um processo fisiológico que consiste na resposta orgânica diante de lesão tissular ou infecção, envolvendo uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido no qual ocorreu a lesão (COTRAN et al., 2006). Este processo pode ser encarado como um mecanismo de defesa do organismo, permitindo abrir caminhos para os processos de reparação, com a cicatrização e a regeneração do tecido afetado (TIZARD, 2002). Entretanto, apesar de extremamente necessário, esse processo poderá em determinadas situações se exacerbar, levando a efeitos deletérios (GILMAN et al., 2006). Assim, inflamação é um termo geral usado para as mudanças que podem ocorrer nos tecidos vascularizados, como resposta a danos teciduais, infecções ou reações imunológicas (SPINOSA et al., 2006).

De modo geral, o processo inflamatório compreende três fases. A fase aguda caracteriza-se pelos eventos vasculares, observando-se a vasodilatação local e o aumento da permeabilidade vascular; a fase tardia onde se observa a migração celular, com a infiltração de leucócitos e células fagocitárias e a fase proliferativa crônica, na qual ocorre degeneração tecidual e fibrose, podendo causar a dor através da ativação e sensibilização de nociceptores (LEES et al., 2004).

Na fase aguda, a inflamação é de curta duração e apresenta os sinais cardiais: a dor, o calor, o rubor, o tumor e a perda da função. A fase crônica perdura por um período indeterminado, variando de acordo com os tipos de mediadores celulares e humorais envolvidos. As modificações decorrentes da liberação destes mediadores levam ao intumescimento tecidual, devido ao extravasamento de proteínas plasmáticas, com conseqüente saída de água para o tecido e a penetração de células inflamatórias, a fim de neutralizar o agente nocivo (GILMAN et al., 2006; SPINOSA et al., 2006).

Para que ocorra este processo, vários são os mediadores químicos envolvidos, que podem ser de origem tissular, como as aminas vasoativas, fator de ativação plaquetária (PAF), eicosanóides, citocinas, radicais livres superóxidos, óxido nítrico (NO) e neuropeptídeos; ou de origem plasmática, como os sistemas de coagulação, do complemento, das cininas e fibrinolítica (RANG et al., 2007).

Estes mediadores são responsáveis pelos eventos vasculares, permitindo a vasodilatação, a estase vascular e o aumento da permeabilidade capilar; além de garantir a migração de leucócitos da circulação para o tecido inflamado e coordenar as variadas respostas de defesa local. Alguns desses mediadores têm a capacidade de estimular neurônios sensoriais locais, contribuindo para o surgimento da nocicepção. Porém, é possível que a inflamação ultrapasse certos níveis, permitindo que quantidades suficientes desses mediadores endógenos penetrem na circulação sistêmica, se disseminando pelo sangue e provocando uma variedade de reações, chamadas de resposta de fase aguda, sendo definida como uma resposta multifatorial do organismo. Estas respostas envolvem mudanças na concentração plasmática de proteínas hepáticas, hormônios, metabólitos intermediários, neutrofilia e alteração do *set point* cerebral de controle dos sinais de doença, os chamados “comportamento de doença” que incluem o desenvolvimento da febre, a perda do apetite, o aumento do ciclo de sono, a diminuição da atividade motora, a redução da libido e a diminuição do comportamento de alerta (ROTH et al., 2009).

Dentre as citocinas liberadas no momento do trauma, existe o fator de necrose tumoral (TNF α) que induz a liberação de outras citocinas, destacando-se a interleucina 1-Beta (IL-1 β) e a interleucina 8 (IL-8). A IL-1 β promove a ativação da enzima cicloxigenase (COX) responsável pela produção de prostaglandinas - PGs, prostaciclina - PIs e tromboxanos – TXs, enquanto a IL-8 atua na liberação local de aminas simpatomiméticas (BASBAUM; JULIUS, 2006; VERRI et al., 2006) (Figura 1).

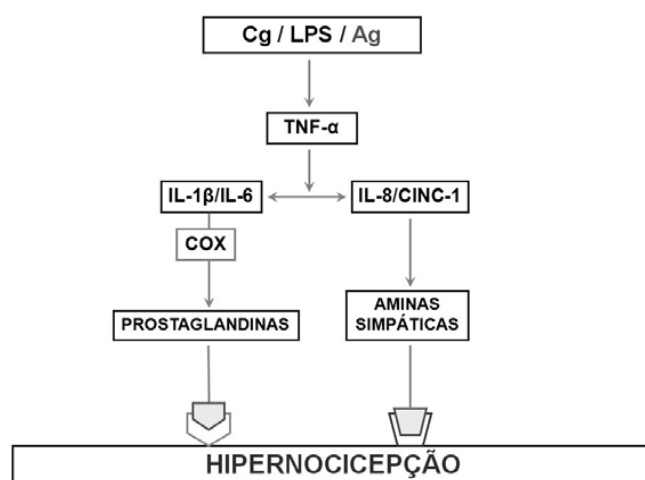


Figura 1: Liberação de mediadores por diferentes estímulos como carragenina (Cg), LPS ou antígenos (Ag) (Adaptado de VERRI et al., 2006).

Com o acúmulo local de prostaglandinas, tromboxanos e outros mediadores químicos, como as aminas simpatomiméticas e a substância P, nociceptores sensitivos primários (NSP)

são induzidos, aumentando sua sensibilização. Isto ocorre devido à queda do limiar de ativação destes nociceptores e pela facilitação da condução neuronal por tornar funcionais uma família de canais de sódio, denominadas tetrodoxina-resistentes (TTX-r). Esses canais parecem ser específicos dos neurônios nociceptivos inflamatórios (BASBAUM; JULIUS, 2006).

2.2 O Ácido Araquidônico e os Eicosanóides

O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo de 20 carbonos, contendo quatro duplas ligações, que apresenta papel regulador chave na fisiologia celular. É liberado a partir de fosfolípidios de membrana através da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂), que pode ser ativada por diversos estímulos químicos, inflamatórios, traumáticos e mitogênicos, que também ativam citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 1 (IL-1) (BROOKS et al., 1999, HILÁRIO et al., 2006). O AA pode ser metabolizado pela via das cicloxigenases, dando origem a formação de prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PIs) e tromboxanos (TXs) ou pela via das lipoxigenases levando a síntese dos leucotrienos (LTs) e lipoxinas (LEES et al., 2004; GILMAN et al., 2006; KATZUNG, 2006; RANG et al., 2007; YEDGAR et al., 2007).

Os produtos do metabolismo do ácido araquidônico por estas duas vias enzimáticas são chamados de eicosanóides, constituindo uma grande família de compostos formada pelas PGs, PIs, TXs e LTs, que possuem elevada potência e garantem um amplo espectro de atividades biológicas (Figura 2). Os eicosanóides desempenham importante função na indução e na facilitação de patologias, principalmente as doenças inflamatórias, tendo por isso, a supressão de suas ações sido um dos principais alvos e objetivos terapêuticos para o desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórias (KATZUNG, 2006; YEDGAR et al., 2007).

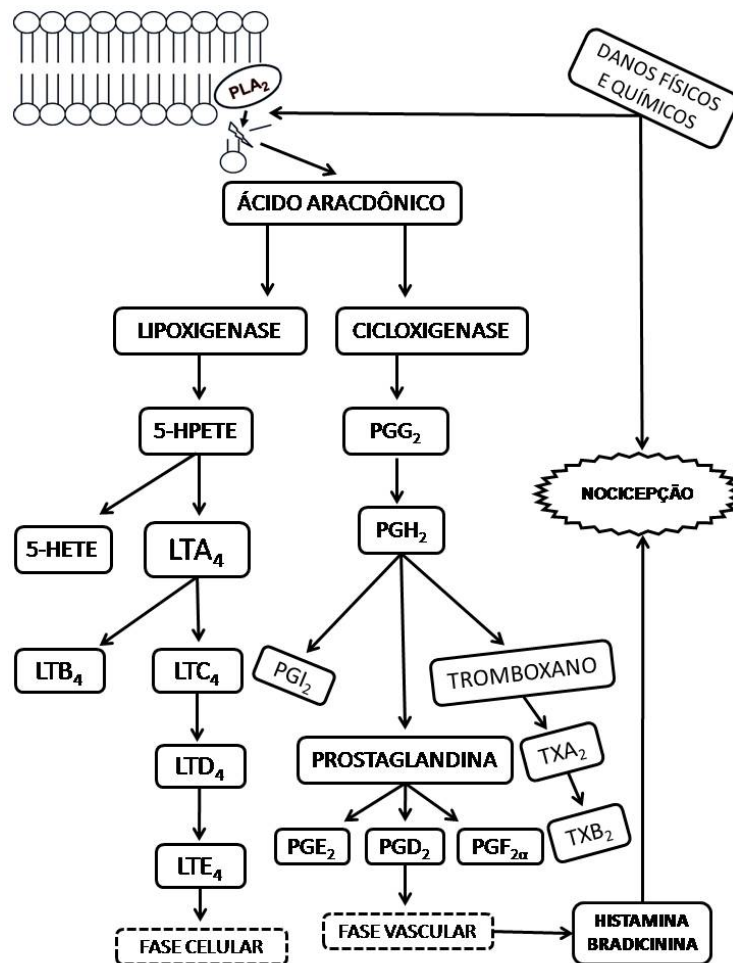


Figura 2: Cascata inflamatória a partir do ácido araquidônico (Adaptado de SPINOSA et al., 2006).

2.3 Via das Cicloxigenases e das Lipoxigenases

A cicloxigenase (COX) é a enzima chave na síntese de prostaglandinas - PGs a partir do seu precursor, o ácido araquidônico - AA (BOTTING, 2006; KVATERNICK et al., 2007). O sítio cicloxigenase promove a oxidação do AA em prostaglandina G₂, que por sua vez é reduzida ao intermediário instável H₂ pelo sítio peroxidase, que não é inibido pelos anti-inflamatórios não esteróides (AINES) (BROOKS et al., 1999). As prostaglandinas G₂ e H₂ são compostos intermediários e quimicamente instáveis e são convertidas pelas isomerases tissulares específicas em múltiplos prostanóides (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂, TXA₂ e TXB₂). Entretanto, a maioria dos tecidos é capaz de converter PGH₂ em apenas alguns desses produtos finais, dependentemente do tipo de isomerase presente em cada tecido (HILÁRIO et al., 2006; FILHO; RAHAL, 2008, KING et al., 2009).

As PGs possuem grande diversidade de receptores específicos e vários mecanismos reguladores, atuando no papel central na inflamação, coagulação sanguínea, angiogênese, ovulação, parturição, metabolismo ósseo, crescimento e no desenvolvimento neuronal, na cicatrização de feridas, na função renal, no tônus vascular e nas respostas imunes (KUMMER; COELHO, 2002; KVATERNICK et al., 2007). Já o tromboxano A_2 , um prostanóide instável com meia-vida curta (aproximadamente 30s), é convertido não enzimaticamente em tromboxano B_2 , um composto estável e relativamente inativo (Figura 2). A prostaglandina ou prostaciclina I_2 também é instável, porém com meia-vida de três minutos, sendo convertida em um composto com menor atividade, a $PGF_{2\alpha}$ (BOTTING, 2006).

São encontradas pelo menos duas isoformas de enzima cicloxigenase: a COX I e a COX II, que desempenham no organismo diferentes funções fisiológicas (LEES et al., 2004). A COX I apresenta 17 aminoácidos em sua cadeia peptídica amino-terminal, enquanto a COX II apresenta 18 aminoácidos na porção carboxi-terminal. Embora sejam muito semelhantes na estrutura protéica, essas enzimas são codificadas por genes diferentes. A COX I e a COX II têm aproximadamente 60% de homologia genética e seus genes estão localizados nos cromossomos 9 e 1, respectivamente. O sítio ativo da COX II é mais largo em aproximadamente 27% (HILÁRIO et al., 2006; MARNETT, 2009). O sítio de ligação da COX I apresenta na posição 523 da cadeia protéica uma molécula de isoleucina, ao passo que a COX II tem uma pequena molécula de valina. Essa mudança é que torna o sítio de ligação da COX II mais largo e mais acessível (KVATERNICK et al., 2007).

A COX I está presente em quase todos os tipos de células, com exceção do eritrócito e é chamada de constitutiva, levando a formação das PGs, principalmente, as relacionadas com ações fisiológicas como proteção gástrica, agregação plaquetária, homeostase vascular e manutenção do fluxo sanguíneo renal. Essa isoforma faz parte da constituição do trato gastrointestinal, sendo associada à produção de muco protetor e inibição da secreção ácida gástrica, sendo que nas plaquetas está associada à síntese do tromboxano A_2 , um mediador que favorece a agregação e a adesão plaquetária. Assim, fármacos que inibem essa isoforma causam diversos distúrbios no trato digestivo e podem estar associadas ao risco de sangramento cutâneo e gastrointestinal como efeito adverso (KUMMER; COELHO, 2002; LEES et al., 2004; BRICKS; SILVA, 2005; FRANCO et al., 2006; HAZEWINDEL et al., 2008; STEAGALL et al., 2009).

Os produtos originados pela cisão do AA através da COX II levam a formação de PGs que participam de eventos inflamatórios, algésicos e térmicos. A expressão desta enzima ocorreria após o estímulo inflamatório nas células migratórias e tecidos lesados, por isso foi chamada de indutiva. Esse estímulo está relacionado à presença de citocinas, fatores de crescimento e estimulantes tumorais, sugerindo sua relevância no câncer e em processos inflamatórios (KUMMER; COELHO, 2002; FRANCO et al., 2006; HAZEWINDEL et al., 2008; STEAGALL et al., 2009). É induzida pelas citocinas pró-inflamatórias como IL- 1, IL- 2, TNF α , e outros mediadores nos sítios de inflamação, como fatores de crescimento e endotoxinas. As citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e a IL-13, assim como os fármacos glicocorticóides inibem a expressão de COX II. (VANE et al., 1998; KUMMER; COELHO, 2002; HILÁRIO et al., 2006; MARNETT, 2009).

Diversos estudos têm relatado pelo menos duas funções importantes das prostaglandinas pró-inflamatórias na inflamação. Primeiro, elas dilatam as arteríolas, aumentando o fluxo sanguíneo para a área de lesão e, embora sua capacidade de aumentar a permeabilidade capilar a proteínas plasmáticas por ação direta seja limitada, elas agem sinergicamente com outros mediadores, tais como a histamina e a bradicinina, que também aumentam a permeabilidade vascular. Em segundo lugar, as PGs, principalmente PGE₂, potencializam as ações de vários mediadores que induzem a dor, incluindo a bradicinina e a histamina, que são liberados nos locais da inflamação promovendo a estimulação dos nociceptores (Figura 1) (LEES, 2003).

A COX II está também relacionada às ações fisiológicas mantenedoras da homeostase em diferentes tecidos como: útero, cartilagens, ossos, rins, ovário e endotélio vascular (KUMMER; COELHO, 2002; BRICKS; SILVA, 2005; HILÁRIO et al., 2006; PAPICH, 2008; STEAGALL et al., 2009). Sua presença também é observada no sistema nervoso central, sendo expressa de forma fisiológica no córtex, no hipocampo, no hipotálamo e no cordão espinhal. Esta isoforma auxilia no desenvolvimento das funções cerebrais normais da atividade sináptica (neurotransmissão) e na consolidação da memória (VANE et al., 1998; KUMMER; COELHO, 2002; SPINOSA et al., 2006). Já no tecido renal ela está presente na mácula densa e nas células intersticiais da medula renal, responsabilizando-se pela manutenção dos níveis de reabsorção de sódio e de água, devido à liberação de renina da macula densa. No sistema vascular assegura a produção de prostaciclina, que produz efeitos vasodilatadores e que evitam a agregação plaquetária, mantendo taxa de filtração

glomerular e o fluxo sanguíneo renal (MATHEWS et al., 1990; KUMMER; COELHO, 2002; CLARK, 2006; SPINOSA et al., 2006).

Atribui-se que os efeitos secundários indesejáveis de fármacos anti-inflamatórios sobre o estômago e os rins são provavelmente devido a inibição da COX-I e consequentemente o benefício pela inibição da COX-II (ENGELHARDT, 1996). Contudo, ficou comprovado não existir uma divisão tão precisa nas atividades das duas isoformas (CARVALHO et al., 2004) e, embora se saiba que a COX II possui propriedades pró-inflamatórias, a resposta inflamatória total é produzida tanto pela COX II como pela COX I (LEES et al., 2004; HILÁRIO et al., 2006).

Na via da lipoxigenase (LOX), os produtos iniciais são gerados por três diferentes LOX, que estão presentes em apenas alguns tipos de células (COTRAN et al., 2006). As lipoxigenases são encontradas nos pulmões, plaquetas, mastócitos e leucócitos, estando presentes principalmente no citosol. A 5-lipoxigenase é a principal enzima deste grupo, atuando sobre o ácido araquidônico e produzindo o ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE), um composto quimiotático para leucócitos, que é convertido em leucotrieno A₄ (LTA₄). O LTA₄ (GOODMAN et al., 2009), pode ser convertido em leucotrieno B₄ (LTB₄) ou em uma série de cisteinil-leucotrienos, LTC₄, LTD₄ e LTE₄. Os cisteinil-leucotrienos são produzidos principalmente por eosinófilos, mastócitos, basófilos e macrófagos, enquanto que o LTB₄ é produzido principalmente por neutrófilos e macrófagos (GILMAN et al., 2006; KATZUNG, 2006; RANG et al., 2007).

O LTB₄ é um importante agente responsável pelo aumento da permeabilidade vascular, causa aderência, quimiotaxia e ativação de polimorfonucleares e monócitos, além de estimular a proliferação de macrófagos e linfócitos e a produção de citocinas por essas células (GOODMAN et al., 2009). Os cisteinil-leucotrienos provocam vasodilatação na maioria do leito vascular, vasoconstrição coronária e contração do músculo brônquico, sendo por isso muito importantes na asma (BERTOLINI et al., 2002). Os LTC₄ e LTD₄ causam edema decorrente do aumento da permeabilidade microvascular (ISHII et al., 1994).

2.4 Citocinas e Quimiocinas no Processo Inflamatório

As citocinas possuem papel essencial na formação dos sinais locais ou sistêmicos de inflamação. São polipeptídeos produzidos por diferentes tipos celulares, principalmente linfócitos e macrófagos ativados, bem como células do endotélio, epitélio e tecido conjuntivo, em resposta a uma variedade de estímulos desencadeados por vírus, parasitas, bactérias e seus produtos ou em resposta a outras citocinas. Modulam funções celulares e são produzidas durante respostas imunes e inflamatórias, sendo sua secreção transitória e estreitamente regulada (COTRAN et al., 2006).

As quimiocinas são consideradas citocinas de um grupo particular, com propriedades químicas e funcionais específicas, importantes nos processos de quimiocinese, capazes de estimular o movimento leucocitário e a quimiotaxia, que é o movimento dirigido dessas células para o foco inflamatório. Interleucinas (IL), quimiocinas, interferons (IFN), fatores estimulantes de colônias, fatores do crescimento e fatores de necrose tumoral (TNF) são superfamílias que compreendem mais de 100 citocinas (COTRAN et al., 2006; RANG et al., 2007).

Embora muitas citocinas possuam funções múltiplas, pode-se agrupá-las em cinco classes de acordo com sua função principal ou natureza de células-alvo: (1) citocinas que regulam a função de linfócitos; (2) citocinas envolvidas na imunidade natural; (3) citocinas que ativam células inflamatórias; (4) quimiocinas e (5) citocinas que estimulam a hematopoiese (COTRAN et al., 2006).

De modo geral, esses mediadores são fundamentais para desenvolvimento da dor e da inflamação. As primeiras citocinas descritas na fisiopatologia do processo inflamatório foram: IL-1 β , TNF- α , IL-6 e as quimiocinas, IL-8, quimiocina quimio-atraente de neutrófilos 1 (CINC-1) e quimiocina derivada dos queratinócitos (KC) (VERRI et al., 2006). A IL-1 β e o TNF- α participam das reações pró-inflamatórias agudas e crônicas, assim como dos processos de reparo e de resolução. São principalmente produzidas por macrófagos ativados e podem estimular, secundariamente, a liberação de mais citocinas (COTRAN et al., 2006; RANG et al., 2007).

A IL-1 β estimula o recrutamento de células da série branca sanguínea, auxilia na produção de febre (pirógeno endógeno), na liberação de proteínas de fase aguda e no aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos (DINARELLO, 1984; 1998), também estimula a expressão de COX II e, como consequência, a formação e liberação de prostanóides, que têm importante papel na sensibilização dos nociceptores, mostrando que indiretamente, a IL-1 β também atua como mediador hipernociceptivo (VERRI et al., 2006).

O TNF- α é produzido rapidamente e em grande quantidade, principalmente por macrófagos, após o estímulo inflamatório, interagindo com a célula alvo através de uma ligação de alta afinidade com os receptores TNFR1 (receptor de TNF, tipo 1) e TNFR2 (receptor de TNF, tipo 2). Sua ligação ao receptor TNFR1 garante a migração de neutrófilos, o choque induzido por endotoxinas e a dor neuropática após lesão do nervo, enquanto que a ligação ao TNFR2 influencia a apoptose celular e a necrose. O TNF- α induz hipernocicepção em ratos através de duas vias independentes e paralelas, uma envolvendo o estímulo a produção de IL-1 β , com consequente liberação de prostanóides, e a outra através ativação da quimiocina CINC-1 (quimiocina de ratos, análoga a IL-8 em humanos), com consequente liberação de aminas simpatomiméticas. Desta forma, os prostanóides e as aminas simpatomiméticas são os mediadores finais da hipernocicepção inflamatória (Figura 1) (VERRI et al., 2006).

A IL-6 é uma citocina com várias células alvo e muitas atividades biológicas, estando envolvida principalmente na regulação das respostas inflamatória e imune. Foi demonstrado por Cunha e colaboradores (1992) que o anticorpo contra IL-6 inibe a hipernocicepção mecânica causada pelo TNF- α em ratos, sugerindo que o TNF- α e as IL-6 e IL-1 β precedem, sequencialmente, a liberação de prostanóides (VERRI et al., 2006). Os maiores indutores da biossíntese de IL-6 são o TNF- α e a IL-1 β (CHAI et al., 1996).

As quimiocinas são quimioatratadores para tipos específicos de leucócitos, possuindo semelhanças em suas sequências de aminoácidos. São classificadas em quatro classes principais, que tem atividades biologicamente distintas: (1) quimiocinas C-X-C ou α ; (2) quimiocinas C-C ou β ; (3) quimiocinas C ou γ ; e (4) quimiocinas CX₃C (COTRAN et al., 2006; RANG et al., 2007).

Quanto aos interferons, existem três classes: INF- α , INF- β e INF- γ . Possuem atividades antivirais e antitumorais e são liberados por células infectadas por vírus (RANG et al., 2007).

2.5 Aminas Simpáticas

A histamina e a serotonina são de grande importância porque se encontram disponíveis em reservas pré-formadas estando, portanto, entre os primeiros mediadores a serem liberados após o estímulo inflamatório (Figura 3) (RANG et al., 2007).

