

ALESSANDRA BEIRITH

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA ESPINHAL E
SUPRAESPINHAL DA DIPIRONA NOS TESTES DA
FORMALINA, CAPSAICINA E GLUTAMATO - ESTUDO DO
MECANISMO DE AÇÃO**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.
Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Florianópolis
1999

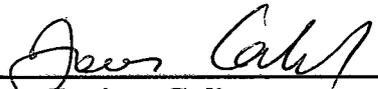
**“ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA ESPINHAL E
SUPRAESPINHAL DA DIPIRONA NOS TESTES DA
FORMALINA, CAPSAICINA E GLUTAMATO – ESTUDO DO
MECANISMO DE AÇÃO”**

POR

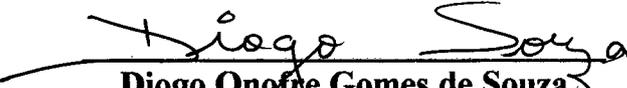
ALESSANDRA BEIRITH

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e membros
da Banca Examinadora, composta pelos
Professores Doutores:**

Banca Examinadora:



João Batista Calixto
(FMC/UFSC-Membro-Titular)



Diogo Onofre Gomes de Souza
(UFRGS/RS-Membro Titular)



Giles Alexander Rae
(FMC/UFSC-Membro Titular)
e
**Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC**

Florianópolis, 12 de Março de 1999.

BEIRITH, Alessandra. **Atividade antinociceptiva espinhal e supraespinhal da dipirona nos teste da formalina, capsaicina e glutamato. Estudo do mecanismo de ação.** Florianópolis, 1999. 88 p
Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Defesa: 12/03/1999

Estudo do efeito antinociceptivo da dipirona em diversos modelos de nocicepção em camundongos. A dipirona apresentou atividade antinociceptiva nos testes de dor induzida pela formalina, capsaicina e glutamato, na hiperalgesia induzida pelo glutamato e nos testes de retirada da cauda (*tail flick*) e placa quente. A antinocicepção causada pela dipirona não parece envolver a participação dos sistemas opióide, GABAérgico, serotoninérgico, adrenérgico, da via L-arginina - óxido nítrico, da proteína G sensível a toxina pertussis, canais de potássio sensíveis ao ATP ou ainda por hormônios secretados pelas glândulas adrenais. Sua atividade antinociceptiva não está relacionada a efeito relaxantes musculares ou sedativos sobre o sistema nervoso central. No entanto, seu efeito antinociceptivo parece estar relacionado à modulação da atividade de aminoácidos excitatórios, um vez que a dipirona inibiu a união específica (*binding*) de [³H] glutamato, a nocicepção e a hiperalgesia induzidas pelo glutamato.

Palavras chave: antinociceptivo, dipirona, nocicepção, camundongos, formalina, capsaicina, glutamato, hiperalgesia, retirada da cauda (*tail flick*), placa quente, opióide, GABAérgico, serotoninérgico, adrenérgico, L-arginina, óxido nítrico, proteína G, toxina pertussis, canais de potássio, glândulas adrenais, união específica (*binding*), [³H] glutamato.

Não te pergunto qual é teu nome, qual é tua nacionalidade, quais são tuas origens, porém qual é o teu sofrimento.

Pasteur

Tenho pavor de sentir dor, qualquer tipo de dor.

*Vera Goulart de Souza
Taquígrafa da Assembléia Legislativa
do Estado de Santa Catarina.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Calixto, pela rigidez e incentivo constantes e pelo exemplo de determinação, perseverança, e principalmente, de consistência e consciência de pesquisa básica.

Ao colega Adair, por me trazer para a Farmacologia, ensinar boa parte do que aprendi e me "contaminar" com encantamento pela pesquisa.

Às professoras Tânia Pasa, pela amizade e sugestões, e Ana Lúcia Rodrigues pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas da turma de mestrado, Elke, Adriana, Rafaela, Nelson e Eduardo e todos os outros colegas da pós-graduação que pensaram com minhas cobranças.

Ao grupo de alunos do professor Calixto, que junto com a Rosana e a Patrícia formam minha "família" em Florianópolis.

Aos amigos, Rosana, Daniela, Martha, Juliano, Patrícia Vianna, Eduardo, Tânia Saleh, Nelson e Ana Paula Trentin, que participam de todas as conquistas e desapontamentos na Farmacologia.

A Ângela Beirith, pela grande amigona que é e pelo auxílio técnico na realização deste trabalho.

Ao sempre companheiro Arthur, pelos conselhos, questionamentos e discussões, ajuda na realização deste trabalho e sobretudo pela paciência.

Aos rapazes do biotério (Pedro, João, "seu" Zeri e Robertão), por estarem sempre ajudando a manter a estrutura para realização dos experimentos.

A meus pais, Maria e Alexandre, pelo apoio e compreensão constantes.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. ANIMAIS	16
3.2. INJEÇÃO INTRATECAL (i.t.)	16
3.3. INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR (i.c.v.)	17
3.4. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA	17
3.4.1. Nociceção induzida pela formalina	17
3.4.2. Nociceção induzida pela capsaicina	19
3.4.3. Nociceção e edema de pata induzidos pela injeção intraplantar de glutamato	19
3.4.4. Teste da retirada da cauda (<i>tail flick</i>)	21
3.4.5. Teste da placa quente	21
3.4.6. Hiperalgesia induzida pelo glutamato	22
3.4.7. Medida do desempenho motor	23
3.5. ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO	23
3.5.1. Participação do sistema opióide na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina	23
3.5.2. Participação do sistema serotoninérgico na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina	24
3.5.3. Participação da proteína G (sensível à toxina pertussis) na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina	24
3.5.4. Participação do sistema GABAérgico na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina	25
3.5.5. Participação da via L-arginina - óxido-nítrico na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina	25
3.5.6. Participação de canais de K_{ATP} na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina	26
3.5.7. Participação de corticóides endógenos liberados pela glândula suprarenal na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina	26
3.5.8. Participação do sistema adrenérgico na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina	27
3.6. EFEITO DA DIPIRONA SOBRE AS ÓXIDO NÍTRICO SINTASES CONSTITUTIVA E NEURONAL	28
3.6.1. Preparação da óxido nítrico sintase constitutiva neuronal (nONS)	28
3.6.2. Preparação da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) de macrófagos e medida da sua atividade	28
3.6.3. Ensaio da atividade da iNOS e nNOS	29
3.7. EFEITO DA DIPIRONA SOBRE A UNIÃO ESPECÍFICA (<i>BINDING</i>) DE $[^3H]$ GLUTAMATO	29
3.8. DROGAS E SOLUÇÕES UTILIZADAS	31
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4. RESULTADOS	32
4.1. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA	32
4.1.1. Nociceção induzida pela formalina	32
4.1.2. Nociceção induzida pela capsaicina	37

4.1.3.	Nociceção e edema de pata induzidos pela injeção intraplantar de glutamato	39
4.1.4.	Teste da retirada da cauda (<i>tail flick</i>) e da placa quente	43
4.1.5.	Hiperalgisia induzida pelo glutamato	44
4.1.6.	Medida do desempenho motor	46
4.2.	ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO	46
4.2.1.	Participação do sistema opióide na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina	46
4.2.2.	Participação do sistema serotoninérgico na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina	46
4.2.3.	Participação da proteína G (sensível à toxina pertussis) na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina	49
4.2.4.	Participação do sistema GABAérgico na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina	49
4.2.5.	Participação da via L-arginina - óxido-nítrico na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina	52
4.2.6.	Participação de canais de K _{ATP} na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina	52
4.2.7.	Participação de corticóides endógenos liberados pela glândula suprarenal na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina	55
4.2.8.	Participação do sistema adrenérgico na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina	55
4.3.	EFEITO DA DIPIRONA SOBRE AS ÓXIDO NÍTRICO SINTASES CONSTITUTIVA E NEURONAL	58
4.4.	EFEITO DA DIPIRONA SOBRE A UNIÃO ESPECÍFICA (BINDING) DE [³H] GLUTAMATO	59
5.	DISCUSSÃO	61
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fórmula estrutural da dipirona	7
Figura 2 -	Duração do efeito antinociceptivo da dipirona, administrada por via intraperitoneal, sobre a nociceção induzida pela formalina	32
Figura 3 -	Efeito antinociceptivo causado pela dipirona, administrada por via intraperitoneal ou intraplantar, sobre a nociceção induzida pela formalina	34
Figura 4 -	Efeito antinociceptivo causado pela dipirona, administrada por via intratecal ou intracerebroventricular, sobre a nociceção induzida pela formalina	35
Figura 5 -	Efeito antinociceptivo causado pela dipirona, administrada por via intraperitoneal ou intraplantar, sobre a nociceção induzida pela capsaicina	36
Figura 6 -	Efeito antinociceptivo causado pela dipirona, administrada por via intratecal ou intracerebroventricular, sobre a nociceção induzida pela capsaicina	37
Figura 7 -	Curva dose-resposta da nociceção e do edema de pata induzidos pela injeção intraplantar de glutamato	39
Figura 8 -	Efeito antinociceptivo causado pela dipirona, administrada por via intraperitoneal, intraplantar, intratecal ou intracerebroventricular, sobre a nociceção induzida pelo glutamato	41

Figura 9 - Efeito antinociceptivo causado pela dipirona e morfina, administradas por via intraperitoneal e subcutânea respectivamente, nos testes da retirada da cauda e da placa quente	42
Figura 10 - Efeito antinociceptivo causado pela dipirona, administrada por via intraperitoneal, sobre a hiperalgesia induzida pelo glutamato	43
Figura 11 - Efeito antinociceptivo causado pela dipirona, administrada por via intracerebroventricular ou intratecal, sobre a hiperalgesia induzida pelo glutamato	44
Figura 12 - Influência do pré-tratamento de camundongos com naloxona sobre a atividade antinociceptiva da dipirona ou morfina, no modelo da formalina	46
Figura 13 - Influência do pré-tratamento de camundongos com cloridrato de DL-p-clorofenilalanina sobre a atividade antinociceptiva da dipirona ou morfina, no modelo da formalina	47
Figura 14 - Influência do pré-tratamento de camundongos com toxina pertussis sobre a atividade antinociceptiva da dipirona ou morfina, no modelo da formalina	49
Figura 15 - Influência do pré-tratamento de camundongos com faclofen sobre a atividade antinociceptiva da dipirona ou baclofen, no modelo da formalina	50
Figura 16 - Influência do pré-tratamento de camundongos com L-arginina sobre a atividade antinociceptiva da dipirona ou N ^G -nitro-L-arginina, no modelo da formalina	52
Figura 17 - Influência do pré-tratamento de camundongos com glibenclamida sobre a atividade antinociceptiva da dipirona ou morfina, no modelo da formalina	53
Figura 18 - Influência da adrenalectomia sobre a atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina	55
Figura 19 - Influência do pré-tratamento de camundongos com prazosin e ioimbina sobre a atividade antinociceptiva da dipirona, fenilefrina ou clonidina, no modelo da formalina	56
Figura 20 - Efeito da dipirona sobre a atividade das óxido nítrico sintases constitutiva e neuronal	57
Figura 21 - Efeito da dipirona sobre a união específica(<i>binding</i>) de [³ H] glutamato	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios das DI ₅₀ s e inibições máximas para a atividade antinociceptiva da dipirona na nocicepção induzida pela formalina, capsaicina e glutamato em camundongos	59
Tabela 2 - Valores médios das DI ₅₀ s e inibições máximas para a atividade antinociceptiva da dipirona na hiperalgesia induzida pelo glutamato em camundongos	60

RESUMO

1 – Este estudo foi destinado a investigar os mecanismos envolvidos na antinocicepção causada pela dipirona, administrada através das vias intraperitoneal (i.p.), intraplantar (i.pl.), intratecal (i.t.) ou intracerebroventricular (i.c.v.) em diversos modelos de nocicepção química e térmica em camundongos. Também avaliamos, através do uso de ensaios neuroquímicos, se a antinocicepção causada pela dipirona estaria relacionada à sua interação com as óxido nítrico sintases constitutiva e induzida ou com a ligação do glutamato aos seus receptores.

2 – A dipirona (90,0 – 720,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) causou inibição, significativa e dependente da dose, de ambas as fases da nocicepção induzida pela formalina (2,5% em 20 μL). Os valores médios das $\text{DI}_{50\text{S}}$ (a dose ou concentração das drogas capaz de reduzir em 50% as respostas nociceptivas em relação ao valor controle) para estes efeitos foram 154,5 e 263,7 $\mu\text{mol/kg}$, respectivamente. Quando co-injetada localmente, em associação com formalina, a dipirona (0,1 – 30,0 $\mu\text{mol/pata}$) também produziu inibição significativa e dependente da dose, de ambas as fases do teste da formalina, sendo contudo, mais potente (cerca de 2 vezes) e mais eficaz em relação à segunda fase. Os valores médios das $\text{DI}_{50\text{S}}$ foram 2,6 e 1,2 $\mu\text{mol/pata}$, respectivamente. Da mesma forma, administrada por via i.c.v. (0,09 – 1,8 $\mu\text{mol/sítio}$) ou i.t. (0,3 – 3,0 $\mu\text{mol/sítio}$), a dipirona produziu inibição equipotente e dependente da dose de ambas as fases da nocicepção induzida pela formalina. Os valores médios das $\text{DI}_{50\text{S}}$ para estes efeitos foram 0,4 e 1,3 $\mu\text{mol/sítio}$ em relação à primeira fase e 0,4 e 0,9 $\mu\text{mol/sítio}$ em relação à segunda fase da nocicepção induzida pela formalina, respectivamente. Entretanto, independente da via de administração utilizada, a dipirona não apresentou efeito significativo sobre o edema de pata associado à fase inflamatória do teste da formalina.

3 – A dipirona, administrada através das vias i.p. (30,0 – 360,0 $\mu\text{mol/kg}$), i.pl. (0,1 – 30,0 $\mu\text{mol/pata}$), i.t. (0,3 – 3,0 $\mu\text{mol/sítio}$) ou i.c.v. (0,09 – 1,8 $\mu\text{mol/sítio}$), inibiu, de maneira significativa e dependente da dose, a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina (1,6 μg em 20 μL). Os valores médios das $\text{DI}_{50\text{S}}$ para estes efeitos foram: 207,6 $\mu\text{mol/kg}$, 2,2 $\mu\text{mol/pata}$, 0,4 $\mu\text{mol/sítio}$ e 0,14 $\mu\text{mol/sítio}$, respectivamente.

4 – A injeção i.pl. de glutamato (0,3 – 60,0 $\mu\text{mol/pata}$) causou um estímulo nociceptivo dependente da dose, caracterizado pelos comportamentos de lambar, agitar, morder ou elevar a pata injetada. A resposta nociceptiva induzida pelo glutamato foi evidente nos primeiros 15 min após sua injeção, diminuindo entre 15 e 30 min e estando praticamente ausente dos 30 aos 40 min. O valor médio da DE_{50} para este efeito (calculado entre 0 e 15 min) foi 2,6 $\mu\text{mol/pata}$. A resposta máxima nociceptiva ($84,8 \pm 13,2$ s) foi observada na concentração de 30,0 $\mu\text{mol/pata}$. A resposta nociceptiva máxima durou 15 min após a injeção de glutamato, e este tempo foi utilizado para a avaliação da atividade antinociceptiva da dipirona neste teste. Além disso, a injeção i.pl. de glutamato também causou aumento dependente da dose no volume das patas, com valor médio da DE_{50} de 0,5 $\mu\text{mol/pata}$ e formação máxima de edema de $70,5 \pm 3,9$ mg na concentração de 10 $\mu\text{mol/pata}$.

5 – A dipirona, quando administrada através das vias i.p. (90,0 – 540,0 $\mu\text{mol/kg}$), i.pl. (1,0 – 30,0 $\mu\text{mol/pata}$), i.t. (0,3 – 3,0 $\mu\text{mol/sítio}$) ou i.c.v. (0,1 – 1,8 $\mu\text{mol/sítio}$) preveniu, de maneira dependente da dose, a nocicepção induzida pelo glutamato (30,0 $\mu\text{mol/pata}$, i.pl.). Os valores médios das $\text{DI}_{50\text{S}}$ para estes efeitos foram: 118,6 $\mu\text{mol/kg}$, 6,3 $\mu\text{mol/pata}$, 1,2 $\mu\text{mol/sítio}$ e 0,3 $\mu\text{mol/sítio}$, respectivamente. Independente da via de administração utilizada, a dipirona não reduziu significativamente o edema de pata causado pela injeção i.pl. de glutamato.

6 – A dipirona (0,3 – 1,2 mmol/kg, i.p.) administrada 30 min antes, causou um aumento significativo no tempo de latência nos testes da retirada da cauda e placa quente. Em condições semelhantes, a morfina (26,6 µmol/kg, subcutânea), utilizada como droga de referência e administrada 30 min antes, causou efeito antinociceptivo significativo em ambos modelos.

7 – A dipirona, administrada i.p. (3,0 – 30,0 µmol/kg), i.c.v. (30,0 – 300,0 nmol/sítio) ou i.t. (9,0 – 90,0 nmol/sítio) inibiu, de forma significativa e dependente da dose, a hiperalgesia induzida pelo glutamato (100 nmol/sítio, i.t.). Os valores médios das DI_{50s} (calculados aos 5 min) foram: 9,0 µmol/kg, 93,9 nmol/sítio e 28,7 nmol/sítio, respectivamente.

8 – O efeito antinociceptivo causado pela dipirona não foi influenciado pela naloxona, L-arginina, faclofen, glibenclamida, cloridrato de DL-p-clorofenilalanina, toxina pertussis ou pelos hormônios secretados pelas glândulas adrenais, quando avaliado no modelo da formalina. Seu efeito antinociceptivo também não está associado a possíveis efeitos não específicos como relaxamento muscular ou sedação dos animais.

9 – A dipirona (10,0 – 1000,0 µM) produziu uma modesta mas significativa inibição da união específica (*binding*) de [3H] glutamato em membranas de córtices cerebrais de ratos e camundongos. No entanto, a dipirona (3,0 – 90,0 µM) não apresentou efeito significativo sobre as atividades da óxido nítrico sintase constitutiva e induzida.

10 – Concluindo, estes resultados demonstram que a dipirona produz antinocicepção periférica, espinhal e supraespinhal dependente da dose quando avaliada nos modelos de nocicepção neurogênica induzida pela formalina, pela capsaicina e pelo glutamato em camundongos. Seu efeito antinociceptivo não parece estar relacionado com a via L-arginina - óxido nítrico, sistema serotoninérgico, ativação da proteína G_i sensível à toxina pertussis, interação com canais de potássio sensíveis a ATP, receptores $GABA_B$, ou com a liberação de glicocorticóides endógenos. Seu efeito antinociceptivo está associado, pelo menos em parte, com a inibição da ligação do glutamato aos seus receptores ou modulando diretamente as ações hiperalgélicas dos aminoácidos excitatórios.

A maioria destes resultados está publicada em:

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; RODRIGUES, A.L.S.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; CALIXTO, J.B. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyron in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 345, p. 233 – 245, 1998.

Além deste trabalho, outros estudos que foram desenvolvidos durante o curso de Mestrado estão publicados ou aceitos nas seguintes revistas:

PERES, M.T.L.P.; DELLE MONACHE, F.; PIZOLATTI, M.G.; SANTOS, A.R.S.; BEIRITH, A.; CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A. Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmaco-chemical criteria used in their isolation. **Phytother. Res.**, v. 12, p. 209 – 211, 1998.

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B.; HESS, S.C.; MESSANA, I.; FERRARI, F.; YUNES, R.A. Study of the Antinociceptive Action of the Ethanolic Extract and the Triterpene 24-Hydroxytormentonic Acid Isolated from *Ocotea suaveolens* (Meissn) Hassler. **Planta Medica**, v. 65, p. 50 – 55, 1999.

BEIRITH, A., CRECZYNSKI-PASA, T.B.; BONETTI, V.R.; KONZEN, M.; SEIFRIZ, I.; PAULA, M.S.; FRANCO, C.V.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties and nitric oxide synthase inhibitory action of new ruthenium complexes. **Eur. J. Pharmacol.**, (no prelo).

1. INTRODUÇÃO

A história do homem confunde-se com a da dor. Filósofos, pensadores, médicos, sacerdotes, psicólogos e sociólogos sempre se curvaram ante este problema que pertence ao homem, como uma realidade intrínseca a sua natureza. O homem sofre fisicamente desde que existe, e a dor é, ainda hoje, um dos mais senão o mais freqüente motivo que leva o paciente ao médico. Entretanto, a proximidade da dor sintomática parece, para o homem, tão certa quanto a ausência de uma explicação uníssona, capaz de dizer-lhe por que sofre. O interesse voltado ao estudo da natureza e do significado da dor física é bastante antigo: gerações inteiras de estudiosos procuraram fornecer um esclarecimento a esta questão.

Devido ao aspecto desagradável da dor, o desconforto que causa, às vezes até agravando o estado da doença, muitos investigadores envolvidos no estudo dos mecanismos moduladores da dor têm concentrado esforços em mapear suas vias e eliminá-la através de meios farmacológicos e/ou cirúrgicos. Buscando aliviar o incômodo causado pela dor física, pode-se até mesmo esquecer de que a dor tem a importante função de proteger e preservar o organismo, alertando sistemas reparadores de que há algo incompatível com o seu funcionamento normal. Não é por acaso que a natureza criou um sistema complexo de percepção e resposta ao estímulo nociceptivo (ou estímulo doloroso), é sobretudo, devido ao seu papel imprescindível como "sintoma de doença". O risco aparece quando esta dor "benéfica" torna-se "prejudicial", como no caso das lesões nervosas, podendo debilitar o paciente (IADAROLA e CAUDLE, 1997).

A procura incessante de explicações sobre a origem, causas e mecanismos da dor ocasionou um progresso substancial no conhecimento de suas características. Descobriu-se muito de seus aspectos biológicos, anátomo-funcionais, neurofisiológicos, bioquímicos e

fisiológicos. Parece-nos prematuro efetuar, ainda hoje, um balanço desse grande trabalho. De fato, tudo o que foi delineado, entrevisto ou suposto está à disposição para interpretações capazes de indicar quais os elementos que devem ser mantidos e que caminho deve ser seguido para o esclarecimento de processos envolvidos na transmissão dolorosa e na prevenção e/ou cura da dor física.

Na busca de agentes que restringissem a sensibilidade do organismo à dor física, surgiu um grupo de drogas genericamente denominadas de "drogas antiinflamatórias não esteroidais" (DAINES), cujas propriedades farmacológicas foram inicialmente relatadas no final do século XIX. Dentro desta classe estão incluídos os mais diversos grupos de substâncias químicas como salicilatos¹, derivados do p-aminofenol², derivados do pirazol³, ácidos arilalcanóicos e seus derivados⁴ e os derivados do ácido antranílico⁵, que têm em comum as propriedades antipiréticas, analgésicas e antiinflamatórias (KOROLKOVAS e BURCKHALTER, 1976; INSEL, 1996). O mecanismo de ação preciso dessa classe de medicamentos permaneceu desconhecido durante praticamente um século, embora essas drogas fossem utilizadas clinicamente para o alívio dos mais diversos tipos e intensidades de dor. Foi somente em 1971 que Vane obteve os primeiros indícios de que a atividade analgésica do ácido acetil salicílico (aspirina) era oriunda da inibição da síntese de prostaglandinas. As primeiras observações foram feitas em homogenatos de pulmão de cobaias, plaquetas humanas e baço de cães. As prostaglandinas são substâncias geradas a partir do ácido araquidônico - parte integrante dos fosfolípidos de membrana - , que por sua vez, é o produto liberado da ação da enzima fosfolipase A₂ sobre a fosfatidilcolina ou produto da atividade da fosfolipase C sobre o fosfatidilinositol. Uma vez formado, o ácido araquidônico

1 ácido salicílico, ácido acetil salicílico, acetilsalicilato de lisina e outros.

2 fenacetina, acetanilida, paracetamol e outros.

3 aminofenazona, dipirona, fenazona, fenilbutazona, azapropazona e outros.

4 ibuprofeno, indometacina, sulindaco e outros.

5 ácido meclofenâmico, floctafenina, colfenamato e outros.

é convertido nas prostaglandinas G₂ e H₂, que são transformadas em outras prostaglandinas (PGE₂, PGD₂, PGI₂, PGF_{2α}) e tromboxanos (TXA₂, TXB₂) pela via da ciclooxigenase, leucotrienos (LTA₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄) e ácidos hidroxicotetraenóicos (11-HETE, 12-HETE, 15-HETE) pela via da lipoxigenase ou epóxidos lipídicos e dióis através da via da epoxigenase (para revisão veja: CASHMAN, 1996; APPLETON, 1997). Sem ter conhecimento da existência das duas isoformas de ciclooxigenase, Vane acreditava que somente uma enzima era responsável pela síntese de prostaglandinas com densidade e distribuição tecidual diferente, e dessa diversidade tecidual resultava a variabilidade da ação das drogas antiinflamatórias não esteroidais (DAINES), sobre a pirose, a dor e a inflamação. Como já é conhecido, as drogas pertencentes a esta classe têm efeitos diferentes sobre estes sintomas, sendo que a maioria delas apresenta um efeito preponderante. Em 1990, descobriu-se que a atividade da ciclooxigenase encontrava-se aumentada em monócitos humanos expostos à endotoxinas bacterianas *in vitro* e em macrófagos peritoneais de camundongos *in vivo* (FU et al., 1990; MASFERRER et al., 1990). Assim, foi verificada a existência de um segundo tipo de ciclooxigenase, induzida por mitógenos, que foi posteriormente caracterizada, clonada (XIE et al., 1991; KUJUBU et al., 1991) e denominada de ciclooxigenase-2 ou induzida, enquanto que a isoforma descrita por Vane passou a ser chamada de ciclooxigenase-1 ou constitutiva.