A histamina é amplamente distribuída nos tecidos, estando presente nos mastócitos, nos basófilos e nas plaquetas sanguíneas. A histamina presente nos grânulos de mastócitos é liberada por desgranulação dessas células, em resposta a uma variedade de estímulos como: (1) lesão física por traumatismo, frio, ou calor; (2) reações imunes envolvendo a ligação de antígenos aos mastócitos; (3) fragmentos do complemento denominados anafilatoxinas; (4) proteínas de liberação da histamina derivadas dos leucócitos; (5) neuropeptídeos; e (6) citocinas (Figura 3). A histamina é considerada o principal mediador na fase imediatamente após a lesão, aumentando a permeabilidade vascular, produzindo lacunas venulares, atuando sobre a microcirculação, principalmente através da interação com receptores H₁ (COTRAN et al., 2006; RANG et al., 2007), e estimulando nociceptores (LEES, 2003).

A serotonina é o segundo mediador vasoativo pré-formado, possuindo ações semelhantes às da histamina. Está presente nas plaquetas e nas células enterocromafins e, em roedores, também nos mastócitos (Figura 3). Sua liberação é estimulada quando as plaquetas se agregam após contato com colágeno, trombina, difosfato de adenosina (ADP) e complexo antígeno-anticorpo. Também são estimuladas pelo fator ativador plaquetário (PAF), proveniente dos mastócitos durante reações mediadas por IgE, resultando em aumento da permeabilidade durante reações imunológicas (COTRAN et al., 2006; RANG et al., 2007).

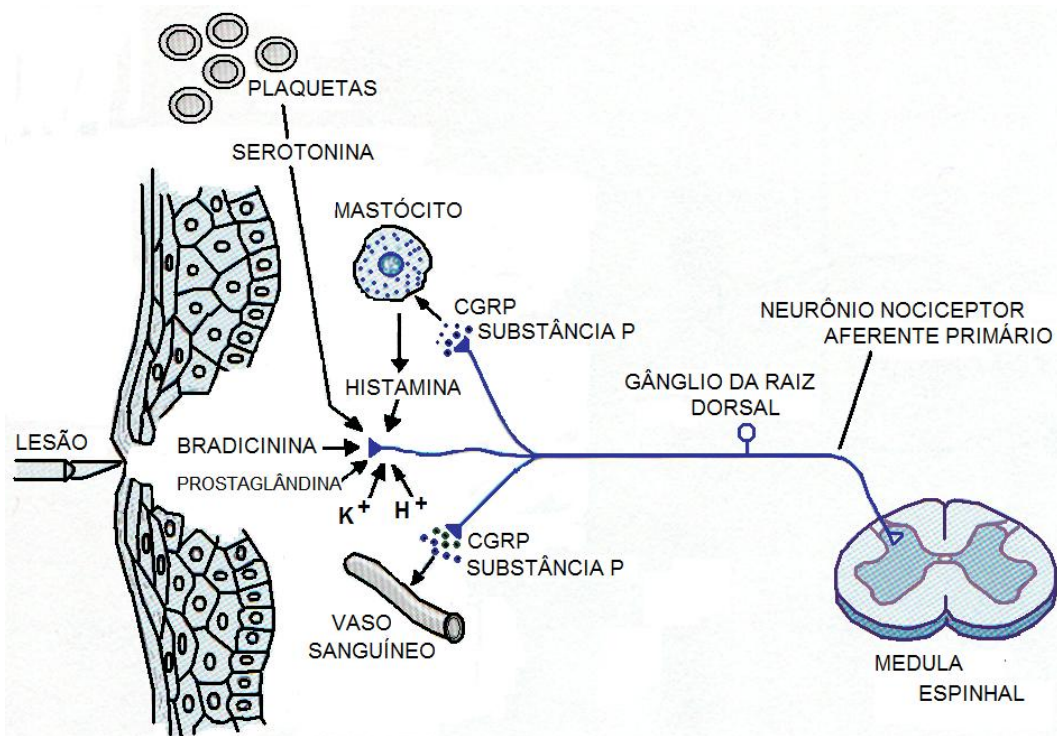


Figura 3: Lesão tissular e ação de mediadores pré-formados (adaptado de NESTLER et al., 2001).

2.6 Neurotransmissores

Os neuropeptídeos são neurotransmissores liberados imediatamente após a estimulação dos nociceptores presentes nas fibras nociceptivas aferentes primários. Estes, por sua vez, podem atuar sobre as próprias células nervosas, regiões medulares específicas, e sobre o tecido adjacente.

Dentre os peptídeos envolvidos no processo inflamatório e que também estão relacionados com a dor podemos citar a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Existem outros mediadores que também modulam a transmissão nociceptiva, dentre os quais, o glutamato (GLU) possui grande importância (Figura 3).

A SP é um peptídeo integrante da família das taquicininas e também está envolvida na transmissão nociceptiva de fibras aferentes primárias, como a fibra do tipo-C (DICKENSON, 1995). É encontrada em altas concentrações nas terminações aferentes da medula espinal, atuando como um mediador da primeira sinapse da transmissão dolorosa (VELÁZQUEZ et al., 1997). Sua atividade é permitida pela interação com receptores NK1 e NK2 (GOUDET et al., 2008; ZHANG et al., 2009). A sua infusão intratecal induz os animais ao comportamento

de lamber, sacudir ou morder o membro administrado, indicando nocicepção, e sugerindo papel estimulatório da via nociceptiva (BJÖRKMAN, 1995).

A lesão tissular desencadeia a síntese e liberação de SP, que produzirá no tecido periférico ações vasculares pró-inflamatórias muito relevantes (FERREIRA, 1995). Ela promove vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, atração de células do sistema imune para o local da lesão e degranulação dos mastócitos com liberação de diversos neuromediadores. Desta forma, a SP contribui para a expansão do processo inflamatório, aumentando do campo receptivo para fibras nervosas adjacentes à área lesionada, contribuindo para o processo de hiperalgesia e alodinia (OTTEN, 1980). A SP, assim como outros neuropeptídeos, aparece também para prolongar as ações do glutamato (KANDEL et al., 2000), (Figura 3).

O CGRP, assim como a SP, é sintetizado e liberado principalmente pelas fibras nociceptivas aferentes primárias do tipo não-mielinizada, como as fibras-C, possuindo ações modulatórias na transmissão nervosa em nível de sistema nervoso central e na inflamação periférica.

Periféricamente, o CGRP é um potente vasodilatador (RANG, 2007), com ações relativamente intensas e de longa duração, contribuindo para o estabelecimento do processo inflamatório (VINCENT, 1992). Apesar de não provocar o extravasamento protéico, o CGRP pode aumentá-lo por favorecer as ações da SP (GREVES, 1985).

O CGRP, na medula espinhal, atua sobre receptores CGRP1 e CGRP2, onde, após uma série de eventos intracelulares, permite a fosforilação de receptores AMPA, que aumenta a excitação neuronal, contribuindo com o estabelecimento da hiperalgesia. Ele facilita a nocicepção por retardar o metabolismo da SP e, também, aumentar a liberação de SP e de glutamato nas terminações centrais das fibras aferentes primárias (OLIVEIRA, 2010).

O GLU é um aminoácido excitatório, que pode ser encontrado em quantidades consideráveis na medula espinhal. É sintetizado e liberado pelas fibras nociceptivas aferentes primárias mielinizadas e não-mielinizadas (HEADLEY; GRILLNER, 1990). Em muitas sinapses a liberação de glutamato é conjunta com a liberação da SP. Aproximadamente 75% da transmissão excitatória no sistema nervoso central é feita pelo glutamato (MAI, 2007).

Três tipos de receptores para o glutamato foram identificados: N-metil-D-aspartato (NMDA), cainato e ácido DL- α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazole-propiónico (AMPA). Os dois últimos receptores são do tipo ionotrópico (BJÖRKMAN, 1995).

A transmissão de estímulos agudos, mecânicos ou térmicos, por fibras do tipo C parece envolver somente o receptor AMPA. Após o receptor NMDA ser ativado, estes estímulos poderão ser prolongados e/ou sua frequência pode ser aumentada pela liberação de transmissores que contribuem para a transmissão nociceptiva, podendo contribuir para a hiperalgesia (DICKENSON, 1995). Existem evidências de que uma retroalimentação positiva, do glutamato nas fibras aferentes primárias, através receptores NMDA pré-sinápticos, contribuiria com a hiperalgesia por garantir um estado de sensibilização central (LIU et al., 1994; 1997; PARADA et al., 2003).

Se a estimulação de fibras-C for repetitiva e/ou de alta frequência (>0,33Hz), desencadeará liberação sustentada de glutamato e neuropeptídeos, como SP e CGRP, na fenda sináptica. Isto irá promover uma ativação persistente de receptores AMPA, especialmente nos neurônios de variação dinâmica ampla (WDR), com conseqüente despolarização progressiva de receptores NMDA. Com isso, há uma resposta ampliada e prolongada aos impulsos nócicos subseqüentes, caracterizando a sensibilização central e permitindo o desenvolvimento da hiperalgesia. (SORKIN; WALLACE, 1999; KHASABOV et al., 2002; D'MELLO; DICKENSON, 2008).

2.7 Dor Inflamatória

Inúmeros mediadores envolvidos no processo inflamatório são responsáveis pelos eventos vasculares da inflamação, podendo, muitos deles estimular os neurônios sensoriais locais, contribuindo para o aparecimento da dor (GILMAN et al., 2006; SPINOSA et al., 2006; RANG et al., 2007; ROTH et al., 2009).

Os mecanismos promotores da dor, atuantes nas diferentes etapas da resposta a estímulos dolorosos, são essencialmente similares entre os animais e o homem, apesar de existir uma idéia de que os animais são mais tolerantes a dor quando comparado aos humanos. Essa idéia deve ser extinta não somente devido aos neurotransmissores compartilharem os

mesmos fundamentos de funcionamento, mas também pelo fato dos mecanismos necessários para desencadear as respostas serem diferentes não somente entre animais e homem, como entre diferentes pessoas (OTERO, 2005).

A dor é uma sensação extremamente importante, pois permite a consciência de que a integridade do organismo está sendo ameaçada ou que corre alguma disfunção (FERREIRA et al., 2010), porém, por outro lado, pode trazer consigo consequências desagradáveis como sofrimento, estresse, prejuízos nas relações sociais e econômicas, devendo, portanto, ser rápida e efetivamente controlada e tratada (LOESER; MELZACK, 1999; BRENNAN et al., 2007).

Especificamente, a dor não é uma resposta somente relacionada à lesão tecidual. Ela possui aspectos subjetivos, referente à experiência dolorosa que passaram a ser cada vez mais considerados (LOESER; MELZACK, 1999). Deste modo, a dor abrange dois componentes: a nocicepção e a percepção. A percepção seria uma função interativa (os aspectos subjetivos) modulada pela emoção, motivação, condição psicológica e história de vida do indivíduo, enquanto a nocicepção resultaria da lesão, com consequente liberação de mediadores inflamatórios e ativação dos sistemas nervosos periférico e central (VERRI et al., 2006). Contudo, estes aspectos subjetivos da dor não são fáceis de serem avaliados em animais, pelo fato de não verbalizarem suas sensações (TJOLSEN; HOLE, 1997; PERL, 2007), obrigando a substituir os termos dor e analgesia, que representam uma experiência subjetiva mais adequadamente empregada para o ser humano, por nocicepção e antinocicepção, quando utilizados para os animais (JONES, 1992; MILANO, 2008). Assim, pode-se dizer que a dor é uma percepção, sendo mais preciso falar de estímulos nociceptivos (noxa: lesão ou dano) nociceptores (receptores para a dor) e vias nociceptivas (PELLEGRINO, 2005).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for the Study of Pain*, IASP) definiu dor como sendo “uma experiência sensorial e/ou emocional desagradável, associada ou não ao dano potencial dos tecidos”. Ela também definiu dor aguda como sendo um desagradável e complexo conjunto de experiências sensoriais, perceptivas e emocionais, relacionadas com respostas autonômicas, produzidas por danos as estruturas somáticas ou viscerais, e a dor crônica, como sendo aquela que persiste ao curso natural de um dano agudo, concomitantemente com processos patológicos duradouros, intermitentes ou repetitivos, no prazo de 3 a 6 semanas ou inclusive meses (OTERO, 2005). Deste mesmo

modo, a IASP redefiniu a sensibilização dos nociceptores em alodinia, que corresponde a uma resposta dolorosa a estímulos inócuos, e hiperalgesia, que seria a resposta dolorosa aumentada à um estímulo previamente doloroso (FERREIRA et al., 2010).

Quando desencadeada pelo processo inflamatório, a dor é resultante, basicamente, da participação de mediadores inflamatórios específicos, oriundos do tecido danificado, com os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos. Estes mediadores podem não somente sensibilizar estes nociceptores, como também pode desencadear a própria resposta dolorosa (HARDY et al., 1950; BJÖRKMAN, 1995).

Esta resposta dolorosa ou simplesmente nocicepção, de maneira geral é decorrente da transformação dos estímulos em potenciais de ação que, a partir das fibras nervosas periféricas, são transferidos para o sistema nervoso central de forma bem organizada (RANG et al., 1991; FERREIRA, 2008). Desta maneira, a dor pode ser resultante da ação de estímulos desencadeantes como químico, térmico ou mecânico, ou de um mediador inflamatório, como a bradicinina, que ativa os neurônios periféricos sensibilizados (HARDY et al., 1950), devendo, ambos, exceder um limiar, para que seja interpretado por este sistema sensorial como nociceptivo (BJÖRKMAN, 1995). Estes estímulos são recebidos pelos nociceptores localizados nas extremidades periféricas das fibras nervosas aferentes, que sofrem modificações funcionais de sua excitabilidade neuronal após o contato com mediadores inflamatórios. Estes mediadores podem ser liberados pelas células danificadas no trauma ou após o reconhecimento de um antígeno no organismo por células residentes, como os macrófagos (FERREIRA, 1993; RIBEIRO et al., 2000).

Então, para que ocorram estas modificações funcionais é necessário que os mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas e aminas simpáticas, atuem em receptores presentes nos neurônios nociceptivos, ativando vias de sinalização intracelular, como a via da adenosina monofosfato cíclico (AMPc); e das proteínas quinases A (PKA) e C (PKC), promovendo a sensibilização neuronal (FERREIRA; NAKAMURA, 1979; TAIWO et al., 1989; ALEY; LEVINE, 1999; ALEY et al., 2000). Estas proteínas quinases quando ativadas, modificam o limiar de ativação de vários canais iônicos, como os de sódio (Na^+), potássio (K^+) e cálcio (Ca^{+2}), induzindo alterações nos potenciais de repouso e diminuição do limiar de ativação da membrana (OKUSE, 2007; FERREIRA et al., 2010). Deste modo, com a sensibilização dos

nociceptores, aumenta-se a probabilidade da ação de estímulos anteriormente inócuos ou pouco efetivos (SCHOLZ; WOOLF, 2002; HOLDEN; PIZZI, 2003; FERREIRA et al., 2010).

Os nociceptores, que permitem a ativação neuronal, estão localizados nas fibras sensoriais periféricas, que por sua vez, dirigem-se ao sistema nervoso central. Com isto, forma-se o sistema nociceptivo, que é um segmento do sistema nervoso que possui fibras nervosas caracteristicamente distribuídas nos tecidos, sendo responsáveis pela informação dolorosa (RANG et al., 1991). Dentre estas fibras, a A-delta ($A\delta$) e a C estão associadas a inflamação e são capazes de transduzir impulsos provenientes de estímulos químicos, térmicos e mecânicos, em impulsos elétricos, que são transmitidos ao sistema nervoso central, após a sua sensibilização. As fibras $A\delta$ são mielinizadas e permitem uma rápida transmissão de estímulos (cerca de 12 a 30 m/segundo) que perdura por um curto período, enquanto que as fibras C, não mielinizadas, transmitem seus impulsos mais lentamente (cerca de 0,5 a 2 m/segundo) por um período mais longo (Figura 4) (RANG et al., 1991; JULIUS; BASBAUM, 2001).

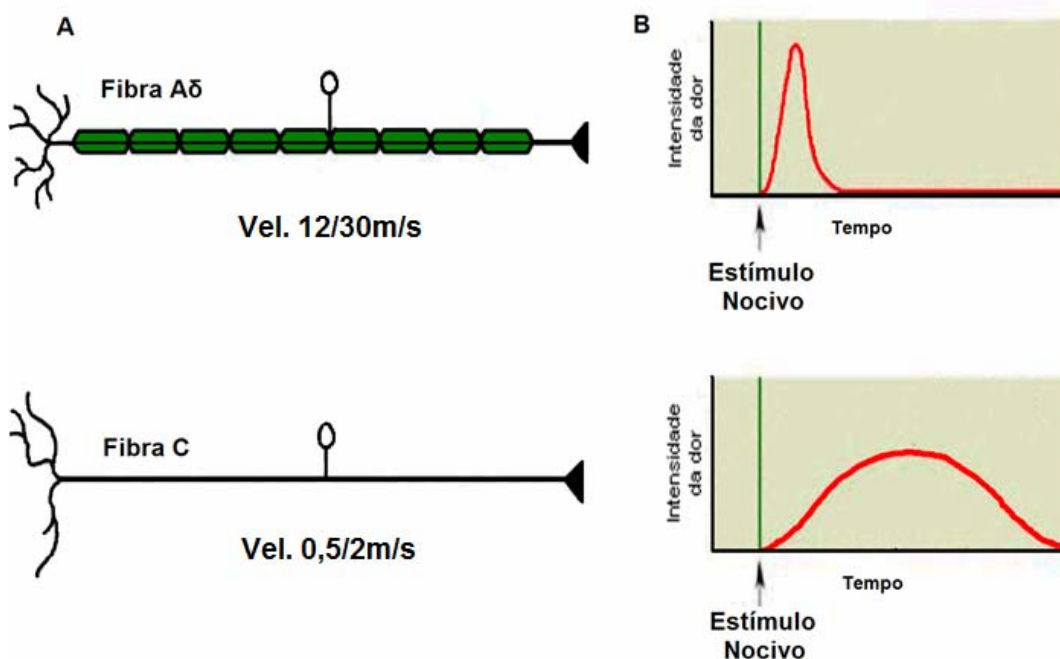


Figura 4: (A) Demonstra a mielinização da fibra $A\delta$, e a desmielinização da fibra C assim como suas respectivas velocidades de condução. (B) A fibra $A\delta$ é responsável pela produção do estímulo doloroso de elevada intensidade por um período curto, enquanto que a fibra C é responsável pela produção do estímulo doloroso de moderada intensidade, porém por um período mais longo.

Estas fibras nervosas, A δ e C, são denominadas de neurônios aferentes primários e possuem seu centro metabólico localizado em seu corpo celular, que por sua vez está presente no gânglio de sua raiz dorsal (GRD). A partir de cada GRD sai um prolongamento axônico que se divide em dois troncos, um se dirigindo para os tecidos periféricos e o outro para a medula espinhal (no caso dos nervos espinhais) ou para o tronco encefálico (no caso dos nervos cranianos) (DEVOR, 1999), de modo que a informação sensorial gerada após estimulação periférica passará pelo GRD e alcançará a medula espinhal pelo seu lado dorsal (Figura 3) comunicando-se com o segundo neurônio (ou neurônio de segunda ordem) em regiões bem específicas do corno dorsal da medula espinhal (MILLAN, 1999). Estes neurônios de segunda ordem projetam seus sinais até neurônios de terceira ordem, em regiões supra-medulares como o bulbo, a ponte, o mesencéfalo, o tálamo e o hipotálamo, que por sua vez levam estes sinais para áreas subcorticais e corticais, onde a dor poderá ser percebida (Figura 5) (LAMONT et al., 2000).

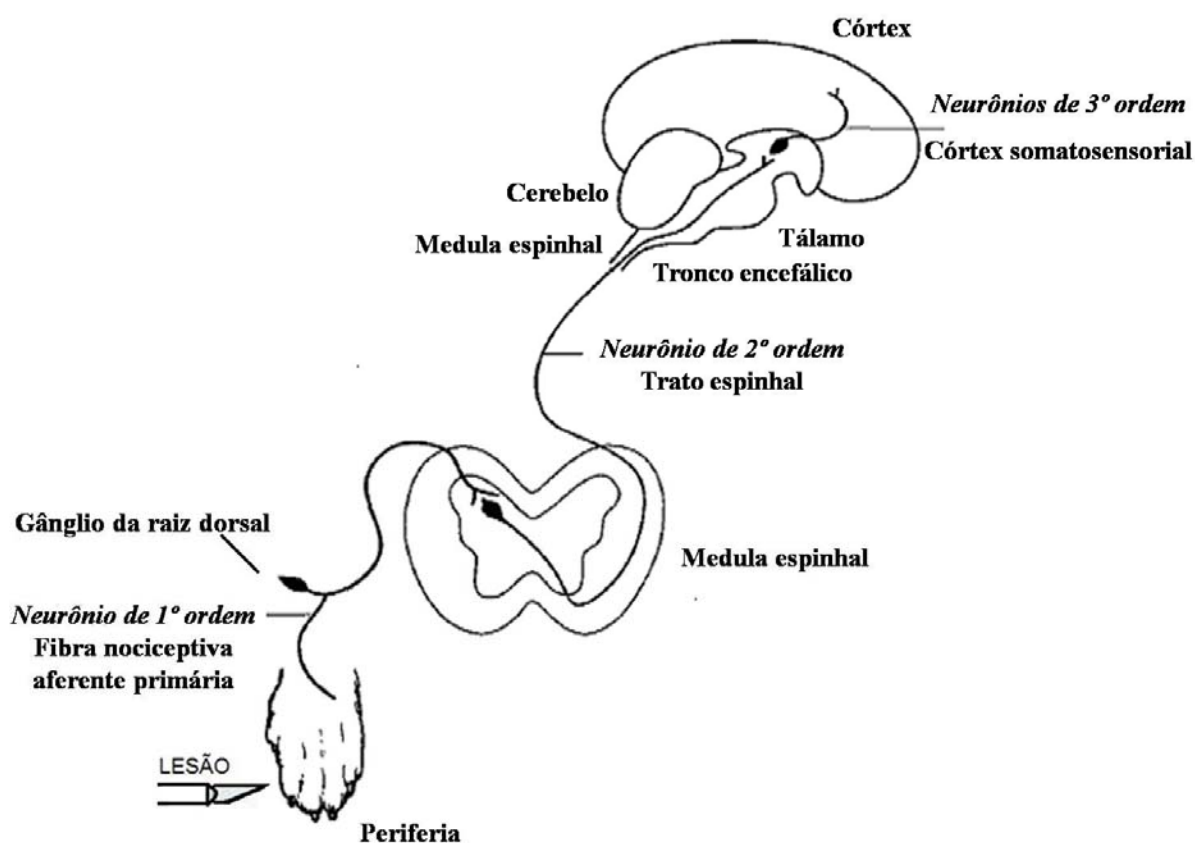


Figura 5: Representação simplificada do processamento nociceptivo como uma cadeia de três neurônios (adaptado de LAMONT et al., 2000).