Como o nome diz, a ciclooxigenase-1 é a isoforma constitutiva da enzima e está presente em praticamente todos os tipos de células, originando prostaglandinas que exercem seus efeitos principalmente em condições fisiológicas. Dentre os processos fisiológicos mais importantes controlados pelos produtos da ciclooxigenase-1 estão: citoproteção gastrointestinal, homeostase vascular e função renal (para revisão veja: NEEDLEMANN e ISAKSON, 1997). Essa enzima foi isolada pela primeira vez em 1976, a partir de vesículas seminais de carneiro (para revisão veja: VANE, 1996). O gene que codifica a enzima tem múltiplos sítios de transcrição, o RNAm da ciclooxigenase-1 tem aproximadamente 2,8 Kb e a

proteína transcrita possui 600 aminoácidos com quatro sítios de glicosilação (WANG et al., 1993; APPLETON, 1997).

A ciclooxygenase-2, por sua vez, é a isoforma induzida da enzima, ou seja, somente está presente em condições normais em alguns tecidos como testículos, cérebro e pulmões (SIMMONS et al., 1991), mesmo assim em pequena quantidade. Contudo, sua expressão pode ser drasticamente aumentada após a exposição de células como fibroblastos, células de músculo liso ou endotélio a fatores de crescimento, ésteres de forbol ou citocinas. Macrófagos e monócitos podem ter sua expressão de ciclooxygenase-2 aumentada após a exposição à endotoxina de *E. coli* (LPS) (VANE e BOTTING, 1996). O RNAm da ciclooxygenase-2 tem cerca de 4,0 Kb, é expresso em pequena quantidade nas células em estado de repouso e a proteína transcrita é formada por 604 aminoácidos (KUJUBU et al., 1991; APPLETON, 1997). Existe cerca de 60% de homologia entre a seqüência do DNAc das enzimas constitutiva e induzida. A enzima induzida é encontrada principalmente no núcleo, havendo somente uma pequena quantidade presente no citoplasma, enquanto a enzima constitutiva é encontrada principalmente associada ao retículo endoplasmático (MIYAMOTO et al., 1976; SMITH et al., 1994). A principal diferença entre as ciclooxygenases é que o gene da enzima do tipo 2 (induzida) possui uma seqüência TATA box e sítios regulatórios para glicocorticóides e citocinas (XU et al., 1995), enquanto o gene da enzima do tipo 1 (constitutiva) não é afetado sob estas condições (DE WITT e MEADE, 1993).

A descoberta da existência de duas isoformas de ciclooxygenase foi a explicação para a variabilidade observada na potência dos efeitos analgésicos, antipiréticos e antiinflamatórios apresentado pelas diversas categorias de substâncias químicas agrupadas na classe das DAINES e que, na hipótese original, Vane atribuía a depósitos celulares diferentes.

As prostaglandinas, produtos das ciclooxygenases, não são capazes de provocar dor quando administradas isoladamente, mas quando geradas após o estímulo nociceptivo têm a propriedade de aumentar a sensibilidade dos nociceptores à dor, ou seja, facilitar a transmissão de informações dolorosas induzida por substâncias como a histamina ou a bradicinina (FERREIRA, 1972). Sua produção está aumentada principalmente em estados inflamatórios, quando há aumento da expressão de ciclooxygenase-2. As prostaglandinas causam dilatação do músculo liso vascular, colaborando, dessa forma, para a vasodilatação e eritema (rubor) característicos destes estados patológicos. A vasodilatação aumenta o fluxo sanguíneo através dos tecidos inflamados e conseqüentemente o extravasamento de fluidos (edema) provocado por outros agentes que aumentam a permeabilidade vascular, como a bradicinina e a histamina (para revisão veja: SOLOMON et al., 1968; WILLIAMS e PECK, 1977; VANE e BOTTING, 1995).

Pertencentes à classe das DAINES, os derivados pirazolônicos foram introduzidos na terapêutica por Knorr, no final do século passado (KOROLKOVAS e BURCKHALTER, 1976). A dipirona⁶, cuja fórmula encontra-se representada a seguir, do mesmo modo que a aminofenazona e fenazona, é um derivado da 5-pirazolona que possui propriedades antipiréticas, analgésicas e antiinflamatórias. Também é conhecida como analgina, metamizol, metampirona, noramidopirina, sulpirina e outros nomes. Apesar de estar presente em cerca de 124 preparações farmacêuticas⁷ (em 48 delas a dipirona aparece isoladamente e em 76 aparece em associação com outros medicamentos), o emprego de agentes derivados da 5-pirazolona, particularmente da dipirona, foi desaconselhado pela Associação Médica Americana e pela Organização Mundial de Saúde, devido aos graves efeitos colaterais que essa classe de drogas ocasiona. Dentre os efeitos colaterais que podem ser observados após o uso contínuo da dipirona estão a agranulocitose (KEWITZ, 1986; LARREGINA et al., 1994),

⁶ noramidopirinometanossulfonato sódico

⁷ Dicionário de Especialidades Farmacêuticas, 1999

choques anafiláticos (MACHALETT, 1978; GLADTKE, 1983) e as discrasias sangüíneas como púrpura trombocitopênica e anemia aplástica. Vários países proibiram ou restringiram seu uso, permitindo sua aplicação somente em casos em que seja necessário e complementar o uso de medicamentos antipiréticos por via parenteral ou quando outros fármacos já tenham fracassado (ARELLANO e SACRISTAN, 1990). Apesar dos efeitos colaterais descritos, que estão associados ao uso clínico da dipirona, inúmeros estudos têm sido realizados comparando sua eficácia à de outras drogas analgésicas opióides e não opióides. Steffen e colaboradores realizaram uma série de estudos avaliando os efeitos da dipirona na analgesia pós-operatória. Observaram que o tratamento com dipirona diminuía a necessidade de opióides após cirurgias laparoscópicas (1996a) e a associação de dipirona e diclofenaco tinha a mesma propriedade em pequenas cirurgias ortopédicas (1996b; 1997). O efeito observado por Steffen et al. (1996a) também foi verificado por Tempel et al. (1996). No estudo deste, a dipirona diminuiu o consumo de opióides e auxiliou no controle da dor após cirurgias abdominais ou urológicas. Em 1998, Planas e colaboradores demonstraram que a atividade analgésica da dipirona é superior à do ibuprofeno em cirurgias bucais. Babej-Dolle e colaboradores (1994) estudaram o efeito analgésico da dipirona em pacientes com dores no nervo ciático e lombares, comparando sua eficácia e tolerabilidade com o diclofenaco. A dipirona apresentou uma eficácia classificada como excelente com baixos efeitos adversos, quando comparada ao diclofenaco e ao placebo.

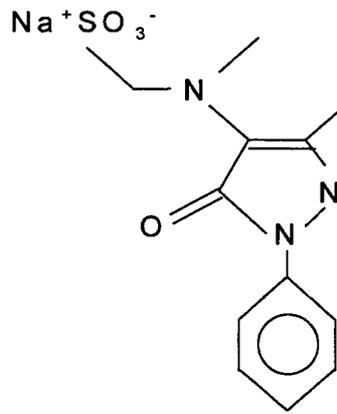


Figura 1 – Fórmula estrutural da dipirona.

No Brasil, não existem restrições por parte da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária quanto ao uso clínico da dipirona. Embora informalmente alguns médicos desaconselhem seu uso, grande parte da população continua a utilizar a dipirona para o alívio de enfermidades, principalmente infantis, como cólicas, febre e cefaléias, por ser um medicamento economicamente acessível. Portanto, como empiricamente se supõe, essa droga não é utilizada apenas como uma ferramenta farmacológica, ou seja, como droga padrão para estudos farmacológicos, mas como alternativa terapêutica bastante útil e vantajosa aos pacientes de baixa renda. Como em nosso país, o acesso ao Sistema Único de Saúde pode ser demorado e/ou complicado, e às clínicas particulares é praticamente inviável (principalmente devido ao alto custo), a automedicação é uma opção concreta em casos de relativa urgência, além de ser uma prática decorrente do saber acumulado do uso de medicamentos.

Por ter propriedades ligeiramente diferentes das DAINES clássicas, como uma atividade antiinflamatória insignificante (praticamente inexistente), diversos estudos têm sido dedicados a avaliar a existência de possíveis mecanismos de ação alternativos à inibição da síntese de prostaglandinas para a atividade antinociceptiva da dipirona.

Numerosas pesquisas têm sido feitas a fim de evidenciar que o efeito analgésico da dipirona decorre, principalmente, de ações sobre o sistema nervoso central. O estudo do mecanismo de ação da dipirona é controverso, enquanto alguns pesquisadores propõem que sua atividade analgésica está relacionada à inibição da síntese de prostaglandinas no sistema nervoso periférico, outros sustentam que ela age principalmente no sistema nervoso central e outros sugerem ainda que sua atividade provém da modulação da síntese de óxido nítrico ou da interferência com a liberação de endorfinas.

O efeito inibitório da dipirona sobre o edema e a hiperalgesia induzidos pela carragenina foi demonstrado por Lorenzetti e Ferreira, em 1985. A dipirona mostrou-se mais potente que a indometacina, paracetamol e ácido acetil salicílico em inibir a hiperalgesia. A suposição levantada por estes pesquisadores, de que a dipirona teria um mecanismo de ação diferente das DAINES clássicas, fortaleceu-se com a verificação de sua habilidade em inibir a hiperalgesia causada pela prostaglandina E₂, isoprenalina e cloreto de cálcio, ao contrário das outras drogas desta mesma classe. A partir deste estudo, Lorenzetti e Ferreira (1985) sugeriram que a dipirona estaria bloqueando diretamente a hiperalgesia inflamatória.

Em 1986, Carlsson e colaboradores começaram os primeiros estudos para mostrar que ações centrais também poderiam ser responsáveis pelo efeito antinociceptivo e antiinflamatório de analgésicos não opióides, como a dipirona. Observaram que a dipirona, administrada por via intraperitoneal ou intratecal, ou ainda diretamente na substância cinzenta periaquedutal, prolongou a latência no modelo da retirada da cauda (*tail flick*), além de deprimir a estimulação de fibras C aferentes. A latência, no modelo da retirada da cauda, significa o tempo de reação à exposição da cauda do animal a um feixe luminoso, ou seja, o tempo que o animal leva para retirar a cauda exposta ao feixe luminoso. No mesmo estudo, perceberam que a dipirona, administrada endovenosamente, aumentou a atividade dos neurônios da substância cinzenta periaquedutal e reduziu a atividade neuronal na substância

negra. Estes resultados levaram Carisson e colaboradores (1986) a sugerir, pela primeira vez, que o efeito analgésico da dipirona envolve ativação central, particularmente estimulando ou inibindo neurônios dessa região.

Complementando os dados do estudo anterior, um ano mais tarde Carlsson e Jurna (1987) verificaram que a procaína diminuiu o aumento da latência induzido pela dipirona no modelo da retirada da cauda e que a morfina potencializou os efeitos da dipirona administrada por via intraperitoneal ou diretamente na substância cinzenta periaquedutal no mesmo modelo. A morfina potencializou ainda os efeitos inibitórios da dipirona administrada por via endovenosa sobre a atividade dos axônios ascendentes por eliminar o efeito estimulante da dipirona em cerca de um terço dos axônios. De acordo com o estudo anterior, estes dados apóiam a hipótese de que a dipirona ativa vias descendentes da substância cinzenta periaquedutal e inibe a transmissão de impulsos nociceptivos ascendentes na medula espinhal.

Em estudo realizado em humanos, Marquez e Ferreira (1987) perceberam que, após infusões repetidas, a dipirona era eficaz em aliviar a dor crônica, e que havia uma tendência em aumentar o seu efeito anti-hiperalgésico. O bloqueio, pela dipirona, do estado hiperalgésico persistente após estimulação nociceptiva freqüente é melhor do que o bloqueio do processo inflamatório. Já em 1988, pesquisadores do mesmo grupo (DE CAMPOS et al., 1988) verificaram que a dipirona inibia a liberação, por macrófagos estimulados com endotoxina, de um fator capaz de provocar contorções abdominais em camundongos. Ao contrário da indometacina, além de impedir a liberação, a dipirona também diminuiu as contorções abdominais induzidas por este fator, sugerindo que este agente antiinflamatório não esteroideal poderia estar inibindo a liberação, por macrófagos, de substâncias que induzem nocicepção através da liberação de substâncias como as prostaglandinas.

Continuando os estudos iniciados em 1986, Carisson e colaboradores, em 1988, investigaram o efeito da dipirona e de outros analgésicos não-opioides sobre a atividade de neurônios da parte dorsomedial do núcleo ventral do tálamo provocada pela estimulação supramáxima de nociceptores aferentes no nervo tibial (nervo sural). Todas as drogas estudadas (morfina, salicilato de lisina, dipirona e aminofenazona), menos o paracetamol, diminuíram, de maneira dependente da dose, a atividade dos neurônios do núcleo ventral do tálamo. Neste estudo, Carisson e colaboradores propõem que analgésicos não-opioides também produzem efeitos analgésicos centrais, tendo, no entanto, propriedades centrais menores que a morfina.

O trabalho realizado por Vlaskovska e colaboradores, em 1989, fornece evidências de que o efeito analgésico da dipirona está relacionado à indução da liberação de β -endorfina e que o pico máximo da atividade antinociceptiva coincide com a liberação máxima deste opióide endógeno. O mesmo trabalho demonstrou ainda que uma administração combinada de dipirona e verapamil (bloqueador de canais de cálcio) prolonga o efeito antinociceptivo e inibe a síntese de PGE₂ de forma distinta, interferindo em vários mecanismos de modulação da dor.

Monitorando a produção de metabólitos da ciclooxigenase e da lipoxigenase de células polimorfonucleares *in vitro*, Abbate e colaboradores (1990), verificaram que a dipirona produz uma inibição significativa da atividade destas enzimas, na mesma faixa de dose que produz analgesia *in vivo*.

A N^G-monometil-L-arginina (inibidor da óxido nítrico sintase) e o azul de metileno (inibidor da guanilato ciclase solúvel) preveniram o efeito antinociceptivo da dipirona enquanto que o MY5445 (inibidor de fosfodiesterase) potencializou sua atividade, no estudo realizado por Duarte e colaboradores (1992). De posse dessas informações, os autores

propuseram, pela primeira vez, a possível participação da via da L-arginina - óxido nítrico - GMPc no efeito analgésico da dipirona.

De acordo com Shimada e colaboradores (1994), a dipirona ou seus principais metabólitos, 4-metilaminofenazona e 4-aminofenazona, são efetivos em inibir a febre, por diminuir a síntese de prostaglandinas tanto no sistema nervoso central quanto no periférico. Impossibilitando a síntese de prostaglandinas, necessária para impedir a pirose, a dipirona teria, por extensão, efeito antinociceptivo pelo mesmo mecanismo.

Utilizando um modelo de monoartrite aguda em gatos e ratos, Neugebauer e colaboradores (1994) observaram que a dipirona diminuiu a atividade espontânea e induzida da maioria (89%) dos neurônios da medula espinhal. Neste estudo, os autores sugerem que a atividade antinociceptiva da dipirona, pode estar relacionada à inibição direta da atividade neuronal aferente, ou seja, que a medula espinhal é seu principal sítio de ação.

Em 1994, Tortorici e Vanegas demonstraram que a dipirona, quando aplicada na substância cinzenta periaquedutal de ratos, aumenta o tempo decorrido entre o início da incidência do estímulo térmico sobre a cauda e a retirada desta do feixe luminoso emitido pelo aparelho utilizado no teste de retirada da cauda (*tail flick*), ou seja, aumenta o tempo de latência no teste. O mesmo estudo mostra também evidências de que a dipirona interfere na resposta ao estímulo térmico projetado na cauda dos animais por afetar as células *off* e *on* da medula ventromedial rostral, que estão envolvidas na transmissão do estímulo nociceptivo.

Ferreira, em 1993, discorre sobre a possibilidade da atividade anti-hiperalgésica da dipirona ser causada pela interferência com a via L-arginina - óxido nítrico - GMPc, uma vez que a sensibilização dos nociceptores é resultado de um aumento da concentração de AMPc/Ca⁺⁺ nos neurônios sensoriais e esta alteração no nível de AMPc pode colaborar para a estimulação desta via.

O efeito analgésico e antiinflamatório da dipirona foi estudado por Tatsuo e colaboradores (1994), comparando a atividade da dipirona, indometacina e dexametasona em um modelo de inflamação crônica em ratos. De suas observações, os autores concluíram que a dipirona tem mecanismo de ação diferente, não relacionado com a inibição da atividade das ciclooxigenases, para reduzir a hiperalgesia e o edema neste modelo. Esta conclusão foi baseada no fato de que a dipirona apresentou efeito antinociceptivo mais pronunciado do que o efeito antiedematogênico. Esta atividade foi contrária ao efeito da indometacina e da dexametasona, que aboliram estes sintomas completa e igualmente. Seus resultados levaram-no a propor que a dipirona pode ser, em alguns casos, uma alternativa para o tratamento da dor associada a patologias como artrite.

Utilizando ovelhas normais e ovelhas com inflamação crônica, Chambers e colaboradores (1995) observaram que a dipirona produziu efeito antinociceptivo em relação à estimulação mecânica, além de inibir a produção de tromboxano B₂. O efeito durou cerca de 2 a 3 horas com a atividade antinociceptiva máxima em torno de 30 min. Além disso, antagonistas de receptores opióides e α_2 adrenérgicos reverteram a ação da dipirona, sugerindo o envolvimento de mecanismos centrais para seu efeito antinociceptivo.

Granados-Soto e colaboradores (1995) observaram que a antinocicepção causada pela dipirona, em um modelo de incapacitação motora em ratos, era prevenida pelo tratamento com a N^G-monometil-L-arginina metil éster, sugerindo, do mesmo modo que Duarte e colaboradores (1992) e Ferreira (1993), a participação local da via do L-arginina - óxido nítrico na antinocicepção causada pela dipirona.

Em 1996, o grupo de Tortorici observou que a naloxona produziu uma reversão parcial do efeito antinociceptivo da dipirona no teste de retirada da cauda, quando injetada na substância cinzenta periaquedutal de ratos. Este efeito parece ser localizado, uma vez que a injeção de dipirona no núcleo próprio da comissura posterior e na formação reticular, laterais

à substância cinzenta periaquedutal, não causou aumento da latência no mesmo teste. Curiosamente, Akman, em um estudo realizado no mesmo ano (1996) não observou atividade antinociceptiva em camundongos tratados com dipirona por via intratecal, intracerebroventricular ou subcutânea, quando avaliados nos testes de retirada da cauda e placa quente. No entanto, quando avaliada em relação às contrações abdominais induzidas pelo ácido acético, a dipirona, administrada através das mesmas vias, apresentou atividade antinociceptiva que, da mesma forma que no estudo realizado por Tortorici, foi revertida pelo pré-tratamento com naloxona. Os únicos fatores que podem ocasionar a diferença observada nos estudos realizados por Tortorici e Akman são as espécies de animais utilizadas e o protocolo experimental. De acordo com Vlaskovska (1989), os resultados acima descritos levam a supor que a atividade analgésica da dipirona pode envolver a liberação de opióides endógenos.

Administrada pelas vias intratecal, intraperitoneal ou intraplantar, ao contrário da via intracerebroventricular, a dipirona apresentou atividade anti-hiperalgésica dependente da dose em relação à hiperalgesia induzida pela injeção intraplantar de prostaglandina em ratos (Lorenzetti e Ferreira, 1996). De modo semelhante ao observado no ano anterior por Granados-Soto e colaboradores e por Duarte e colaboradores, em 1992, este efeito desaparece quando os animais são pré-tratados topicamente com L-nitro-N-arginina ou azul de metileno, sugerindo que a atividade antinociceptiva da dipirona pode resultar de efeitos centrais e periféricos em neurônios sensoriais primários através da estimulação da via L-arginina – óxido nítrico - GMPc. O que surpreende neste estudo é que o efeito antinociceptivo da dipirona foi revertido por inibidores da óxido nítrico sintase e da guanilato ciclase, substâncias às quais alguns autores também atribuem atividade antinociceptiva (MOORE et al., 1991; MELLER e GEBHART, 1992; YAMAMOTO et al., 1993; SAKURADA et al., 1996).

Jones (1996) verificou que injeções de dipirona no núcleo magno da rafe provocam um aumento dependente da dose no tempo de latência de ratos avaliados em relação à nocicepção térmica, no teste de retirada da cauda. Estes resultados sugerem que a dipirona modula neurônios bulboespinais no núcleo magno da rafe, inibindo, assim, os reflexos nociceptivos espinhais.

Em 1997, Vanegas e colaboradores sugeriram que pelo menos parte da diminuição das respostas nociceptivas provocadas pelas drogas antiinflamatórias não esteroidais é oriunda da ativação supraespinhal de vias modulatórias eferentes. Em seu trabalho, observou que a dipirona, injetada na substância cinzenta periaquedutal, foi capaz de deprimir a excitação nociceptiva de neurônios sensoriais espinhais por ativar vias inibitórias descendentes.

Utilizando um modelo de dor visceral, Taylor e colaboradores (1998), verificaram que a dipirona e a morfina, administradas conjuntamente em doses subanalgésicas a ratos, têm seus efeitos antinociceptivos potencializados e que antagonistas opióides não são capazes de reverter este efeito. Do mesmo modo que antagonistas opióides administrados isoladamente, a associação de morfina e dipirona diminuiu a indução bilateral de *c-Fos* causada pelo ácido acético nas lâminas superficiais (I-II) do corno dorsal da medula espinhal, quando comparada aos tratamentos individuais. Assim como observado por Akman em 1996, Taylor não verificou efeito antinociceptivo da dipirona no modelo de estimulação térmica das patas de ratos.

Recentemente, um efeito interessante foi creditado à dipirona, a atividade anticonvulsivante em modelos de convulsões induzidas por eletrochoque ou sons (em animais suscetíveis ou não) (Doretto et al., 1998). Esta atividade parece ser específica para a dipirona, já que outras DAINES como a indometacina, a aspirina e o diclofenaco não apresentaram a mesma atividade. A diferença entre o efeito da dipirona e das outras drogas

pertencentes à mesma classe pode ser um indício da possibilidade de realmente existir um mecanismo de ação alternativo para a dipirona, possivelmente central, além da inibição da síntese de prostaglandinas.

Como descrito acima, não estão completamente esclarecidos os mecanismos através dos quais a dipirona exerce seus efeitos antinociceptivos. Vários mecanismos têm sido propostos para explicar suas ações antinociceptivas e antiinflamatórias, incluindo a estimulação ou inibição central⁸, inibição da transmissão do impulso nociceptivo na medula espinhal⁹, inibição da liberação de substâncias que podem provocar dor¹⁰, indução da liberação de opióides endógenos¹¹, modulação da via L-arginina - óxido nítrico - GMPc¹² até a inibição da síntese de prostaglandinas tanto no sistema nervoso central quanto periférico¹³.

Neste trabalho serão abordados alguns aspectos sobre a atividade antinociceptiva da dipirona, administrada através de diversas vias e avaliada em diversos modelos de nocicepção térmica e química. Também serão investigados, através do uso de técnicas farmacológicas e neuroquímicas, possíveis mecanismos adicionais responsáveis pela sua atividade analgésica.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- 1) Avaliar o efeito antinociceptivo da dipirona, administrada através das vias sistêmica, tópica, espinhal e supraespinhal, nos modelos de nocicepção térmica e química,

⁸ Maiores informações veja: Carlsson, 1986; *ibid.* 1988; Tortorici, 1996; Jones, 1996; Vanegas, 1997

⁹ Maiores informações veja: Carlsson, 1987; Neugebauer, 1994; Tortorici, 1993

¹⁰ Maiores informações veja: De Campos, 1988

¹¹ Maiores informações veja: Vlaskovska, 1989; Akman, 1996

¹² Maiores informações veja: Duarte, 1992; Ferreira, 1993; Granados-Soto, 1995; Lorenzetti, 1996

¹³ Maiores informações veja: Abbate, 1990; Shimada, 1993; Chambers, 1995

causada pela formalina, capsaicina e glutamato e na hiperalgesia induzida pela injeção espinal de glutamato em camundongos e

- 2) investigar, através de técnicas farmacológicas e neuroquímicas, os possíveis mecanismos que podem estar colaborando para o efeito analgésico da dipirona nestes modelos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos suíços machos, pesando entre 25 e 35 g, e ratos Wistar machos, pesando entre 120 e 180 g, criados no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em temperatura controlada (23 ± 2 °C), em ciclo 12 h claro/12 h escuro e tratados com água e ração *ad libitum* e permaneceram no laboratório durante um período de adaptação de pelo menos 1 h antes dos testes farmacológicos, realizados geralmente entre 8 e 17 h, a temperatura de 20 ± 3 °C.

3.2. Injeção intratecal (i.t.)

A administração de drogas através da via i.t. foi feita de acordo com o método descrito por Hylden e Wilcox (1980), com algumas modificações. Inicialmente, os animais foram levemente anestesiados com éter e foi injetado um volume de 5 μ L da droga em análise ou solução salina estéril (NaCl 0,9%, o controle) entre as vértebras L5 e L6, com uma microseringa conectada a um tubo de polietileno. As respostas nociceptivas foram avaliadas após 10 min.

3.3. Injeção intracerebroventricular (i.c.v.)

Para a administração de drogas através da via i.c.v., seguiu-se o método descrito por Laursen e Belknap (1986), com algumas modificações. Após serem levemente anestesiados com éter, os animais receberam uma injeção contendo 5 μ L da droga em análise ou solução salina estéril (NaCl 0,9%, o controle) num dos ventrículos laterais (coordenadas para localização em relação ao bregma: 1 mm lateral, 1 mm rostral, -3 mm vertical). As respostas nociceptivas foram avaliadas após 10 min.

3.4. Estudo da atividade antinociceptiva

Os experimentos relacionados a seguir foram realizados com a finalidade de avaliar o efeito antinociceptivo da dipirona, administrada por diversas vias, sobre modelos de nocicepção térmica e química, e sobre a hiperalgesia causada pela injeção intratecal de glutamato em camundongos. A possibilidade de seu efeito antinociceptivo estar associado a efeitos não específicos como relaxamento muscular ou sedação dos animais também foi avaliada.

3.4.1. Nocicepção induzida pela formalina

Com o objetivo de avaliar o efeito antinociceptivo da dipirona, foi utilizado o modelo da nocicepção induzida pela formalina, que permite distinguir dois tipos de dor, uma de origem neurogênica (estimulação direta dos neurônios nociceptivos - nociceptores) e outra de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios). O teste da formalina permite evidenciar estas duas fases de sensibilidade dolorosa: a primeira, que ocorre durante os primeiros 5 min após a injeção de formalina (dor de origem neurogênica), e a segunda, que ocorre entre 15 e 30 min após a injeção de formalina (resposta tônica à dor).