O corno dorsal ou posterior da medula é dividido com base em critérios citoarquitetônicos em seis lâminas: lâmina I ou zona marginal; lâmina II ou substância gelatinosa; lâminas III e IV (núcleo próprio) bem como, lâminas V e VI (camada profunda). As lâminas I, II e V constituem as regiões predominantemente implicadas na recepção, processamento e transmissão rostral da informação nociceptiva, assim, as fibras C terminam principalmente nas lâminas I e II, enquanto as fibras A δ terminam nas lâminas I e V (Figura 6) (GOMES, 2005). Estas lâminas I e II também são chamadas de lâmina de Rexed (DUBNER; BENNETT, 1983; BESSON; CHAOUCH, 1987).

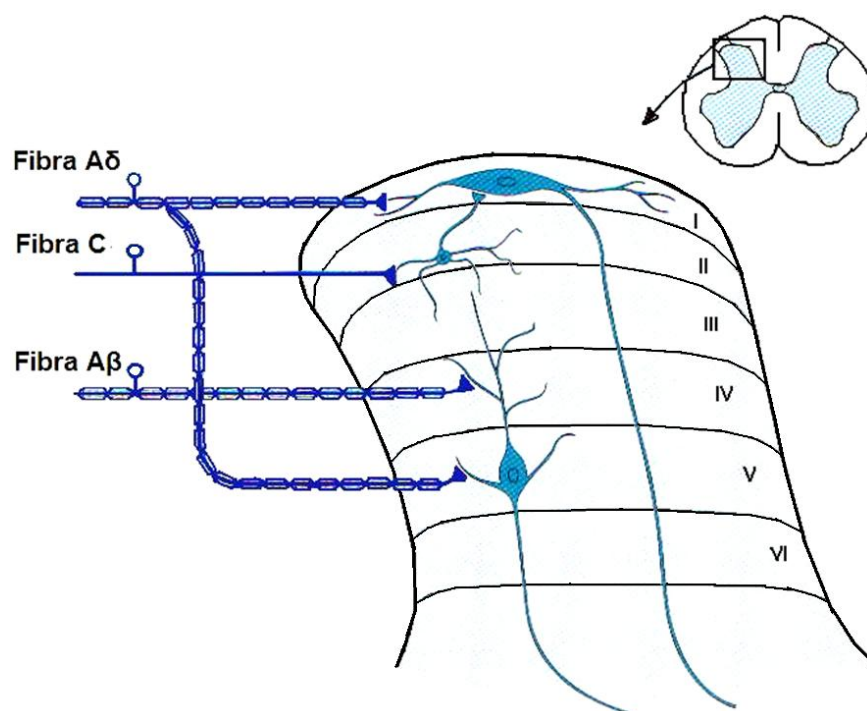


Figura 6: Divisão citoarquitetônica do corno dorsal ou posterior da medula, evidenciando os locais preferenciais de término das fibras aferentes primárias A δ , C e A β (adaptado de NESTLER et al., 2001).

A comunicação entre o neurônio primário e o neurônio secundário se dá por meio da liberação de diferentes neurotransmissores como a substância P, aminoácido excitatório glutamato (GLU) (JU et al., 1987; BATTAGLIA; RUSTIONI, 1988; TRACEY et al., 1991; SMITH et al., 1993), aspartato, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, colecistocinina, galanina, somatostatina (GOMES, 2005) ou por mecanismos ainda não reconhecidos (FERREIRA et al., 2010). Este neurônio secundário faz parte das vias que transmitem o estímulo doloroso da medula até o encéfalo. O trato espinotalâmico ascendente, via mais importante desta transmissão, está localizado na substância branca ventral contralateral ao local de estimulação (BESTER et al., 2000), projetando-se para o tálamo, onde se dá a percepção de que existe uma sensação dolorosa (BEAR et al., 2002).

Sendo assim, o efeito final deste estímulo produz uma resposta comportamental no organismo. Esta resposta pode ser de reflexo, sendo automática e sem intervenções dos centros superiores do sistema nervoso. Por outro lado, ao mesmo tempo uma imagem consciente deste estímulo é produzida, passando assim a atuar com base nessa percepção (PELLEGRINO, 2005). A interpretação ou consciência da experiência da sensação da dor é entendida como função cortical, que analisa a informação recebida em locais especializados em detectar, localizar e determinar a intensidade do estímulo em áreas corticais responsáveis pela interpretação do processo doloroso (FERREIRA et al., 2010).

As modificações funcionais que os mediadores inflamatórios desencadearam nestes neurônios aferentes primários nociceptivos permitem o surgimento da hiperalgesia inflamatória (HARDY et al., 1950). Deste modo, os mediadores inflamatórios responsáveis pela sensibilização e/ou estimulação destas fibras nervosas são divididos em dois grupos: mediadores hiperalgésicos intermediários e os mediadores hiperalgésicos finais. Este primeiro grupo de mediadores é liberado no início e durante a inflamação, sendo também responsáveis pela liberação de outros mediadores intermediários. Já os mediadores do segundo grupo, que interagem diretamente com os receptores específicos nos neurônios aferentes primários, são os responsáveis pelas modificações no limiar de ativação destas células nervosas (FERREIRA; NAKAMURA, 1979; TAIWO et al., 1989; ALEY; LEVINE, 1999; ALEY et al., 2000).

Dentre o grupo dos mediadores hiperalgésicos intermediários com elevada característica inflamatória pode-se citar as citocinas e as quimiocinas (descritas no item 2.4 desta revisão) cuja presença é fundamental para este processo. As citocinas mais importantes na hipernocicepção são o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e as interleucinas 1 (IL-1) e 8 (IL-8) (FERREIRA et al., 1988; CUNHA et al., 1992; FERREIRA et al., 1993; WATKINS et al., 1995). O TNF- α , citocina-chave do processo inflamatório (CUNHA et al., 1992), é o precursor da liberação de IL-1 e IL-8 ou experimentalmente em ratos CINC-1 (CUNHA et al., 1991), que por sua vez, são responsáveis pela liberação das prostaglandinas e aminas simpatomiméticas (VERRI et al., 2006). Além das citocinas e quimiocinas, a bradicinina e os fatores do complemento C3a e C5a, de origem peptídica e provenientes do plasma, também são de grande importância (FERREIRA et al., 2010).

Quanto aos mediadores hiperalgésicos finais, dentre os mais importantes destacam-se, os eicosanóides (prostaglandinas e prostaciclina), os leucotrienos, as aminas simpáticas, o fator de agregação plaquetária (PAF), a histamina e a serotonina (FERREIRA et al., 2010). A nociceção persistente decorrente de lesão tecidual e/ou a observada em processos inflamatórios, onde ocorre estimulação constante dos nociceptores, levará a alterações plásticas no tecido nervoso periférico bem como a nível central (SCHOLZ; WOOLF, 2002; HOLDEN; PIZZI, 2003).

Assim, quando processos inflamatórios não são tratados ou os tratamentos são ineficazes, a dor crônica decorrente contribui para o surgimento da alodinia, que pode ser causada pela reorganização anatômica das fibras A β , que são fibras de baixo limiar responsáveis por detectarem estímulos táteis inócuos. As terminações espinhais das fibras aferentes primárias A β normalmente se localizam em lâminas profundas do corno dorsal da medula. A lesão de fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro ocasiona um brotamento de terminais das fibras A β para a lâmina II, permitindo que neurônios de segunda ordem localizados nesta região da medula espinhal, que fazem sinapse exclusivamente com fibras de alto limiar, passem também a ser ativados por estímulos inócuos (WOOLF; COSTIGAN, 1999; HILL, 2001).

Do mesmo modo, a estimulação excessiva de fibras aferentes e o consequente aumento na produção e liberação de mediadores excitatórios na medula espinhal, induz uma redução do mecanismo inibitório devido à perda de interneurônios inibitórios opioidérgicos e gabaérgicos, amplificando ainda mais o processo doloroso (MILLAN, 1999), gerando um estado de hiperexcitabilidade da via nociceptiva, que contribui para o fenômeno comportamental da alodinia e da hiperalgesia (WOOLF; COSTIGAN, 1999; WOOLF; SALTER, 2000; HUCHO; LEVINE, 2007).

2.8 Compostos Pirazólicos

De origem sintética, os compostos pirazólicos são constituídos em sua estrutura química de um anel pirazolínico. Tal anel é composto por 5 (cinco) membros em seu heterociclo, sendo as posições um e dois ocupadas por dois átomos de Nitrogênio (Figura 7). Estes compostos tem demonstrado eficácia no controle da dor por possuírem atividades anti-

inflamatórias, analgésicas e antipiréticas (BORNE, 1995; GÖRSOY et al., 2000; MILANO et al., 2008; SAUZEM et al., 2008).

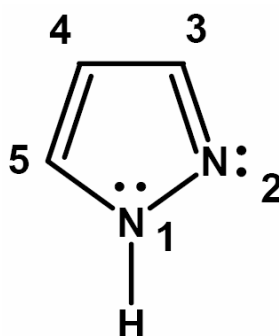


Figura 7: Anel Pirazolínico.

Os compostos pirazólicos foram descobertos no ano de 1884, quando Ludwig Knorr, um químico alemão, tentava sintetizar derivados quinolínicos de atividade antipirética. Acidentalmente se obteve a antipirina, que possui atividades analgésica, antipirética e anti-reumática, porém, com elevada toxicidade. Pouco tempo depois, um derivado 3-metilamino da antipirina foi sintetizado, chamado de aminopirina, sendo utilizado na Europa e nos Estados Unidos como analgésico e antipirético, até surgirem relatos fatais de agranulocitose associados ao uso deste composto (BORNE, 1995). Por estes motivos, até 1940, o interesse por pesquisas com estes compostos foi baixo, até que foi sintetizada uma série de pirazolidinodionas mais seguras (INSEL, 1996).

A fenilbutazona é o representante mais importante dessa série, possuindo alta atividade anti-inflamatória e tem seu uso restrito ao tratamento da espondilite anquilosante em alguns países devido aos seus efeitos colaterais (RANG et al., 2007). Em pacientes tratados com fenilbutazona já foram observados: náuseas, vômitos, desconforto epigástrico e, até mesmo casos de agranulocitose associados a sua utilização (INSEL, 1996).

No ano de 1921, ao se substituir uma das metilas do grupo amino da 5-pirazolona pelo metileno-sulfoxilato de sódio, o laboratório *Hoechst* obteve a Dipirona, outro derivado pirazolínico. Inúmeros estudos em humanos e animais demonstraram que a dipirona possui alto efeito antipirético, com moderada ação analgésica e pouca atividade anti-inflamatória (LECANNELIER, 1976). Devido a seu baixo custo e alta eficácia, a dipirona se tornou popular em países em desenvolvimento e em alguns países da Europa (ARELLANO; SACRISTAN, 1990). Por outro lado, nos Estados Unidos a sua utilização foi proibida devido a casos relacionados com agranulocitose (INSEL, 1996). Apesar da controvérsia em relação à

segurança do uso clínico da dipirona, ela é um derivado pirazólico largamente utilizado para o controle da dor e muitos estudos são empregados objetivando caracterizar o mecanismo de ação da dipirona (SAUZEM, 2004).

Após a descoberta da dipirona, vários compostos contendo o anel pirazol continuaram a ser estudados, como os estudos realizados por Oshima e colaboradores (1969), quando o 1(4-metoxi-6-metil-2-pirimidinil)-3-metil-5-metoxipirazol e mais 43 análogos deste composto, tiveram avaliadas as suas atividades farmacológicas, principalmente em relação aos seus efeitos analgésicos. Deste modo, os autores observaram que derivados de 1-pirimidinilpirazol são iguais ou mais potentes que a aminopirina, enquanto que a 2-pirimidinilpirazol apresenta atividade analgésica muito menor. Porém, em relação à toxicidade, ao comparar a DL50, observou-se que os derivados pirazólicos são menos tóxicos, concluindo-se que compostos contendo grupamento metoxi na posição 5 do anel pirazol apresentam ação analgésica, antipirética e anti-inflamatória mais pronunciada.

Inúmeros estudos demonstram que pirazolininas administradas no sistema nervoso central, mais especificamente na medula espinhal, produz antinocicepção (YAKSH; HAMMOND, 1982; TAIWO; LEVINE, 1988; BJÖRKMAN, 1995; TORTORICI et al., 1996; HERNANDEZ; VANEGAS, 2001; OCHI; GOTO, 2001). Ações antinociceptiva foram observadas em camundongos quando se utilizou uma série de pirazol 4-acil-arilhidrazonas em testes de contorções abdominais induzidas pela acetilcolina, sendo encontradas potências dez vezes maiores que a dipirona nos compostos que apresentavam os substituintes *p*-N(CH₃), ou *m*-OH e *p*-OCH₃ no anel aromático acil-hidrazona (MATHEUS et al., 1991).

Estudos de Tsuji e colaboradores (1997) avaliaram o potencial anti-inflamatório do 3-(difluormetil)-1-(4-metoxifenil)-5-[4-(metilsulfinil)fenil] pirazol (FR140423). Por inibir a COX II, este composto revelou possuir ações anti-inflamatórias (OCHI et al., 1999a), e ao inibir a nocicepção no modelo de estímulo térmico do *tail-flick*, efeito antagonizado pela administração de naloxona, um antagonista de receptor opióide, indicou a participação de diferentes mecanismos na nocicepção (OCHI et al., 1999b). Deste modo, o FR140423 além de agir em tecidos inflamados, possui alguma interação com o sistema opióide (OCHI et al., 1999c).

Outro composto do grupo, o 3-metil-5-hidróxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1*H*-1-piraxolcarboxiamida (MPCA), demonstrou ações antinociceptiva nas duas fases do teste da formalina, fase neurogênica e fase inflamatória, levando a acreditar que este composto não exerce ações sobre receptores opióides devido a não reversão de seus efeitos após aplicação da naloxona (SOUZA et al., 2001). Outros resultados mostraram que o MPCA e seu análogo 3-phenyl-5-hidróxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1*H*-1-piraxolcarboxiamida (FPCA) exercem suas atividades em receptores serotoninérgicos e α_2 -adrenérgico espinhais, pois a antinocicepção causada foi evitada com o uso intratecal de metisergida e ioimbina (GODOY et al., 2004). O MPCA e FPCA revertem a febre em camundongos induzidos pelo lipopolissacarídeo (LPS), sendo a administração sistêmica capaz de reverter a febre em um intervalo de uma hora e em duas horas (h), quando a administração foi feita diretamente a nível central, sugerindo que estes pirazóis necessitariam de metabolização prévia para uma ação mais rápida. O MPCA e FPCA não possuíram atividade antinociceptiva no teste de imersão da cauda em água a 55°C (SOUZA et al., 2002). Por outro lado, o 3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1*H*-1-metilpirazol (PZ 2) e um análogo 3-etoximetil-5-etoxicarbonil-1*H*-1-fenilpirazol (PZ 3), diferentemente do MPCA e FPCA, promoveram antinocicepção no teste de imersão da cauda em água a 55°C (TABARELLI et al., 2004).

O composto 2-[5-triclorometil-5-hidróxi-3-fenil-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-il]-4-(4-bromofenil)-5-metiltiazol (B50) é um derivado pirazol-tiazol que apresenta efeitos dose dependentes no teste das contorções abdominais induzida pelo ácido acético, porém, não apresentou atividade antinociceptiva no teste de imersão da cauda, assim como o MPCA. Este efeito antinociceptivo obtido pelo B50 foi evitado após a administração de naloxona, um antagonista não seletivo de receptores opióides, o que não ocorreu após a utilização de norbinaltorfimina, um antagonista de receptores κ -opióide, demonstrando não ocorrer envolvimento dos receptores κ -opióide na antinocicepção promovida pelo B50 (PROKOPP, 2004).

O 4-metil-5-hidroxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazolcarboxamida (NF0) e o 3-metil-5-hidroxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1*H*-1-pirazolcarboxamida (NF2), dois compostos inéditos, demonstraram atividades antinociceptivas. O NF0 foi efetivo ao inibir as duas fases de nocicepção do teste da formalina, porém o NF2 apenas promoveu antinocicepção na fase inflamatória. Esses compostos foram ativos no teste da formalina, porém, para o NF0, o envolvimento de mecanismos opióides não foi evidenciado, pois sua atividade não foi

prevenida pelo pré-tratamento com naloxona. O NF0 e o NF2 não apresentam efeitos antinociceptivos nos testes da placa quente e das contorções abdominais e também não influenciaram o edema de pata induzido pela carragenina em ratos (SAUZEM, 2004).

Com a proposta de se desenvolver novas drogas anti-inflamatórias, numa primeira etapa desse estudo foram obtidos diferentes compostos pirazólicos através do processo de síntese orgânica. Esta etapa foi realizada na faculdade de farmácia da Universidade Federal Fluminense, sob a coordenação dos professores Dr. Antônio Carlos Carreira Freitas e João Carlos Martins Mafra. Levando-se em conta a simplicidade e o baixo custo do processo, a estabilidade, bem como a solubilidade dos compostos sintetizados, foi selecionado o composto 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP. A etapa seguinte envolveu a investigação de atividades farmacológicas do composto pirazólico selecionado, DHP, que através desta dissertação de mestrado, objetivou avaliar suas propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória, utilizando diferentes modelos farmacológicos em camundongos e ratos.

Com base nestas evidências, e pela importância de se descobrir analgésicos e anti-inflamatórios eficientes e de poucas reações adversas, inúmeros compostos heterocíclicos tem sido sintetizados e estudados quanto a sua atividade biológica (GOEL; MADAN, 1995; BONACORSO et al., 1999; SOUZA et al., 2001).

3 OBJETIVOS

Avaliar os potenciais analgésico e anti-inflamatório do composto pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP em diferentes modelos farmacológicos em camundongos e ratos.

4 JUSTIFICATIVAS

Determinar, através dos resultados obtidos com as avaliações farmacológicas do composto DHP, se será justificável a realização de futuros estudos farmacodinâmicos, farmacocinéticos, de toxicidade e clínicos.

Essa contribuição esta direcionada para a busca e a obtenção de novos fármacos que possuam potencia anti-inflamatória, baixa incidência de efeitos colaterais e que apresentem favorável custo comercial, podendo assim representar avanços, como uma nova alternativa na clínica médica veterinária, no tratamento da dor e de doenças inflamatórias.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Para realização dos experimentos foram utilizados ratos (*Ratus norvegicus*) variedade Wistar pesando entre 250 e 300g e camundongos (*Mus musculus*) variedade Swiss pesando entre 25 e 30g, machos e adultos fornecidos pelo biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Estes animais foram mantidos sob iluminação controlada em um ciclo claro/escuro de 12/12h e com alimentação composta por água e ração *ad libitum*.

Respeitando um período mínimo de uma hora para adaptação dos animais ao laboratório, os experimentos foram realizados entre 07:00h e 19:00h, e após as avaliações experimentais os animais foram sacrificados por anestesia etérea profunda.

Para realização destes experimentos envolvendo dor, foram seguidas normas que envolvem cuidados com animais de laboratório e normas éticas (ZIMMERMANN, 1983; 1986; PORTER, 1992). No mesmo sentido, esforços foram feitos objetivando minimizar o número de animais utilizados, assim como, seu desconforto. Toda a metodologia foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa e Experimentação em Biologia, sob o protocolo 011/2007/CEPEB, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

5.2 Drogas, Reagentes, Solventes e Sais

Composto 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP (composto químico fornecido pelo Prof. Dr. Antônio Carlos Carreira Freitas e João Carlos Martins Mafrá, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense), citrato de fentanila (Fentanest[®], Cristalia Prod. Quim. Farm., São Paulo, Brasil), dexametasona (Decadron[®], Aché Lab. Farm., São Paulo, Brasil), óleo de cróton, carragenina, indometacina, heparina e Tween[®] 80 (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), acetona, formalina, solução de Türk e ácido acético glacial (Merck AG, Darmstadt, Germany), associação de benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina potássica, de diidroestreptomicina base sulfato e estreptomicina base sulfato (Pentabiótico veterinário[®], Fort Dodge Sacede Animal Ltda, São Paulo, Brasil), solução de

iodo-povidona 10% tópico (Riodeíne[®], Laboratório Ind. Farm. Rioquímica Ltda, São Paulo, Brasil), diazepam (Sigma Pharma Ltda, São Paulo, Brasil), cloridrato de ketamina (Dopalen[®], Sespo – Divisão Vetebrands Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (Anasedan[®], Sespo – Divisão Vetebrands Saúde Animal, São Paulo, Brasil).

Para os tratamentos realizados nos animais, utilizando o veículo (água + Tween[®] 80 a 0,5%) para os animais controles, os fármacos (dexametasona, fentanil e indometacina) para o controle positivo ou o composto pirazólico DHP a ser avaliado, estabeleceu-se concentrações adequadas de modo a permitir a administração de um volume constante de 10mL/kg para camundongos e para ratos.

As administrações realizadas com o veículo, com o composto pirazólico DHP e com a indometacina ocorreram pela via oral, a dexametasona e o fentanil foram injetados pela via subcutânea, o ácido acético e a carragenina foram injetados pela via intraperitoneal, a formalina foi injetada pela via intraplantar, o óleo de cróton e a solução de iodo-povidona foram aplicados topicamente e a antibioticoterapia profilática foi realizada pela injeção intramuscular.

Para a administração pela via oral, a solubilização do composto DHP em água, foi procedida com a utilização de solução de Tween[®] 80 a 0,5%. Solução de salina a 0,9% foi necessária para se obter a solução de ácido acético a 1,2%, a solução de formalina a 2,5% e a solução de carragenina a 1%, e a acetona foi utilizada para a preparação do óleo de cróton a 2,5%.

5.3 Avaliação da Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória em Camundongos

5.3.1 Teste das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

Seguindo a metodologia descrita por Koster e colaboradores (1959), foram divididos 5 grupos experimentais com 6 camundongos, tratados oralmente com veículo (água), o composto pirazólico (1, 3 ou 10mg/kg) ou com a indometacina (10mg/kg), controle positivo do teste.

Após 60 minutos (min) dos tratamentos, em todos os animais se injetou ácido acético diluído em salina (1,2%; 100mL/10g, *i.p.*) e durante 30min, foram contadas as contorções abdominais (ILUSTRAÇÃO 1), entendidas como a contração da parede abdominal seguida pela extensão de pelo menos uma das patas posteriores (VACHER et al., 1964).

Antes da injeção do ácido acético, funis de vidro foram colocados sobre cada camundongo, aguardando sempre um período de 15min para sua adaptação. Os resultados foram expressos como as médias dos números de contorções acumuladas durante os 30min da avaliação experimental ou pela porcentagem de inibição das contorções comparativamente ao grupo controle, que permitiu determinar a dose inibitória 50% (ID50).

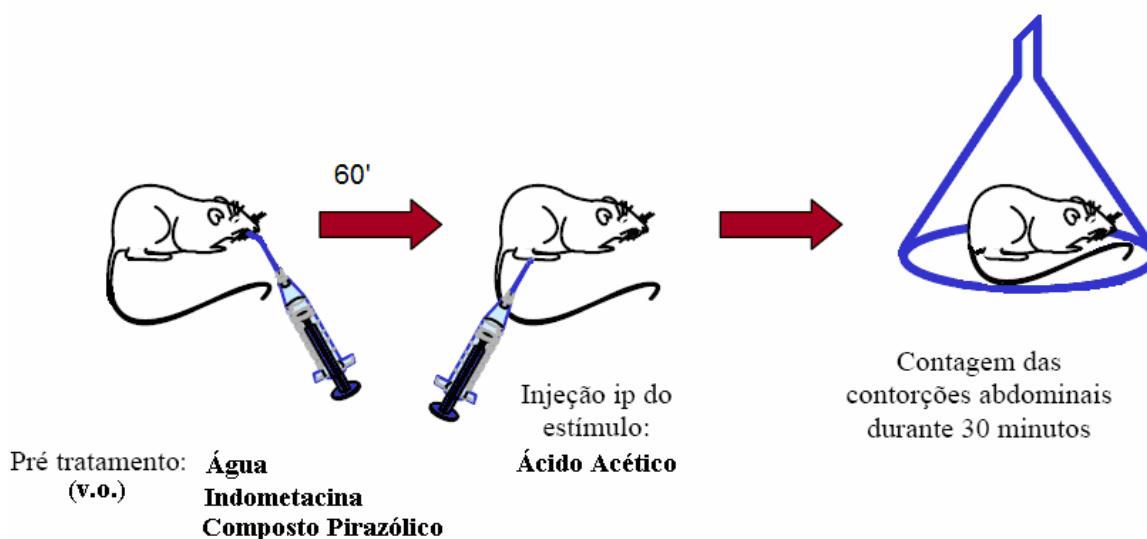


Ilustração 1: Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético (Adaptado de VALE, 2000)

5.3.2 Teste do *rota-rod*

Este método permite avaliar a especificidade da ação antinociceptiva de drogas, verificando se estas promovem incoordenação motora nos animais, seja por sedação e/ou por relaxamento muscular (DUHAM; MYIA, 1957). O aparelho é constituído de uma barra de 2,5 cm de diâmetro, subdividida em 5 compartimentos e girando a 12 r.p.m. a 25 cm de altura (Ilustração 2). Os animais foram selecionados em sessões de 1min de duração antes dos tratamentos, sendo escolhidos aqueles que permaneceram na barra giratória durante este período.

Grupos com 10 animais selecionados que foram colocados no *rota-rod* por 1min, após 60min do tratamento pela via oral com o veículo ou o composto DHP (10mg/kg), e 30min para o tratamento do grupo controle positivo do teste, diazepam (3mg/kg, *s.c.*), sendo avaliado o número de quedas e o tempo de permanência na barra giratória.

5.3.3 Teste de *Tail-flick*

Seguindo a metodologia descrita por D'Amour e Smith (1941), este ensaio permite o estudo de drogas com atividades semelhante aos opióides, mediante a avaliação do tempo, em segundos (s), que o animal leva para retirar a cauda do local de incidência de um estímulo térmico doloroso. Este estímulo nociceptivo foi produzido por um foco de luz convergente na cauda, obtido de um analgesímetro térmico (modelo *tail flick* 7360 V-115, Ugo-Basile).

Grupos experimentais de 8 camundongos foram previamente selecionados quanto a sua reatividade ao estímulo térmico nociceptivo, não sendo utilizados animais cujo tempo de resposta foi superior a 8s. A reatividade foi medida a cada 30min, iniciando-se 30min antes e prolongando-se por 150min após a administração oral do veículo (água), do composto pirazólico DHP (10mg/kg) ou subcutânea de fentanil (200µg/kg, *s.c.*), utilizado como controle positivo do ensaio. Após os tratamentos, foi estabelecido o período máximo de latência de 30s a fim de se evitar lesão tecidual.

5.3.4 Teste da Formalina

Grupos de camundongos (n = 6 a 10) foram tratados pela via oral com o veículo (água), com o controle positivo indometacina (10mg/kg) ou com o composto pirazólico DHP 10mg/kg. Uma hora após os tratamentos os animais receberam a administração intraplantar de 20µL de solução de formalina a 2,5% sob o coxim plantar da pata traseira direita.

Imediatamente após, foi cronometrado o tempo, em segundos, que os animais manifestaram sinais dolorosos, através de lambeo, sacudir ou morder a pata injetada. Estes sinais são respostas nociceptivas promovidas pela formalina durante duas fases (DUBUISSON; DENNIS, 1977). A primeira fase de nocicepção ou inicial, que varia de zero a 5min após a injeção, chamada de neurogênica, na qual os nociceptores são ativados por mediadores pré-formados e a segunda fase de nocicepção ou tardia, conhecida como fase

inflamatória e avaliada entre 15 e 30min, onde o comportamento observado é resultante da ação de mediadores inflamatórios sintetizados e liberados após o estímulo promovido pelo formaldeído (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

5.3.5 Teste do Edema de Orelha Induzido por Óleo de Cróton

Grupos experimentais contendo 8 camundongos foram tratados com o veículo (água, *p.o.*), dexametasona (2mg/kg, *s.c.*), controle positivo do ensaio, ou com o composto pirazólico DHP (10mg/kg, *p.o.*). Uma hora após os tratamentos com veículo ou com o composto pirazólico, e 30min para o grupo tratado com dexametasona, foram aplicados topicamente 10 µL de óleo de cróton (2,5% v/v em acetona) na orelha direita e 10 µL de acetona na orelha esquerda. Quatro horas após, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e de suas orelhas, esquerda e direita, foi retirado um fragmento de 6 mm de diâmetro, sendo estes pesados em balança analítica. Os resultados foram expressos como médias e erros padrões da diferença de peso, em miligramas (mg), entre as orelhas direita e esquerda (Δ) (TUBARO et al. 1986; ZANINI et al. 1992).

5.3.6 Teste da Peritonite Induzida por Carragenina

A peritonite induzida pela carragenina avaliou a migração leucocitária para a cavidade peritoneal, conforme o método descrito por Ferrándiz e Alcaraz em 1991.

Para cada grupo experimental de 8 camundongos, foram realizados os seguintes tratamentos: veículo (água, *p.o.*), dexametasona (2mg/kg, *s.c.*) ou o composto pirazólico DHP (3, 10 e 30mg/kg, *p.o.*). Sessenta minutos após estes tratamentos, foi injetado nestes animais 10 µL/g de carragenina (1% em salina), pela via intraperitoneal. Decorridos 4h, os animais foram sacrificados sob anestesia etérea profunda e foi injetado em sua cavidade peritoneal 2 mL de PBS heparinizado (10UI/mL) seguida por 50 compressões leves no abdômen, que antecederam a coleta do fluido peritoneal. A amostra retirada foi diluída em solução de Türk (1:20) e a contagem celular realizada em câmara de Neubauer. Foram expressos como resultados, as médias dos números de leucócitos totais ($\times 10^6$ /mL) de cada grupo experimental ou a percentagem de inibição da migração de leucócitos comparativamente ao grupo experimental controle.

5.4 Determinação da Nociceção Relacionada ao Modelo de Indução em Ratos

5.4.1 Delineamento Experimental

Foram divididos três grupos experimentais, de modo que um grupo foi incisado e tratado com composto pirazólico DHP (10mg/kg) e os outros dois grupos destinados aos controles, foram tratados com veículo, sendo somente um desses grupos controles submetido à incisão.

Em todos os grupos os testes de nociceção foram realizados, mantendo-se sempre os mesmos intervalos, seja para a avaliação da alodinia mecânica (*von Frey*) ou hiperalgesia térmica (*Hargreaves*), cuja etapas são descritas a seguir e apresentadas na Figura 8:

1ª ETAPA (Nociceção basal e cirurgia): os animais foram submetidos a testes de nociceção para a obtenção de valores basais de latência, expressos em gramas para o método *von Frey* e em segundos para o teste de *Hargreaves*. Após essa determinação, os ratos foram operados com a técnica de incisão na região plantar, o que não ocorreu com o grupo de animais destinados ao controle não incisado. Para a determinação da evolução da alodinia mecânica e da hiperalgesia térmica, foram realizadas nos três dias subsequentes à cirurgia, avaliações nos dois modelos de nociceção (Figura 8).

2ª ETAPA (Tratamentos e avaliação da hipersensibilidade e alodinia): no terceiro dia após o início da 1ª etapa foram procedidos os tratamentos, de modo que o composto pirazólico DHP (10 mg/kg, *p.o.*) foi administrado em um grupo incisado e o veículo (água) no grupo não incisado e no outro grupo incisado. Após 30min, 1, 3, 6, 9, 12 e 24h dos tratamentos, foram efetuadas avaliações que permitiram determinar a efetividade analgésica do composto.

3ª ETAPA (Avaliação da hipersensibilidade e alodinia tardia): Nesta etapa, as avaliações nociceptivas feitas nos 7º, 10º e 14º dia pós-incisão, objetivou o acompanhamento do curso da hiperalgesia e da alodinia até o possível retorno a valores semelhantes aos basais.

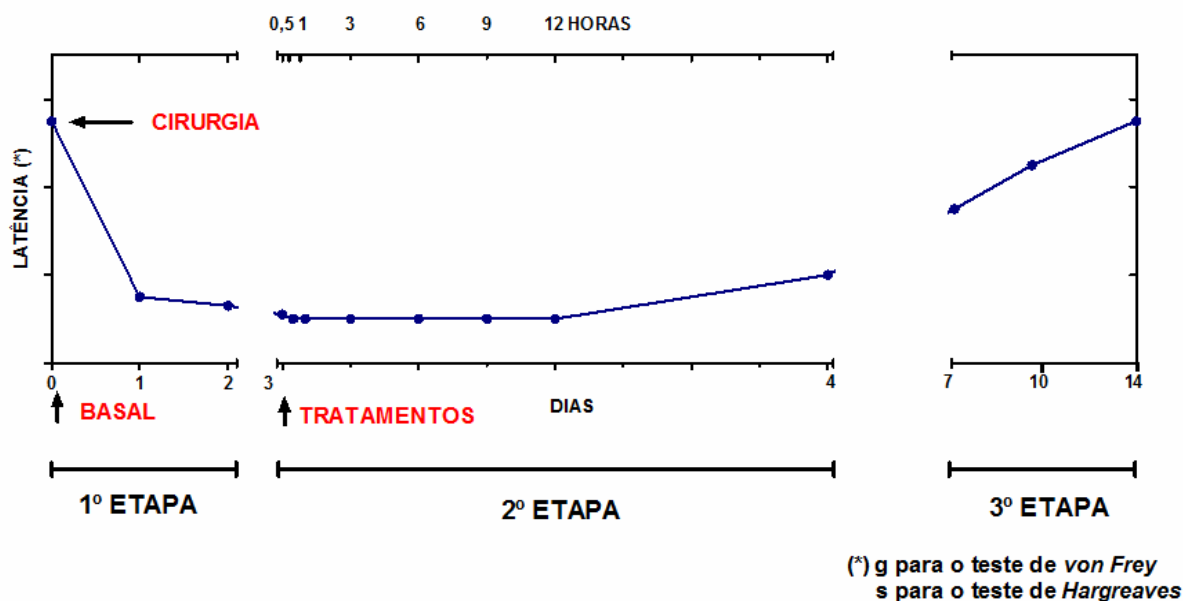


Figura 8: Protocolo experimental proposto para a avaliação da influência do o composto pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP, na alodinia mecânica (*von Frey*) e na hiperalgesia térmica (*Hargreaves*).

Após a obtenção das medidas de latências para os métodos *Hargreaves* (segundos) e *von Frey* (gramas) os resultados foram expressos, respectivamente, como porcentagem de reversão da hiperalgesia (%RH) ou porcentagem de reversão da alodinia (%RA), sendo este cálculo obtido através da fórmula:

$$\% \text{ RH ou RA} = \frac{\text{Latência pós-tratamento (GDHP)} - \text{Latência pré-tratamento (GIV)} \times 100}{\text{Latência basal (GINV)} - \text{Latência pré-tratamento (GIV)}}$$

Deste modo, a latência pós-tratamento representa os valores observados no grupo de animais incisados e submetidos ao tratamento com composto pirazólico (GDHP), a latência basal e latência pré-tratamento indicam, respectivamente, os resultados obtidos no grupo não-incisado (GINV) e no grupo incisado (GIV), ambos tratados com veículo. Nas diferentes etapas experimentais e para os três grupos, foram considerados em média, as latências das avaliações de 10 animais para o teste de *von Frey* e de 8 animais para o teste de *Hargreaves*.

5.4.2 Procedimento Cirúrgico

A cirurgia realizada seguiu-se o método descrito por Brennan e colaboradores (1996). Os animais foram anestesiados com uma associação de quetamina (50mg/kg) e xilazina

(5mg/kg), administrados pela via intraperitoneal. Um pentabiótico veterinário foi administrado em todos os animais operados, na dose de 0,5mg/kg, por via intramuscular, seguido por procedimentos de antissepsia e utilizando solução de iodo-povidona 10% tópico para a preparação da região plantar do membro posterior direito.

Após isolar o membro utilizando um pano de campo estéril, foi feita uma incisão na pele e fáscia da musculatura plantar, a partir de 0,5cm da borda do calcanhar e de, aproximadamente, 1 cm de comprimento que se estendeu em direção ao dedos. Na sequência, a musculatura plantar foi divulsionada e elevada, permitindo sua incisão longitudinal, mantendo intacta a sua origem e inserção. Após promover hemostasia compressiva, pressionando delicadamente o membro, a pele foi suturada com dois pontos de fio cirúrgico de nylon 5-0. Para a recuperação da anestesia, individualmente os animais foram acondicionados em novas caixas de acrílico, aquecidas sob fonte de luz incandescente, com maravalha nova cobertos por toalha de papel.

5.4.3 Avaliação da Alodinia Mecânica

Esta avaliação foi realizada seguindo descrição de Möller e colaboradores (1998), pelo teste de pressão crescente na pata, também conhecido como método *von Frey* eletrônico (VON FREY, 1896). É bastante utilizado em experimentos laboratoriais com objetivo de avaliar drogas em relação à sensibilidade nociceptiva em animais de laboratório. Esta avaliação baseia-se na observação da sensibilidade tecidual a um estímulo mecânico.

Foi utilizado um analgesímetro digital modelo EFF 302 (Insight[®]), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expresso em gramas (g), com precisão de 0,1g. Para o contato do transdutor de pressão com a pata dos animais, foi adaptada uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5 mm de diâmetro. Assim, uma pressão manual e linearmente crescente, realizada na região plantar da pata dos animais, foi proporcionada por intermédio desta ponteira adaptada, de maneira a produzir uma resposta característica de retirada da pata estimulada (*flinch*).

As caixas de acrílico, utilizadas para o acondicionamento dos animais durante as avaliações, foram acomodadas sobre uma estante que fornece como assoalho uma rede de malha de 5 mm² (tipo tela) confeccionada de arame não maleável de 1 mm de espessura. Esta

estante permite a utilização de um espelho, acoplado 25 cm abaixo das caixas, com inclinação de aproximadamente 35 graus, possibilitando a visualização das plantas das patas dos animais.

Após um período de 5min para a adaptação dos animais às caixas, o comportamento nociceptivo foi obtido através da média de três valores expressos em gramas, representando a latência de retirada da pata ao estímulo mecânico, para cada tempo e momento de avaliação.

5.4.4 Avaliação da Hiperalgisia Térmica

Este teste consiste na observação da retirada da pata traseira por aplicação de fonte de luz infravermelha (HARGREAVES et al., 1988), usando um analgesímetro térmico modelo 7360 V-115 (Ugo-Basile).

Manualmente, cada animal foi contido e cuidadosamente colocado sobre o aparelho, de modo que a região plantar de sua pata traseira ficasse posicionada sobre a fonte da luz infravermelha com potência previamente estabelecida de 50 watts. Na sequência, já com o animal posicionado, a luz infravermelha foi acionada juntamente com um cronômetro eletrônico, possibilitando a contagem do tempo simultaneamente ao estímulo, até que o animal retirasse sua pata, encerrando a contagem.

Foi atribuído o limite máximo de 20 s para a exposição da pata ao raio infravermelho, evitando possíveis danos teciduais. Em cada animal foram realizadas duas medidas, sendo estas obtidas em intervalos entre 5 a 10min. A média destas medidas representou a latência de retirada da pata, sendo expressa em segundos, para os diferentes tempos e momentos da avaliação.

5.5 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média mais ou menos o erro padrão. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas pela análise de variância (ANOVA). Para comparação entre as médias dos grupos experimentais utilizou-se o teste “*t*” não pareado, admitindo diferença significativa a partir de $p < 0,05$ (SOKAL; ROHLF, 1981). A análise estatística e apresentação gráfica dos resultados foram realizadas através do programa GraphPad Prism 5.0.

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação da Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória em Camundongos

6.1.1 Teste das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

Os tratamentos pela via oral com o composto DHP (1, 3 e 10mg/kg) reduziu, de forma dose dependente, o numero de contorções abdominais após sessenta minutos da administração. Deste modo, foram observadas, reduções de 41,3% ($22,0 \pm 4,0$ contorções), 62,7% ($14,0 \pm 5,0$ contorções) e 76,0% ($9,0 \pm 3,4$ contorções) quando comparado ao grupo tratado com veículo ($37,5 \pm 4,5$ contorções). O grupo controle positivo tratado com indometacina (10 mg/kg, *p.o.*) produziu inibição de 68,8% ($11,7 \pm 3,6$ contorções (Tabela 1 e Figura 9). A dose inibitória 50%, obtida por interpolação foi de 1,29 mg/kg, *p.o.* (Figura 10).

Tabela 1: Influência do pré-tratamento com o composto pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP no número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (1,2%; 100µL/10g, *i.p.*). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

| Tratamentos | Doses (mg/kg, <i>p.o.</i>) | Contorções Abdominais (30min) | % Inibição |
|-------------|-----------------------------|-------------------------------|------------|
| Veículo | - | $37,5 \pm 4,5$ | - |
| DHP | 1 | $22,0 \pm 4,0$ | 41,3 % |
| DHP | 3 | $14,0 \pm 5,0$ | 62,7 % * |
| DHP | 10 | $9,0 \pm 3,4$ | 76,0 % ** |
| Indo | 10 | $11,7 \pm 3,6$ | 68,8 % ** |

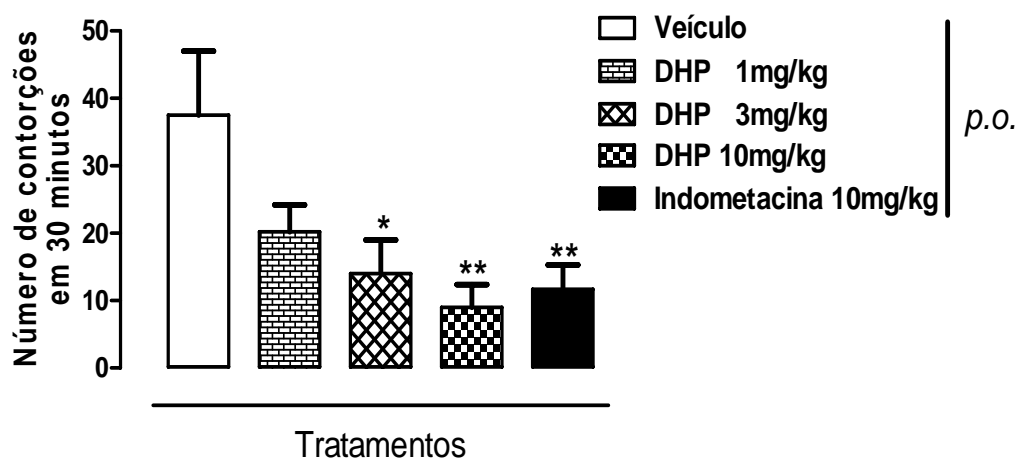


Figura 9: Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (1,2%; 100µL/10g, *i.p.*). As colunas e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão em grupos experimentais de 6 animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

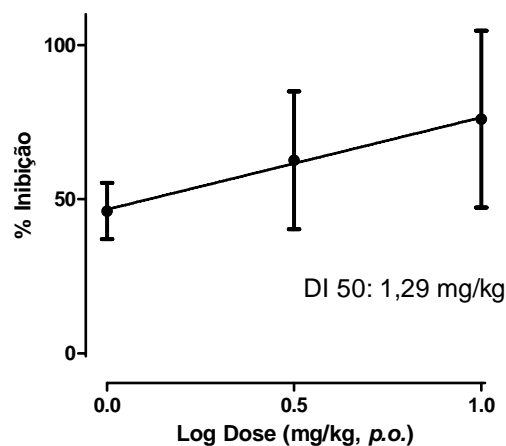


Figura 10: Relação dose-efeito inibitória pelo método de contorções abdominais induzido por ácido acético em camundongos previamente tratados pela via oral com o composto pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP, nas doses de 1, 3, e 10mg/kg. Os símbolos e linhas verticais representam as médias \pm o erro padrão para grupos experimentais de 6 animais.

6.1.2 Teste do *rota-rod*

Os camundongos tratados pela via oral com o veículo, ao serem colocados na barra giratória por 1 minuto, apresentaram $1,7 \pm 0,4$ quedas e se equilibraram por $54,7 \pm 2,7$ s, sendo obtido resultado semelhante ao verificado com o grupo de animais administrados com o composto DHP (10mg/kg) que tiveram $1,8 \pm 0,5$ quedas e permaneceram por $52,1 \pm 1,5$ s no *rota-rod* (Tabela 2), indicando que o tratamento com o DHP não produz perda da coordenação motora dos animais. Entretanto, a injeção do diazepam (3mg/kg, *s.c.*), controle positivo do teste, ampliou de forma significativa o número de quedas ($6,2 \pm 0,6$) e reduziu o tempo de permanência ($38,9 \pm 5,9$ s) na barra giratória.

Tabela 2: Influência do pré-tratamento com o composto pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP (10mg/kg, *p.o.*) na atividade motora de camundongos (médias \pm erro padrão) avaliada pelo número de quedas e o tempo de permanência sob a barra giratória, durante 60s no teste do *rota rod*. * $p < 0,05$, e *** $p < 0,001$ n = 10 animais.

| TRATAMENTOS | CONTAGEM | |
|---------------------------------|-------------------|---------------------------------|
| | Nº DE QUEDAS | TEMPO DE PERMANÊNCIA (segundos) |
| Veículo | $1,7 \pm 0,4$ | $54,7 \pm 2,7$ |
| DHP (10mg/kg, <i>p.o.</i>) | $1,8 \pm 0,5$ | $52,1 \pm 1,5$ |
| Diazepam (3mg/kg, <i>s.c.</i>) | $6,2 \pm 0,6$ *** | $38,9 \pm 5,9$ * |

6.1.3 Teste de *Tail-flick*

No teste de *Tail-flick*, a administração oral do composto DHP (10mg/kg) não promoveu alteração no tempo de latência para a resposta ao estímulo térmico em nenhum dos tempos avaliados (30, 60, 90, 120 e 150min), quando comparado as latências observadas para o grupo veículo. Como esperado, o controle positivo fentanil (200µg/kg, *s.c.*) ampliou significativamente a reatividade dos animais ao estímulo térmico em 138,3%, 98,1%, 38,5%, 52,0% e 31,4%, para os respectivos tempos de: 30, 60, 90, 120 e 150min, quando comparado ao grupo controle (Tabela 3 e Figura 11).