O procedimento utilizado foi similar ao descrito anteriormente por Dubuisson e Dennis (1977) e Shibata et al., (1989), com algumas modificações (VAZ et al., 1996). Os animais receberam 20 μ L de formalina 2,5% (0,92% de formaldeído) ou solução salina (NaCl 0,9%) sob a superfície plantar (intraplantar; i.pl.) da pata posterior direita e esquerda, respectivamente. Logo após a injeção de formalina, os animais foram colocados, individualmente, sob campânulas transparentes (funis de vidro com 20 cm de diâmetro) ao lado de espelhos, para facilitar a observação. O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina foi medido com um cronômetro durante 30 min e considerado como indicativo de dor.

Para verificar a duração da atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina e obter o tempo ideal de tratamento para a realização dos experimentos subseqüentes, os animais foram tratados com dipirona através da via i.p. (180,0 μ mol/kg) e observados durante 6 h após sua administração.

Para avaliar o efeito antinociceptivo da dipirona neste modelo, camundongos foram tratados com esta droga através das vias intraperitoneal (i.p., 90,0 - 720,0 μ mol/kg), 30 min antes da injeção de formalina, intraplantar (i.pl., 0,1 - 30,0 μ mol/pata), em co-administração com a formalina ou ainda i.t. (0,3 - 3,0 μ mol/sítio) ou i.c.v. (0,09 - 1,8 μ mol/sítio), 10 min antes da injeção de formalina. Os grupos controle receberam o mesmo volume do veículo utilizado para diluir a dipirona ou as drogas padrão.

Ao final do tempo de observação, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as patas posteriores cortadas na junção tíbio-tarsal e pesadas em balança para quantificação do edema de pata induzido pela formalina. A diferença entre o peso (em mg) da pata direita (injetada com formalina) e da pata esquerda (injetada com solução salina) foi considerada como índice de edema.

3.4.2. Nociceção induzida pela capsaicina

A fim de obter outras evidências sobre a atividade antinociceptiva da dipirona na dor de origem neurogênica, camundongos tratados com dipirona através de diversas vias foram avaliados no modelo da dor induzida pela injeção intraplantar de capsaicina. O procedimento utilizado foi similar ao descrito por Sakurada e colaboradores (1992), com algumas modificações (CORRÊA et al., 1996). Antes do teste, os animais foram colocados individualmente sob campânulas transparentes (funis de vidro com 20 cm de diâmetro), que serviram de câmaras de observação. Grupos de animais foram tratados com dipirona por via i.p. (30,0 – 360,0 $\mu\text{mol/kg}$), 30 min antes da, ou i.pl. (0,1 – 30,0 $\mu\text{mol/pata}$) em associação com a injeção de capsaicina. Em outros experimentos, os animais foram tratados com dipirona por via i.c.v. (0,09 - 1,8 $\mu\text{mol/sítio}$) ou i.t. (0,3 – 3,0 $\mu\text{mol/sítio}$), 10 min antes, como descrito anteriormente. Decorrido o tempo necessário para cada via de administração, 20 μl de capsaicina (1,6 $\mu\text{g/pata}$ dissolvida em PBS) foi injetada por via i.pl. Os animais foram observados individualmente durante 5 min após a injeção de capsaicina. O tempo despendido, pelo animal, lambendo a pata injetada com capsaicina foi cronometrado e considerado como indicativo de dor.

3.4.3. Nociceção e edema de pata induzidos pela injeção

intraplantar de glutamato

Como observado anteriormente por Ferreira et al. (no prelo) e também por Aanonsen e Wilcox (1987), o glutamato, injetado intratecalmente em camundongos ou ratos, causa hiperalgesia e comportamento indicativo de nociceção, quando avaliado em modelos de nociceção térmica, como retirada da cauda e placa quente. Da mesma maneira, quando aplicado intraplantarmente, o glutamato pode causar hiperalgesia (JACKSON et al., 1995). Levando em consideração estes relatos, foi avaliada a nociceção induzida pelo glutamato

quando injetado na superfície plantar da pata traseira direita de camundongos.

Um volume de 20 μL de glutamato (0,3 – 60,0 $\mu\text{mol/pata}$) ou solução salina estéril (NaCl 0,9%) foi injetado por via i.pl e os camundongos foram observados no período de 0 a 40 min. Os 40 min foram divididos em períodos de 5 min para facilitar a visualização da duração e de um possível pico de nocicepção durante a observação. Após a injeção intraplantar de glutamato, os animais foram colocados imediata e individualmente sob campânulas transparentes (funis de vidro com 20 cm de diâmetro), que serviram como câmaras de observação. O tempo despendido pelos animais para lambar ou morder a pata injetada foi registrado com o auxílio de um cronômetro e considerado como indicativo de nocicepção. Após o tempo de observação, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as patas cortadas na junção tíbio-tarsal e pesadas em balança. O edema de pata foi medido pela comparação entre a diferença de peso da pata tratada com glutamato e da pata controle (não tratada).

A fim de avaliar o efeito da dipirona sobre a nocicepção induzida pelo glutamato, diferentes grupos de camundongos receberam dipirona i.p. (90,0 – 540,0 $\mu\text{mol/kg}$) 30 min antes da injeção de glutamato (30,0 $\mu\text{mol/pata}$, i.pl.) ou i.pl. (1,0 - 30,0 $\mu\text{mol/pata}$), co-injetada em associação com glutamato. Outros grupos de animais foram tratados com dipirona por via i.t. (0,3 – 3,0 $\mu\text{mol/sítio}$) ou i.c.v. (0,1 – 1,8 $\mu\text{mol/sítio}$). Para investigar se a antinocicepção causada pela dipirona estaria associada a uma atividade antiedematogênica neste modelo, ao final do tempo de observação, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as patas posteriores cortadas na junção tíbio-tarsal, como descrito acima, para quantificação do edema de pata induzido pelo glutamato. A diferença entre o peso (em mg) da pata direita (injetada com glutamato) e da pata esquerda (não tratada) foi considerada como índice de edema.

3.4.4. Teste de retirada da cauda (*tail flick*)

O teste de nociceção térmica induzida por um feixe luminoso no aparelho de retirada da cauda (*tail flick*, Albarsch, modelo Tail-Flick Analgesia Meter) foi utilizado para medir a latência dos animais ao estímulo térmico, de acordo com o método descrito anteriormente por D'Amour e Smith (1941), com algumas modificações. Foi medido o tempo de reação (s) à exposição da cauda a um feixe luminoso (90 watts), ou seja, o tempo que o animal leva para retirar a cauda exposta ao feixe luminoso. Camundongos foram tratados com dipirona (0,6 – 1,2 mmol/kg, i.p.), morfina (26,6 μ mol/kg, s.c.) ou solução salina (NaCl 0,9%) 30 min antes e submetidos ao teste, respondendo ao estímulo luminoso focalizado na cauda, retirando ou sacudindo-a, e dessa forma, expondo imediatamente a fotocélula do aparelho. O tempo de reação foi registrado, consecutivamente, no intervalo de 30 min após os tratamentos e considerado como período de latência. Um tempo máximo de 20 s foi adotado para evitar possíveis danos teciduais. Os animais foram selecionados 24 h antes dos experimentos, tomando como base sua reação ao teste ($5,0 \pm 0,4$ s).

3.4.5. Teste da placa quente

O teste da placa quente foi utilizado para avaliar a latência dos animais ao estímulo térmico, de acordo com o método descrito anteriormente por Eddy e Leimbach (1953), com algumas modificações. Neste experimento, o aparelho de placa quente (Ugo Basile, modelo-DS 37) foi mantido a 56 ± 1 °C. Camundongos foram tratados com dipirona (0,3 – 0,9 mmol/kg, i.p.), morfina (26,6 μ mol/kg, s.c.) ou solução salina (NaCl 0,9%) 30 min antes e colocados em um cilindro de vidro com 24 cm de diâmetro sobre uma superfície aquecida. O tempo decorrido entre a colocação do animal na superfície aquecida e o aparecimento das reações de balançar, morder ou lambe as patas, ou ainda de tentar subir na parede do cilindro foi registrado e considerado como índice de latência. Um tempo máximo de 30 s foi

utilizado para prevenir possíveis danos teciduais. Cada animal foi testado 24 h antes do teste a fim de obter uma resposta basal ($5,0 \pm 0,3$ s) e eliminar os animais que apresentaram uma latência alta na temperatura utilizada.

3.4.6. Hiperalgisia induzida pelo giutamato

Para testar a hipótese de que os aminoácidos excitatórios estariam envolvidos na antinocicepção causada pela dipirona, esta foi administrada a camundongos através de diversas vias e avaliada sobre as respostas hiperalgésicas causadas pelo giutamato administrado espinalmente ($100,0$ nmol/sítio, i.t.) em camundongos. Os experimentos foram realizados como descrito anteriormente por Aanonsen e Wilcox (1987), com algumas modificações (FERREIRA, no prelo). A resposta nociceptiva foi medida no aparelho de placa quente (Ugo Basile, modelo-DS 37), mantido a 50 ± 1 °C, como descrito no item anterior. A resposta hiperalgésica máxima causada pela injeção intratecal de giutamato foi observada durante 60 min após a injeção. Um tempo máximo de 30 s foi utilizado para o teste da placa quente. Diferentes grupos de animais foram tratados com dipirona por via i.p. ($3,0 - 30,0$ μ mol/kg), i.t. ($9,0 - 90,0$ nmol/sítio) ou i.c.v. ($30,0 - 300,0$ nmol/sítio) 30 e 10 min antes da administração de giutamato, com exceção daqueles pré-tratados pela via i.t., quando a dipirona foi co-administrada com o giutamato. Os grupos controle foram tratados com solução salina estéril (NaCl 0,9%) por via i.p., i.t. ou i.c.v. A percentagem do efeito máximo (PEM) da hiperalgisia induzida pelo giutamato foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{PEM} = \frac{\text{latência pós-droga} - \text{latência pré-droga}}{30 - \text{latência pré-droga}} \times 100 \%$$

3.4.7. Medida do desempenho motor

Com o intuito de verificar possíveis efeitos relaxantes musculares não específicos ou sedativos da dipirona sobre o sistema nervoso central, os animais tiveram seu desempenho avaliado no teste do rota-rod (ROSLAND et al., 1990). O aparelho de rota rod (Ugo Basile, Modelo 7600) consiste em um cilindro com 2,5 cm de diâmetro, subdividido em seis compartimentos por discos de 25 cm de diâmetro. O cilindro gira a uma velocidade constante de 22 rotações por minuto. Os camundongos foram selecionados com 24 h de antecedência para eliminar aqueles que não permaneciam sobre a barra durante dois períodos consecutivos de 60 s. No dia do experimento, os animais foram tratados com dipirona (1,8 mmol/kg, i.p.) ou com solução salina (NaCl 0,9%) 30 min antes de serem submetidos ao teste. O resultado foi expresso como tempo (s) que os animais permaneceram sobre o rota-rod. O tempo máximo utilizado foi de 60 s.

3.5. Estudo do mecanismo de ação

Os experimentos relacionados a seguir foram realizados para investigar, através de técnicas farmacológicas e neuroquímicas, os possíveis mecanismos adicionais que podem estar contribuindo para o efeito analgésico da dipirona.

3.5.1. Participação do sistema opióide na atividade

antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina

Com a intenção de verificar se a atividade antinociceptiva da dipirona envolve a participação de receptores opióides, os camundongos foram pré-tratados com naloxona (um antagonista não-seletivo de receptores opióides, 13,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) e após 15 min foram tratados com dipirona (540,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), morfina (agonista não seletivo de receptores opióides, 13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) ou solução salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.). Decorridos 30 min

após a administração de dipirona ou morfina, os animais foram analisados em relação à dor induzida pela injeção intraplantar de formalina (VAZ et al., 1996). Os grupos controle foram tratados somente com dipirona (540,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.), naioxona (13,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) ou solução salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.).

3.5.2. Participação do sistema serotoninérgico na atividade

antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina

Para avaliar a possível participação da via serotoninérgica eferente no efeito antinociceptivo causado pela dipirona, os camundongos foram tratados com cloridrato de DL-p-clorofenilalanina (PCPA, um inibidor da síntese de serotonina, 399,8 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) durante 4 dias consecutivos, antes da administração de dipirona (540,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) ou solução salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.). Outro grupo de animais foi tratado, durante 4 dias consecutivos, com solução salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.), antes da administração de dipirona (540,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) ou morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.). Decorridos 30 min da administração de dipirona ou morfina, os animais foram avaliados em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Os grupos controle foram tratados somente com dipirona (540,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) ou solução salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.) (SANTOS et al., 1995).

3.5.3. Participação da proteína G (sensível a toxina pertussis) na

atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da

formalina

O envolvimento da proteína G (sensível a toxina pertussis) na atividade antinociceptiva da dipirona foi avaliado através do tratamento de um grupo de camundongos com toxina pertussis (produz ADP-ribosilação, impedindo a atividade da proteína G_i , 1,0

$\mu\text{g/sítio}$, i.c.v.) 7 dias antes da administração de dipirona ($540,0 \mu\text{mol/kg}$, i.p.), morfina ($13,3 \mu\text{mol/kg}$, s.c.) ou solução salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.) (SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ e GARZÓN, 1991). A morfina foi utilizada como controle positivo. Outro grupo de animais foi pré-tratado com solução salina estéril (NaCl 0,9%, $5 \mu\text{L/sítio}$, i.c.v.), e 7 dias após recebeu dipirona ($540,0 \mu\text{mol/kg}$, i.p.), morfina ($13,3 \mu\text{mol/kg}$, s.c.) ou solução salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.), 30 min antes da injeção de formalina. Os grupos controle foram tratados somente com dipirona ($540,0 \mu\text{mol/kg}$, i.p.), morfina ($13,3 \mu\text{mol/kg}$, s.c.) ou solução salina (NaCl 0,9%, i.p.).

3.5.4. Participação do sistema GABAérgico na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina

Para investigar uma possível participação do sistema GABAérgico (ácido γ -aminobutírico) na atividade antinociceptiva da dipirona, grupos de camundongos foram pré-tratados com faclofen (um antagonista seletivo de receptores GABA_B, $40,0 \mu\text{mol/kg}$, i.p.), 10 min antes da administração de dipirona ($540,0 \mu\text{mol/kg}$, i.p.), baclofen (um agonista seletivo de receptores GABA_B, $4,6 \mu\text{mol/kg}$, i.p.) ou solução salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.). Decorridos 30 min após a administração de dipirona ou baclofen, os animais foram analisados em relação à dor induzida pela injeção intraplantar de formalina (VAZ et al., 1996). Os grupos controle foram tratados somente com dipirona ($540,0 \mu\text{mol/kg}$, i.p.), baclofen ($4,6 \mu\text{mol/kg}$, i.p.), faclofen ($40,0 \mu\text{mol/kg}$, i.p.) ou solução salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.).

3.5.5. Participação da via L-arginina - óxido-nítrico na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina

Em outra série de experimentos, investigou-se a participação da via óxido nítrico-L-arginina no efeito antinociceptivo causado pela dipirona. Os animais foram pré-tratados com L-arginina (substrato utilizado pela óxido nítrico sintase, $3,4 \text{ mmol/kg}$, i.p.), e após 15 min

receberam dipirona (540,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), N^G -nitro-L-arginina (um inibidor da óxido nítrico sintase, L-NOARG, 342,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) ou solução salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.) (SANTOS et al., 1995; VAZ et al., 1996). As respostas relativas à primeira e segunda fase do teste da formalina foram avaliadas 30 min após a administração da dipirona ou L-NOARG. Outros grupos de animais (controle) receberam somente dipirona (540,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), L-NOARG (342,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), L-arginina (3,4 mmol/kg , i.p.) ou solução salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.) 30 min antes da injeção de formalina.

3.5.6. Participação de canais de K_{ATP} na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina

Na perspectiva de avaliar um possível papel dos canais de potássio sensíveis ao ATP no efeito antinociceptivo da dipirona, os animais foram pré-tratados com glibenclamida (81,0 nmol/sítio , i.c.v.) (um bloqueador de canais de K_{ATP}), e após 15 min receberam dipirona (540,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) ou solução salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.) (RAFFA e MARTINEZ, 1995). A resposta à injeção de formalina foi avaliada 30 min após a administração de dipirona, morfina ou solução salina. Outros grupos de animais receberam somente solução salina estéril (5 $\mu\text{L/sítio}$, i.c.v.), 15 min antes da administração da dipirona (540,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) ou solução salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.) 30 min antes da injeção de formalina.

3.5.7. Participação de corticóides endógenos liberados pela glândula suprarrenal na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina

Uma possível participação dos glicocorticóides endógenos no efeito antinociceptivo da dipirona foi verificada através da remoção das glândulas suprenais de camundongos. Os

animais foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (0,25 g/kg, i.p.) e ambas glândulas supra-renais foram removidas através de uma incisão dorsal, como descrito por Vaz (1996). Após a cirurgia, os animais foram recolocados em suas caixas, com acesso a comida e bebida *ad libitum*, mas a água foi substituída por solução salina (NaCl 0,9%) para manter a concentração plasmática fisiológica de sódio. Em outro grupo de animais foi realizada a incisão dorsal, mas as glândulas supra-renais foram preservadas (“falso-operados”). Da mesma maneira que os animais adrenalectomizados, estes foram recolocados em suas caixas e tiveram livre acesso a comida e bebida.

Após uma semana, os animais dos dois grupos receberam dipirona (540,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) ou solução salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.), 30 min antes da injeção de formalina. Os animais “falso-operados” foram utilizados como controle.

3.5.8. Participação do sistema adrenérgico na atividade

antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina

Grupos de camundongos foram pré-tratados com prazosin (antagonista seletivo de adrenoceptores α_1 , 0,4 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) para verificar a participação do sistema adrenérgico na atividade antinociceptiva da dipirona. Após 10 min, receberam dipirona (540,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), fenilefrina (agonista seletivo de adrenoceptores α_1 , 49,1 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) ou solução salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.). Decorridos 30 min da administração de dipirona, fenilefrina ou salina, os animais foram examinados em relação à dor induzida pela injeção intraplantar de formalina. Outro grupo de animais foi pré-tratado com ioimbina (antagonista seletivo de adrenoceptores α_2 , 0,4 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.). Após 10 min, os animais foram tratados com dipirona (540,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), clonidina (agonista seletivo de adrenoceptores α_2 3,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) ou solução salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.) (SANTOS et al., 1995; VAZ et al., 1996). Os grupos controle foram tratados somente com dipirona (540,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), prazosin (0,4 $\mu\text{mol/kg}$,

i.p.), fenilefrina (49,1 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), ioimbina (0,4 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), clonidina (3,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) ou solução salina estéril (NaCl 0,9%, i.p.).

3.6. Efeito da dipirona sobre as óxido nítrico sintases constitutiva e neuronai

3.6.1. Preparação da óxido nítrico sintase constitutiva neuronai (nNOS)

O procedimento utilizado foi descrito anteriormente por Knowles e colaboradores (1990). Os cerebelos de cinco ratos, mortos por decapitação, foram retirados e homogeneizados com um triturador de tecidos em uma solução (1:5 m/v) contendo 50 mM de tampão Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), 1 mM de ditioneitol (DTT), 10 mg/mL de inibidor de tripsina de feijão de soja, 2 mg/mL de aprotinina e 320 mM de sacarose a 4 °C. O homogenato foi centrifugado a 4 °C a 10.000 g durante 20 min e o sobrenadante foi aliquoteado e congelado a -70 °C (a atividade da nNOS mantém-se durante várias semanas após a preparação). Em ambas preparações de NOS (constitutiva e induzida), a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry e colaboradores (1951).

3.6.2. Preparação da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) de macrófagos e medida da sua atividade

Os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos pré-tratados (4 dias) com 2 mL de tioglicolato (3% m/v em água). Para a obtenção da iNOS, as células (5×10^7) foram incubadas em garrafas (75 cm²) com RPMI¹⁴. Depois de 2 h de incubação a 37 °C com 5% de CO₂, as células não aderentes foram removidas por

¹⁴ meio de cultura contendo: 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina, 1 mM de glutamina, 20 mM de HEPES e 10% de soro fetal bovino

lavagem. Para a indução da formação de iNOS, lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS, sorotipo 026:B6) 100 ng/mL e interferon γ 20 U/mL, foram adicionados a uma alíquota de meio fresco. As células foram novamente incubadas por mais 16 h, raspadas e centrifugadas a 250 g durante 10 min. O sobrenadante foi descartado, as células foram resuspensas em um meio de homogeneização e congeladas a -70 °C em alíquotas. Para a medida da atividade enzimática, uma alíquota foi descongelada e as células foram rompidas por ultra-som e centrifugadas a 10.000 g durante 10 min a uma temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi utilizado como fonte de iNOS.

3.6.3. Ensaio da atividade da iNOS e nNOS

As atividades das NOSs foram medidas pela sua capacidade em converter [3 H] L-arginina em [3 H] L-citrulina. O procedimento utilizado foi originalmente descrito por Bredt e Snyder (1990) e modificado por Wolff e Datto (1992). O meio de reação padrão contém 50 mM de KH_2PO_4 , pH 7,2, 1,2 mM de MgCl_2 , 0,25 mM de CaCl_2 , 60 mM de L-valina, 1,2 mM de L-citrulina, 2,5 μM de [3 H] L-arginina (1,6 $\mu\text{Ci/mL}$) 1 mM de ditioneitol (DTT), 4 μM de flavina adenina dinucleotídeo (FAD), 4 μM de flavina mononucleotídeo (FMN), 10 μM de tetrahydrobiopterina (TBH_4) e 120 μM de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH, forma reduzida), na presença ou ausência de dipirona. As reações foram iniciadas pela adição da preparação de enzima. Após 1 h de incubação na temperatura ambiente, as reações foram interrompidas com a adição de uma resina de troca catiônica AG 50 W-X8. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g durante 5 min e alíquotas do sobrenadante misturadas ao líquido de cintilação e contadas. As atividades das NOSs foram obtidas pela subtração da atividade independente de cálcio (medida na presença de 1 mM de ácido etileno glicol tetracético - EGTA).

3.7. Efeito da dipirona sobre a união específica (*binding*) de [³H]

giutamato

Camundongos foram mortos por decapitação e os córtices cerebrais foram dissecados, pesados e homogeneizados em 20 volumes de uma solução de sacarose 0,32 M, Tris/HCl 10 mM, pH 7,4 e MgCl₂ 1 mM em um *Potter* de vidro contendo duas vazas. O homogeneizado foi centrifugado à 1.000 g durante 15 min. O sobrenadante (S1) dessa centrifugação foi separado e mantido em gelo. O precipitado, contendo a fração nuclear detritos celulares e um pouco de mielina, foi resuspenso no mesmo volume de tampão utilizado inicialmente e centrifugado novamente a 1.000 g durante 15 min. O segundo precipitado foi desprezado, o sobrenadante (S2) misturado a S1, e a mistura centrifugada a 27.000 g, durante 15 min. O precipitado resultante foi resuspenso em 20 volumes de tampão Tris/HCl 1 mM, pH 7,4, onde permaneceu no gelo durante 60 min, depois deste período foi submetido à centrifugação a 27.000 g durante 15 min. O precipitado resuspenso em tampão Tris/HCl 10 mM, pH 7,4 e centrifugado a 27.000 g durante 15 min (SOUZA e RAMÍMREZ, 1991), procedimento que foi repetido três vezes. O precipitado resultante da terceira lavagem foi resuspenso em tampão Tris/HCl 10 mM, pH 7,4 de forma a obter uma concentração proteica em torno de 2,0 mg de proteína por mL.

As membranas foram congeladas a -70 °C até o uso. No dia do experimento de união específica (*binding*) propriamente dita, as membranas foram descongeladas rapidamente a 37 °C. A membrana foi resuspensa em *potter* com três volumes de tampão Tris/HCl 10 mM, pH 7,4. Adicionou-se Triton X-100 na concentração final de 0,04% e as membranas foram pré-incubadas a 37 °C durante 30 min. Após este período, as membranas permaneceram no gelo durante 5 min, e em seguida foram centrifugadas a 27.000 g durante 15 min. O precipitado foi lavado três vezes com tampão Tris/HCl 10 mM, pH 7,4. As membranas foram resuspensas em tampão Tris/HCl 10 mM e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry e colaboradores (1951). Os ensaios de união específica (*binding*) de [³H] glutamato foram

realizados em triplicata em um volume total de 0,5 mL contendo 0,1 mL de membrana (0,2 - 0,3 mg proteína), tampão Tris/HCl 50 mM, pH 7,4, ligante radioativo ($[^3\text{H}]$ glutamato, 53 Ci/mmol) 40 nM, na presença ou ausência de dipirona (concentração na ordem de 10 a 1000 μM). A união específica (*binding*) inespecífica foi realizada da mesma maneira, com exceção de que 40 μM de glutamato não-radioativo (*displacer* ou deslocador) foi acrescentado ao meio de incubação. Após 15 min de incubação a 30 °C, as membranas foram centrifugadas a 12.000 g durante 25 min foi utilizada para separar o $[^3\text{H}]$ glutamato não ligado às membranas. O sobrenadante foi descartado, as paredes dos tubos Eppendorf e as superfícies dos *pellets* foram completa e cuidadosamente lavadas com água deionizada gelada. As amostras foram misturadas ao líquido de cintilação e contadas. A união específica (*binding*) específica foi calculado como a diferença entre os valores da união específica (*binding*) na ausência e na presença do glutamato não-radioativo. Os resultados representam a média de três experimentos independentes.