Tabela 3: Influência do tratamento oral com o composto 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a), na dose 10mg/kg, sob o período de latência ao estímulo térmico nociceptivo, no teste de *Tail-flick*. Os valores apresentados para cada tratamento e em cada período estão expressos em segundos \pm seu respectivo erro padrão. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$

| Leituras (min) | Veículo (água) | Composto DHP (10mg/kg, <i>p.o.</i>) | Fentanil (200µg/kg, <i>s.c.</i>) |
|----------------|----------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| -30 | 6,0 \pm 0,5 | 7,4 \pm 0,4 | 6,6 \pm 0,3 |
| 0 | 8,0 \pm 0,7 | 6,6 \pm 0,5 | 7,0 \pm 0,8 |
| 30 | 9,4 \pm 0,2 | 10,4 \pm 0,6 | 22,4 \pm 0,6 *** |
| 60 | 10,6 \pm 0,7 | 10,4 \pm 0,9 | 21,0 \pm 1,2 *** |
| 90 | 9,6 \pm 0,5 | 11,3 \pm 0,7 | 13,3 \pm 0,9 ** |
| 120 | 10,4 \pm 0,5 | 11,3 \pm 0,8 | 15,8 \pm 1,3 ** |
| 150 | 10,5 \pm 0,2 | 11,3 \pm 0,8 | 13,8 \pm 0,3 ** |

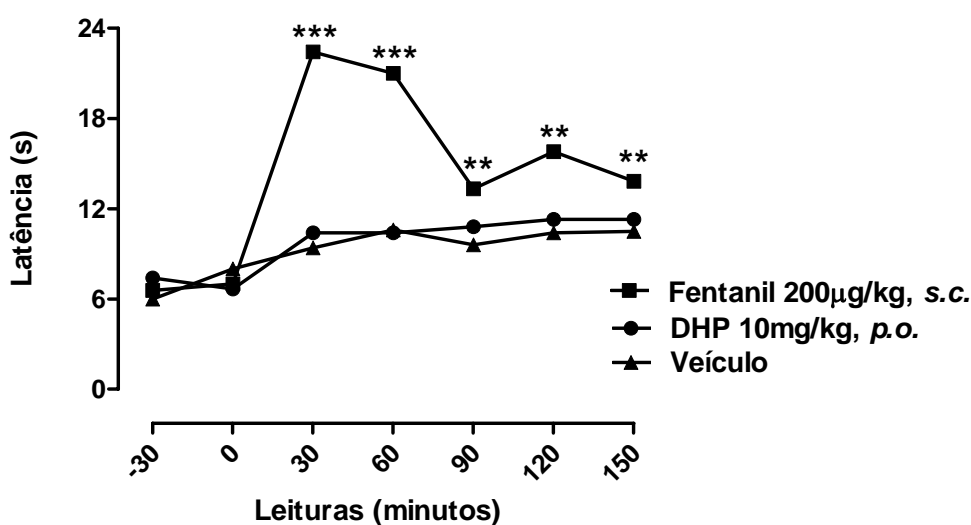


Figura 11: Tempos de latência (segundos) para os intervalos de avaliação no teste de *Tail-flick*. Os símbolos e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão das médias de grupos experimentais contendo até 8 animais. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$

6.1.4 Teste da Formalina

A administração oral do composto DHP ou indometacina na dose de 10mg/kg não influenciaram a primeira fase de nocicepção (dor neurogênica) do teste da formalina, apresentando reatividades de $154,5 \pm 10,0$ s e $119,3 \pm 14,7$ s respectivamente, em relação ao grupo experimental tratado com o veículo $117,4 \pm 16,2$ s (Figura 12a).

Na segunda fase da nocicepção (dor inflamatória) do teste, o DHP promoveu redução significativa de 40,9% ($145,9 \pm 14,7$ s) na reatividade dos animais produzida pela injeção intraplantar de formaldeído, quando comparado ao grupo controle veículo ($246,9 \pm 32,9$ s). Do mesmo modo, a indometacina, controle positivo da segunda fase, produziu inibição de 48,7% ($126,6 \pm 31,8$ s) (Tabela 4 e Figura 12b).

Tabela 4: Influência do pré-tratamento com o composto pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP, na dose de 10mg/kg, sobre a reatividade na 2ª fase de nocicepção do teste da formalina (20µL de solução de formalina à 2,5%, intraplantar). O tempo médio observado e seu erro estão expressos em segundos. ** $p < 0,01$

| Tratamentos | Doses (mg/kg, p.o.) | Reatividade na 2ª Fase (segundos) | % Inibição |
|-------------|---------------------|-----------------------------------|------------|
| Veículo | - | $246,9 \pm 32,9$ | - |
| DHP | 10 | $145,9 \pm 14,7$ | 40,9% ** |
| Indo | 10 | $126,6 \pm 31,8$ | 48,7% ** |

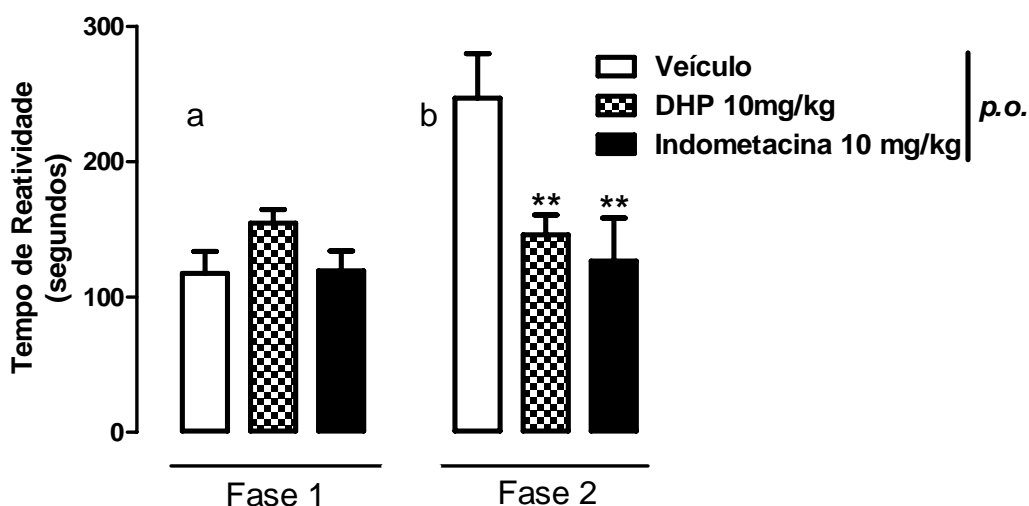


Figura 12: Reatividades em segundos nas fases 1 e 2 do teste da formalina (20µL de solução de formalina à 2,5%). As colunas e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão em grupos experimentais de 6 a 10 animais. ** $p < 0,01$

6.1.5 Teste do Edema de Orelha Induzido por Óleo de Cróton

Ao comparar a diferença (Δ) de peso entre a orelha direita (tratada com 10 μ L óleo de cróton - 2,5% v/v em acetona) e a orelha esquerda (tratada com 10 μ L acetona) no teste do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, a administração oral do composto DHP na dose de 10mg/kg inibiu a formação do edema em 54,0% ($\Delta = 3,9 \pm 0,8$ mg) quando comparado com o grupo controle tratado com veículo ($\Delta = 8,5 \pm 1,0$ mg). O grupo tratado com dexametasona (2mg/kg, *s.c.*), controle positivo do teste, produziu 55,3% ($\Delta = 3,8 \pm 0,7$ mg) de inibição (Tabela 5 e Figura 13).

Tabela 5: Influência do pré-tratamento com o composto pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP, na dose de 10mg/kg, na formação do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton. Δ representa a diferença de peso entre a orelha direita (10 μ L óleo de cróton - 2,5% v/v em acetona) e a orelha esquerda (10 μ L acetona), e estão expressos em miligramas. ** $p < 0,01$

| Tratamentos | Doses (mg/kg) | Δ (mg) | % Inibição |
|-------------------------|---------------|---------------|------------|
| Veículo (<i>p.o.</i>) | - | 8,5 \pm 1,0 | - |
| DHP (<i>p.o.</i>) | 10 | 3,9 \pm 0,8 | 54,1% ** |
| Dexa (<i>s.c.</i>) | 2 | 3,8 \pm 0,7 | 55,3% ** |

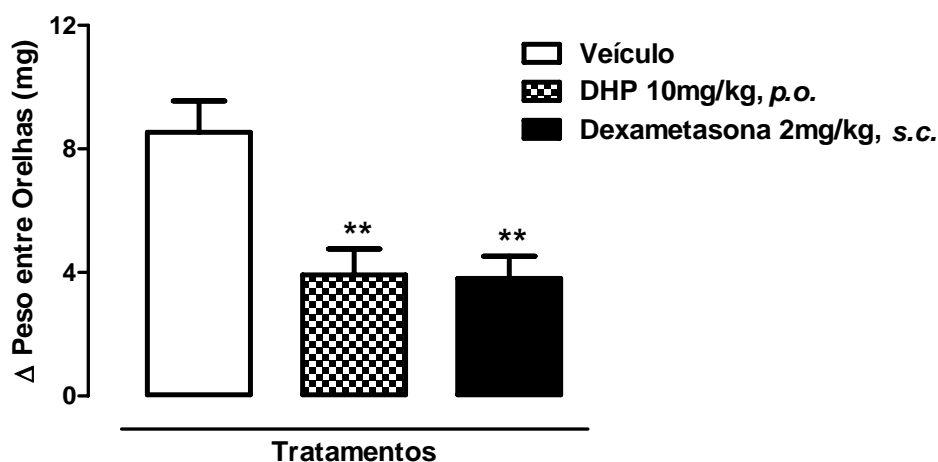


Figura 13: Edema de orelha induzido pelo óleo de cróton. As colunas e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão em grupos experimentais contendo 8 animais. Significativamente diferente do grupo experimental controle ** $p < 0,01$

6.1.6 Teste da Peritonite Induzida por Carragenina

Na contagem total de leucócitos pelo teste da peritonite induzida pela carragenina (10 μ L/grama de carragenina (1% em salina), a administração oral do compostos DHP (3, 10 e 30mg/kg) produziu inibição dose dependente na migração leucocitária para a cavidade peritoneal de 12,5% (11,9 \pm 0,2 x 10⁶ leucócitos/mL), 39,0% (8,3 \pm 0,2 x 10⁶ leucócitos/mL) e 53,7% (6,3 \pm 0,3 x 10⁶ leucócitos/mL), quando comparado com o grupo controle veículo (13,6 \pm 0,2 x 10⁶ leucócitos/mL). Para o controle dexametasona foi observado inibição de 72,7% (3,7 \pm 0,1 x 10⁶ leucócitos/mL) (Tabela 6, Figura 14). A dose inibitória de 50% (ID50) obtida pelo tratamento com o DHP foi de 22,9 mg/kg (Figura 15).

Tabela 6: Influência do pré-tratamento com o composto pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP, nas doses de 3, 10 e 30mg/kg, sob a contagem total de leucócitos, para o teste da peritonite induzida pela carragenina (10 μ L/grama de carragenina (1% em salina)). * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001

| Tratamentos | Doses (mg/kg) | Leucócitos (x 10 ⁶ /mL) | % Inibição |
|-------------------------|---------------|------------------------------------|------------|
| Veículo (<i>p.o.</i>) | - | 13,6 \pm 0,2 | - |
| DHP (<i>p.o.</i>) | 3 | 11,9 \pm 0,2 | 12,5% |
| DHP (<i>p.o.</i>) | 10 | 8,3 \pm 0,2 | 39,0% * |
| DHP (<i>p.o.</i>) | 30 | 6,3 \pm 0,3 | 53,7% ** |
| Dexa (<i>s.c.</i>) | 2 | 3,7 \pm 0,1 | 72,7% *** |

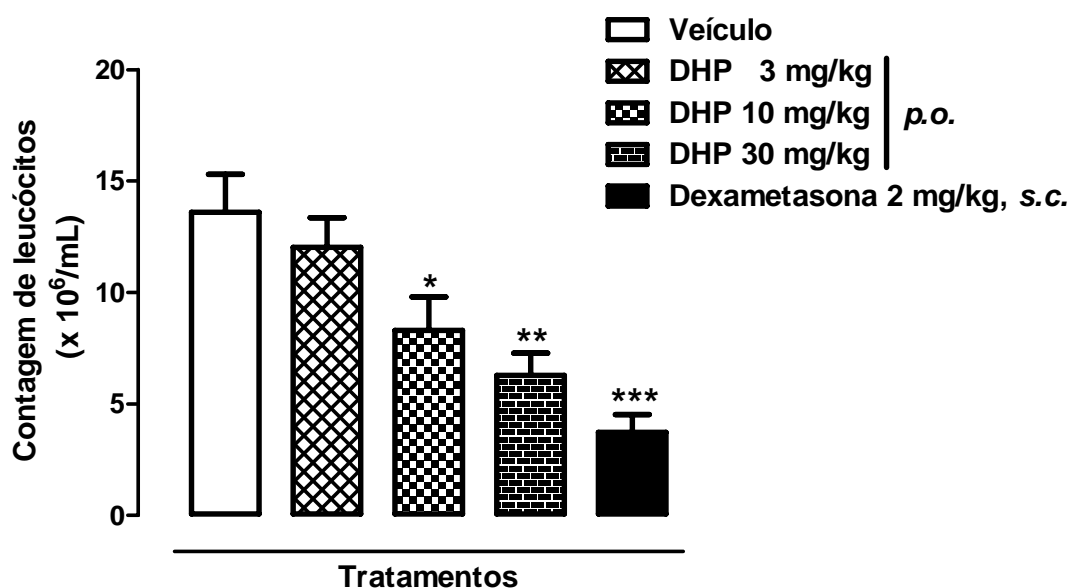


Figura 14: Contagem de leucócitos totais no teste da migração leucocitária para a cavidade peritoneal após a administração de carragenina. As colunas e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão em grupos experimentais de 8 animais. * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001

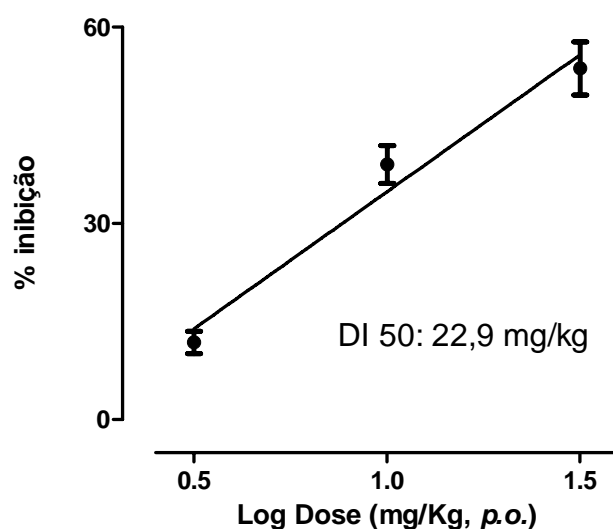


Figura 15: Relação dose-efeito inibitória para o método de migração leucocitária tratados pela via oral com o composto pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP, nas doses de 3, 10 e 30mg/kg. Os símbolos e linhas verticais representam as médias \pm o erro padrão para grupos experimentais de 8 animais.

6.2 Determinação da Nociceção Relacionada ao Modelo de Indução em Ratos

6.2.1 Avaliação da Alodinia Mecânica pelo Método *von Frey*

Três grupos experimentais de animais foram utilizados na avaliação do potencial antinociceptivo do composto pirazólico DHP. Dois grupos controles foram tratados com veículo, sendo um submetido ao procedimento cirúrgico incisional (GIV – grupo incisado veículo), permitindo a obtenção de valores para o controle positivo do teste, e o outro, apenas tratado e não submetido à realização da incisão plantar (GNIV- grupo não incisado veículo), fornecendo os valores controle negativo ou basal. O terceiro grupo (GDHP) foi submetido ao procedimento cirúrgico e recebeu tratamento com o composto pirazólico DHP.

Conforme os valores apresentados na Tabela 7 e Figura 16, na primeira etapa, os valores basais dos três grupos experimentais não apresentaram diferença estatística, demonstrando para o grupo GNIV, valores de latência média de $72,5 \pm 2,3g$, não ocorrendo grandes variações no decorrer dos quatorze dias de experimento. Muito similar ao grupo GNIV, o grupo GIV apresentou valores basais médios de latência de $72,4 \pm 3,3g$, diferindo pela sua progressiva queda após o procedimento cirúrgico, atingindo valores basais mínimos de $8,7 \pm 0,6g$, ao terceiro dia. O grupo GDHP, apresentou valores basais de $69,9 \pm 4,5g$, e assim como o grupo GIV, obteve acentuada queda até o terceiro dia ($7,5 \pm 0,7g$).

Na segunda etapa do experimento, após o tratamento oral com o composto pirazólico (GDHP) na dose de 10mg/kg, obteve-se um progressivo e significativo aumento na latência, em relação ao grupo veiculo incisado (GIV), com percentuais de reversão da alodinia (%RA) de 6,8% (11,9 ± 1,2g), 11,0% (16,0 ± 0,9g), 13,2% (22,7 ± 1,4g), 24,7% (26,4 ± 1,2g), 28,2% (28,3 ± 1,6g) e 26,9% (30,0 ± 2,3g) nos tempos de 1, 3, 6, 9, 12 e 24h (Tabela 7, Tabela 8 e Figura 16).

Na terceira etapa, com o objetivo de avaliar a recuperação da latência até valores basais próximos ao grupo GNIV, as avaliações obtidas nos 7º, 10º e 14º dias após a cirurgia mostraram valores de RA de 26,9% (30,0 ± 2,3g), 43,4% (49,0 ± 2,7g) e 60,4% (55,5 ± 2,1g), respectivamente (Tabela 8). Entretanto, essa recuperação gradual das latências dos animais tratados com o composto DHP até o 14º dia não alcançaram valores semelhantes ao grupo GNIV, assim como o grupo GIV (Tabela 7 e Figura 16).

Tabela 7: Influência do tratamento com o composto pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP (10mg/kg, *p.o.*) na sensibilidade nociceptiva (médias ± erro padrão da latência em gramas) induzida pela incisão na região plantar, obtidos através do método *von Frey* e percentuais de reversão da alodinia (%RA). ***p*<0,01 e ****p*<0,001 n = 10 animais em média.

| | <i>von Frey</i> LEITURAS | GRUPOS / LATÊNCIAS (gramas) | | | % RA |
|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------|------------|-------------|
| | | GNIV | GDHP | GIV | |
| Primeira Etapa | Basal | 72,5 ± 2,3 | 69,9 ± 4,5 | 72,4 ± 3,3 | |
| | 1º Dia | 73,9 ± 2,4 | 16,2 ± 1,5 | 12,3 ± 1,9 | |
| | 2º Dia | 72,4 ± 2,4 | 9,7 ± 1,4 | 7,8 ± 0,8 | |
| | 3º Dia | 72,1 ± 2,7 | 7,5 ± 0,7 | 8,7 ± 0,6 | |
| Segunda Etapa | 30 Minutos | 71,8 ± 2,5 | 10,5 ± 0,8 | 8,1 ± 1,3 | |
| | 1 Hora | 71,1 ± 2,1 | 11,9 ± 1,2** | 7,6 ± 0,8 | 6,8 |
| | 3 Horas | 71,4 ± 2,0 | 16,0 ± 0,9*** | 9,1 ± 0,9 | 11,0 |
| | 6 Horas | 74,0 ± 1,6 | 22,7 ± 1,4*** | 14,9 ± 0,8 | 13,2 |
| | 9 Horas | 72,7 ± 2,0 | 26,4 ± 1,2*** | 11,2 ± 0,9 | 24,7 |
| | 12 Horas | 69,5 ± 2,2 | 28,3 ± 1,6*** | 12,1 ± 1,4 | 28,2 |
| | 24 Horas | 73,7 ± 2,8 | 30,0 ± 2,3*** | 13,9 ± 3,2 | 26,9 |
| Terceira Etapa | 7º Dia | 73,2 ± 2,4 | 34,0 ± 1,7*** | 19,6 ± 1,5 | 26,9 |
| | 10º Dia | 74,3 ± 2,0 | 49,0 ± 2,7*** | 29,6 ± 2,5 | 43,4 |
| | 14º Dia | 72,1 ± 1,0 | 55,5 ± 2,1*** | 30,2 ± 1,7 | 60,4 |

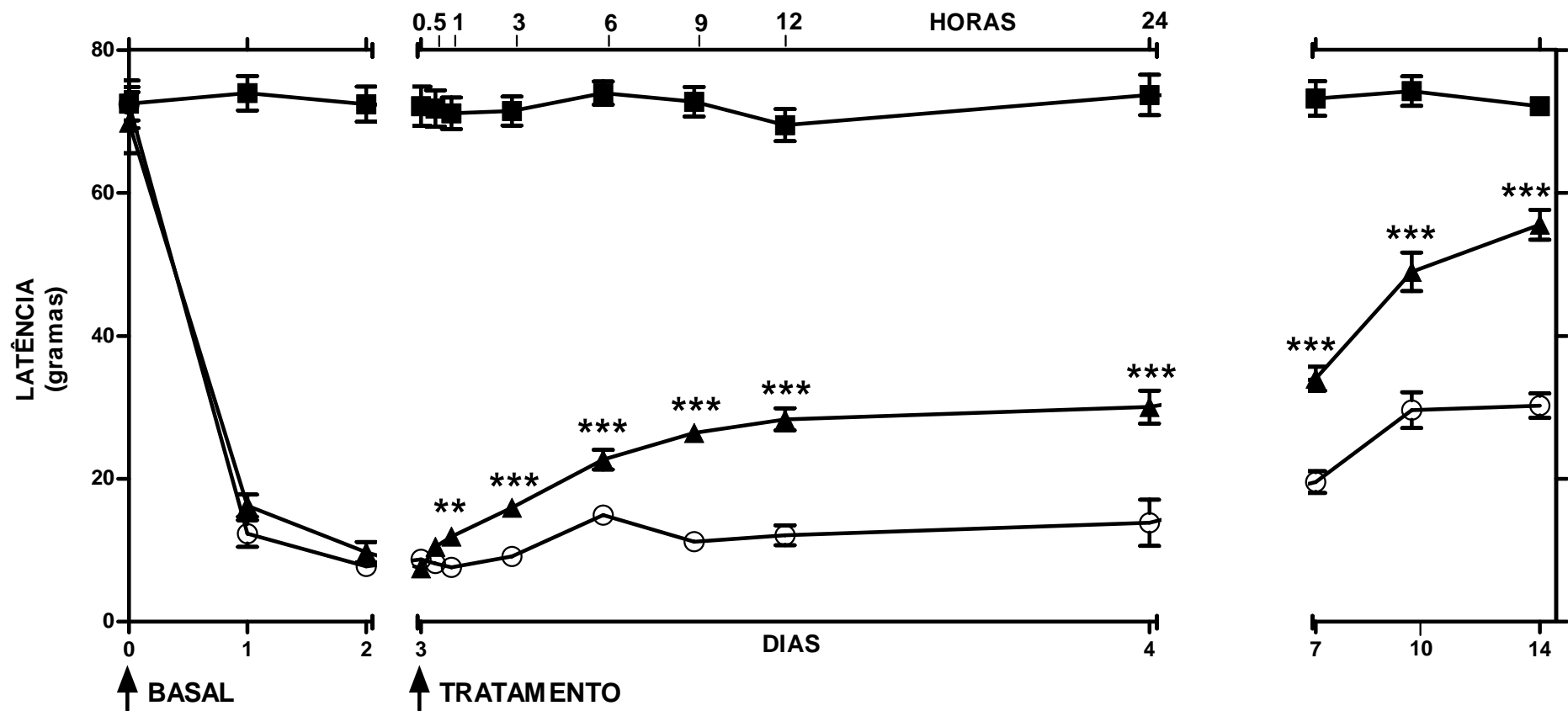


Figura 16: Efeito do composto pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP (10mg/kg, *p.o.*) sobre o limiar nociceptivo (latência em gramas) induzida pela incisão na região plantar, obtidos através do método *von Frey*. Os símbolos (■ GNIV, ▲ GDHP e ○ GIV) e barras verticais representam as médias ± erro padrão das variações da latência em gramas dos grupos experimentais contendo dez animais em média. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$