3.8. Drogas e soluções utilizadas

As seguintes substâncias foram utilizadas: formalina, cloridrato de morfina (Merck, AG, Darmstadt, Alemanha), dipirona, ácido L-giutâmico, cloridrato de DL-p-clorofenilalanina metil éster, toxina pertussis, 2,2,2-tribromoetanol, cloridrato de ioimbina, cloridrato de clonidina, cloridrato de fenilefrina, L-arginina, N^6 -nitro-L-arginina (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), prazosin (Pfizer, NY, EUA), cloridrato de naloxona (Dupont, Garden City, EUA), capsaicina (Calbiochen, San Diego, USA), glibenclamida, baclofen e faclofen (Research Biochemicals International, Natick, EUA). $[^3\text{H}]$ glutamato (53 Ci/mmol) e $[^3\text{H}]$ L-arginina (64 Ci/mmol) foram adquiridos da Amersham International, U.K. Todas as drogas foram preparadas imediatamente antes do uso em solução salina (NaCl 0,9% w/v), com exceção da capsaicina, que foi preparada em etanol absoluto. A concentração final de etanol não excedeu 5% e não causou qualquer efeito *per se*. Nos estudos neuroquímicos, as drogas foram dissolvidas em água de Milli Q.

3.9. Análise estatística

Os resultados estão apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M., 95%), exceto os valores de DI_{50} (a dose ou concentração da droga capaz de reduzir em 50% as respostas nociceptivas em relação ao valor controle) que estão apresentadas como as médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança de 95%. A diferença estatisticamente significativa entre os grupos foi avaliada através de análise de variância seguida pelo teste de múltiplas comparações de Dunnett ou pelo teste de Newmann Keuls, quando apropriado. Valores de P menores que 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Os valores de DI_{50} foram determinados por interpolação gráfica dos resultados de experimentos individuais.

4. RESULTADOS

4.1. Estudo da atividade antinociceptiva

4.1.1. Nocicepção induzida pela formaiina

A fim de verificar a duração do efeito antinociceptivo da dipirona, quando administrada através da via i.p., e para determinar o tempo ideal para a realização dos experimentos subseqüentes, um grupo de camundongos recebeu dipirona ($180,0 \mu\text{mol/kg}$) e foi avaliado no modelo da formaiina durante 6 horas. Os dados apresentados na figura 2 mostram que sua atividade antinociceptiva foi observada já a partir de 30 minutos após sua administração e durou cerca de 2 horas neste teste.

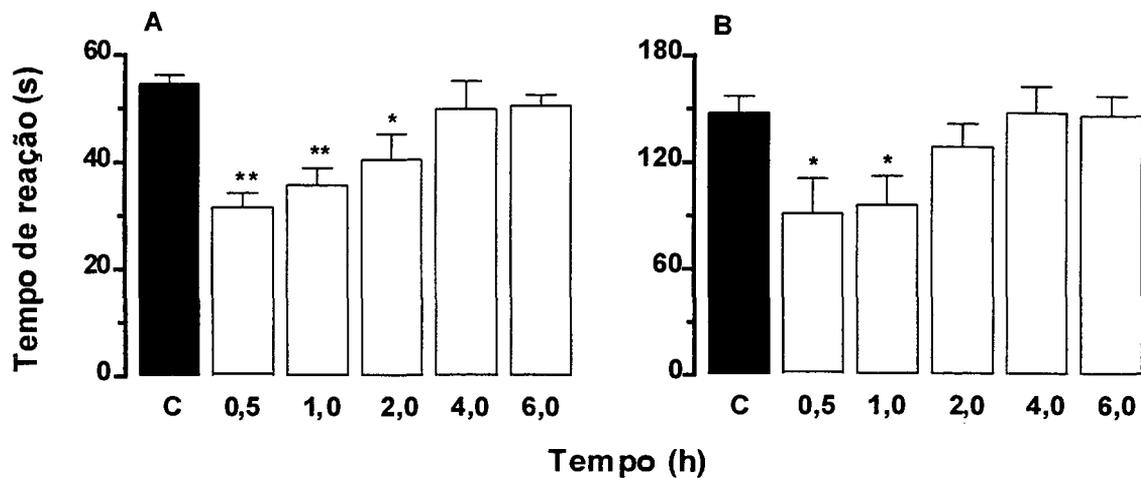


Figura 2 - Duração do efeito antinociceptivo da dipirona ($180 \mu\text{mol/kg}$), quando administrada por via intraperitoneal, em relação à primeira (A) e a segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5% em $20 \mu\text{L}$) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

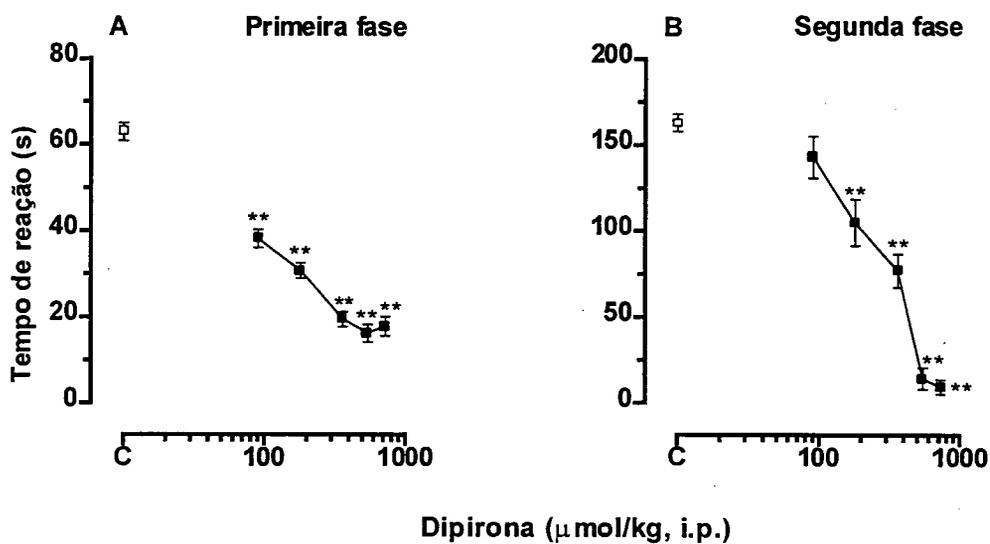
Os resultados apresentados na figura 3 mostram que a dipirona causou inibição dependente da dose e significativa tanto das respostas fase neurogênica (0 a 5 min) quanto da fase inflamatória (15 a 30 min) da nocicepção induzida pela formalina. Essa atividade antinociceptiva foi observada quando a dipirona foi administrada por via i.p. ($90,0 - 720,0 \mu\text{mol/kg}$), 30 min antes, ou i.pl., co-administrada com a formalina ($0,1 - 30,0 \mu\text{mol/pata}$). Os valores médios das DI_{50s} para a primeira fase foram $154,5$ ($99,9 - 238,8$) $\mu\text{mol/kg}$ e $2,6$ ($0,8 - 8,4$) $\mu\text{mol/pata}$, respectivamente. Para a segunda fase, os valores das DI_{50s} foram $263,7$ ($234,0 - 296,9$) $\mu\text{mol/kg}$ e $1,2$ ($0,2 - 9,2$) $\mu\text{mol/pata}$, respectivamente. As inibições máximas observadas, em relação às respostas controle, foram $74 \pm 2\%$ e $57 \pm 5\%$ na primeira fase e $91 \pm 1\%$ e 100% na segunda fase, respectivamente (ver tabela 1, página 59).

Administrada por via i.t. ($0,3 - 3,0 \mu\text{mol/sítio}$) ou i.c.v. ($0,09 - 1,8 \mu\text{mol/sítio}$) 10 min antes, a dipirona também produziu inibição dependente da dose e significativa de ambas

fases da dor induzida pela formalina (figura 4). Os valores médios das DI_{50s} ($\mu\text{mol/sítio}$) para a atividade da dipirona, administrada por via i.t., na primeira e a segunda fase da dor induzida pela formalina foram 1,3 (0,9 - 1,8) e 0,9 (0,6 - 1,4) $\mu\text{mol/sítio}$, respectivamente. As inibições máximas observadas, em relação às repostas controle, foram $61 \pm 3\%$ e $86 \pm 7\%$ na primeira e segunda fase, respectivamente. Os valores médios das DI_{50s} ($\mu\text{mol/sítio}$) para a atividade da dipirona, administrada por via i.c.v., na primeira e a segunda fase da dor induzida pela formalina foram 0,4 (0,3 - 0,7) e 0,4 (0,3 - 0,5) $\mu\text{mol/sítio}$, respectivamente. As inibições máximas observadas, em relação aos respectivos controles, foram $68 \pm 7\%$ e $82 \pm 8\%$ na primeira e segunda fase, respectivamente (tabela 1).

Independente da via de administração, a dipirona não demonstrou efeito significativo sobre o edema de pata associado à fase inflamatória do teste da formalina (resultados não apresentados).

INTRAPERITONEAL



INTRAPLANTAR

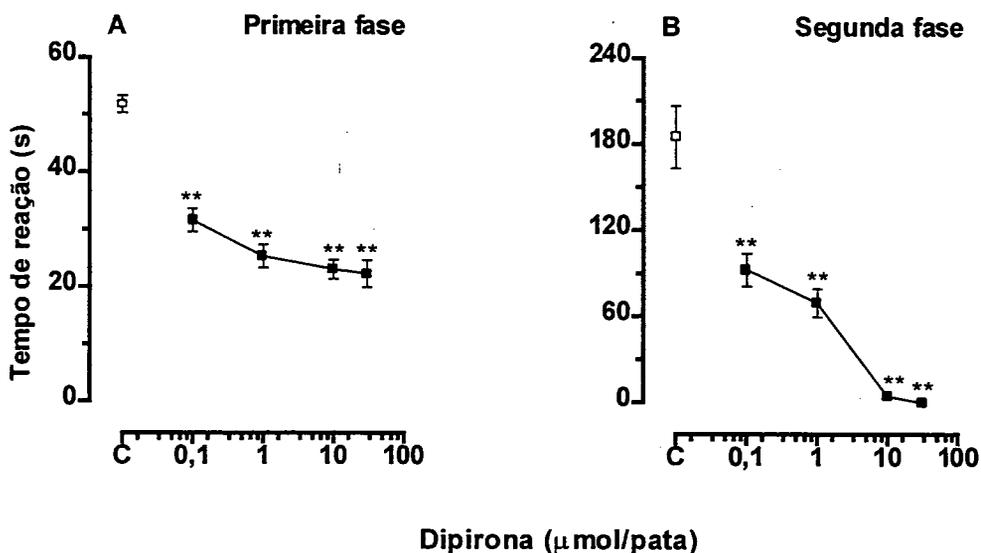
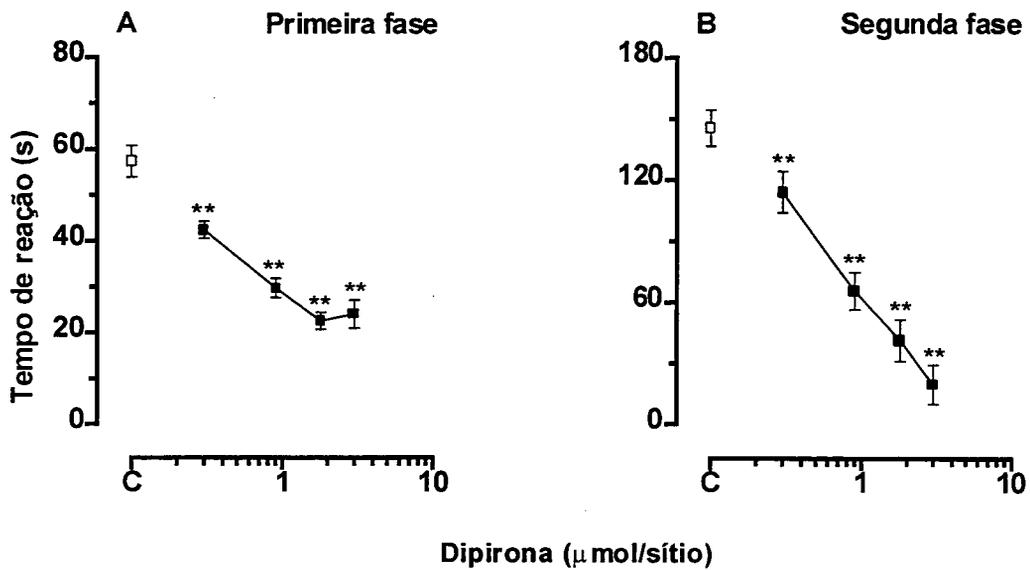


Figura 3 - Efeito antinociceptivo causado pela dipirone, quando administrada por via intraperitoneal (i.p., painéis superiores) ou intraplantar (i.pl., painéis inferiores), em relação à primeira (A) e a segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5% em 20 μL) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 - 16 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, ** $P < 0,01$.

INTRATECAL



INTRACEREBROVENTRICULAR

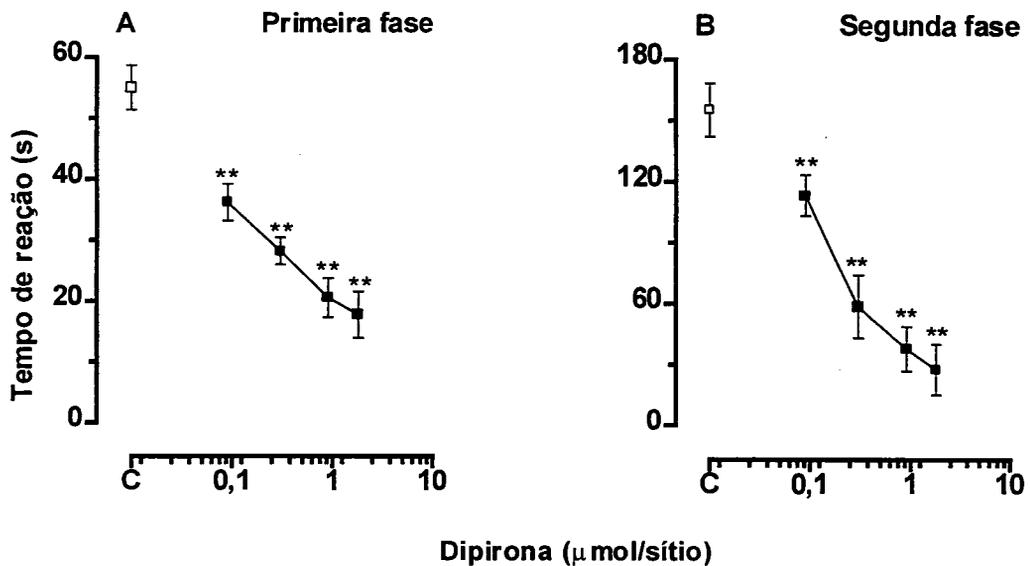
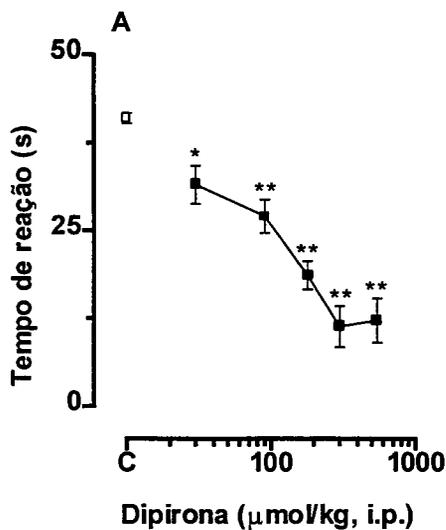


Figura 4 - Efeito antinociceptivo causado pela dipirona, quando administrada por via intratecal (i.t., painéis superiores) ou intracerebrocentricular (i.c.v, painéis inferiores), em relação à primeira (A) e a segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5% em 20 μL) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 - 10 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, ** $P < 0,01$.

4.1.2. Nociceção induzida pela capsaicina

Os dados apresentados na figura 5 demonstram que a dipirona, administrada através das vias i.p. (30,0 - 360,0 $\mu\text{mol/kg}$), 30 min antes, ou i.pl. (0,1 - 10,0 $\mu\text{mol/pata}$), injetada em associação com capsaicina (1,6 mg em 20 μL), mostrou atividade antinociceptiva significativa e dependente da dose em camundongos quando avaliada no modelo da dor induzida pela capsaicina. Os valores médios das $\text{DI}_{50\text{s}}$ foram 207,6 (179,5 - 240,0) $\mu\text{mol/kg}$ e 2,2 (0,5 - 9,2) $\mu\text{mol/pata}$, respectivamente. As inibições máximas observadas, em relação às respostas controle, foram $70 \pm 8\%$ e $66 \pm 8\%$, respectivamente (tabela 1).

INTRAPERITONEAL



INTRAPLANTAR

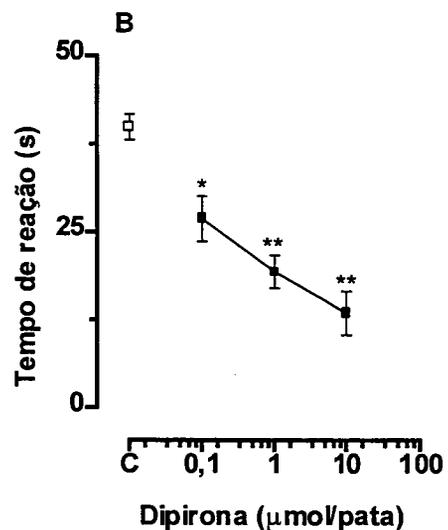
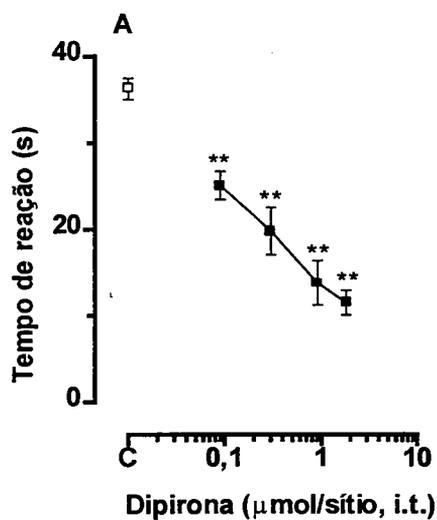


Figura 5 - Efeito antinociceptivo causado pela dipirona, quando administrada por via intraperitoneal (i.p., A), 30 min antes, ou intraplantar (i.pl., B) em co-administração com a capsaicina, em relação à nociceção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina (1,6 μg em 20 μL) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 - 10 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

A administração i.t. (0,3 - 3,0 $\mu\text{mol/sítio}$) ou i.c.v. (0,09 - 1,8 $\mu\text{mol/sítio}$) de dipirona, 10 min antes, também causou efeito antinociceptivo significativo e dependente da dose em camundongos quando avaliada no modelo da dor induzida pela injeção intraplantar de capsaicina (figura 6). Os valores médios das DI_{50S} ($\mu\text{mol/sítio}$) foram 0,4 (0,3 - 0,6) e 0,14 (0,11 - 0,19), respectivamente. As inibições máximas observadas, em relação às respostas controle, foram $68 \pm 4\%$ e $80 \pm 5\%$, respectivamente (tabela 1).

INTRATECAL



INTRACEREBROVENTRICULAR

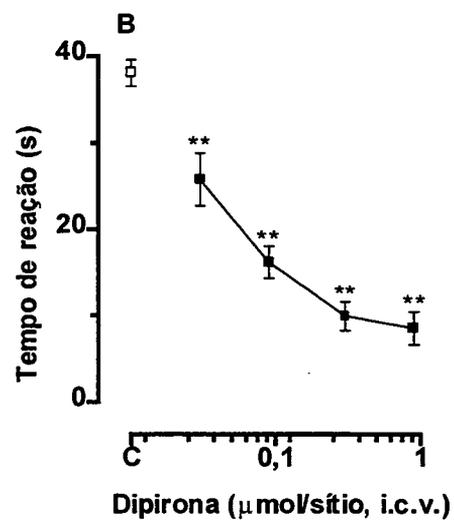


Figura 6 - Efeito antinociceptivo causado pela dipirona, quando administrada por via intratecal (i.t., A) ou intracerebroventricular (i.c.v., B), em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina (1,6 μg em 20 μL) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 - 10 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, ** $P < 0,01$.

4.1.3. Nocicepção e edema de pata induzidos pela injeção

intrapiantar de glutamato

Quando injetado por via i.pl., em camundongos, o glutamato (0,3 – 60,0 $\mu\text{mol}/20 \mu\text{L}$) induziu uma resposta nociceptiva de maneira dependente da dose (figura 7), caracterizado por um comportamento de lamber, agitar, morder e elevar a pata injetada. Os períodos de 5 min foram agrupados em três intervalos para facilitar a visualização do pico do comportamento nociceptivo apresentado pelos animais. A resposta nociceptiva induzida pela injeção intrapiantar de glutamato foi mais evidente nos primeiros 15 min, diminuindo gradativamente dos 15 aos 30 min e sendo praticamente ausente entre os 30 e 40 min. Dessa forma, o período de tempo de 15 min iniciais foi escolhido para avaliar o efeito da dipirona sobre a nocicepção e edema de pata induzidos pelo glutamato. O valor médio da DI_{50} (e limite de confiança de 95%) para este efeito, calculado entre 0 a 15 min, foi correspondente a 2,6 (1,6 – 4,3) $\mu\text{mol}/\text{pata}$. A resposta nociceptiva máxima ($84,8 \pm 13,2 \text{ s}$) ao glutamato foi observada na dose de 60,0 $\mu\text{mol}/\text{pata}$.

Além disso, a injeção intrapiantar de glutamato também causou aumento dependente da dose do volume das patas, com valor médio de DI_{50} de 0,5 (0,4 – 0,7) $\mu\text{mol}/\text{pata}$ e o edema máximo observado foi $70,5 \pm 3,9 \text{ mg}$, na dose de 10,0 $\mu\text{mol}/\text{pata}$ (figura 7).

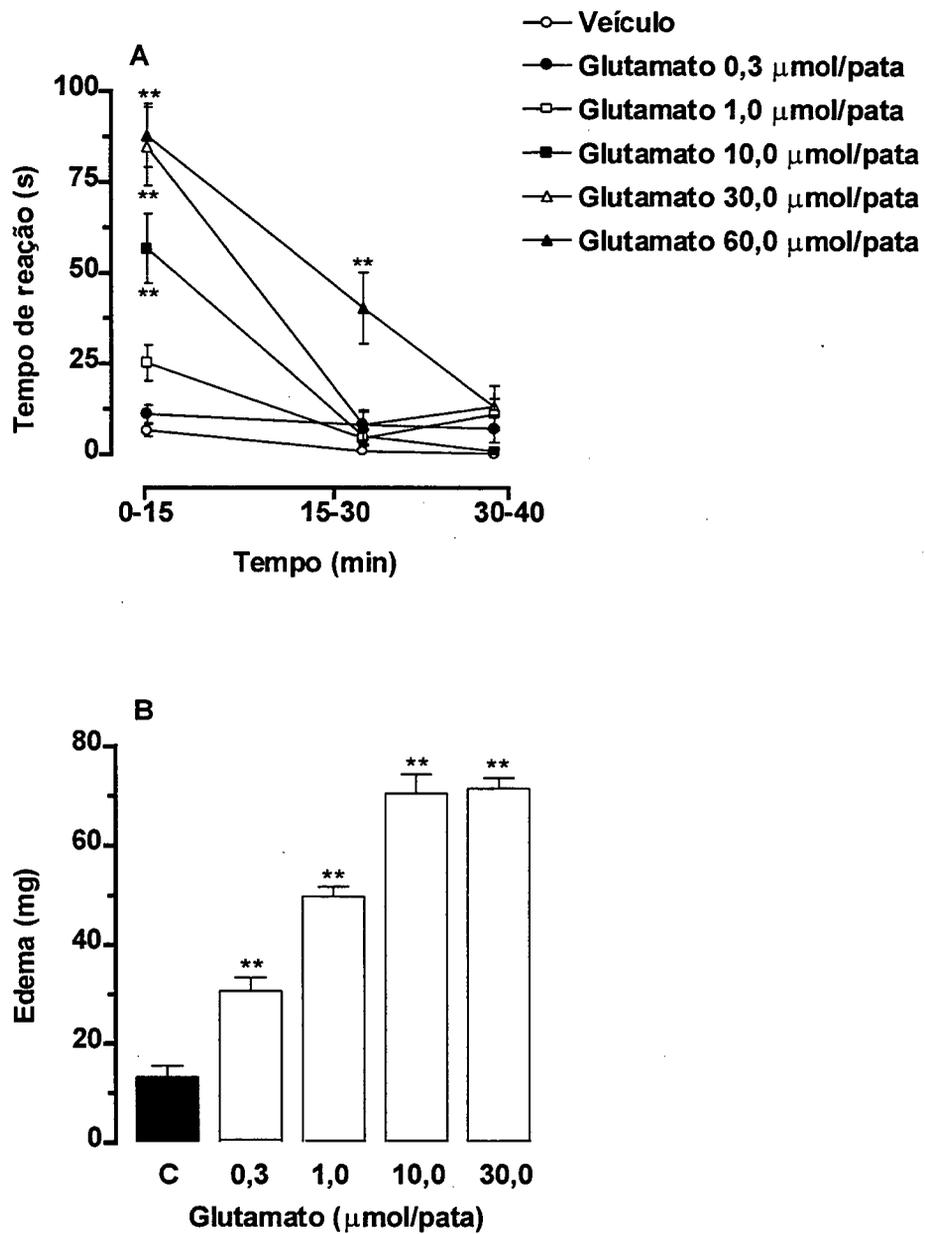


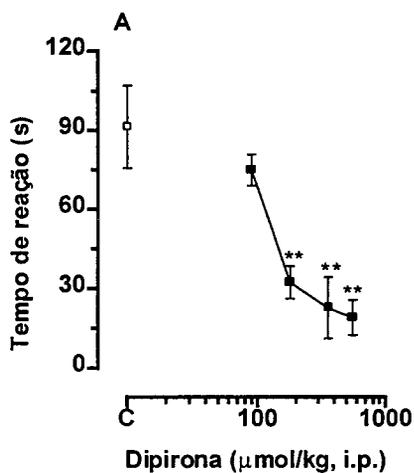
Figura 7 – Curva dose-resposta de nocicepção e edema de pata causados pela injeção intraplantar de glutamato (0,3 - 60,0 $\mu\text{mol/pata}$) ou solução salina estéril (NaCl 0,9%) em camundongos. Cada grupo representa a média de 12 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, $**P < 0,01$.