Tabela 8: Percentuais de reversão da alodinia mecânica e hiperalgesia térmica obtidos após o tratamento com composto pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) em modelo de dor pós incisional avaliado pelo método de *von Frey* e de *Hargreaves* durante as 2^a e 3^a etapas do experimento.

| LEITURAS | | MÉTODOS | |
|----------------------|----------|-----------------|-------------------|
| | | <i>von Frey</i> | <i>Hargreaves</i> |
| | | %RA | %RH |
| 2 ^a Etapa | 1 Hora | 6,8 | 14,8 |
| | 3 Horas | 11,0 | 68,9 |
| | 6 Horas | 13,2 | 67,1 |
| | 9 Horas | 24,7 | 58,6 |
| | 12 Horas | 28,2 | 46,2 |
| | 24 Horas | 26,9 | 29,8 |
| 3 ^a Etapa | 4° Dia | 26,9 | 43,4 |
| | 7° Dia | 43,4 | 28,6 |
| | 14° Dia | 60,4 | 64,0 |

6.2.2 Avaliação da Hiperalgesia Térmica pelo Método *Hargreaves*

Do mesmo modo que o método de *von Frey*, no método de *Hargreaves* foi obtida a mesma evolução de respostas em sua primeira etapa de avaliação. Nesta, os valores médios das latências basais também não apresentaram diferença estatística (GNIV - $15,7 \pm 0,7s$, GDHP - $14,7 \pm 0,9s$ e GIV - $13,9 \pm 1,0s$), com o grupo GNIV mantendo durante os quatorze dias de experimento valores semelhantes a sua latência média basal inicial. Os grupos GDHP e GIV apresentaram uma diminuição progressiva de seus valores médios de latência, atingindo valores de $4,6 \pm 0,3s$ e $5,4 \pm 0,5s$, respectivamente no terceiro dia após a incisão (Tabela 9 e Figura 17).

Na segunda etapa do experimento, após o tratamento oral com 10mg/kg do composto pirazólico DHP, obteve-se um aumento progressivo no tempo médio de latência nas leituras de 1, 3 e 6h, com percentuais de reversão da hiperalgesia térmica (%RH), de 14,8% ($6,8 \pm 0,6s$), 68,9% ($5,8 \pm 0,4s$) e 67,1% ($6,2 \pm 0,5s$) respectivamente, seguido de reduções do %RH

de 58,6% ($11,0 \pm 0,3s$), 46,2% ($10,0 \pm 0,8s$), e 29,8% ($8,8 \pm 0,9s$) para as leituras de 9, 12 e 24h, respectivamente (Tabela 8, Tabela 9 e Figura 17).

Com os valores de latência obtidos nos dias 7, 10 e 14 após a cirurgia, obteve-se com o grupo GDHP uma recuperação da latência até o 14º dia quando atingiu valores semelhantes ao GNIV e a sua latência basal, entretanto, não atingiu latências semelhantes aos basais (Tabela 7 e Figura 16), apesar do grupo GIV ter apresentado gradual retorno em direção aos valores da primeira avaliação.

Tabela 9: Influência do tratamento com o composto pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP (10mg/kg, *p.o.*) na sensibilidade nociceptiva (médias \pm erro padrão da latência em segundos) induzida pela incisão na região plantar, obtido através do método de *Hargreaves* e percentuais de reversão da hiperalgesia (%RH). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ n = 8 animais em média.

| | <i>Hargreaves</i> LEITURAS | GRUPOS / LATÊNCIAS (segundos) | | | % RH |
|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------|----------------|-------------|
| | | GNIV | GDHP | GIV | |
| Primeira Etapa | Basal | 15,7 \pm 0,7 | 14,7 \pm 0,9 | 13,9 \pm 1,0 | |
| | 1º Dia | 15,6 \pm 0,9 | 7,9 \pm 0,3 | 7,8 \pm 0,6 | |
| | 2º Dia | 15,3 \pm 1,2 | 5,6 \pm 0,3 | 5,6 \pm 0,8 | |
| | 3º Dia | 14,7 \pm 0,9 | 4,6 \pm 0,3 | 5,4 \pm 0,5 | |
| Segunda Etapa | 30 Minutos | 15,0 \pm 0,9 | 5,5 \pm 0,4 | 5,5 \pm 0,4 | |
| | 1 Hora | 17,7 \pm 1,1 | 6,8 \pm 0,6** | 4,9 \pm 0,4 | 14,8 |
| | 3 Horas | 14,6 \pm 0,7 | 10,8 \pm 1,0*** | 5,8 \pm 0,4 | 68,9 |
| | 6 Horas | 14,1 \pm 0,9 | 11,5 \pm 0,9*** | 6,2 \pm 0,5 | 67,1 |
| | 9 Horas | 14,6 \pm 0,5 | 11,0 \pm 0,3*** | 5,9 \pm 0,8 | 58,6 |
| | 12 Horas | 14,2 \pm 1,1 | 10,0 \pm 0,8** | 6,4 \pm 0,5 | 46,2 |
| | 24 Horas | 15,4 \pm 1,6 | 8,8 \pm 0,9* | 6,0 \pm 0,7 | 29,8 |
| Terceira Etapa | 7º Dia | 15,7 \pm 1,3 | 11,0 \pm 0,7** | 7,4 \pm 0,7 | 43,4 |
| | 10º Dia | 16,7 \pm 0,9 | 11,0 \pm 0,6*** | 8,3 \pm 0,3 | 32,1 |
| | 14º Dia | 16,7 \pm 1,0 | 14,5 \pm 1,0** | 10,6 \pm 0,7 | 64,0 |

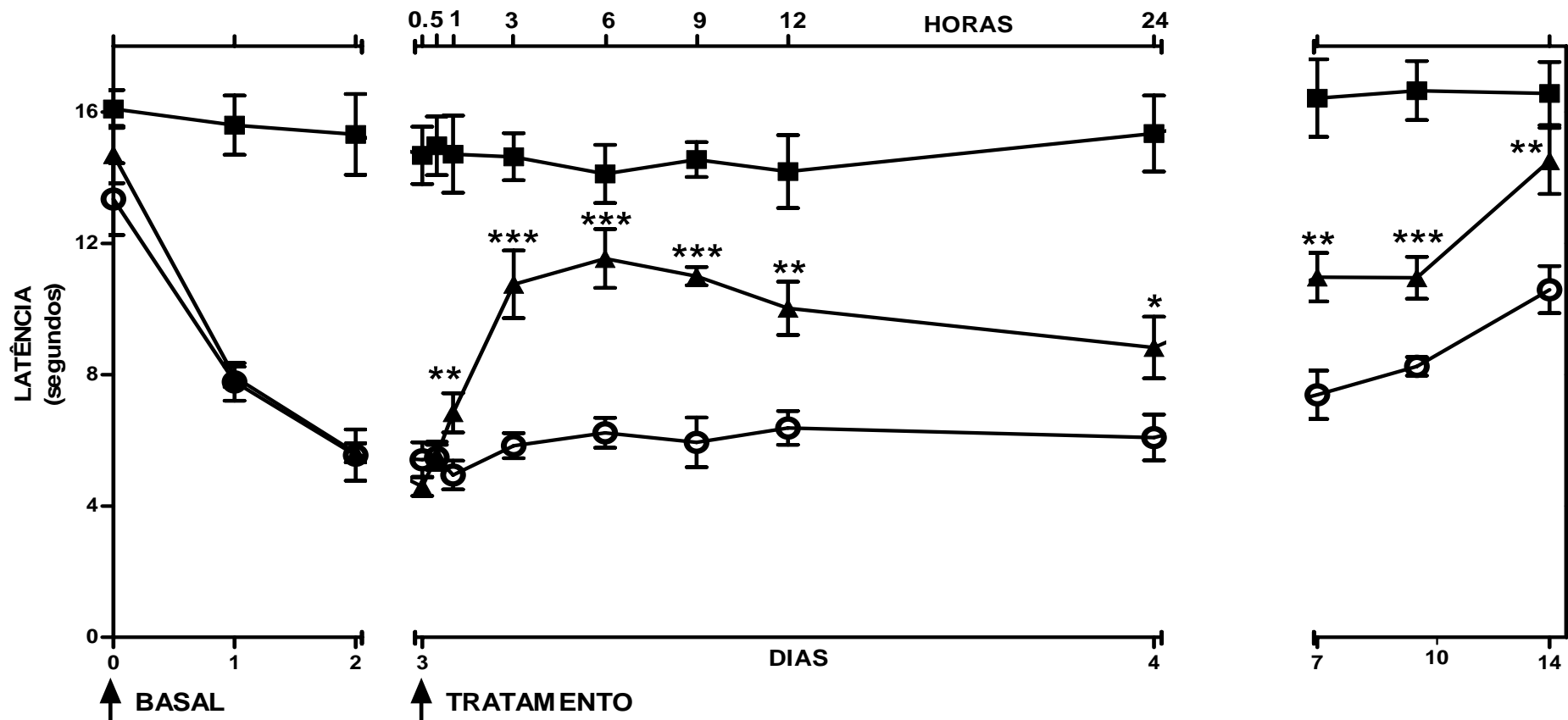


Figura 17: Efeito do composto pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP (10mg/kg, *p.o.*) sobre o limiar nociceptivo (latência em segundos) induzida pela incisão na região plantar, obtido através do método de *Hargreaves*. Os símbolos(■ GNIV, ▲ GDHP e ○ GIV) e barras verticais representam as médias ± erro padrão das variações da latência em segundos dos grupos experimentais contendo oito animais em média. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$

7 DISCUSSÃO

A dor é um sinal clássico dos processos inflamatórios, e o seu controle contribui de maneira substancial na terapêutica a ser empregada, portanto, os fármacos anti-inflamatórios que possuem boa eficácia no tratamento da dor são bastante desejados.

Assim, as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do DHP foram testadas em modelos agudos de nocicepção (químico e térmico) e de inflamação em camundongos, bem como através de modelo crônico que avaliou a influência deste composto sobre a alodinia mecânica e a hiperalgesia térmica na dor incisional em ratos, considerando, cuidadosamente, que muitas variáveis podem influenciar os parâmetros medidos como sinais de analgesia e inflamação.

A nocicepção induzida experimentalmente varia com o grau de consciência do animal e também com a presença de outras aferências sensoriais como o ambiente agressivo, as baixas temperaturas, o estresse ou a irritação com possível lesão tecidual no animal, produzida, por exemplo, por extratos vegetais contendo saponinas, taninos ou o pH das soluções, quando injetados por via subcutânea ou intraperitoneal. Além disso, a maioria dos métodos de avaliação experimental da dor envolve uma resposta motora dos animais, de tal forma, que resultados falsos positivos podem ser obtidos caso os extratos ou os compostos testados produzam sedação e imobilização dolorosa, comprometendo a motricidade (NODINE; SIEGLER, 1964; RATES; BARROS, 1994).

Por outro lado, na interpretação do edema como sinal de inflamação, limitações semelhantes devem ser consideradas, pois sua formação depende da perfusão vascular do tecido avaliado, da pressão sanguínea sistêmica e dos níveis de glicocorticóides circulantes, podendo também determinar o aparecimento de resultados falsos positivos (RATES; BARROS, 1994; SOUCCAR; LAPA, 1997).

O primeiro modelo farmacológico empregado foi o teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, que frequentemente é utilizado para a triagem de compostos sintéticos e naturais, com o qual se objetivou observar a presença de atividade antinociceptiva central e/ou periférica, pois esse método farmacológico possui sensibilidade aos anti-inflamatórios não-esteroidais, assim como aos opióides (ZAKARIA et al., 2006b;

FISCHER et al., 2008). Esse modelo permite determinar a dose inibitória 50% (ID50) e através desse parâmetro, comparar o potencial analgésico de diferentes fármacos (SANTOS et al., 1998). Dados da literatura mostram uma boa correlação entre a potência de drogas analgésicas neste modelo e as suas eficácias clínicas (SIEGMUND et al., 1957; NODINE; SIEGLER, 1964; PONG et al., 1985; DUBINSKY et al., 1987).

Quando injetado por via intraperitoneal, o ácido acético induz de forma indireta o aparecimento de contorções abdominais, agindo através da liberação de mediadores endógenos que estimularão os neurônios nociceptivos sensíveis (FISCHER et al., 2008). A sensibilização destes nociceptores ocorre através da liberação e/ou produção de mediadores como histamina, serotonina, bradicinina, citocinas, e prostaglandinas. Deste modo, a nocicepção observada neste modelo tem sido relacionada a mediadores como PGE₂, PGF_{2α} e PGI₂, bem como produtos da lipoxigenase (PARVEEN et al., 2007). Assim, este modelo também induz a liberação de TNF-α e IL-1β, mediadores diretamente ligados aos processos inflamatório e nociceptivo, tendo sido caracterizado que anticorpos anti-TNF-α e anti-IL-1β inibem as contorções abdominais (VERRI et al., 2006), comprovando a relação do modelo com processos inflamatórios e nociceptivos.

A analgesia moderada produzida pelo ácido acetilsalicílico e pela indometacina é explicada pela inibição da atividade da cicloxigenase e redução da síntese de prostaglandinas (VANE, 1971). Entretanto, nos testes padrão em animais nos quais se induz uma reação inflamatória tem sido difícil separar a influência da atividade anti-inflamatória destes compostos de um efeito analgésico singular (HUNSKAAR et al., 1986).

Diferentemente, quando comparado aos compostos pirazólicos 4-metil-5-hidróxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-1-pirazolcarboxamida (NF0) e 3-metil-5-hidróxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-1-pirazolcarboxamida (NF2), que não apresentaram atividade antinociceptiva no teste das contorções abdominais (SAUZEM, 2004), a administração oral do composto 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP produziu efeito antinociceptivo de maneira dose dependente, observado através da inibição do número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Esta relação dose efeito permitiu o cálculo da DI50, que foi de 1,29mg/kg, *p.o.*

Esses resultados evidenciaram uma boa potência antinociceptiva para o composto DHP, considerando comparativamente que controle positivo deste teste, a indometacina, administrada em dose semelhante (10mg/kg) a maior dose do composto, produziu menor inibição das contorções. Adicionalmente, esse valor de DI50 do DHP reforça a sua eficácia ao se relacionar esse resultado com os obtidos nos estudos de Pires (2009), que utilizando o mesmo modelo experimental, avaliou as DI50 de diferentes fármacos anti-inflamatórios empregados na clínica médica veterinária, revelando que a administração oral do firocoxibe (DI50 = 1,9mg/kg), do carprofeno (DI50 = 2,3mg/kg) e do cetoprofeno (DI50 = 3,6mg/kg) tiveram valores superiores de DI50, enquanto que somente o meloxicam (DI50 = 0,1mg/kg) e o flunixin meglumine (DI50 = 0,4mg/kg) apresentaram maior potência antinociceptiva que o 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP.

Buscando investigar possíveis mecanismos envolvidos com a antinocicepção produzida pelo DHP no teste de contorções abdominais, foi empregado o teste de *tail-flick*, ou teste de retirada da cauda, que consiste na aplicação térmica de uma fonte radiante de calor na cauda do animal como estímulo nociceptivo, provocando seu movimento de retirada (D'AMOUR; SMITH, 1941), caracterizando-se por uma nocicepção aguda não-inflamatória (ZAKARIA et al., 2006a; FISCHER et al., 2008). Do ponto de vista farmacológico, o teste do *tail-flick* é sensível para identificar a atividade de compostos presentes em extratos vegetais ou isolados a partir dessas, bem como sintéticos, cujos mecanismos se assemelhem aos promovidos pelos analgésicos opióides (LE BARS et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2008), uma vez que a morfina administrada sistemicamente é capaz de suprimir respostas de neurônios espinhais ao estímulo térmico nocivo na cauda (DOUGLASS; CARSTENS, 1997).

Assim, o fentanil (200µg/kg, *s.c.*), fármaco opióide 150 vezes mais potente que a morfina (OTERO, 2005) e utilizado como controle positivo para o teste, aumentou significativamente o período de latência dos camundongos ao estímulo térmico nos tempos de 30, 60, 90, 120 e 150min após a sua aplicação. Por outro lado, o composto DHP, administrado oralmente na dose (10mg/kg) que produziu efeito antinociceptivo máximo no teste das contorções abdominais, não alterou o período de latência dos animais ao estímulo térmico durante todos os tempos de avaliação pós-tratamento, quando comparado ao grupo controle, indicando com esse resultado que a antinocicepção do composto DHP não parece estar relacionada a mecanismos de ações no sistema nervoso central.

Numa outra abordagem para o estudo da antinocicepção do DHP, foi utilizado o teste da formalina, que se caracteriza por apresentar duas fases distintas de nocicepção: uma primeira denominada de fase neurogênica e uma posterior ou tardia denominada de fase inflamatória (HUNSKAAR et al., 1985; DICKENSON; SULLIVAN, 1987; COWAN et al., 1989), sendo esse modelo uma ferramenta muito utilizada para a pesquisa de compostos com ação antinociceptiva (McNAMARA et al., 2007). A primeira fase ou fase neurogênica começa imediatamente após a injeção intraplantar da formalina e possui curta duração. É caracterizada pela liberação de mediadores como serotonina, substância P, cininas, histamina e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (GONÇALVES et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008). Diferentemente, a fase tardia ou fase inflamatória, é mais duradoura e persistente, causada por inflamação local devido à formação e/ou liberação de mediadores como citocinas, eicosanóides, cininas, glutamato e óxido nítrico (CHICHORRO et al., 2004; TASSORELLI et al., 2006). Este teste, apresenta alta sensibilidade à ação da maioria dos AINEs, neles incluindo o ácido acetil salicílico, a indometacina e o naproxeno (GONÇALVES et al., 2008).

Foi demonstrado que a formalina pode ativar diretamente nociceptores através de receptores de potencial transitório, tipo anquirina 1 (TRPA1) (McNAMARA et al., 2007), sendo capaz de degranular mastócitos, causando a liberação de histamina e serotonina (PARADA et al., 2001), que ativam os nociceptores, promovendo também a liberação de neuropeptídeos como substância P, neurocinina A, neurocinina B e CGRP, nos terminais periféricos aferentes primários (SANTOS; CALIXTO, 1997), assim como os aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato (OMOTE et al., 1998). Desta forma, acredita-se que estes mediadores químicos parecem ser os responsáveis pela nocicepção transitória observada nos primeiros cinco minutos após a injeção de formalina (MILANO, 2008).

Complementarmente, esta liberação de mediadores na primeira fase do teste da formalina, promove o extravasamento plasmático, a vasodilatação de capilares adjacentes, a ativação de fibras simpáticas, de macrófagos e de mastócitos, que por sua vez também induzem a liberação de mais mediadores do processo inflamatório, tais como as cininas, prostaglandinas, citocinas, dentre outros (SHIBATA et al., 1989; CORRÊA; CALIXTO, 1993), garantindo com isso, além da nocicepção, o envolvimento do processo inflamatório, para esta fase do teste (TJOLSEN et al., 1992).

Drogas analgésicas possuem ações diferentes na primeira e segunda fase do teste da formalina. Os opióides possuem ação central e inibem as duas fases similarmente. Por outro lado, os analgésicos não opióides como a dipirona, um exemplo de derivado pirazólico, possuem ação central e periférica, produzindo efeitos antinociceptivos em ambas as fases, porém, mais caracterizada na segunda, a qual se observa a inibição mediante doses menores quando comparadas à primeira fase (HUNSKAAR; HOLE, 1987; SHIBATA et al., 1989).

Na primeira fase de nocicepção do teste da formalina, o DHP (10mg/kg) não influenciou a reatividade dos camundongos aos sinais dolorosos, sendo este resultado compatível com o obtido no teste do *tail-flick* e semelhante ao observado no estudo de Sauzem (2004), quando o composto pirazólico 3-metil-5-hidróxi-5-trifluormetil-4,5-diidro-1H-1-pirazolcarboxamida não foi capaz de reduzir o comportamento nociceptivo nesta fase. Por outro lado, na fase inflamatória, o DHP produziu redução significativa (40,9%) na reatividade dos animais, indicando que a antinocicepção do composto pode depender de ações que interferem no processo inflamatório.

O edema é um dos parâmetros empregados na avaliação de processos inflamatórios, assim como na atividade de fármacos com propriedades anti-inflamatórias. O óleo de cróton, utilizado para a indução do edema de orelha, gera uma resposta inflamatória aguda, que se caracteriza pela produção de PGs e LTs, aumento da permeabilidade vascular, edema e infiltração de neutrófilos. O edema tem a sua gênese promovida pela vasodilatação e pelo aumento da permeabilidade vascular, que favorecem o extravasamento de proteínas e água, garantindo a pressão oncótica local (SHIN et al., 2006; ZHANG et al., 2007). A formação deste edema é mediada inicialmente pela serotonina e histamina e, posteriormente, pelas prostaglandinas (PARVEEN et al., 2007) e leucotrienos (ISHII et al., 1994) de modo que a maior parte da atividade pró-inflamatória do óleo de cróton se deve a formação de ácido araquidônico. Assim, todos os inibidores da PLA₂, como das vias das cicloxigenases ou lipoxigenases, são efetivos na supressão do edema de orelha (ZHANG et al., 2007).