Os resultados da figura 8 demonstram que, do mesmo modo que em outros modelos de nocicepção, a dipirona produziu inibição significativa e dependente da dose da dor induzida pela injeção intraplantar de glutamato (30,0 $\mu\text{mol}/20 \mu\text{L}$) em camundongos. Esta atividade antinociceptiva foi observada quando os animais foram tratados com dipirona por via i.p. (90,0 - 540,0 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) 30 min antes da injeção intraplantar de glutamato ou i.pl. (1,0 - 30,0 $\mu\text{mol}/\text{pata}$), em co-injeção, associada ao glutamato (figura 8 A e B, respectivamente). Os valores médios das $\text{DI}_{50\text{S}}$ foram 118,6 (147,6 - 241,0) e 6,3 (4,2 - 9,7), respectivamente. As inibições máximas observadas, em relação aos grupos controle, foram $86 \pm 7\%$ e $57 \pm 3\%$, respectivamente (tabela 1, página 59).

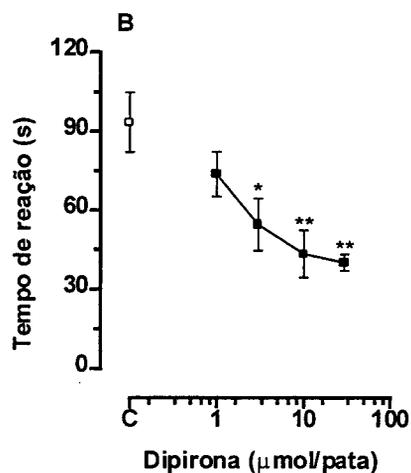
A dipirona também foi capaz de inibir, de maneira dependente da dose e significativa, a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (30,0 $\mu\text{mol}/20 \mu\text{L}$) em camundongos quando administrada através das vias i.t. (0,3 - 3,0 $\mu\text{mol}/\text{sítio}$) e i.c.v. (1,0 - 30,0 $\mu\text{mol}/\text{sítio}$), 10 min antes da aplicação de glutamato (figura 8 C e D, respectivamente). Os valores médios das $\text{DI}_{50\text{S}}$ ($\mu\text{mol}/\text{sítio}$) foram 1,2 (0,8 - 1,8) e 0,3 (0,2 - 0,5), respectivamente. As inibições máximas observadas, em relação aos grupos controle, foram $57 \pm 5\%$ e $71 \pm 8\%$, respectivamente (tabela 1).

Independente da via de administração utilizada, a dipirona não apresentou efeito significativo sobre o edema de pata associado à injeção intraplantar de glutamato, (resultados não apresentados).

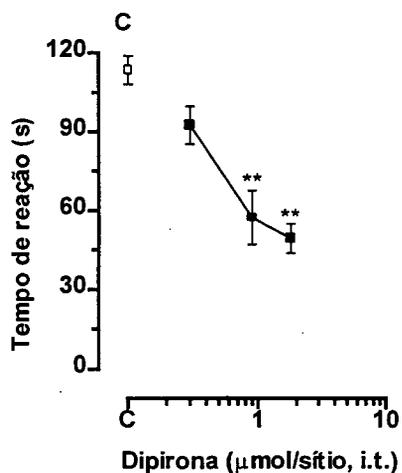
INTRAPERITONEAL



INTRAPLANTAR



INTRATECAL



INTRACEREBROVENTRICULAR

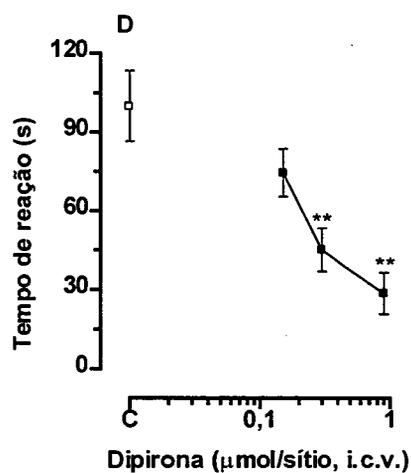


Figura 8 – Efeito da dipirona administrada por via intraperitoneal (i.p., A), intraplantar (i.pl., B), intratecal (i.t., C) ou intracerebroventricular (i.c.v., D), em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (30,0 µmol em 20 µL). Cada grupo representa a média de 6 - 10 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, *P<0,05 e **P<0,01.

4.1.4. Teste da retirada da cauda (*tail flick*) e da placa quente

O tratamento dos animais com dipirona (0,3 – 1,2 mmol/kg, i.p.) causou efeito antinociceptivo, quando analisado nos teste de retirada da cauda e da placa quente, verificado através do aumento do tempo de latência dos animais quando avaliados nestes modelos (figura 9). A morfina (26,6 μ mol/kg, s.c.) causou efeito antinociceptivo importante quando avaliada nos mesmos testes.

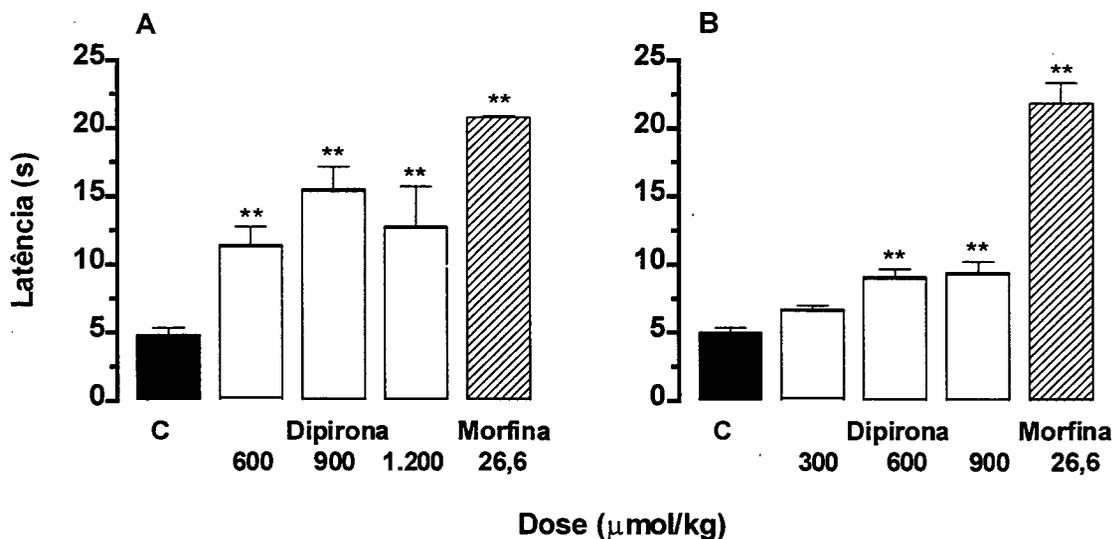


Figura 9 – Efeito do tratamento com dipirona (i.p.), morfina (s.c.) ou solução salina estéril em relação à nocicepção térmica induzida pelo teste de retirada da cauda (A) e placa quente (B) em camundongos. Cada grupo representa a média de 8 - 16 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, **P<0,01.

4.1.5. Hiperálgia induzida pelo glutamato

A dipirona foi efetiva em inibir, de maneira dependente da dose, a hiperálgia induzida pela injeção i.t. de glutamato (100,0 nmol/sítio) quando administrada por via i.p. (3,0 - 30,0 $\mu\text{mol/kg}$), i.t. (9,0 - 90,0 nmol/sítio) ou i.c.v. (30,0 - 300,0 nmol/sítio) (figuras 10 e 11). Os valores médios das $\text{DI}_{50\text{s}}$ (calculados aos 5 min) foram 9,0 (6,8 - 11,9) $\mu\text{mol/kg}$, 93,9 (70,8 - 124,8) nmol/sítio e 28,7 (24,2 - 34,0) nmol/sítio, respectivamente (tabela 2). As inibições máximas observadas, em relação aos grupos controle, foram 100%. Quando administrada isoladamente, nas mesmas doses que foi efetiva em inibir a hiperálgia induzida pelo glutamato, a dipirona não causou efeito antinociceptivo no teste da placa quente (resultados não apresentados).

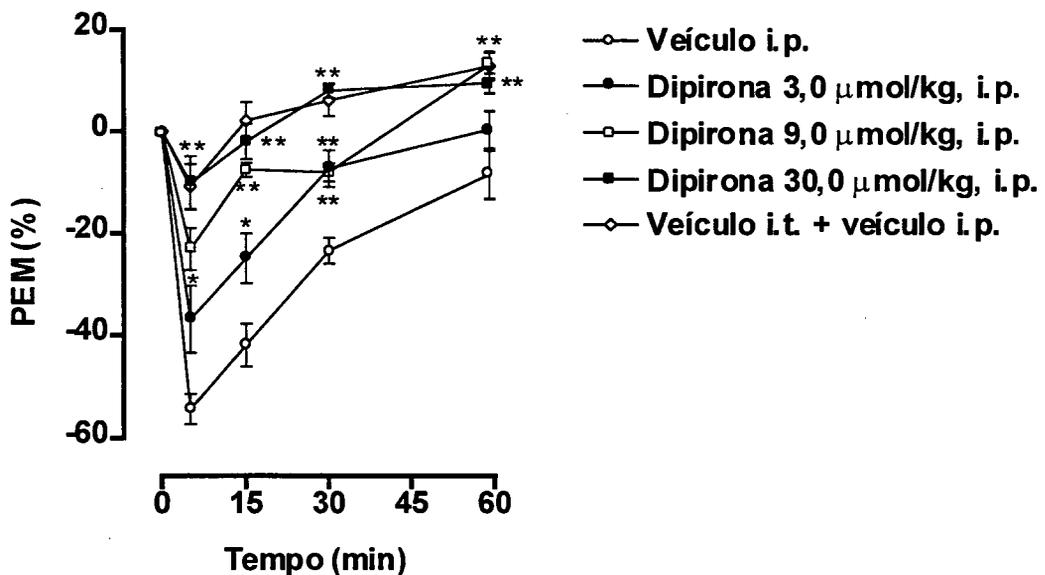


Figura 10 - Efeito da dipirona administrada por via intraperitoneal, em relação a hiperálgia induzida pelo glutamato (100,0 nmol/sítio) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

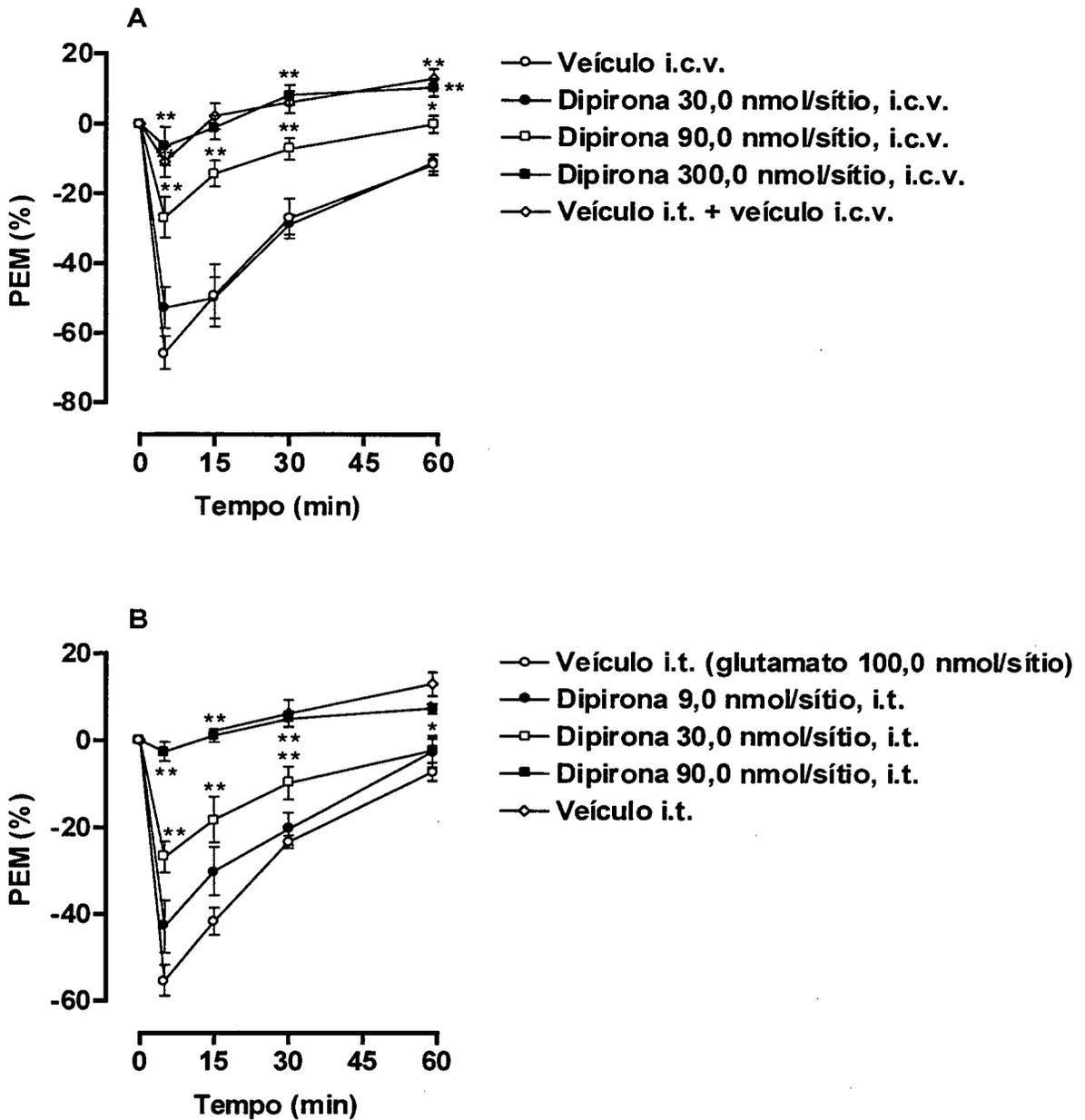


Figura 11 - Efeito da dipirona administrada por via intracerebroventricular (A) e intratecal (B) em relação a hiperálgia induzida pelo glutamato (100 nmol/sítio) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

4.1.6. Medida do desempenho motor

A dipirona, até a dose de 1,8 mmol/kg, administrada i.p., 30 min antes do teste, não alterou significativamente a resposta motora dos animais. A resposta controle no teste do rota-rod foi 60 s em relação a 60 s na presença da dipirona (N= 8) (resultados não apresentados).

4.2. Estudo do mecanismo de ação

4.2.1. Participação do sistema opióide na atividade

antinociceptiva da dipirona no modelo da formaiina

O pré-tratamento dos animais com naioxona (antagonista não seletivo de receptores opióides, 13,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) causou reversão completa do efeito antinociceptivo da morfina (agonista não seletivo de receptores opióides, 13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.). No entanto, o pré-tratamento com naioxona não alterou a antinocicepção causada pela dipirona (540,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), quando analisada em relação à dor induzida pela formaiina (figura 12).

4.2.2. Participação do sistema serotoninérgico na atividade

antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina

Os dados apresentados na figura 13 mostram que o tratamento dos animais com DL-p-clorofenilalanina (PCPA, inibidor da síntese de serotonina, 399,8 $\mu\text{mol/kg}$, i.p., durante 4 dias consecutivos) não causou alteração significativa da atividade antinociceptiva da dipirona (540,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) quando analisada em relação à dor induzida pela formaiina.

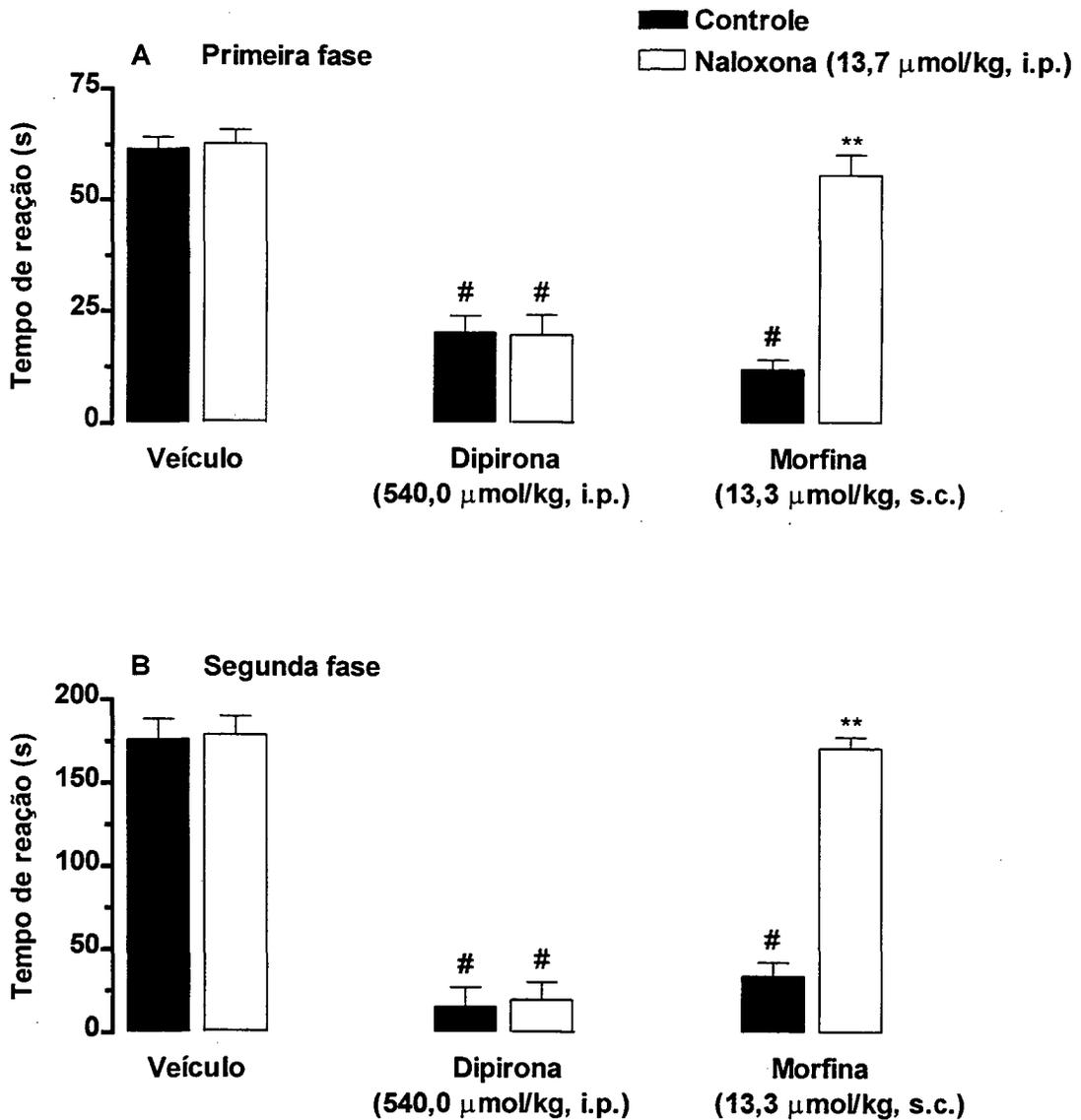


Figura 12 - Influência do pré-tratamento de camundongos com naloxona sobre o efeito antinociceptivo causado pela dipirona ou morfina em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5% em 20 µL). Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do respectivo grupo controle, **P<0,01.

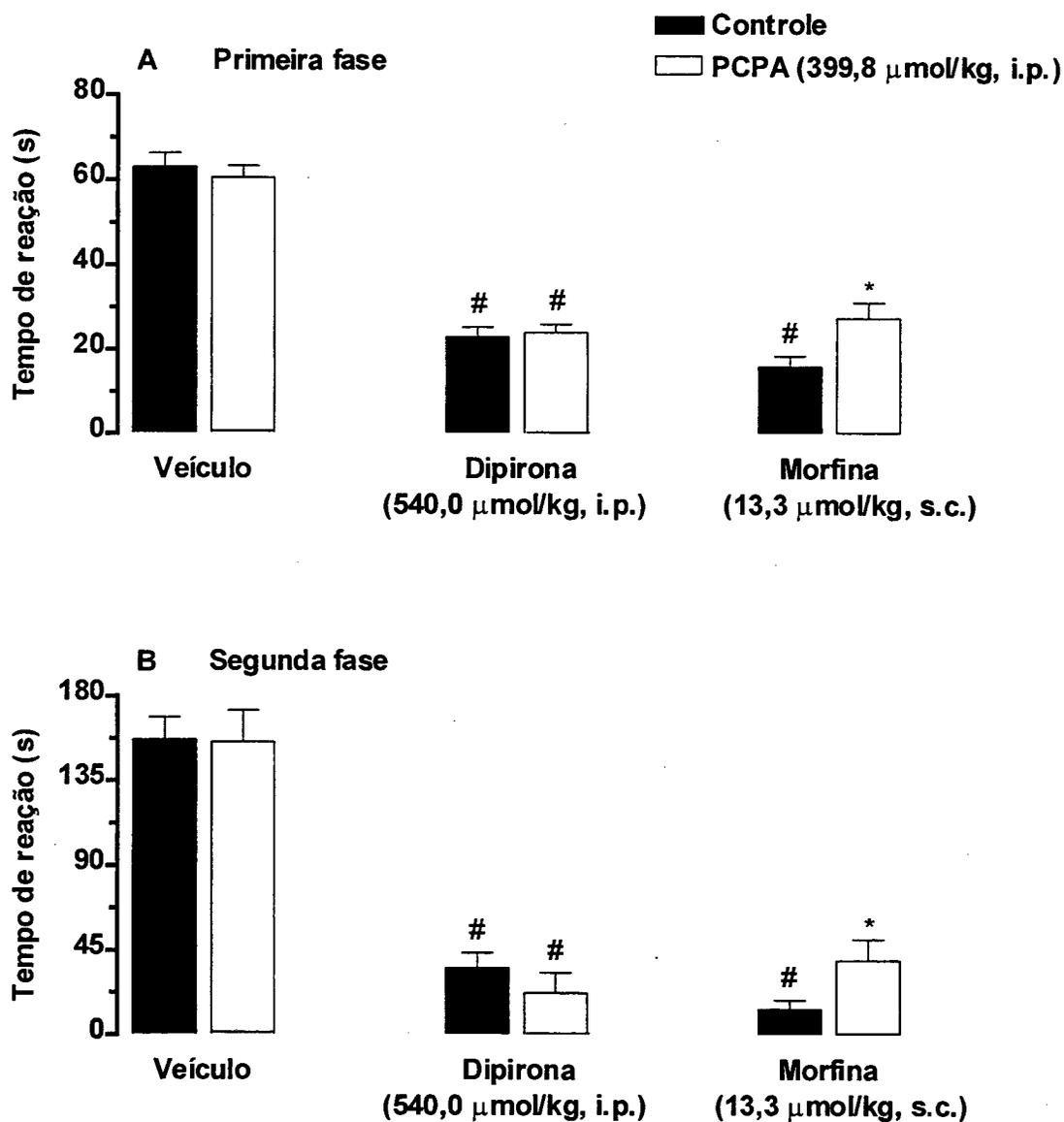


Figura 13 - Influência do pré-tratamento de camundongos com DL-p-clorofenilalanina metil éster sobre o efeito antinociceptivo causado pela dipirona ou morfina em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5% em 20 μL). Cada grupo representa a média de 6 - 10 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do respectivo grupo controle, * $P < 0,05$.

4.2.3. Participação da proteína G (sensível a toxina pertussis) na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina

O tratamento dos animais com toxina pertussis 7 dias antes do teste diminuiu significativamente o efeito antinociceptivo da morfina (13,3 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.) quando analisada em relação à dor induzida pela injeção de formalina. Contudo, a atividade antinociceptiva da dipirona (540,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) não foi alterada significativamente pelo tratamento com toxina pertussis, quando avaliada no mesmo modelo (figura 14).

4.2.4. Participação do sistema GABAérgico na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina

Conforme mostram os resultados apresentados na figura 15, o pré-tratamento dos animais com faclofen (antagonista seletivo de receptores GABA_B, 40,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), 10 min antes, causou reversão completa da atividade antinociceptiva do baclofen (agonista seletivo de receptores GABA_B, 4,6 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.). O mesmo pré-tratamento não causou alteração significativa da antinocicepção induzida pela dipirona (540,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) quando analisada em relação à dor induzida pela injeção de formalina.

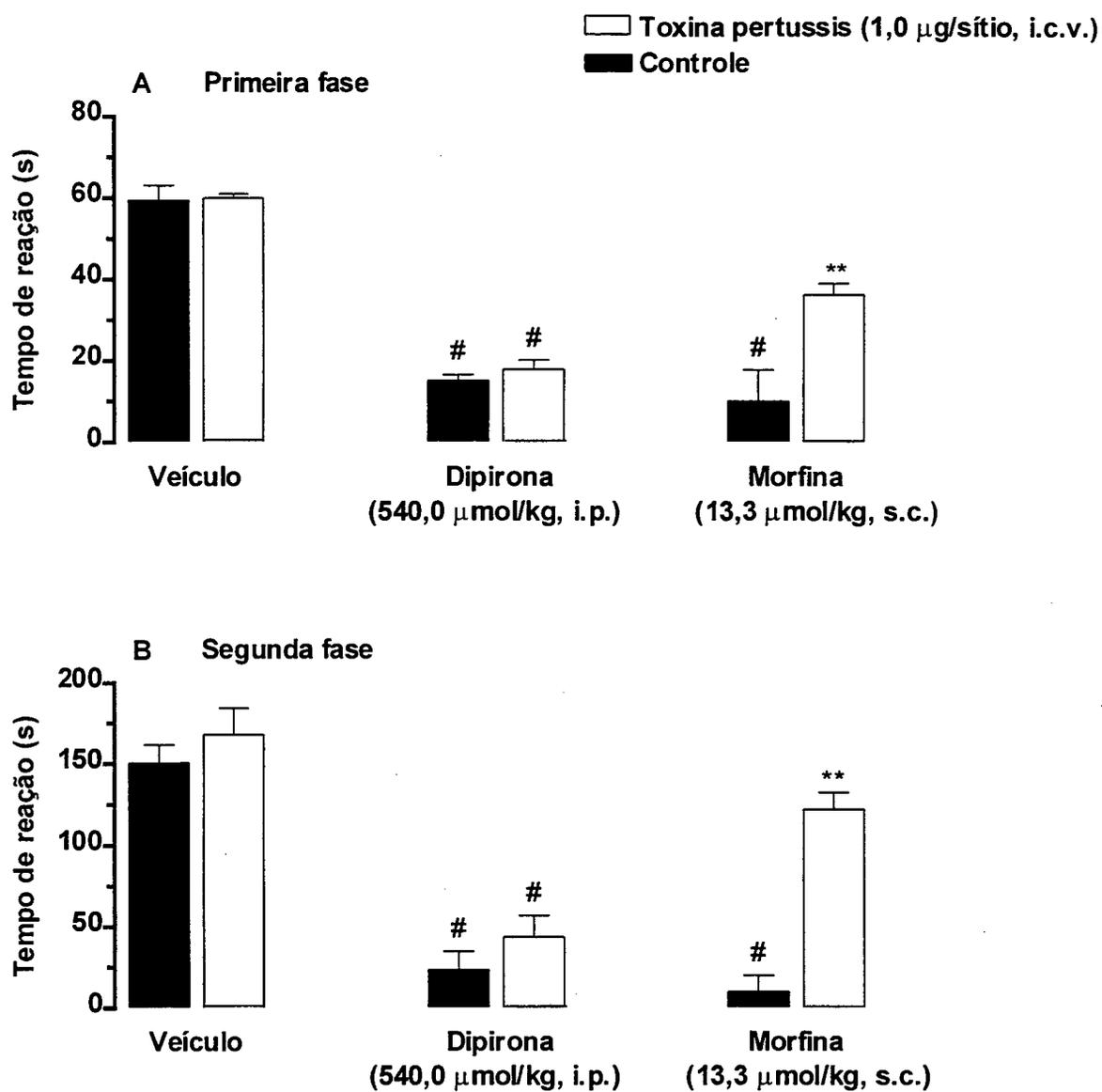


Figura 14 - Influência do pré-tratamento de camundongos com toxina pertussis sobre o efeito antinociceptivo causado pela dipirona ou morfina em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5% em 20 µL). Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do respectivo grupo controle, **P<0,01.

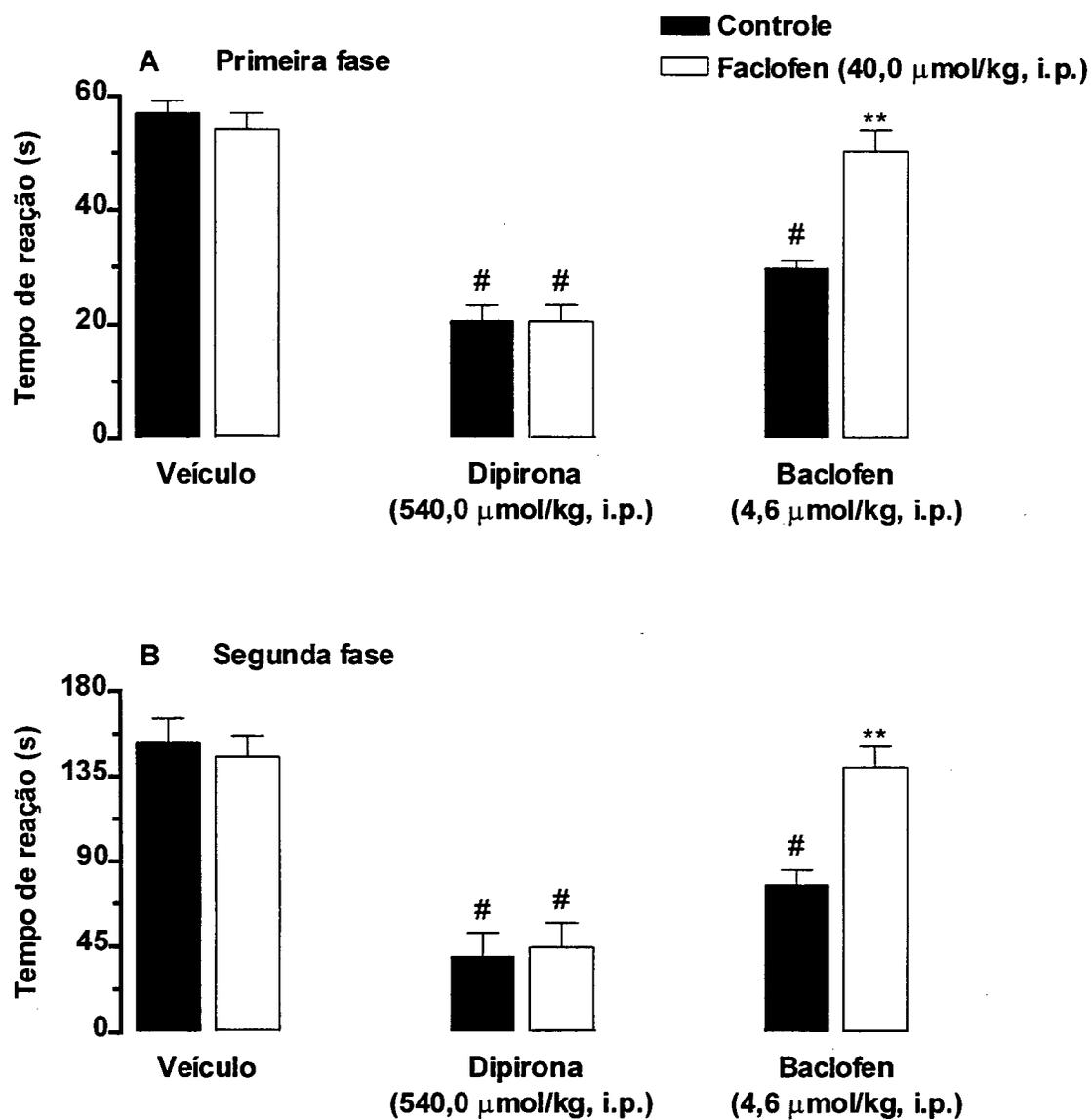


Figura 15 - Influência do pré-tratamento de camundongos com faclofen sobre o efeito antinociceptivo causado pela dipirona ou baclofen em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5% em 20 µL). Cada grupo representa a média de 6 - 14 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do respectivo grupo controle, **P<0,01.

4.2.5. Participação da via L-arginina - óxido-nítrico na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formaiina

O pré-tratamento dos animais com L-arginina, (substrato da óxido nítrico sintase, 3,4 mmol/kg, i.p.), 15 min antes, não alterou a atividade antinociceptiva da dipirona (540,0 μ mol/kg, i.p.) quando analisada em relação à dor induzida pela injeção de formaiina. O efeito antinociceptivo da N^G -nitro-L-arginina (um inibidor da óxido nítrico sintase, L-NOARG, 342,0 μ mol/kg, i.p.) foi quase que completamente revertido pelo pré-tratamento dos animais com L-arginina, no mesmo modelo (figura 16).

4.2.6. Participação de canais de K_{ATP} na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina

A participação de canais de potássio sensíveis a ATP na antinocicepção causada pela morfina (13,3 μ mol/kg, s.c.) fica evidente pela reversão do seu efeito antinociceptivo com o pré-tratamento dos animais com glibenclamida (bloqueador de canais de K_{ATP} , 81,0 nmol/sítio, i.c.v.). Entretanto, o mesmo pré-tratamento não modificou o efeito antinociceptivo causado pela dipirona (540,0 μ mol/kg, i.p.), quando analisada em relação à dor induzida pela formaiina (figura 17).

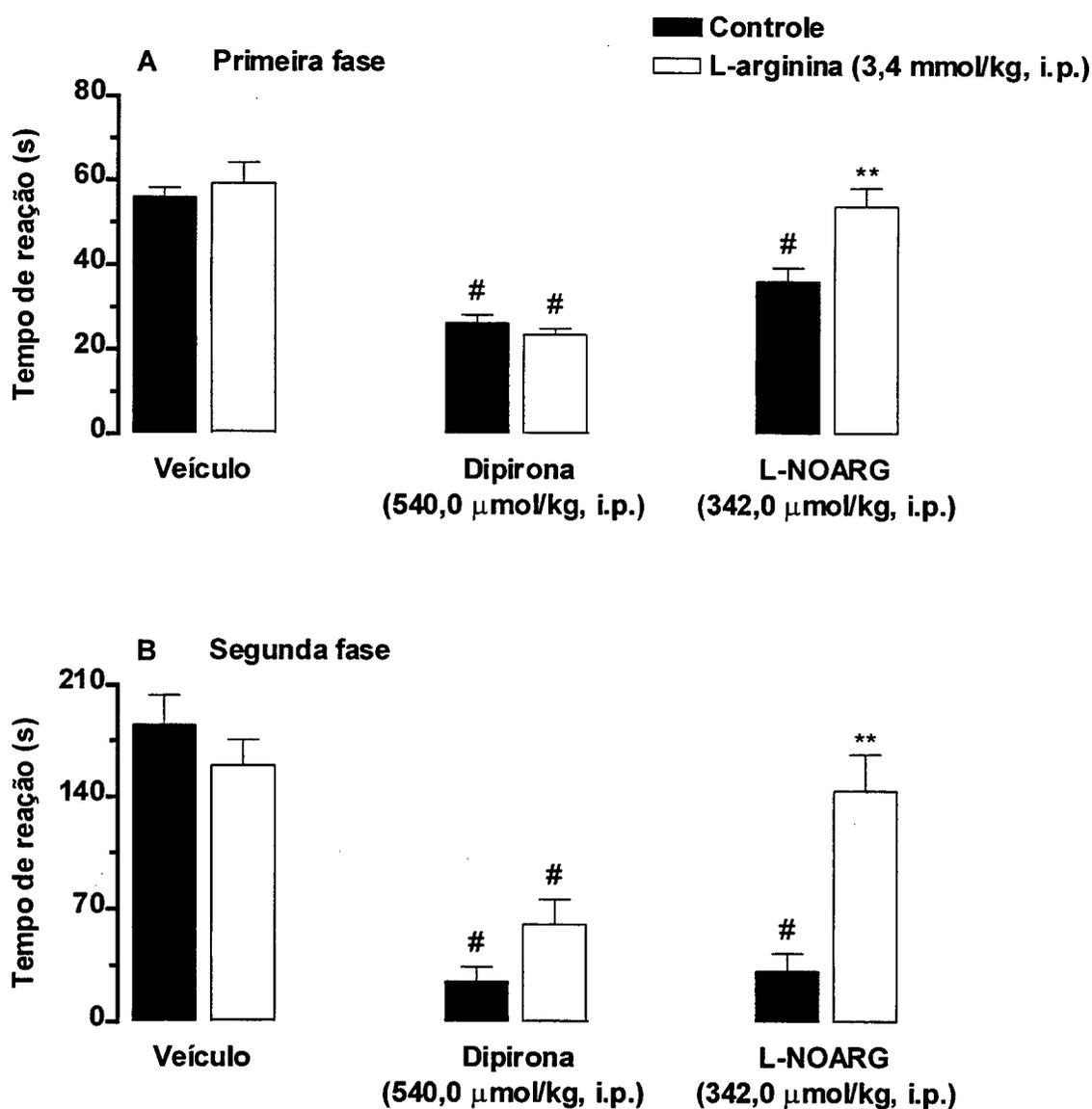


Figura 16 - Influência do pré-tratamento de camundongos com L-arginina sobre o efeito antinociceptivo causado pela dipirona ou N^G-nitro-arginina em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5% em 20 µL). Cada grupo representa a média de 6 - 18 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do respectivo grupo controle, **P<0,01.

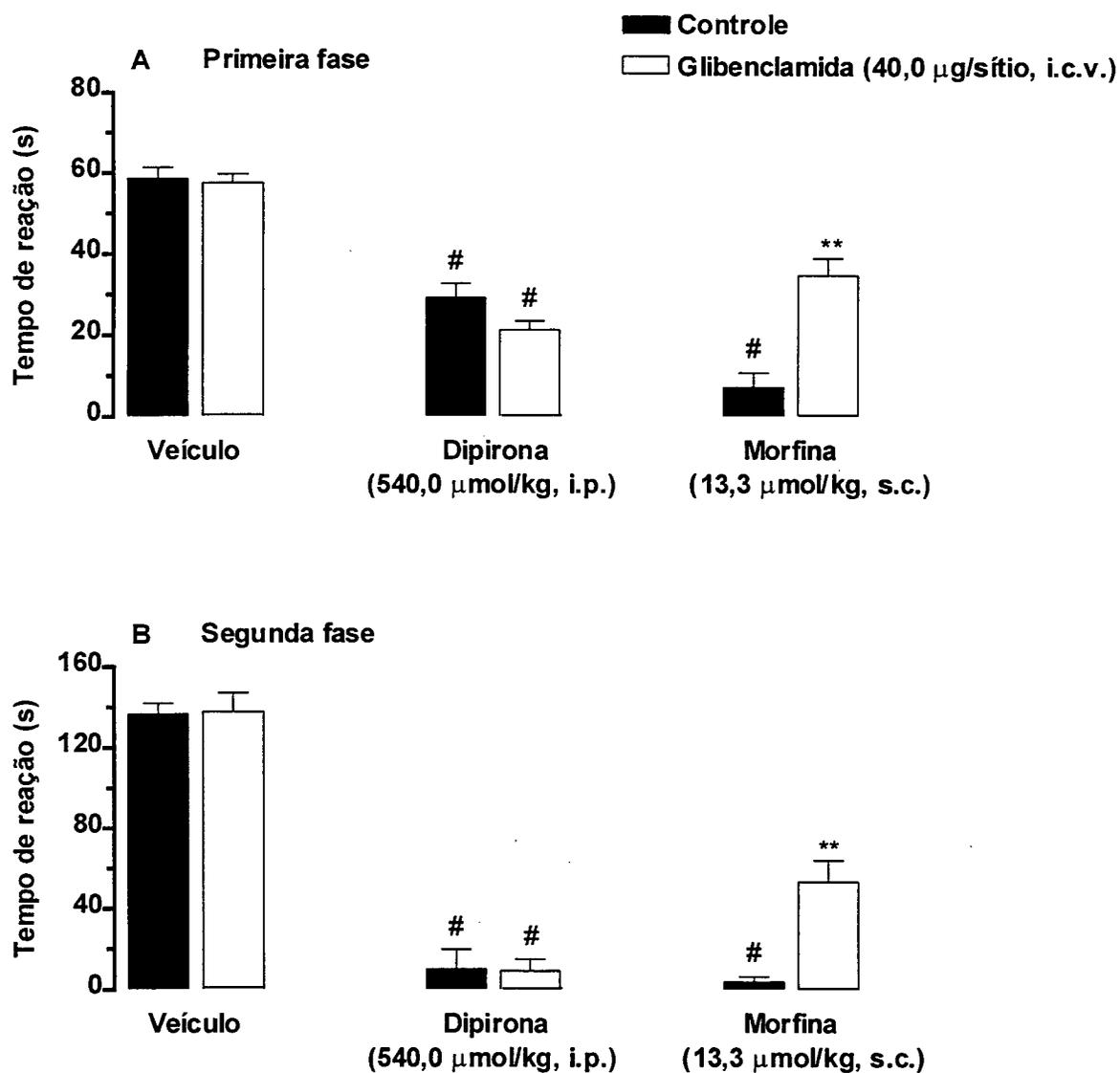


Figura 17 - Influência do pré-tratamento de camundongos com glibenclamida sobre o efeito antinociceptivo causado pela dipirona ou morfina em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5% em 20 µL). Cada grupo representa a média de 6 - 14 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do respectivo grupo controle, **P<0,01.

4.2.7. Participação de corticóides endógenos liberados pela glândula suprarrenal na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina

Os resultados apresentados na figura 18 mostram que a remoção das glândulas supra-renais não foi capaz de alterar significativamente o efeito antinociceptivo da dipirona (540,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) quando analisada uma semana após a cirurgia em relação à dor induzida pela formalina em camundongos. Os animais “falso-operados” serviram como controle.

4.2.8. Participação do sistema adrenérgico na atividade antinociceptiva da dipirona no modelo da formalina

O pré-tratamento dos animais com prazosin (antagonista seletivo de adrenoceptores α_1 , 0,4 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), 10 min antes, reverteu completamente o efeito antinociceptivo causado pela fenilefrina (agonista seletivo de adrenoceptores α_1 , 40,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), quando analisada em relação a dor induzida pela formalina. Do mesmo modo, o pré-tratamento dos animais com ioimbina (antagonista seletivo de adrenoceptores α_2 , 0,4 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), 10 min antes, reverteu completamente o efeito antinociceptivo induzido pela clonidina (agonista seletivo de adrenoceptores α_2 , 3,7 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.). Nenhum dos antagonistas de adrenoceptores (prazosin ou ioimbina) foi capaz de interferir na atividade antinociceptiva da dipirona (540,0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.) quando analisada em relação à dor induzida pela formalina (figura 19).

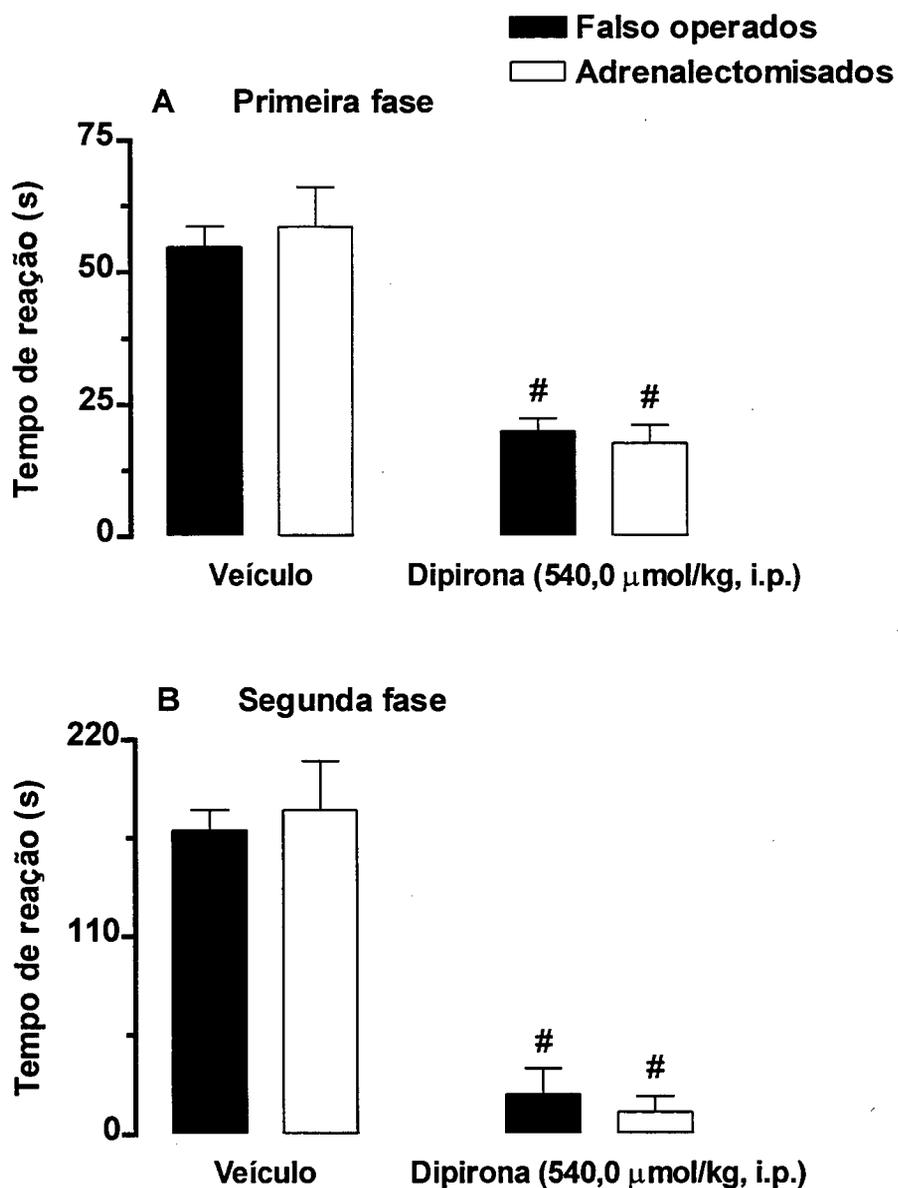


Figura 18 - Influência da adrenalectomia dos camundongos sobre o efeito antinociceptivo causado pela dipirona em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5% em 20 μL). Cada grupo representa a média de 6 - 8 animais e as linhas verticais os E.P.M.

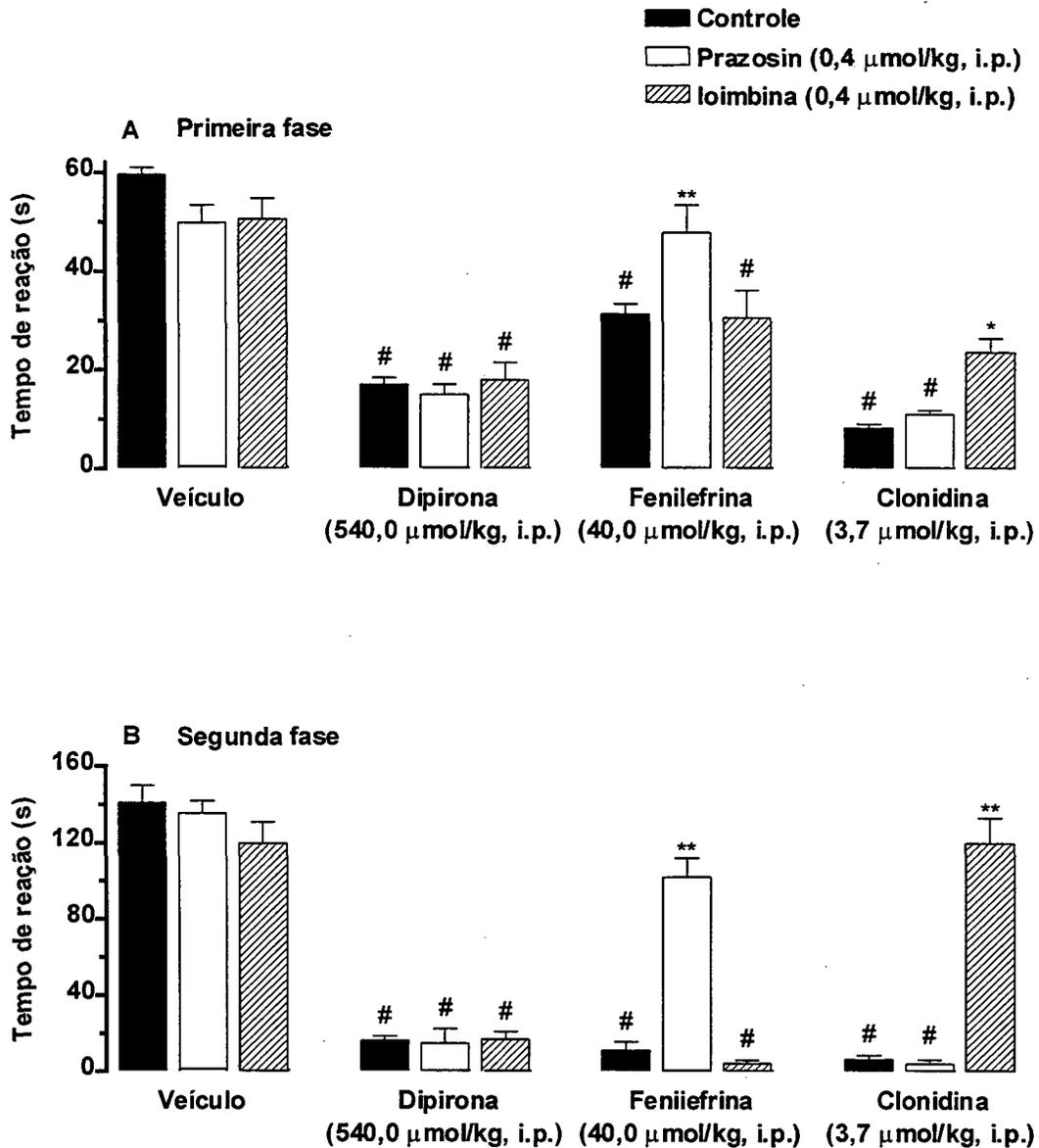


Figura 19 - Influência do pré-tratamento de camundongos com prazosin e ioimbina sobre o efeito antinociceptivo causado pela dipirona, fenilefrina ou clonidina em relação à primeira (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2,5% em 20 μL). Cada grupo representa a média de 6 - 10 animais e as linhas verticais os E.P.M. Difere significativamente do respectivo grupo controle, ** $P < 0,01$.

4.3. Efeito da dipirona sobre as óxido nítrico sintases constitutiva e neuronai

Tendo em vista que o pré-tratamento dos animais com L-arginina não influenciou o efeito antinociceptivo da dipirona, foi avaliada a influência direta desta sobre as atividades das óxido nítrico sintases constitutiva e induzida. A dipirona (3,0 – 90,0 μ M) não causou alteração significativa sobre a atividade de ambas as óxido nítrico sintases (figura 20).

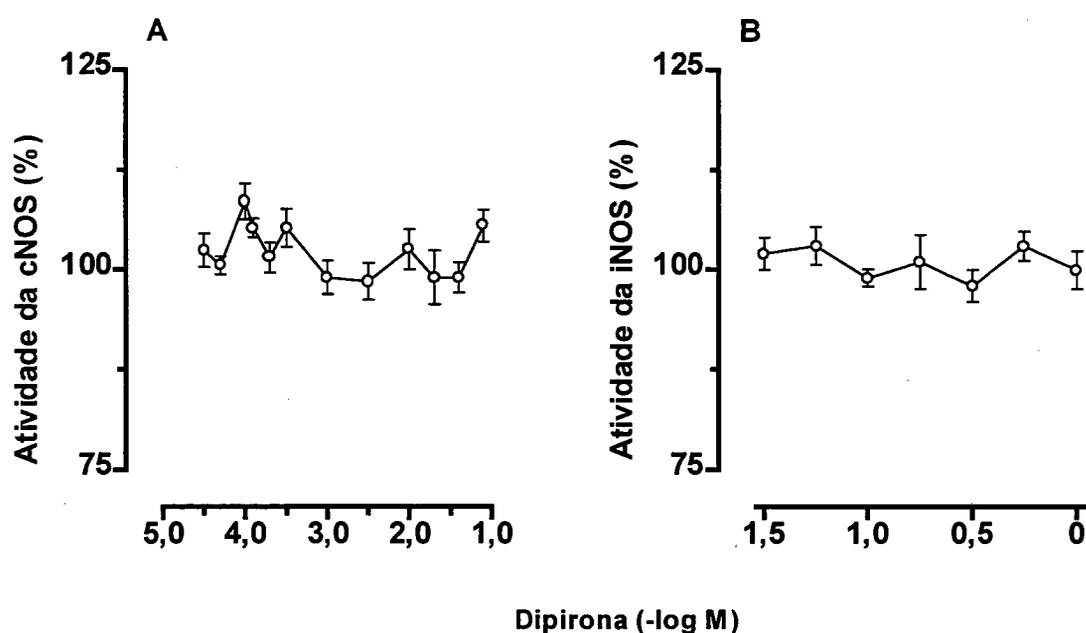


Figura 20 – Efeito de concentrações crescentes de dipirona sobre a atividade das óxido nítrico sintases constitutiva (A) e induzida (B). A atividade enzimática foi medida pela capacidade de conversão de [3 H] L-arginina em [3 H] L-citrulina. Os resultados são representados pela média de 4 experimentos e cada experimento foi feito em duplicata.