No teste do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton em camundongos, o tratamento oral com o DHP na dose de 10mg/kg, inibiu a formação do edema em 54%, seguindo perfil semelhante ao obtido com o controle positivo do teste, a dexametasona. Essa atividade anti-edematogênica reforça a indicação de que mecanismos anti-inflamatórios estão envolvidos na efetividade exercida pelo composto nos testes anteriores.

Considerando que a inibição da migração de leucócitos é também um dos efeitos característicos de fármacos com propriedades anti-inflamatórias, o teste da peritonite induzida pela carragenina teve por objetivo avaliar a influência do DHP na migração leucocitária para cavidade peritoneal. A carragenina, um polissacarídeo sulfatado, desencadeia uma inflamação aguda envolvendo a liberação sequencial de vários mediadores pró-inflamatórios, principalmente a histamina, a serotonina, as cininas, as prostaglandinas e os tromboxanos (DI ROSA et al., 1971; DAMAS et al., 1990). Este modelo de inflamação aguda permite a quantificação de leucócitos que migram para a cavidade peritoneal, sob ação de agentes quimiotáticos, principalmente leucotrienos e interleucinas; sendo sensível à ação de anti-inflamatórios esteroidais (VINEGAR et al., 1973; HIGGS et al., 1980; MIKAMI; MIYASAKA, 1983; BROOKS; DAY, 1991).

O processo de migração leucocitária é dependente da produção e da liberação de mediadores quimiotáticos, como os produtos da lipoxigenase e quimiocinas, sendo constituído por eventos como a marginalização e rolamento de leucócitos, a sua aderência e o processo de transmigração em direção à região lesionada. Fármacos com atividade anti-inflamatória podem reduzir a migração de leucócitos por impedir a síntese e/ou liberação de mediadores quimiotáticos ou bloquear alguma fase da migração dos leucócitos (MULLER, 2002). Apesar de alguns estudos relatarem que a migração dos leucócitos não estaria diretamente relacionada aos produtos da cicloxigenase (HIGGS et al., 1980; BROOKS; DAY et al., 1991), este processo pode ser inibido por diversos AINEs, indicando que vários mecanismos podem estar envolvidos no seu controle. Menezes e colaboradores (2005) demonstraram que a $PGF_{2\alpha}$ era capaz de induzir a migração de leucócitos, sugerindo que a propriedade inibitória de AINEs parece estar principalmente relacionada com a produção reduzida de $PGF_{2\alpha}$.

No teste da peritonite induzida pela carragenina, a administração oral do composto DHP, promoveu inibição dose-dependente da migração total de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos, com DI_{50} de 20,9mg/kg. Esse resultado dose dependente indicou a especificidade da ação exercida pelo DHP em influenciar o estabelecimento do processo inflamatório, reduzindo a migração leucocitária, revelando também nesse modelo, suas propriedades anti-inflamatórias.

Em seguida, para investigar a influência do DHP sobre a dor pós-incisional em ratos, foi avaliada a alodinia mecânica, determinada através do teste de pressão crescente na pata

incisada, conhecido como método *von Frey* eletrônico, que consiste em determinar a latência, expressa em gramas, através de um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força (MOLLER et al., 1998); bem como a hiperalgesia térmica, teste que avalia a latência em segundos, para a retirada da pata incisada, por aplicação de fonte de luz infravermelha (HARGREAVES et al., 1988).

Os modelos experimentais baseados em testes mecânicos permitem a avaliação do aumento da sensibilidade do nociceptor a estímulos inócuos (alodinia) ou nocivos (hiperalgesia). Porém, além de estímulo de nociceptores de fibras A δ e nociceptores de fibras C, também podem ser ativados mecanorreceptores, resultando em estímulos inespecíficos que nem sempre refletem a neurofisiologia da nocicepção (LE BARS et al., 2001). Particularmente, o teste de *von Frey*, é usado para avaliar através do estímulo mecânico inócuo e crescente (alodinia mecânica) a sensibilidade tecidual provocada pela incisão (MOLLER et al., 1998).

O comportamento nociceptivo, observado pelo teste de *Hargreaves*, consiste em medir a reatividade dos animais ao estímulo térmico nociceptivo, através do intervalo de tempo, em segundos, para que o animal retire a pata do local de incidência do estímulo térmico (HARGREAVES et al., 1988). Modelos de estímulos térmicos sensibilizam os termorreceptores e, quando a temperatura é elevada, os nociceptores são ativados, por isso, como em testes mecânicos, podem também apresentar estímulos não específicos onde a reação não representa essencialmente uma resposta nociceptiva (LE BARS et al., 2001).

Durante os três primeiros dias da primeira etapa do experimento, o grupo de animais incisados e posteriormente tratados com veículo, partindo de valores basais, apresentou uma progressiva diminuição da latência, obtendo-se valores mínimos no terceiro dia após a incisão, nos métodos de *von Frey* e de *Hargreaves* na avaliação nociceptiva. Durante todas as etapas do experimento, o grupo de animais não incisados e tratados com o veículo não apresentou alterações significativas nos valores de latências aferidos em ambos os métodos, como esperado.

No terceiro dia, quando se iniciou a segunda etapa experimental com a realização dos tratamentos com o DHP ou com o veículo, garantiu-se que a avaliação dos animais fosse feita sob um estado de dor já estabelecido, em que o comportamento de hipersensibilidade não

fosse influenciado pelo tratamento durante cirurgia ou no período inicial do pós-operatório (WHITESIDE et al., 2004).

Nas avaliações desta segunda etapa, tanto no *von Frey* quanto no *Hargreaves*, o tratamento com o composto DHP (10mg/kg, *p.o.*) exibiu uma atividade antinociceptiva significativa que se iniciaram a partir da primeira hora após o tratamento.

Na alodinia mecânica, as latências observadas no grupo tratado com DHP caracterizaram-se por um aumento progressivo até a leitura de doze horas, quando se obteve o maior percentual de reversão da alodinia. Nos 4º, 7º e 14º dias, da terceira etapa do experimento as latências desse grupo se mantiveram em progressivo aumento, apresentando maior reversão da alodinia no 14º dia não alcançando, entretanto, valores semelhantes aos do grupo não incisado nesse mesmo dia.

Esse potencial antinociceptivo do DHP se assemelharam aos obtidos por Teixeira (2010), que avaliou o potencial analgésico de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais utilizados na clínica médica veterinária, com o mesmo modelo experimental de dor incisional. Esse estudo revelou que no *von Frey*, o flunixin-meglumine, o cetoprofeno e o firocoxibe apresentaram reversão da alodinia máxima, doze horas após as administrações, de forma semelhante ao DHP e diferentemente aos obtidos com o carprofeno (6h) e do meloxicam (9h), tendo somente o cetoprofeno e o meloxicam se destacado na inibição da alodinia mecânica, comparativamente ao composto pirazólico testado.

Na segunda etapa do teste de *Hargreaves*, a latência ao estímulo térmico máxima foi observada três horas após o tratamento com DHP, com percentual de reversão da hiperalgisia de 68,9%, podendo-se observar nas avaliações realizadas nesta e na terceira etapa do experimento, uma recuperação gradual da latência até o 14º dia e, diferentemente do resultado obtido no *von Frey*, a reversão da hiperalgisia alcançou valores semelhantes as do grupo não incisados, não ocorrendo o mesmo com o grupo incisado tratado com veículo.

O teste de *Hargreaves* realizado no estudo de Teixeira (2010) mostrou que a utilização do cetoprofeno e do firocoxibe garantiram uma reversão da hiperalgisia máxima nove horas após as administrações, sendo esses muito superiores aos obtidos com o DHP nesse mesmo tempo. Por outro lado, o meloxicam e o flunixin-meglumine obtiveram reversão da

hiperalgesia máxima após seis horas das administrações e o carprofeno após doze horas das administrações, mantendo também maiores potências antinociceptivas ao estímulo térmico que o DHP.

Estes resultados experimentais demonstram que a administração do DHP, produziu maior reversão da hiperalgesia térmica no método de *Hargreaves* que na alodinia mecânica (*von Frey*), exercendo em ambos os métodos uma antinocicepção significativa.

Na avaliação nociceptiva pelo método de *von Frey*, foi observado que o DHP promoveu significativa reversão da hiperalgesia em um determinado intervalo de duração do experimento, o mesmo ocorrendo no método de *Hargreaves*. Esta efetividade, analisada com o conjunto dos resultados obtidos nos modelos anteriores, indica que o composto estudado apresenta propriedades anti-inflamatórias, considerando que fármacos anti-inflamatórios ao inibirem o processo de síntese de prostaglandinas, desempenham um importante papel na redução dos sinais e sintomas da inflamação, não gerando sensibilização dos nociceptores de fibras aferentes e diminuindo a resposta a estímulos álgicos que resultariam em hiperalgesia.

O aumento da atividade em fibras aferentes sensoriais após dano associado à sensibilização do nociceptor pode alterar o processamento espinhal de informações sensoriais (YAKSH, 1993). Assim, a lesão periférica ou a inflamação podem gerar um estado de facilitação espinhal, em que um estímulo moderado poderá evocar uma descarga profunda nos neurônios nociceptivos do corno posterior, avaliados como uma diminuição nas latências de retirada da pata a um estímulo térmico radiante (HARGREAVES et al., 1988) ou uma diminuição do limiar para estímulos mecânicos (FERREIRA et al., 1978). Esta sensibilização pode ocorrer em nível periférico e central, onde os prostanóides são potentes em sensibilizar os agentes envolvidos na modulação da transdução e transmissão da informação nociceptiva, produzindo hipersensibilidade pronunciada para estímulos mecânicos e térmicos na pele (BURIAN; GEISLINGER, 2005).

Estudos de Ortiz e colaboradores (2005) revelaram que o tratamento com acemetacina, um AINES com estrutura similar a indometacina, foi capaz de diminuir a hiperalgesia térmica induzida pela carragenina de forma dose dependente em camundongos. Já a administração oral de um inibidor seletivo da COX-2 (JTE522) ou indometacina, um potente e clássico inibidor da enzima cicloxigenase, reduziram alodinia tátil (YAMAMOTO et al., 2000).

Portanto, fármacos com propriedades anti-inflamatórias podem inibir a hiperalgesia térmica e a alodinia mecânica, efeitos esses aqui evidenciados após a administração do DHP.

Considerando que alguns dos métodos escolhidos no presente estudo (contorções abdominais, *tail-flick*, formalina, *von Frey* e *Hargreaves*) para a avaliação da atividade antinociceptiva, sempre exigiram respostas motoras dos animais, resultados falso positivos poderiam ser obtidos, caso ocorresse perda da coordenação motora dos animais por sedação e/ou relaxamento muscular. Para descartar tal possibilidade do efeito do composto DHP sobre a motricidade, foi estudado com o teste do *rota-rod*. Neste teste, o pré-tratamento oral dos animais com o DHP, utilizando dose sete vezes maiores que a DI50 obtida no modelo das contorções abdominais, não modificou o número de quedas, nem o tempo de permanência dos camundongos no *rota-rod*, excluindo influências motoras e diferentemente do diazepam, controle positivo do ensaio. Este resultado indicou a especificidade do efeito antinociceptivo do DHP, não sendo acompanhado de depressão do sistema nervoso central, o que seria esperado de um opióide de ação central, tipo morfina.

Corroborando com pesquisas com as quais foram obtidas atividades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas em diferentes compostos pirazólicos (BORNE, 1995; GÖRSOY et al., 2000; MILANO et al., 2008; SAUZEM et al., 2008), nossos resultados revelam que o composto pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) - DHP possui propriedades analgésica e anti-inflamatória, sinalizando perspectivas favoráveis para o desenvolvimento de novos estudos (farmacodinâmicos, farmacocinéticos, toxicidade e clínicos) que determinem a possibilidade, a oportunidade e até mesmo as vantagens da sua utilização no tratamento da dor, bem como de diferentes doenças inflamatórias em relação aos inúmeros fármacos anti-inflamatórios utilizados na clínica médica veterinária.

8 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos nos diferentes ensaios farmacológicos desenvolvidos neste trabalho, concluímos que:

- O composto 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) - DHP possui atividade antinociceptiva no teste das contorções abdominais.
- O efeito antinociceptivo do composto DHP não parece depender de mecanismos de ação no sistema nervoso central, considerando o resultado negativo no modelo experimental do *tail-flick*.
- Os resultados do teste da formalina, quando o DHP foi capaz de inibir a segunda fase de nocicepção (dor inflamatória), não influenciando a primeira fase (dor neurogênica) deste modelo, reforçou a hipótese apresentada no item anterior e indicou mecanismos anti-inflamatórios na antinocicepção do composto.
- A atividade anti-edematogênica evidenciada com a redução do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, representou outra evidência das propriedades anti-inflamatórias do DHP.
- A inibição da migração leucocitária produzida pelo DHP no teste da peritonite por carragenina, reforçou também nesse modelo a atividade anti-inflamatória do composto.
- O DHP inibiu a dor incisional, nos testes da alodinia mecânica (*von Frey*) e da hiperalgesia térmica (*Hargreaves*).
- O DHP não produziu alterações na atividade motora dos animais.

9 PERSPECTIVA

Estes resultados sinalizam favoravelmente para a realização de estudos farmacodinâmicos, farmacocinéticos, de toxicidade e clínicos, que permitirão determinar se o novo composto 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) - DHP, representará avanços no tratamento da dor e da inflamação.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEY, K.O.; LEVINE, J.D. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. **The Journal of Neuroscience**, v.19, n.6, p.2181-2186, 1999.

ALEY, K.O.; MESSING, R.O.; MONCHLY-ROSEN, D.; LEVINE, J.D. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isoenzyme of protein kinase C. **The Journal of Neuroscience**, v.20, n.12, p.4680-4685, 2000.

ARELLANO, R.; SACRISTAN, S.A. Metamizole: reassessment of its therapeutic role. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.38, p.617-619, 1990.

BASBAUM, A.I.; JULIUS, D. Novos alvos contra a dor. **Scientific American Brasil**, v.50, p.76-83, 2006.

BATTAGLIA, G.; RUSTIONI, A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. **The Journal of Comparative Neurology**, v.277, n.2, p.302-312, 1988.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociência – Desvendando o Sistema Nervoso**. Porto Alegre: Artmed, 2^a ed., 2002.

BERTOLINI, A.; OTTANI A.; SANDRINI, M. Selective COX-2 inhibitors and dual acting anti-inflammatory drugs: critical remarks. **Current Medicinal Chemistry**, v.9, n.10, p.1033-1043, 2002.

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

BESSON, J.M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiological Reviews**, v.67, n.1, p.67-186, 1987.

BJÖRKMAN, R. Central antinociceptive affects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. **Acta Anaesthesiologia Scandinavica**, v.39, n.103, p.1-44, 1995.

BRENNAN, F.; CARR, D. B.; COUSINS, M. Pain management: A fundamental human right. **Anesthesia & Analgesia**, v.105, p.205-221, 2007.

BRENNAN, T.J.; VANDERMEULEN, E.; GEBHART, G.F. Characterization of a rat model of incisional pain. **Pain**, v.64, p.493-501, 1996.

BONACORSO, H.G.; OLIVEIRA, M.R.; WENTZ, A.P.; WASTOWSKY, A.D.; OLIVEIRA, A.B.; HÖERNER, M.; ZAMATTA, N.; MARTINS, M.A.P. Haloacetylated enol ethers: 12 [18]. Region specific synthesis and structural determination of stable 5-hydroxy-1H-pyrazolynes. **Tetrahedron**, v.55, p.345-352, 1999.

BORNE, R.F. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: FOYE, W.O.; WILLIAMS, D.A. **Medicinal Chemistry**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1995.

BOTTING, R.M. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927–2004). **Journal of Thermal Biology**, v.31, p.208-219, 2006.

BRICKS, L.F.; SILVA, C.A.A. Toxicidade dos anti-inflamatórios não-hormonais. **Pediatrics**, v.27, n.3, p.181-193, 2005.

BROOKS, P.M.; DAY, R.O. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs – differences and similarities. **The New England Journal of Medicine**, v.324, p.1716-1725, 1991.

BROOKS, P.M.; EMERY, E.; EVANS, F. Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase I and cyclooxygenase II. **Rheumatology**, v.38, p. 779-788, 1999.

BURIAN, M.; GEISSLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacology & Therapeutics**, v.107, p.139-154, 2005.

CARVALHO, W.A.; CARVALHO, R.D.S.; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos inibidores específicos da ciclooxigenase-2: avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.54, p.448-464, 2004.

CHAI, Z.; GATTI, S.; TONIATTI, C.; POLI, V.; BARTFAI, T. Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 β : a study on IL-6 deficient mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v.183, p.311-316, 1996.

CHICHORRO, J.G.; LORENZETTI, B.B.; ZAMPRONIO, A.R. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. **British Journal of Pharmacology**, v.141, p.1175-1184, 2004.

CLARK, T.P. The clinical pharmacology of cyclooxygenase-2-selective and dual inhibitors. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.36, p.1061-1085, 2006.

CORRÊA, C.R.; CALIXTO, J. B. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **British Journal of Pharmacology**, v.110, p.93-98, 1993.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.

COWAN, A.; PORRECA, F.; WHEELER, H. Use of the formalin test in evaluation analgesics. **NIDA Research Monograph**, v.95, p.116-122, 1989.

CUNHA, F.Q.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **British Journal of Pharmacology**, v.104, n.3, p.765-767, 1991.

CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v.107, n.3, p.660-664, 1992.

DAMAS, J.; BOURDON, V.; REMACLE-VOLON, G.; ADAM, A. Kinins and peritoneal exudates induced by carrageenin and zymosan in rats. **British Journal of Pharmacology**, v.101, p.418-422, 1990.

D'AMOUR, F.E.; SMITH, J. A method for determining loss of pain sensation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.72, p.74-79, 1941.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A.H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v.101, p.8-16, 2008.

DEVOR, M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion, **Pain**, v.6, p.27-35, 1999.

DICKENSON, A.H.; SULLIVAN, A.F. Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurones. **Neuroscience Letters** v.83, p.207-211, 1987

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

DINARELO, C.A. Interleukin 1 as mediator of the acute-phase response. **Survey of Immunologic Research**, v.3, n.1, p.29-33, 1984.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 antagonist. **International Reviews of Immunology**, v.16, p.457-499, 1998.

DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenin and turpentine. **Journal of Pathology**, v.104, p.15-29, 1971.

DOUGLASS, D.K.; CARSTENS, E. Responses of rat sacral spinal neurons to mechanical and noxious thermal stimulation of the tail. **Journal of Neurophysiology**, v.77, p.611-620, 1997.

DUBINSKY, B.; GEBREMARIAM, S.; CAPETOLA, R.J.; ROSENTHALE, M.E. The antialgesic drugs: human therapeutic correlates of their potency in laboratory animal models of hyperalgesia. **Agents and Actions**, v.20, n.1/2, p.50-60, 1987.

DUBNER, R.; BENNETT, G.J. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. **Annual Review of Neuroscience**, v.6, p.381-418, 1983.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v.4, p.161-174, 1977.

DUHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v.46, p.208-209, 1957.

ENGELHARDT, G.; BÖGEL, R.; SCHNOTZLER, C.; UTZMANN, R. Meloxicam: Influence on Arachidonic Acid Metabolism – Part II – *In vivo* findings. **Biochemical Pharmacology**, v.51, p.29-38, 1996.

FERRÁNDIZ, M.L.; ALCARAZ, M.J. Antiinflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids: **Agents and Actions**, v.32, n.3-4, p.283-288, 1991.

FERREIRA, K.A.S.L. **Dor e qualidade de vida relacionada a saúde de pacientes com câncer: influência das citocinas pro-inflamatória TNF- α , IL-6, IL-8 e IL1- β** . Tese de doutorado apresentada à Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo, 2008.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; CORREA, F.M. Central and peripheral analgesic action of aspirin-like drugs. **European Journal of Pharmacology**, v. 53, p.39-48, 1978.

FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M.I. Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. **Prostaglandins**, v.18, n.2, p.179-190, 1979.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; BRISTOW, A.F.; POOLE, S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, v.334, n.6184, p.698-700, 1988.

FERREIRA, S.H. The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics. **Drugs**, v.46, n.1, p.1-9, 1993.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytoline-mediated inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v.110, n.3, p.1227-1231, 1993.

FERREIRA, S.H. Hiperálgesia inflamatória, óxido nítrico y control periférico del dolor. **Revista Latino Americana de Dolor**, v.12, p. 6-17, 1995.

FERREIRA, S.H.; FERRARI, L.F.; CUNHA, T.M.; NASCIMENTO, P.G.B.D.; VERRI, W.A.; CUNHA, F.Q. **Dor Inflamatória**. Disponível em: <<http://www.dolinf.br/html/DorInflamatoria.html>>, Acessado em: outubro/2010.

FILHO, M.M.M.; RAHAL, S.C. O uso de antiinflamatórios inibidores COX II seletivos na osteoartrite canina. **Veterinária e Zootecnia**, v.15, n.3. p.407-415, 2008.

FISCHER, L.G.; SANTOS, D.; SERAFIN, C.; MALHEIROS, A.; DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; CECHINEL, V.F.; SOUZA, M.M. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) leaves. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.32, p.235-239, 2008.

FRANCO, G.C.N.; MORETTI, D.; CAVALCANTE, P.F.C.; LOPES, L.C. Uma análise crítica sobre viabilidade do uso dos inibidores seletivos de COX II em odontologia. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v.18, n.1, p.75-81, 2006.

GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11a ed. Rio de Janeiro: Grow-Hill, 2006.

GODOY, M.C.M.; FIGHERA, M.R.; SOUZA, F.R.; FLORES, A.E.; RUBIN, M.A.; OLIVEIRA, M.R.; ZAMATTA, N.; MARTINS, M.A.P.; BONACORSO, H.G.; MELLO, C.F. α_2 -adrenoreceptors and 5-HT receptors mediate the antinociceptive effects of new pyrazolines, but not of dipyrone. **European Journal of Pharmacology**, v.496, p.93-97, 2004.

GOEL, A.; MADAN, A.K. Structure-activity study on anti-inflammatory pyrazole carboxylic acid hydrazide analogs using molecular connectivity indices. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v.35, n.3, p.510-524, 1995.

GOMES, K.S. **Expressão da Proteína Fos na Investigação do Substrato Neural da Antinociceção Induzida pelo Medo**. Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2005.

GONÇALVES, J.C.; OLIVEIRA, F.S.; BENEDITO, R.B.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N.; ARAÚJO, D.A. Antinociceptive activity of (-) Carvone: Evidence of association decrease peripheral nerve excitability. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.31, p.1017-1020, 2008.

GOODMAN, L.; TORRES, B.; PUNKE, J.; REYNOLDS, L.; SPEAS, A.; ELLIS, A.; BUDSBERG, S. Effects of firocoxib and tepoxalin on healing in a canine gastric mucosal injury model. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, p.56-62, 2009.

GÖRSOY, A.; DEMIRAYAK, S.; CAPAN, G.; EROL, K.; VURAL, K. Synthesis and preliminary evaluation of new 5-pyrazolinone derivatives as analgesic agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.35, p.359-364, 2000.