4.4. Efeito da dipirona sobre a união específica (*binding*) de [³H] glutamato

Os resultados representados na figura 21 mostram que a dipirona (10,0 – 1000,0 μ M) produziu modesta, porém significativa inibição da união específica (*binding*) do [³H] glutamato em membranas de córtex cerebral de camundongos. A percentagem máxima de inibição ($37\pm 3\%$) foi observada com 1000,0 μ M de dipirona. A dipirona também causou inibição similar da união específica (*binding*) de [³H] glutamato membranas de córtex cerebral de ratos (resultados não apresentados).

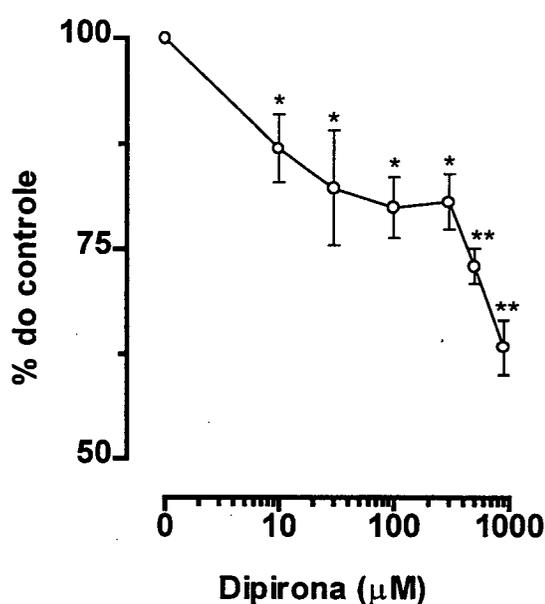


Figura 21 – Efeito de concentrações crescentes de dipirona (10,0 – 1000,0 μ M) sobre a união específica (*binding*) de [³H] glutamato em membranas de córtex cerebral de camundongos. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes (cada experimento realizado em triplicata) e as linhas verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

Tabela 1 - Valores médios das DI_{50} s e inibições máximas, em relação aos grupos controle, para a atividade antinociceptiva da dipirona na nocicepção induzida pela formalina, capsaicina e glutamato em camundongos.

Dipirona	Formalina			
	Primeira fase		Segunda fase	
	DI_{50}^a	IM (%) ^b	DI_{50}^a	IM (%) ^b
i.p. ($\mu\text{mol/kg}$)	154,5 (99,9 – 238,8)	74 \pm 3	263,7 (234,3 – 296,9)	94 \pm 3
i.pl. ($\mu\text{mol/pata}$)	2,6 (0,8 - 8,4)	57 \pm 5	1,2 (0,2 - 9,2)	100
i.c.v. ($\mu\text{mol/sítio}$)	0,4 (0,3 - 0,7)	68 \pm 7	0,4 (0,3 - 0,5)	82 \pm 8
i.t. ($\mu\text{mol/sítio}$)	1,3 (0,9 - 1,8)	61 \pm 3	0,9 (0,6 - 1,4)	86 \pm 7
	Capsaicina			
	DI_{50}^a	IM (%) ^b		
i.p. ($\mu\text{mol/kg}$)	207,6 (179,5 – 240,0)	72 \pm 7		
i.pl. ($\mu\text{mol/pata}$)	2,2 (0,5 – 9,2)	66 \pm 8		
i.c.v. ($\mu\text{mol/sítio}$)	0,14 (0,11 – 0,19)	80 \pm 5		
i.t. ($\mu\text{mol/sítio}$)	0,4 (0,3 – 0,6)	68 \pm 4		
	Glutamato			
	DI_{50}^a	IM (%) ^b		
i.p. ($\mu\text{mol/kg}$)	118,6 (147,6 - 241,0)	86 \pm 7		
i.pl. ($\mu\text{mol/pata}$)	6,3 (4,2 – 9,7)	57 \pm 3		
i.c.v. ($\mu\text{mol/sítio}$)	0,3 (0,2 - 0,5)	71 \pm 8		
i.t. ($\mu\text{mol/sítio}$)	1,2 (0,8 - 1,8)	57 \pm 5		

Observação: Cada valor representa a média de 6 a 10 animais. ^a DI_{50} s com seus respectivos limites de confiança (95%), ^bInibições máximas.

Tabela 2 - Valores médios das DI_{50} s e inibições máximas, em relação aos grupos controle, para a atividade antinociceptiva da dipirona na hiperalgisia induzida pelo glutamato em camundongos.

Dipirona	Glutamato	
	ID_{50}^a	IM (%) ^b
i.p. ($\mu\text{mol/kg}$)	9,0 (6,8 - 11,9)	100
i.t. (nmol/sítio)	28,7 (24,2 - 34,0)	100
i.c.v. (nmol/sítio)	93,9 (70,8 - 124,8)	100

Observação: Cada valor representa a média de 6 a 10 animais. ^a DI_{50} s com seus respectivos limites de confiança (95%), ^bInibições máximas.

5. DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados demonstram a atividade antinociceptiva da dipirona, administrada por via sistêmica, tópica, espinal ou supraespinal em modelos de nocicepção térmica e química, e sobre a hiperalgisia causada pelo glutamato, em camundongos. Além disso, através de abordagens farmacológicas e neuroquímicas, este estudo fornece novas evidências sobre os possíveis mecanismos que podem contribuir para explicar a atividade antinociceptiva e antihiperalgésica da dipirona.

A dipirona inibiu, de maneira significativa e dependente da dose, as duas fases da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina, que possivelmente representam tipos diferentes de dor (seção 4.1.1). Acredita-se que a primeira fase é causada pela estimulação direta dos nociceptores, e a dor produzida por esta estimulação só pode ser controlada por analgésicos que atuam sobre o sistema nervoso central, como os opióides. A segunda fase da dor induzida pela formalina está associada à resposta inflamatória, que envolve a

produção de prostaglandinas e outros mediadores inflamatórios, e portanto pode ser controlada pelas drogas pertencentes à classe dos antiinflamatórios esteroidais e não esteroidais ou ainda por analgésicos que atuam centralmente (HUNSKAAR e HOLE, 1987). A maioria das drogas pertencentes às classes dos antiinflamatórios esteroidais (como a dexametasona) e não esteroidais (como a indometacina e o naproxeno), é reconhecidamente mais eficaz em bloquear as dores de origem inflamatória, uma vez que a inibição da atividade das ciclooxigenases reduz a inflamação e, conseqüentemente, a dor causada pelos mediadores inflamatórios. A dipirona apresentou praticamente a mesma potência, comparando-se as DI_{50} s, para inibir a fase neurogênica (primeira fase) e a fase inflamatória (segunda fase) da resposta álgica induzida pela formalina, apesar de ser significativamente mais eficaz em relação à segunda fase, dependendo da via de administração. A eficácia da atividade antinociceptiva apresentada pela dipirona na primeira fase do modelo da formalina¹⁵ poderia justificar sua utilidade clínica principalmente nos casos de dor pós-operatória e na indução da anestesia (STEFFEN et al., 1996a; 1996b; 1997). Os resultados relacionados à primeira fase do modelo da formalina, que sugerem uma atividade sobre o sistema nervoso central, estão de acordo com trabalhos realizados anteriormente, por Carisson e colaboradores em 1986, Tortorici e Vanegas em 1994 e Jones em 1996. Outrossim, de modo semelhante ao observado por estes pesquisadores, a dipirona, administrada por via intraperitoneal, em altas doses, causou aumento significativo e dependente da dose no tempo de latência de camundongos em dois modelos de nocicepção térmica, a placa quente e retirada da cauda (seção 4.1.4). Curiosamente, Akman e colaboradores (1996) obtiveram resultados que mostravam que a dipirona não aumenta o tempo de latência dos animais nos testes de retirada da cauda e da placa quente.

¹⁵ 57 a 74% de inibição, conforme a via de administração.

Conforme os resultados apresentados, a antinocicepção produzida pela dipirona não é relacionada com suas propriedades antiinflamatórias, uma vez que, nas doses e vias de administração testadas, a dipirona não inibiu a formação do edema de pata associada a segunda fase da nocicepção induzida pela formalina. Diversos pesquisadores têm relatado que o edema de pata induzido pela formalina envolve a liberação de vários mediadores, como cininas, prostaglandinas, aminoácidos excitatórios e óxido nítrico (HALEY e WILCOX, 1990; CODERRE e MELZACK, 1992; YAMAMOTO e YAKSH, 1992 a, b; CORRÊA e CALIXTO, 1993; CORRÊA et al., 1996).

A nocicepção induzida pela capsaicina é muito similar à primeira fase da nocicepção induzida pela formalina, ou seja, corresponde provavelmente à estimulação direta dos nociceptores periféricos, embora a capsaicina possua receptores específicos, os receptores vanilóides do tipo 1 (RV1), que estão presentes principalmente nos gânglios da raiz dorsal da medula espinhal e no gânglio do trigêmio (CATERINA et al., 1997). Os receptores vanilóides são acoplados a um canal iônico permeável a cátions mono e divalentes (ordem de permeabilidade: cálcio > magnésio > sódio \approx potássio \approx céσιο), que, quando aberto, produz em uma despolarização e excitação dos neurônios. A dipirona administrada através das vias intraperitoneal, tópica, espinhal ou supraespinhal também causou antinocicepção importante¹⁶ neste modelo (seção 4.1.2), possivelmente por inibir a transmissão do estímulo nociceptivo na medula espinhal, como já sugerido em estudos realizados por Carlsson e Jurna em 1987, Neugebauer e colaboradores em 1994 e Tortorici e Vanegas em 1993. Sakurada e colaboradores, em estudos realizados em 1996 (a e b), mostraram que a nocicepção induzida pela injeção intraplantar ou intratecal de capsaicina pode ser mediada, pelo menos em parte, pela produção de óxido nítrico, liberação de substância P, neurocinina A, CGRP, glutamato e aspartato na medula espinhal. Dependendo da via de administração utilizada, a dipirona foi

¹⁶ 66 a 80% de inibição, conforme a via de administração

equipotente em prevenir a nocicepção induzida pela injeção intraplantar tanto de formalina quanto capsaicina. Em relação à DI_{50} , no teste da formalina, a dipirona foi cerca de 13 a 541 vezes menos potente que a morfina, mas cerca de 5 a 10 vezes mais potente que a aspirina e acetaminofeno, dependendo da via de administração utilizada (VAZ et al., 1996).

A antinocicepção potente e dependente da dose causada pela dipirona, quando administrada sistêmica, intraplantar, espinhal e supraespinhalmente, em relação à nocicepção induzida pela formalina e a capsaicina, é particularmente relevante, já que a maioria das DAINES testadas são ineficazes em prevenir a resposta neurogênica induzida tanto pela formalina (primeira fase) quanto pela capsaicina (SHIBATA et al., 1989; MALMBERG e YAKSH, 1992; CORRÊA e CALIXTO, 1993; VAZ et al., 1996; SANTOS et al., 1998). Tais evidências sugerem que a dipirona pode ter um mecanismo adicional interessante para sua ação analgésica, além da conhecida habilidade de inibir os produtos da ciclooxigenase derivados da via do ácido araquidônico (FERREIRA et al., 1978; ABBATE et al., 1990; SHIMADA et al., 1994).

Nos últimos anos, foi demonstrado que dentre os vários neurotransmissores endógenos envolvidos nas reações nociceptivas, figuram os aminoácidos excitatórios, especialmente glutamato e aspartato, atuando em receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) e não-NMDA. Os receptores chamados de não-NMDA subdividem-se em metabotrópico, cainato e α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA). O mecanismo de transdução relacionado às respostas mediadas pela ativação dos receptores de aminoácido excitatórios já foi bastante estudado. NMDA, cainato e AMPA são acoplados a canais iônicos enquanto que os receptores metabotrópicos são acoplados à proteína G_s (NAKANISHI e MASU, 1994; DICKENSON, 1995; HUDSPITH, 1997). Estes receptores são de fundamental importância para a transmissão da dor aguda e crônica. A transmissão mediada pelas fibras C após estímulos breves, mecânicos ou térmicos, parece envolver somente a ativação de receptores

AMPA, enquanto que os receptores NMDA somente são ativados se o estímulo persistir ou sua frequência e/ou intensidade forem aumentadas.

Diversos trabalhos têm mostrado que existe uma intensa liberação de aminoácidos excitatórios na medula espinhal, principalmente glutamato e aspartato, após a injeção intraplantar de formalina (OMOTE et al., 1998; MALMBERG e YAKSH, 1995; TEOH et al., 1996), capsaicina (SAKURADA et al., 1996a; TEOH et al., 1996; JURÁNEK e LEMBECK, 1997) ou substância P (JURÁNEK, 1997 e LEMBECK). Outros estudos mostram que os aminoácidos excitatórios provocam um comportamento nociceptivo quando injetados local ou intratecalmente (AANONSEN, 1987; JACKSON, 1985; SAKURADA, 1996; ZHOU, 1996; LIU, 1997). Levando-se em consideração estes relatos e o fato de que os antagonistas de receptores NMDA e não-NMDA causam antinocicepção no modelo da formalina (MURRAY, 1991; NÄSSTRÖM, 1992), avaliamos o efeito da dipirona na nocicepção induzida pelo glutamato, injetado intraplantarmente, em camundongos. De acordo com as informações encontradas na literatura, a administração tópica de glutamato induziu um comportamento típico de nocicepção, semelhante ao provocado pela injeção intraplantar de formalina ou capsaicina. De forma dependente da dose e do tempo, o glutamato fez com que estes animais mantivessem a pata suspensa e próxima ao corpo, associada com despender tempo lambendo, agitando ou mordendo-a; sinais evidentes de desconforto. Além de provocar dor, a aplicação tópica de glutamato na pata de camundongos induziu também, de maneira dependente da dose, a formação de edema. Administrada através das vias sistêmica, tópica, espinhal e supraespinhal, a dipirona foi capaz de inibir¹⁷ esta nocicepção induzida pelo glutamato, o que fornece indícios sobre a possibilidade de seu mecanismo de ação estar relacionado pelo menos em parte com os aminoácidos excitatórios (seção 4.1.3).

¹⁷ 57 a 86% de inibição, conforme a via de administração

Também tem sido demonstrado que aminoácidos excitatórios, administrados intratecalmente, causam hiperalgesia térmica em ratos e camundongos (AANONSEN, 1987; FERREIRA, J., 1999) e quando administrados subcutaneamente NMDA, AMPA e cainato resultam em hiperalgesia mecânica e alodinia (ZHOU, 1996). Antagonistas de receptores NMDA e não-NMDA são efetivos em inibir as respostas hiperalgésicas e a alodinia induzida por diversos mediadores como a carragenina e o adjuvante completo de Freund (HALEY, 1992; REN, 1992 e 1996). Em baixas doses administradas por via intraperitoneal, intracerebroventricular ou intratecal, a dipirona diminuiu, de maneira dependente da dose, a hiperalgesia induzida pela injeção intratecal de glutamato em camundongos (seção 4.1.5). Estes resultados complementam os anteriores descritos na literatura (LORENZETTI, 1985; LOPEZ-MUÑOZ, 1994) e indicam que a dipirona, à semelhança da morfina, e diferente da maioria das DAINES, parece exercer um efeito direto sobre a transmissão dolorosa, como já sugerido por Carlsson e Jurna (1987), Neugebauer et al. (1994) e Tortorici e Vanegas (1993). Portanto, a possibilidade de um efeito modulatório da dipirona sobre a liberação e/ou ação dos aminoácidos excitatórios não pode ser descartada e necessita de uma investigação mais profunda.

Examinamos também se a antinocicepção causada pela dipirona poderia estar associada à inibição direta da ligação do [³H] glutamato em sítios de membranas de córtex cerebral de ratos e camundongos. Apesar da atividade antinociceptiva e anti-hiperalgésica apresentada pela dipirona administrada por via sistêmica, espinhal e supraespinhal quando avaliada em relação à nocicepção e hiperalgesia induzidas pelo glutamato, essa droga, somente em altas concentrações, inibiu parcialmente¹⁸ a ligação do glutamato a seus receptores em membranas corticais de ratos e camundongos (seção 4.4). Tais resultados sugerem que a atividade antinociceptiva da dipirona não parece estar associada

¹⁸ inibição de 37%

exclusivamente à inibição direta dos sítios de ligação do glutamato, e provavelmente está associada à modulação pré- ou pós-sináptica da liberação e/ou ação do glutamato.

A ativação de receptores NMDA e não-NMDA já foi associada à ativação da cascata do ácido araquidônico, provavelmente pela ativação de uma fosfolipase A_2 dependente de cálcio e da fosfolipase C (DUMUIS, 1988, 1990). Os aminoácidos excitatórios também já foram relacionados à hiperalgesia inflamatória observada em articulações, onde antagonistas de receptores NMDA e não-NMDA reduziram a dor mas não o edema relacionado ao processo inflamatório (LAWAND, 1997) e a maioria das DAINES é capaz de diminuir ambos sintomas. Tonussi e Ferreira, em 1992 demonstraram que a dipirona foi capaz de diminuir a sensibilidade dos nociceptores, induzida pela injeção intra-articular de carragenina, corroborando assim com os resultados obtidos neste estudo.

Neste estudo também mostramos que a antinocicepção causada pela dipirona não parece ser secundária a efeitos centrais depressores e/ou não específicos, pois mesmo em altas doses¹⁹ demonstrou ausência de efeitos como incapacitação ou incoordenação motora, que são detectáveis no teste do rota-rod (seção 4.1.6).

Outros estudos farmacológicos, envolvendo o uso de agonistas e antagonistas, foram desenvolvidos com o objetivo de fornecer novas evidências sobre o mecanismo através do qual a dipirona inibe a resposta álgica neurogênica e inflamatória induzida pela formalina. Os resultados demonstram que a ativação da via opióide sensível a naloxona não parece estar envolvida diretamente na antinocicepção causada pela dipirona (seção 4.2.1). Alguns compostos, como a morfina, exercem efeito analgésico por interagir com receptores opióides mimetizando a ação dos opióides endógenos sobre estes receptores. A naloxona, um antagonista não-seletivo de receptores opióides, em condições em que reverteu completamente a antinocicepção induzida pela morfina, não foi capaz de reverter a atividade antinociceptiva da dipirona.

Em relação ao mecanismo de transdução envolvido na antinocicepção causada pela dipirona, os resultados deste estudo demonstram pela primeira vez que esta droga, ao contrário da morfina, nas mesmas doses antinociceptivas, não parece interagir com a proteína G_i sensível ao pré-tratamento com toxina pertussis. O tratamento dos animais, através da via intracerebroventricular com uma dose de toxina pertussis que comprovadamente suprime o efeito antinociceptivo causado pela morfina através da ADP ribosilação (presente estudo; SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ, 1991; HERNANDEZ, 1995), não apresentou efeito significativo sobre a antinocicepção causada pela dipirona quando avaliada no teste da formalina (seção 4.2.3). Estes resultados indicam que a antinocicepção causada pela dipirona, ao contrário da morfina, não parece estar associada a mecanismos que envolvem receptores acoplados a proteína G sensível a toxina pertussis.

Oriundo principalmente dos interneurônios, o ácido γ -aminobutírico (GABA) tem um papel fundamental no controle da dor. Atuando em receptores $GABA_A$ (pós-sináptico) e $GABA_B$ (pré-sináptico) modula a transmissão aferente da informação nociceptiva principalmente através de mecanismos pré-sinápticos (HAMMOND, 1997). A antinocicepção causada pela dipirona parece ser independente de uma interação com receptores $GABA_B$. Estas conclusões estão baseadas no fato de que o faclofen, um antagonista seletivo de receptores $GABA_B$, reverte significativamente a antinocicepção induzida pelo baclofen (um agonista de receptores $GABA_B$) (MALCANGIO, 1991; VAZ, 1996). No entanto, quando avaliado no modelo da nocicepção induzida pela formalina, o tratamento dos animais com faclofen não interferiu na antinocicepção induzida pela dipirona (seção 4.2.4).

Sabe-se que a ativação de vias descendentes serotoninérgicas eferentes da medula espinhal contribui para a atividade analgésica da morfina e de opióides endógenos liberados pela estimulação elétrica de áreas como a substância cinzenta periaquedutal, o núcleo magno da rafe e outras estruturas da medula ventromedial (MILLAN, 1997). A atividade

¹⁹ doses maiores do que as que induziram atividade antinociceptiva em camundongos.

antinociceptiva da dipirona não parece estar relacionada à modulação que o sistema serotoninérgico exerce sobre a transmissão nociceptiva. O tratamento dos animais com cloridrato de DL-p-clorofenilalanina (PCPA), um inibidor da síntese de serotonina, na dose em que reverteu significativamente a antinocicepção induzida pela morfina, não causou alteração significativa da antinocicepção causada pela dipirona (seção 4.2.2). Este mesmo tratamento, porém, é capaz de antagonizar o efeito antinociceptivo de vários tipos de analgésicos como morfina e DAINES (presente estudo; TABER, 1981; VON VOIGTLANDER, 1984; VAZ, 1996; VITALE, 1998). No entanto, quando avaliado no modelo da nocicepção induzida pela formalina, o tratamento dos animais com PCPA não interfere com a antinocicepção induzida pela dipirona.

Diversos analgésicos opióides e não-opióides têm seus efeitos mediados pela abertura de canais de potássio sensíveis à variação da concentração intracelular de ATP (chamados canais K_{ATP}). Agonistas seletivos de α -adrenoceptores e opióides causam antinocicepção por abrirem canais de potássio em neurônios (OCAÑA, 1993). A ativação de canais de potássio sensíveis ao ATP parece não ter um papel importante no efeito antinociceptivo induzido pela dipirona no teste da formalina. O tratamento dos animais com glibenclamida, em condições em que essa droga reverteu o efeito antinociceptivo causado pela morfina, não foi capaz de reverter a antinocicepção causada pela dipirona quando avaliada em relação ao modelo da formalina (RAFFA, 1995; SHEWADE, 1995) (seção 4.2.6).

A ativação da óxido nítrico sintase e a conseqüente produção de óxido nítrico desencadeada pela ativação do receptor NMDA, parece estar envolvida em estados dolorosos (MAO, 1992; MELLER, 1993; DICKENSON, 1995; DRAY, 1995). Existem estudos mostrando que a dipirona reverte, de maneira dependente da dose, a hiperalgesia causada pela injeção subplantar de carragenina e de prostaglandina E_2 na pata de rato, por um mecanismo que parece ser modulado pela via da L-arginina - óxido nítrico (FERREIRA, 1993;

TONUSSI, 1994; LORENZETTI, 1996). Nossos resultados não reforçam esta possibilidade e demonstram que a antinocicepção causada pela dipirona em relação a nocicepção induzida pela formalina não parece envolver uma interação direta com o óxido nítrico ou com substâncias relacionadas ao óxido nítrico, já que o pré-tratamento dos animais com L-arginina, um precursor do óxido nítrico (substrato para a óxido nítrico sintase), em condições onde reverteu a antinocicepção causada pela N^G-nitro-L-arginina (um inibidor da óxido nítrico sintase) (SANTOS, 1995; VAZ, 1996), não interferiu na antinocicepção induzida pela dipirona (seção 4.2.5). Além disso, a dipirona, mesmo em altas concentrações *in vitro*, não apresentou efeito significativo sobre as óxido nítrico sintases constitutiva e induzida (seção 4.3). Outra discrepância entre nossos resultados e os descritos recentemente por Lorenzetti e Ferreira (1996), é que estes autores observaram a ausência de efeitos analgésicos centrais da dipirona quando esta foi testada em relação à hiperalgesia induzida pela prostaglandina E₂ em pata de rato. Em nosso estudo, a dipirona apresentou importante atividade antinociceptiva quando administrada espinhal e supraespinhalmente. Uma ação analgésica central da dipirona também foi sugerida por Carisson e colaboradores (1986) e Carisson e Jurna (1987) quando foi esta foi avaliada no teste de retirada da cauda. Isto sugere que, dependendo do modelo de nocicepção e/ou espécie de animal utilizado, a dipirona pode apresentar diferentes mecanismos de ação analgésica ou antihiperalgésica.

O efeito antinociceptivo causado por agonistas de receptores adrenérgicos α_1 e α_2 nos modelos da formalina e da capsaicina já foi amplamente descrito por Tasker et al. (1992), Bentley et al., (1983), Ueda et al., (1995) e outros. Os resultados aqui apresentados confirmam estes relatos e demonstram que a atividade antinociceptiva da dipirona não parece estar envolvida com a ativação de receptores α_1 e α_2 . Essa observação está baseada no fato de que o tratamento dos animais com um antagonista seletivo de adrenoceptores α_1 , prazosin, em condições em que reverteu o efeito antinociceptivo da fenilefrina (agonista

seletivo de adrenocetores α_1), não causou alteração relevante sobre o efeito antinociceptivo da dipirona no modelo da formalina. Da mesma maneira, o antagonista seletivo de adrenocetores α_2 , ioimbina, não interferiu com a atividade antinociceptiva da dipirona, em condições em que antagonizou completamente o efeito antinociceptivo da clonidina (seção 4.2.8).