GOUDET, C.; CHAPUY, E.; ALLOUI, A.; ACHER, F.; PIN, J. P.; ESCHALIER, A. Group III metabotropic glutamate receptors inhibit hyperalgesia in animal models of inflammation and neuropathic pain. **Pain**, v.137, p.112-24, 2008.

GREVES, P.L.; NYBERG, F.; TERENIUS, L.; HÖKFELT, T. Calcitonin gene related peptide is a potent inhibitor of substance P degradation. **European Journal Pharmacology**, v.115, p.309-311, 1985.

HARDY, J.D.; WOLFF, H.G.; GOODELL, H. Experimental evidence on the nature of cutaneous hyperalgesia. **The Journal Clinical Investigation**, v.29, n.1, p.115-140, 1950.

HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C.; JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, v.32, n.1, p.77-88, 1988.

HAZEWINKEL, H.A.W.; VAN DEN BROM, W.E.; THEYSE, L.F.H.; POLLMEIER, M.; HANSON, P.D. Comparison of the effects of firocoxib, carprofen and vedaprofen in a sodium urte crystal induced synovitis model of arthritis in dogs. **Research in Veterinary Science**, v.84, p.74-79, 2008.

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

HERNANDEZ, N.; VANEGAS, H. Antinociception induced by PAG-microinjected dipyrone (metamizol) in rats: involvement of spinal endogenous opioids. **Brain Research**, v.896, p.175-178, 2001.

HIGGS, G.A.; EAKINS, K.E.; MUGRIDGE, K.G.; MONCADA, S.; VANE, J.R. The effects on non-steroid anti-inflammatory drugs on leukocyte migration in carrageenin-induced inflammation. **European Journal Pharmacology**, v.66, p.81-86, 1980.

HILÁRIO, M.O.E.; TERRERI, M.T.; LEN, C.A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Journal of Pediatrics**, v.82, n.5, 2006.

HILL, R.G. Molecular basis for the perception of pain. **The Neuroscience**, v.7, p.282-292, 2001.

HOLDEN, J.E.; PIZZI, J. A. The Challenge of chronic pain. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.55, p. 935-948, 2003.

HUCHO, T.; LEVINE, J. D. Signaling pathways in sensitization: Toward a nociceptor cell biology. **Neuron**, v.55, p.365-376, 2007.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesia. **Journal Neuroscience Methods**, v.14, p.69-76, 1985.

HUNSKAAR, S.; BERGER, O.G.; HOLE, K. Dissociation between antinociceptive and antiinflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. **Pain**, v.25, p.125-132, 1986.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v.30, p.103-114, 1987.

INSEL, P.A. Analgesic – antipyretic and anti-inflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: HARDMAN, J.G.; LINBIRD, L.E.; MALINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GOODMAN GILMAN, A. **Pharmacological**, 1996.

ISHII, K.; MOTOYOSHI, S.; KAWATA, J.; NAKAGAWA, H.; TAKEYAMA, K. A useful method for differential evaluation of anti-inflammatory effects due to cyclooxygenase and 5-lipoxygenase inhibitors in mice. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v.65, p.297-303, 1994.

JONES, S.L. Anatomy of pain. In SINATRA, R.S.; HORD, A.H; GINSBERG, B; PREBLE, L. **Acute pain: Mecanisms & Management**. St. Louis: Mosby-YearBook, 1992.

JU, G.; HOKFELT, T.; BRODIN, E.; FAHRENKRUG, J.; FISCHER, J.A.; FREY, P.; ELDE, R.P.; BROWN, J.C. Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and their relation to substance P-, somatostatin-, galanin-, vasoactive intestinal polypeptide- and cholecystokinin-immunoreactive ganglion cells. **Cell and Tissue Research**, v.247, n.2, p.417-431, 1987.

JULIUS, D; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, p.203-210, 2001.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Principles of Neuronal Science**. New York: McGraw-Hill, 2000. p. 472-491.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

KHASABOV, S.G.; ROGERS, S.D.; GHILARDI, J.R.; PETERS, C.M.; MANTYH, P.W.; SIMONE, D.A. Spinal neurons that possess the substance P receptor are required for the development of central sensitization. **The Journal of Neuroscience**, v.22 p.9086-9098, 2002.

KING, J.N.; DAWSON, J.; ESSER, R.E.; FUJIMOTO, R.; KIMBLE, E.F.; MANIARA, W.; MARSHALL, P.J.; O'BYRNE, L.; QUADROS, E.; TOUTAIN, P.L.; LEE, P. Preclinical pharmacology of rofecoxib: a novel selective inhibitor of cyclooxygenase-2. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics**, v.32, p.1-17, 2009.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v.18, p.412, 1959.

KUMMER, C.L.; COELHO, T.C.R.B. Anti-inflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase II (COX II): aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.5, n.4, 2002.

KVATERNICK, V.; POLLMEIER, M.; FISCHER, J.; HANSON, P.D. Pharmacokinetics and metabolism of orally administered firocoxib, a novel second generation coxib, in horses. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics**, v.30, p.208-217, 2007.

LAMONT, L.A.; TRANQUILLI, W.J.; KURT, A.G. Physiology of pain. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 30, n. 4, p.703-728, 2000.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v.53, p.597-652, 2001.

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

LEES, P. Pharmacology of drugs used to treat osteoarthritis in veterinary practice. **Inflammopharmacology**, v.11, p.385-399, 2003.

LEES, P.; LANDONI, M.F.; GIRAUDEL, J.; TOUTAIN, P.L. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. **J Veterinary of Pharmacology and Therapeutics**, v.27, p.479-490, 2004.

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

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

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: An Overview. **Lancet**, v.353, p.1607-1609, 1999.

MAI, C.M.G. **Avaliação do potencial antinociceptivo de novos 3-metil-1h-1-pirazol metil esterres 5-substituídos em camundongos**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

MARNETT, L.J. The COXIB experience: A look in the rear-view mirror. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.49, p.265-290, 2009.

MATHEWS, K.A.; DOHERTY, T.; DYSON, D.H.; WILCOCK, B.; VALLIANT, A. Nephrotoxicity in dogs associated with methoxyflurane anesthesia and flunixin meglumine analgesia. **The Canadian Veterinary Journal**, v.31, p.766-771, 1990.

MATHEUS, M.E.; OLIVEIRA, L.F.; FREITAS, A.C.C.; CARVALHO, A.M.S.P.; BARREIRO, E.J. Antinociceptive property of new 4-acyl-arilhidrazone pyrazole compounds. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.24, p.1219-1222, 1991.

McNAMARA, C.R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D.M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K.L.; ZHAO, M.; HAYWARD, N.J.; CHONG, J.A.; JULIUS, D.; MORAN, M.M.; FANGER, C.M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, n.33, 2007.

MENEZES, G.B.; REIS, W.G.; SANTOS, J.M.; DUARTE, I.D. FRANCISCHI, J.N. Inhibition of prostaglandin F (2alpha) by selective cyclooxygenase 2 inhibitors accounts for reduced rat leukocyte migration. **Inflammation**, v.29, p.163-169, 2005.

MIKAMI, T.; MIYASAKA, K. Effects of several antiinflammatory drugs on the various parameters involved in the inflammatory response in rat carrageenin-induced pleurisy. **European Journal of Pharmacology**, v.95, p.1-12, 1983.

MILANO, J. **Avaliação do Potencial Antinociceptivo de 5-trialometil-4,5-diidro-1h-pirazol metil Ésteres Inéditos em Camundongos**. Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

MILANO, J.; ROSSATO, M.F.; OLIVEIRA, S.M.; DREWES, C.; MACHADO, P.; BECK, P.; ZANATTA, N.; MARTINS, M.A.P.; MELLO, C.F.; RUBIN, M.A.; FERREIRA, J.; BONACORSO, H.G. Antinociceptive action of 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1H-pyrazole methyl ester in models of inflammatory pain in mice. **Life Sciences**, v.83, p.739-746, 2008.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v.57, p.1-164, 1999.

MOLLER, K.A.; JOHANSSON, B.; BERGE, O.G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **Journal of Neuroscience Methods**, v.84, p.41-47, 1998.

MULLER, W.A. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. **Laboratory Investigation**, v.82, p.521-533, 2002.

NESTLER, E.J.; HYMAN, S.E.; MALENKA, R.C. **Molecular neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience**. New York: Macgraw-Hill, 2001.

NODINE, J.H.; SIEGLER, P.E. **Animal and Clinical Pharmacologic Techniques in Drug Evaluation**. EUA, Year Book Medical Publishers Inc. 1964, 660p.

OCHI, T.; GOTO, T. The spinal antinociceptive effect of FR140423 in mice. Involvement of the descending noradrenergic and serotonergic systems. **Life Science**, v.69, p.2256-2264, 2001.

OCHI, T.; FUJII, T.; MOTOYANA, Y.; GOTO, T. Antinociceptive properties of FR140423 mediated through spinal δ - but not M- and κ -, opioid receptors. **European Journal of Pharmacology**, v.380, p.73-79, 1999b.

OCHI, T.; FUJII, T.; MOTOYANA, Y.; GOTO, T. The profile of FR140423, a novel anti-inflammatory compound, in yeast-induced rat hyperalgesia. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.81, n.1, p.94-98, 1999a.

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

OKUSE, K. Pain signalling pathways: from cytokines to ion channels. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, n.3, p.490-496, 2007.

OLIVEIRA, F.S.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N. Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.31, p.588-591, 2008.

OLIVEIRA, C.M.B.; ISSY, A.M.; SAKATA, R.K. Fisiopatologia da dor pós operatória. **Revista Brasileira de Medicina**, v.11, n.67, p.415-418, 2010.

OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; NAMIKI, A. Formalin-induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw. **Brain Research**, v.787, p.161-164, 1998.

ORTIZ, M.I.; CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, G.; GRANADOS-SOTO, V. Pharmacological evidence for the activation of Ca²⁺-activated K⁺ channels by meloxicam in the formalin test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.81, p.725–731, 2005.

OSHIMA, Y.; AKIMOTO, T.; TSUCADA, W.; YAMASAKI, T.; IAMAGUCHI, K.; KOJIMA, H. Studies on pyrimidinylpyrazoles, IV. Pharmacological actives of 1(4-metoxo-6-methyl-2-pyrimidinyl)-3-methyl-5-metoxypyrazol and its related compounds. **Chemical & Pharmaceutical bulletin**, v.17, n.7, p.1492-1497, 1969.

OTERO, P.E. Manejo da dor e a medicina veterinária. In OTERO, P.E. **Dor: avaliação e tratamento em pequenos animais**. São Paulo: Interbook, 2005, p.02-05.

OTTEN, U.; GOEDERT, M.; MAYER, N.; LEMBECK, F. Requirement of nerve growth factor for development of substance P-containing sensory neurones. **Nature**, v.287, p.158-159, 1980.

PAPICH, M.G. An update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Small Animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.38, p.1243-1266, 2008.

PARADA, S.A.; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, v.4, p.937-944, 2001.

PARADA, S.A.; VIVANCOS, G.G.; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fiber causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, n.5, p.2923-2928, 2003.

PARVEEN, Z.; DENG, Y.; SAEED, M.K.; DAI, R.; AHAMAD, W.; YU, Y.H. Antiinflammatory and analgesic activities of Thesium chinese Turcz extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside. **Yakugaku Zasshi**, v.127, p.1275-1279, 2007.

PELLEGRINO, F. Organização funcional das vias da dor. In OTERO, P.E. **Dor: avaliação e tratamento em pequenos animais**. São Paulo: Interbook, 2005. p.06-28.

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

PIRES, P.A. **Potencial analgésico, anti-edematogênico, antipirético e atividade ulcerogênica de fármacos anti-inflamatórios, em roedores**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009.

PONG, S.F.; DEMUTH, S.M.; KINNEY, C.M.; DEEGAN, P. Prediction of human analgesic dosages of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) from analgesic ED50 values in mice. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v.273, p.212-220, 1985.

PORTER, D.G. Ethical scores for animal experiments. **Nature**, v.356, n.6365, p.101-102, 1992.

PROKOPP, C.R. **2-[5-triclorometil-5-hidróxi-3-fenil-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il]-4-(4-bromofenil)-5-metiltiazol (B50) provoca antinocicepção em camundongos**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria, 2004.

RANG, H.P.; BEVAN, S.; DRAY, A. Chemical activation of nociceptive peripheral neurons. **British Medical Bulletin**, v.47, n.3, p.534-548, 1991.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 6ª Ed. Editora Elsevier, 2007.

RATES, S.M.K.; BARROS, H.M.T. Modelos animais para a avaliação da dor: métodos para triagem de novos analgésicos. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.75, n.2, p.3134, 1994.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; THOMAZZI, S.M.; PASCHOALATO, A.B.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v.387, n.1, p.111-118, 2000.

ROTH, J.; RUMMEL, C.; BARTH, S.W.; GERSTBERGER, R.; HÜBSCHLE, T. Molecular aspects of fever and hyperthermia. **Immunology And Allergy Clinics of North America**, v.29, p.229-245, 2009.

SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, v.31, p.381-389, 1997.

SANTOS, A.R.S.; VEDANA, E.M.A.; FREITAS, G.A.G. Antinociceptive effects of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflammation Research**, v.47, p.302-307, 1998.

SAUZEM, P.D. **Derivados pirazólicos inéditos causam antinocicepção em camundongos no teste da formalina**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria, 2004.

SAUZEM, P.D.; MACHADO, P.; RUBIN, M.A.; SANT'ANNA, G.S.; FABER, H.B.; SOUZA, A.H.; MELLO, C.F.; BECK, P.; BURROW, R.A.; BONACORSO, H.G.; ZANATTA, N.; MARTINS, M.A.P. Design and microwave-assisted synthesis of 5-trifluoromethyl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles: Novel agents with analgesic and anti-inflammatory properties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.43, p.1237-1247, 2008.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Can we conquer pain? **Nature Neurosci**, v.5, p.1062-1067, 2002.

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

SHIN, J.W.; HWANG, K.S.; KIM, Y.K.; LEEM, J.G.; LEE, C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs suppress pain-related behaviors, but not referred hyperalgesia of visceral pain in mice. **Anesthesia & Analgesia**, v.102, p.195-200, 2006.

SIEGMUND, E.; CADMUS, R.; LU, G. Method for evaluating both nonnarcotic and narcotic analgesics. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.95, p.729, 1957.

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

SMITH, C.H.; BARKER, J.N.; MORRIS, R.W.; MACDONALD, D.M.; LEE, T.H. Neuropeptides induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocytic infiltration in human skin. **The Journal of Immunology**, v.151, n.6, p.3274-3282, 1993.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry: The principles and Practice of Statistics**. New York: W. H. Freeman, 1981.

SORKIN, L. S.; WALLACE, M. S. Acute pain mechanisms. **Surgical Clinics of North America**, v.79, p.213-229, 1999.

SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. Analgesic and antiinflammatory screening of two Brazilian medicinal plants: A positive and a falsepositive result. **Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v.49, n.5/6, p.417-421, 1997.

SOUZA, F.R.; FIGHERA, M.R.; LIMA, T.T.F.; BASTIANI, J.; BARCELLOS, I.B.; ALMEIDA, C.E.; OLIVEIRA, M.R.; BONACORSO, H.G.; FLORES, A.E.; MELLO, C.F. 3-metil-5-hidróxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1*H*-1-piraxolcarboxiamide induces antinociception. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.68, p.525-530, 2001.

SOUZA, F.R.; SOUZA, V.T.; RATZLAFF, V.; BORGES, L.P.; OLIVEIRA, M.R.; BONACORSO, H.G.; ZAMATTA, N.; MARTINS, M.A.P.; MELLO, C.F. Hypothermic and antipyretic effects of 3-metyl and 3-phenyl-5-hidróxi-5-triclorometil-4,5-diidro-1*H*-1-

piraxolcarboxiamide induces antinociception. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.451, p.141-147, 2002.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIAK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

STEAGALL, P.V.M.; MOUTINHO, F.Q.; MATOVANI, F.B.; PASSARELLI, D.; THOMASSIAN, A. Evaluation of the adverse effects of subcutaneous carprofen over six days in healthy cats. **Research in Veterinary Science**, v.86, p.115-120, 2009.

TABARELLI, Z.; RUBIN, M.A.; BERLESE, D.B.; SAUZEN, P.D.; MISSIO, T.P.; TEIXEIRA, M.V.; SINHORIN, A.P.; MARTINS, M.A.P.; ZAMATTA, N.; BONACORSO, H.G.; MELLO, C.F. Antinociceptive, effects of model pyrazolines en mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, *in press*, 2004.

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

TAIWO, Y.O.; BJERKNES, L.K.; GOETZL, E.J.; LEVINE, J.D. Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. **Neuroscience**, v.32, n.3, p.577-580, 1989.

TASSORELLI, C.; GRECO, R.; WANG, D.; SANDRINI, G.; NAPPI, G. Prostaglandins, glutamate and nitric oxide synthase mediate nitroglycerin-induced hyperalgesia in the formalin test. **European Journal Pharmacology**, v.534 p.103-107, 2006.

TEIXEIRA, F.M. **Avaliação comparativa do efeito de fármacos anti-inflamatórios com a acupuntura no modelo de dor pós-incisional em ratos** Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2010.

TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6ª ed. São Paulo: Editora Roca, 2002.

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

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

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

TRACEY, D.J.; DE BIASI, S.; PHEND, K.; Rustioni, A. Aspartate-like immunoreactivity in primary afferent neurons. **Neuroscience**, v.40, n.3, p.673-686, 1991.

TSUJI, K.; KONISHI, N.; SPEARS, G.W.; OGINO, T.; NAKAMURA, K.; TOJO, T.; OCHI, T.; SHIMOJO, F.; SENOH, H.; MATSUO, M. Studies on anti-inflammatory agents. V. Synthesis and pharmacological properties of 3-(difluormetil)-1-(4-metoxifenil)-5-[4-(metilsulfinil)fenil] pyrazole and relates compounds. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.45, p.1475-1481, 1997.

TUBARO, A.; DRI, P.; MELATO, M.; MULAS, G.; BIANCHI, P.; DEL NEGRO, P.; DELLA LOGGIA, R. In the croton oil ear test the effects of non steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) are dependent on the dose of the irritant. **Agents & Actions**, v.19, p.371-373, 1986.

VACHER, P.J.; DUCHÉNE-MARULLAZ, P.; BARBOT, P. A propos de quelques produits usuels – comparaison de deux méthodes d'étude des analgésiques. **Medicina Experimentalis**, v.11, p.51-58, 1964.

VALE, M.L. **Atividade analgésica das interleucinas 4, 13 e 10 (IL-4, IL-13 e IL10) na dor inflamatória experimental**: Papel de células residentes e citocinas. Dissertação de Mestrado em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, 2000.

VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirinlike drugs. **Nature New Biology**, v.231, p.232-239, 1971.

VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenase 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.38, p.97-120, 1998.

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

VERRI JR, W.A.J.; CUNHA, T.M.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, v.112, p.116-138, 2006.

VINCENT, M.B.; WHITE, L.R.; ELSAS, T.; QVIGSTAD, G.; SJAASTAD, O. Substance P augments the rate of vasodilation induced by calcitonin gene-related peptide in porcine ophthalmic artery in vitro. **Neuropeptides**, v.22, p. 137-141, 1992.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELOH, J.L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in the rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.143, p.711-714, 1973.

VON FREY, M. Untersuchungen über die Sinnesfunctionen der menschlichen Haut. **Bandes der Abhandlungen der mathematisch-physischen Classe der Königl. Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften**, v.23, p.175-266, 1896.

YAKSH, T.L. The spinal pharmacology of facilitation of afferent processing evoked by high-threshold afferent input of the postinjury pain state. **Current Opinion in Neurology and Neurosurgery**, v.6, p.250–256. 1993.

ZAKARIA, Z.A.; GOPALAN, H.K.; ZAINAL, H.; MOHD POJAN, N.H.; MORSID, N.A.; ARIS, A.; et al. Antinociceptive, antiinflammatory and antipyretic effects of *Solanum nigrum* Chloroform extract in animal models. **Yakugaku Zasshi**, v.126, p.1171-1178, 2006a.

ZAKARIA, Z.A.; ABDUL, Z.D.G.; RADEN, R.N.M.N; GOPALAN, H.K.; SULAIMAN, M.R.; ABDULLAH, F.C. Antinociceptive and antiinflammatory activities of *Dicranopteris linearis* leaves chloroform extract in experimental animals. **Yakugaku Zasshi**, v.126, p.1197-1203, 2006b.

ZANINI JUNIOR, J.C.; MEDEIROS, Y.S.; CRUZ, A.B.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Actions of compounds from *Mandevilla velutina* on croton oil-induced ear edema in mice. A comparative study with steroidal and nonsteroidal antiinflammatory drugs. **Phytotherapy Research**, v.6, p.1-5, 1992.

ZHANG, B.; LI, B.J.B.; ZHANG, D.M.; DING,Y.; DU, G.H. Analgesic and antiinflammatory activities of a fraction rich in Gaultherin isolated from *Gaultheria yunnanensis* (Franch.) Rehder. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.30, n.3, p.465-469, 2007.

ZHANG, H. M.; CHEN, S. R.; PAN, H. L. Effects of activation of group III metabotropic glutamate receptors on spinal synaptic transmission in a rat model of neuropathic pain. **Neuroscience**, v.158, p.875-884, 2009.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, n.2, p.109-110, 1983.

ZIMMERMANN, M. Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. **Acta physiologica Scandinavica Supplementum**, v.554, p.221-233, 1986.

WATKINS, L.R.; GOEHLER, L.E.; RELTON, J.; BREWER, M.T.; MAIER, S.F. Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) hyperalgesia. **Brain Research**, v.692, n.1-2, p.244-250, 1995.

WHITESIDE, G.T.; HARRISON, J.; BOULET, J.; MARK, L.; PEARSON, M.; GOTTSALL, S.; WALKER, K. Pharmacological characterization of a rat model of incisional pain. **British Journal of Pharmacological**, v.141, p.85-91, 2004.

WOOLF, C.J.; COSTIGAN, M. transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, p.7723-7730, 1999.

WOOLF, C.J.; SALTER, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v.288, p.1765-1769, 2000.

YAKSH, T.L.; HAMMOND, D.L. Peripheral and central substrates involved in the rostral transmissions of nociceptive information. **Pain**, v.13, p.1-85, 1982.

YAMAMOTO, T.; SAKASHITA, Y.; OZAKI-TAGUCHI, N. Anti-allodynic effects of oral COX-2 selective inhibitor on postoperative pain in the rat. **Canadian Journal Anesthesiology**, v.47, n.4, p.354-360, 2000.

YEDGAR, S.; KRIMSKY, M.; COHEN, Y.; FLOWER, R. Treatment of inflammatory diseases by aselective eicosanoid inhibitor: a double-edged sword? **Pharmacological Sciences**, v.28, n.9, p.459-464, 2007.