Flower e colaboradores (1986) observaram que a resposta inflamatória induzida pela carragenina é reduzida em ratos adrenalectomizados, em relação aos “falso-operados”, quando compararam a exsudação e a migração celular. A quantidade de eicosanóides, tromboxanos e leucotrienos produzida pela ativação das fosfolipases nos exsudatos inflamatórios também diminuiu significativamente. A antinocicepção induzida pela dipirona não parece ser modulada por hormônios secretados pelas glândulas suprenais, como indicado pelo fato de que o mesmo efeito antinociceptivo foi observado em animais adrenalectomizados e “falso-operados” (seção 4.2.7).

Com base em estudos comportamentais e eletrofisiológicos, sabe-se que os receptores de aminoácidos excitatórios estão implicados na modulação da hiperalgisia térmica e na nocicepção após lesão nervosa. Dessa maneira, antagonistas seletivos desses receptores revelam-se analgésicos potentes, embora alguns causem disfunções motoras em animais (MAO, 1992; EISENBERG, 1993; CODERRE, 1994; FERREIRA, 1994). Os resultados aqui apresentados demonstram, pela primeira vez, que a antinocicepção induzida pela dipirona pode envolver, pelo menos em parte, sua habilidade em interagir com os aminoácidos excitatórios. Esta interação é demonstrada pelo fato de que a dipirona causou inibição dependente da dose na hiperalgisia induzida pela injeção intratecal de glutamato, quando a mesma foi administrada por via sistêmica, espinhal e supraespinhal em camundongos. Igualmente ao efeito observado nos modelos de nocicepção induzida pela formalina e pela capsaicina, a dipirona causou antinocicepção quando avaliada em relação à

dor induzida pela injeção intraplantar de glutamato na pata de camundongos. A antinocicepção, como descrita nos outros testes de dor e de hiperaiglesia realizados, foi observada em todas as vias de administração testadas. É interessante mencionar que a dipirona, exceto quando administrada por via intracerebroventricular, foi cerca de 14 a 45 vezes mais potente em reverter o efeito hiperalgésico causado pela injeção intratecal de glutamato, do que para apresentar atividade antinociceptiva nos modelos de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina, capsaicina e do próprio glutamato, quando injetado na pata de camundongos. Tais resultados sugerem um efeito preferencial da dipirona sobre as ações hiperalgésicas dos aminoácidos excitatórios. Recentemente, Liu e colaboradores (1997) relataram que a injeção intratecal de NMDA causa nocicepção e a liberação de substância P de fibras sensitivas primárias de pequeno diâmetro. Estes efeitos do NMDA também estão associados à internalização dos receptores para a substância P nos neurônios do corno dorsal e alterações em sua estrutura (LIU, 1997). Todos estes efeitos provocados pela injeção intratecal de NMDA foram antagonizados pelo tratamento com antagonistas seletivos de receptores NMDA ou receptores do subtipo NK₁, bem como pelo tratamento neonatal dos animais com capsaicina. Estes e outros dados descritos na literatura (DOUGHERTY, 1991; RUSIN, 1993) demonstram uma complexa interação entre os aminoácidos excitatórios e o sistema taquicininérgico.

Em resumo, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a dipirona produziu antinocicepção quando administrada por via sistêmica, espinal e supraespinal de maneira dependente da dose, quando avaliada em relação a nocicepção induzida pela formalina, capsaicina e glutamato, bem como na hiperalgesia induzida pela injeção intratecal de glutamato em camundongos. O mecanismo preciso através do qual a dipirona exerce seu efeito antinociceptivo não está ainda completamente esclarecido, mas não parece estar associado à sua interação com os receptores GABA_B, opióides, sistema serotoninérgico e

adrenérgico, interação com canais de potássio sensíveis ao ATP, via L-arginina - óxido nítrico, participação da proteína G sensível à toxina pertussis ou modulação por hormônios secretados pela glândula suprarrenal. No entanto, a atividade antinociceptiva da dipirona parece estar relacionada, pelo menos em parte, a sua capacidade de modular a liberação e/ou ação dos aminoácidos excitatórios na medula espinhal. Finalmente, uma interação parcial da dipirona com a ligação do glutamato a seus receptores também pode colaborar, pelo menos em parte, para sua ação antinociceptiva.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AANONSEN, L.M.; WILCOX, G.L. Nociceptive action of excitatory amino acids in the mouse: effects of spinally administered opioids, phencyclidine and *sigma* agonists. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 243, n. 1, p. 9-19, 1987.
- ABBATE, R.; GORI, A.M.; PINTO, S.; ATTANASIO, M.; PANICCIA, R.; COPPO, M.; CASTELLANI, S.; GIUSTI, B.; BODDI, M.; NER SERNERI, G.G. Cyclooxygenase and lipoxygenase metabolite synthesis by polymorphonuclear neutrophils: in vitro effect of dipyron. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 41, n. 2, p. 89-93, 1990.
- AKMAN, H.; AKSU, F.; GÜLTEKIN, I.; ÖZBEK, H.; ORAL, U.; DORAN, F.; BAYSAL, F. A possible central antinociceptive effect of dipyron in mice. **Pharmacology**, v. 53, p. 71-78, 1996.
- APPLETON, I. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and pain. In: DICKENSON, A.; BESSON, J.-M. **The pharmacology of pain**, Germany : Springer, p. 43-54, 1997.
- ARELLANO, F.; SACRISTAN, J.A. Metamizole: reassessment of its therapeutic role. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 38 , n. 6, p. 617-619, 1990.
- BABEJ-DOLLE, R.; FREYTAG, S.; ECKMEYER, J.; ZERLE, G.; SCHINZEL, S.; SCHMEIDER, G.; STANKOV, G. Parenteral dipyron versus diclofenac and placebo in patients with acute lumbago or sciatic pain: randomized observer-blind multicenter study. **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 32 , n. 4, p. 204-209, 1994.
- BENTLEY, G.A.; NEWTON, S.H.; STARR, J. Studies on the antinociceptive action of alpha-agonist drugs and their interactions with opioid mechanisms. **Br. J. Pharmacol.**, v. 79, p. 125-134, 1983.
- BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 87, p. 682-685, 1990.
- CARLSSON, K.H.; HELMREICH, J.; JURNA, I. Activation of inhibition from the periaqueductal grey matter mediates central analgesic effect of metamizol (dipyron). **Pain**, v. 27 , n. 3, p. 373-390, 1986.
- CARLSSON, K.H.; JURNA, I. The role of descending inhibition in the antinociceptive effects of the pyrazolone derivatives, metamizol (dipyron) and aminophenazone ("Pyramidon"). **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 335 , n. 2, p. 154-159, 1987.
- CARLSSON, K.H.; MONZEL, W.; JURNA, I. Depression by morphine and the non-opioid analgesic agents, metamizol (dipyron), lysine acetylsalicylate, and paracetamol, of activity in rat thalamus neurones evoked by electrical stimulation of nociceptive afferents. **Pain**, v. 32 , n. 3, p. 313-326, 1988.
- CASHMAN, J.N. The mechanisms od action of NSAIDS in analgesia. **Drugs**, v. 52 , n. 5, p. 13-23, 1996.

- CATERINA M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p. 816-824, 1997.
- CHAMBERS, J.P.; WATERMAN, A.E.; LIVINGSTON, A. The effects of opioid and alpha 2 adrenergic blockade on non-steroidal anti-inflammatory drug analgesia in sheep. **J. Vet. Pharmacol. Ther.**, v. 18, n. 3, p. 161-166, 1995.
- CODERRE, T.J.; MELZACK, R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. **J. Neurosci.**, v. 12, p. 3665-3670, 1992.
- CODERRE, T.J.; VAN EMPEL, I. The utility of excitatory amino acid (EAA) antagonists as analgesic agents. II. Assessment of the antinociceptive activity of combinations of competitive and non-competitive NMDA antagonists with agents acting at allosteric glycine and polyamine receptor sites. **Pain**, v. 59, n. 353-359, 1994.
- CORRÊA, C.R.; CALIXTO, J.B. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 193-198, 1993.
- CORRÊA, C.R.; KYLE, D.J.; CHAKRAVARTY, S.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive profile of the pseudopeptide B2 bradykinin receptor antagonist NPC 18688 in mice. **Br. J. Pharmacol.**, v. 117, p. 552-558, 1996.
- D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.L. A method for determining loss of pain sensation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 72, p. 74-79, 1941.
- DE CAMPOS, D.I.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. A new mechanism of action of dipyrrone: blockade of the release of a nociceptive factor from macrophages. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 21, n. 3, p. 565-568, 1988.
- DE WITT, D.L.; MEADE, E.A. Serum and glucocorticoid regulation of gene transcription and expression of the prostaglandin H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2 isozymes. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 306, n. 1, p. 94-102, 1993.
- DICIONÁRIO de especialidades farmacêuticas. Rio de Janeiro : Publicações Científicas, 27 ed., 1998/1999.
- DICKENSON, A.H. Central acute pain mechanisms. **Ann. Med.**, v. 27, p. 223-227, 1995.
- DORETTO, M.C.; GARCIA-CAIRASCO, N.; PIMENTA, N.J.G.; SOUZA, D.A.; TATSUO, M.A.K.F. Dipyrrone, a novel anticonvulsant agent? Insights from three experimental epilepsy models. **Neuroreport**, v. 9, p. 2415-2421, 1998.
- DOUGHERTY, P.M.; WILLIS, W.D. Enhancement of spinothalamic neuron responses to chemical and mechanical stimuli following combined micro-iontophoretic application of N-methyl-D-aspartic acid and substance P. **Pain**, v. 47, p. 85-93, 1991.
- DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.**, v. 75, p. 125-131, 1995.

- DUARTE, I.D.; SANTOS, I.R.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 217, p. 225-227, 1992.
- 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.
- DUMUIS, A.; SEBBEN, M.; HAYNES, L.; PIN, J.P.; BOCKAERT, J. NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. **Nature**, v. 336, p. 68-70, 1988.
- DUMUIS, A.; PIN, J.P.; OOMAGARI, M.S.; SEBBEN, M.; BOCKAERT, J. Arachidonic acid release from striatal neurons by joint stimulation of ionotropic and metabotropic quisqualate receptors. **Nature**, v. 347, p. 182-184, 1990
- EDDY, N.B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 107, p. 385-393, 1953.
- EISENBERG, E.; VOS B.P.; STRASSMAN, A.M. The NMDA antagonist memantine blocks pain behavior in a rat model of formalin-induced facial pain. **Pain**, v. 54, p. 301-307, 1993.
- FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. **Neuropharmacology**, 1999 (no prelo).
- FERREIRA, S.H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nature**, v. 240, p. 200-203, 1972.
- FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; CORREA, F.M.A. Central and peripheral antialgic action of aspirin-like drugs. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 53, p. 39-48, 1978.
- 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. Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. **Neuropharmacology**, v. 33, p. 1479-1485, 1994.
- FLOWER, R.J.; PARENTE, L.; PERISCO, P.; SALMON, J.A. A comparison of the acute inflammatory response in adrenalectomised and sham-operated rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 87, n. 1, p. 57-62, 1986.
- FU, J.Y.; MASFERRER, J.L.; SEIBERT, K.; RAZ, A.; NEEDLEMAN, P. The induction and supression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 16737-16740, 1990.
- GLADTKE, E. Use of antipyretic analgesics in the pediatric patient. **Am. J. Med.**, v. 75, n. 5A, p. 121-126, 1983.

- GRANADOS-SOTO, V.; FLORES-MURRIETA, F.J.; CASTANEDA-HERNANDEZ, G.; LOPEZ-MUNOZ, F.J. Evidence for the involvement of nitric oxide in the antinociceptive effect of ketorolac. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 277, n. 2-3, p. 281-284, 1995.
- HALEY, J.E.; WILCOX, G.L. Involvement of excitatory amino acids and peptides in the spinal mechanisms underlying hyperalgesia. In: **Hyperalgesia and Allodynia**, Raven Press, New York, p. 287-349, 1992.
- HAMMOND, D.L. Inhibitory neurotransmitters and nociception: role of GABA and glycine. In: **The pharmacology of pain**, Springer Verlag, Germany, p. 361-377, 1997.
- HERNANDEZ, A.; SOTO-MOYANO, R.; MESTRE, C.; ESCHALIER, A.; PELISSIER, T.; PAEILE, C.; CONTRERAS, E. Intrathecal pertussis toxin but not cyclic AMP blocks kappa opioid-induced antinociception in rat. **Int. J. Neurosci.**, v. 81, p. 193-197, 1995.
- HUDSPITH, M.J. Glutamate: a role in normal brain function, anaesthesia, analgesia and CNS injury. **Br. J. Anaesth.**, v. 78, p. 731-747, 1997.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, H. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.
- HYLDEN, J.K.L.; WILCOX, G.L. Intrathecal morphine in mice: A new technique. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 67, p. 313-316, 1980.
- IADAROLA, M.J.; CAUDLE, R.M. Good pain, bad pain. **Science**, v. 278, p. 239-240, 1997.
- INSEL, P.A. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: HARDMANN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **Goodman & Gilman's - The pharmacological basis of therapeutics**. 9. ed., New York : McGraw-Hill, p. 617-657, 1996.
- JACKSON, D.L.; GRAFF, C.B.; RICHARDSON, J.D.; HARGREAVES, K.M. Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 284, p. 321-325, 1995.
- JONES, S.L. Dipyrone into the nucleus raphe magnus inhibits the rat nociceptive tail-flick reflex. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 318, p. 37-40, 1996.
- JURÁNEK, I.; LEMBECK, F. Afferent C-fibres release substance P and glutamate. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 75, p. 661-664, 1997.
- KEWITZ, H. Rare but serious risks associated with non-narcotic analgesics: clinical experience. **Med. Toxicol.**, v. 1, n. 1, p. 86-92, 1986.
- KNOWLES, R.G.; PALACIOS, M.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. Kinetic characteristics of nitric synthase from rat brain. **Biochem. J.**, v. 269, p. 207-210, 1990.
- KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J.H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1976.

- KUJUBU, D.A.; FLETCHER, B.S.; VARNUM, B.C.; LIM, R.W.; HERSCHMAN, H.R. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 12866-12872, 1991.
- LARREGINA, A.; AGGIO, M.C.; ALVAREZ, R.V. Incidence and probable etiology of toxic agranulocytosis in a definite population in the province of Buenos Aires (1963-1976). **Medicina (B Aires)**, v. 54, n. 1, p. 13-16, 1994.
- LAURSEN, S.E.; BELKNAP, J.K. Intracerebroventricular injections in mice: Some methodological refinements. **J. Pharmacol. Methods**, v. 16, p. 355-357, 1986.
- LAWAND, N.B.; WILLIS, W.D.; WESTLUND, K.N. Excitatory amino acid receptor involvement in peripheral nociceptive transmission in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 324, p. 169-177, 1997.
- LIU, H.; MANTYH, P.W.; BASBAUM, A.I. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. **Nature**, v. 386, p. 721-724, 1997.
- LÓPEZ-MUÑOZ, F.J.; VILLALÓN, C.M.; TERRÓN, J.A.; SALAZAR, L.A. Analgesic interactions produced by dipyron and either morphine or D-propoxyphene in the pain-induced functional impairment model in rat. **Drug Dev. Res.**, v. 32, p. 50-57, 1994.
- LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Mode of analgesic action of dipyron: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 114, p. 375-381, 1985.
- LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyron-induced spinal and peripheral analgesia. **Inflamm. Res.**, v. 45, n. 6, p. 308-311, 1996.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MACHALETT, H. Case report on an anaphylactic shock following intravenous administration of analgin (sodium noraminophenazonesulfonate) with fatal outcome. **Z. Arztl. Fortbild. (Jena)**, v. 72, n. 6, p. 280-282, 1978.
- MALCANGIO, M.; GHELARDINI, C.; GIOTTI, A.; MALMBERG-AIELLO, P.; BARTOLINI, A. CGP 35348, a new GABAB antagonist, prevents antinociception and muscle-relaxant effect by baclofen. **Br. J. Pharmacol.**, v. 103, p. 1303-1308, 1991.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Antinociceptive actions of nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 263, p. 136-146, 1992.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E2 using microdialysis in conscious rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 114, p. 1069-1075, 1995.

- MAO, J.; PRICE, D.D.; HAYES, R.L.; LU, J.; MAYER, D.J. Differential roles of NMDA and non-NMDA receptor activation in induction and maintenance of thermal hyperalgesia in rats with painful peripheral mononeuropathy. **Brain Res.**, v. 598, p. 271-278, 1992.
- MARQUEZ, J.O.; FERREIRA, S.H. Regional dipyrone nociceptor blockade: a pilot study. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 20, n. 3-4, p. 441-444, 1987.
- MASFERRER, J.L.; ZWEIFEL, B.S.; SEIBERT, S.; NEEDLEMAN, P. Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. **J. Clin. Invest.**, v. 86, p. 1375-1379, 1990.
- MELLER, S.T.; PECHMAN, P.S.; GEBHART, G.F.; MAVES, T.J. Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat. **Neuroscience**, v. 50, n. 1, p. 7-10, 1992.
- MELLER, S.T.; GEBHART, G.F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain**, v. 52, p. 127-136, 1993.
- MILLAN, M.J. The role of descending noradrenergic and serotonergic pathways in the modulation of nociception: focus on receptor multiplicity. In: DICKENSON, A.; BESSON, J.-M. **The pharmacology of pain**. Germany : Springer, p. 385-421, 1997.
- MIYAMOTO, T.; OGINO, N.; YAMAMOTO, S.; HAYAISHI, O. Purification of prostaglandin endoperoxid synthetase from bovine vesicular gland microsomes. **J. Biol. Chem.**, v. 251, p. 2629-2636, 1976.
- MOORE, P.K.; OLUYOMI, A.O.; BABBEDGE, R.C.; WALLACE, P.; HART, S.L. L-N^G-nitroarginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, v. 102, p. 198-202, 1991.
- MURRAY, C.W.; COWAN, A.; LARSON, A.A. Tachykinin and NMDA antagonists (but not a kainic acid antagonist) are antinociceptive in the mouse formalin model. **Pain**, v. 44, p. 179-185, 1991.
- NAKANISHI, S.; MASU, M. Molecular diversity and functions of glutamate receptors. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 23, p. 319-348, 1994.
- NÄSSTRÖM, J.; KARLSSON, U.; POST, C. Antinociceptive actions of different classes of excitatory amino acid receptor antagonist in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 212, p. 21-29, 1992.
- NEUGEBAUER, V.; SCHAIBLE, H.G.; HE, X.; LÜCKE, T.; GÜNDLING, P.; SCHMIDT, R.F. Electrophysiological evidence for a spinal antinociceptive action of dipyrone. **Agents Actions**, v. 41, p. 62-70, 1994.
- NEEDLEMAN, P.; ISAKSON, P.C. The discovery and function of COX-2. **J. Rheumatol.**, v. 24, n. 49, p. 6-8, 1997.
- OCAÑA, M.; BAEYENS, J.M. Differential effects of K⁺ channel blockers on antinociception induced by α 2-adrenoceptor, GABAB and κ -opioid receptor agonist. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 1049-1054, 1993.

- OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; KAWAMATA, M.; NAMIKI, A. Formalin-induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw. **Brain Res.**, v. 787, n. 1, p. 161-164, 1998.
- PLANAS, M.E.; GAY-ESCODA, C.; BAGAN, J.V.; SANTAMARIA, J.; PENARROCHA, M.; DONADO, M.; PURTA, J.L.; GARCIA-MAGAZ, I.; RUIZ, J.; ORTIZ, P. Oral metamizol (1 g and 2 g) versus ibuprofen and placebo in the treatment of lower third molar surgery pain: randomised double-blind multi-centre study. Cooperative Study Group. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 53, n. 6, p. 405-409, 1998.
- RAFFA, R.B.; MARTINEZ, R.P. The 'glibenclamide-shift' of centrally-acting antinociceptive agents in mice. **Brain Res.**, v. 677, p. 277-282, 1995.
- REN, K.; WILLIAMS, G.M.; HYLDEN, J.L.K.; RUDA, M.A.; DUBNER, R. The intrathecal administration of excitatory amino acid receptor antagonist selectively attenuated carrageenan-induced behavioral hyperalgesia in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 219, p. 235-243, 1992.
- REN, K.; IADAROLA, M.J.; DUBNER, R. An isobolographic analysis of the effects of N-methyl-D-aspartate and NK₁ neurokinin receptor antagonist on inflammatory hyperalgesia in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 117, p. 196-202, 1996.
- ROSLAND, J.H.; HUNSKAAR, S.; HOLE, K. Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently in mice. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 66, p. 382-386, 1990.
- RUSIN, K.I.; BLEAKMAN, D.; CHARD, P.S.; RANDIC, M.; MILLER, R.J. Tachykinins potentiate N-methyl-D-aspartate responses in acutely isolated neurons from the dorsal horn. **J. Neurochem.**, v. 60, p. 952-960, 1993.
- SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacology**, v. 31, n. 12, p.: 1279-1285, 1992.
- SAKURADA, T.; SUGIYAMA, A.; SAKURADA, C.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K.; HARA, A.; ABIKO, Y. Involvement of nitric oxide spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. **Neurochem. Int.**, v. 29, n. 3, p. 271-278, 1996a.
- SAKURADA, T.; SUGIYAMA, A.; SAKURADA, C.; TAN-NO, K.; YONEZAWA, A.; SAKURADA, S.; KISARA, K. Effect of nitric oxide inhibition on capsaicin-induced nociceptive response. **Life Sci.**, v. 59, n. 11, p. 921-930, 1996b.
- SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ, P.; GARZÓN, J. Cholera toxin and pertussis toxin an opioid- and - α 2-mediated supraspinal analgesia in mice. **Life Sci.**, v. 48, p. 1721-1727, 1991.
- SANTOS, A.R.S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Analysis of the mechanisms underlying the antinociceptive effect of the extracts of plants from the genus *Phyllanthus*. **Gen. Pharmacol.**, v. 26, p. 1499-1506, 1995.
- SANTOS, A.R.S.; VEDANA, E.M.; DE FREITAS, G.A. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflamm. Res.**, v. 47, n. 7, p. 302-307, 1998.

- SHEWADE, D.G.; RAMASWAMY, S. Prolactin-induced analgesia is dependent on ATP-sensitive potassium channels. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 22, p. 635-636, 1995.
- SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347-352, 1989.
- SHIMADA, S.G.; OTTERNESS, I.G.; STITT, J.T. A study of the mechanism of action of the mild analgesic dipyrone. **Agents Actions**, v. 41, p. 188-192, 1994.
- SIMMONS, D.L.; XIE, W.; CHIPMAN, J.G.; EVETT, G.E. Multiple cyclooxygenases: cloning of a mitogen-inducible form. In: BAILEY, J.M. **Prostaglandins, leukotrienes, lipoxins and PAF**. Plenum : New York, p. 324-451, 1991.
- SMITH, W.L.; REGIER, M.K.; MORITA, I.; SCHINDLER, M.; DE WITT, D.L.; LANEUVILLE, O.; LECOMTE, M.; BHATTACHARYYA, D.; OTTO, J.C. Structure, function and regulation of PGH synthase isozymes. Proceedings of the 9th International Conference on Prostaglandins and Related Compounds, Florence, 1994.
- SOLOMON, L.M.; JUHLIN, L.; KIRCHENBAUM, M.B. Prostaglandins on cutaneous vasculature. **J. Invest. Derm.**, v. 51, p. 280-282, 1968.
- SOUZA, D.O.; RAMÍREZ, G. Effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase in chick optic tectum and cerebellum. **J. Mol. Neurosci.**, v. 3, p. 39-45, 1991.
- STEFFEN, P.; DRDUCK, A.; KRINN, E.; MOLLER, A.; GEORGIEFF, M.; SEELING, W. Differential indications of non-opioid drugs for postoperative analgesia II. Quantification of the analgesic effect of a combination of metamizol plus diclofenac via patient-controlled analgesia. **Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther**, v. 31, n. 4, p. 216-221, 1996a.
- STEFFEN, P.; SCHUHMACHER, I.; WEICHEL, T.; GEORGIEFF, M.; SEELING, W. Differential administration of non-opioids in postoperative analgesia, I. Quantification of the analgesic effect of metamizole using patient-controlled analgesia. **Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther**, v. 31, n. 3, p. 143-147, 1996b.
- STEFFEN, P.; SEELING, W.; REISER, A.; ROCKEMANN, M.; GEORGIEFF, M. Differential indications for non-opioids for postoperative analgesia III. Analgesic effect of perioperative administration of metamizole plus diclofenac after spinal anesthesia. **Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther**, v. 32, n. 8, p. 496-501, 1997.
- TABER, R.I.; LANTRANYI, A.V. Antagonism of the analgesic effect of opioid and non-opioid agents by p-chlorophenylalanine (PCPA). **Eur. J. Pharmacol.**, v. 75, p. 215-222, 1981.
- TASKER, R.A.R.; CONNELL, B.J.; YOLE, M.J. Systemic injections of alpha-1 adrenergic agonists produce antinociception in the formalin test. **Pain**, v. 49, p. 383-391, 1992.
- TATSUO, M.A.; CARVALHO, W.M.; SILVA, C.V.; MIRANDA, A.E.; FERREIRA, S.H.; FRANCISCHI, J.N. Analgesic and antiinflammatory effects of dipyrone in rat adjuvant arthritis model. **Inflammation**, v. 18, n. 4, p. 399-405, 1994.

- TAYLOR, J.; MELLSTROM, B.; FERNAUD, I.; NARANJO, J.R. Metamizol potentiates morphine effects on visceral pain and evoked c-Fos immunoreactivity in spinal cord. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 351, n. 1, p. 39-47, 1998.
- TEMPEL, G.; VON HUNDELSHAUSEN, B.; REEKER, W. The opiate-sparing effect of dipyron in post-operative pain therapy with morphine using a patient-controlled analgesic system. **Intensive Care Med.**, v. 22, n. 10, p. 1043-1047, 1996.
- TEOH, H.; MALCANGIO, M.; FOWLER, L.J.; BOWERY, N.G. Evidence for release of glutamic acid, aspartic acid and substance P but not g-aminobutyric acid from primary afferent fibres in rat spinal cord. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 302, p. 27-36, 1996.
- TONUSSI, C.R.; FERREIRA, S.H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, v. 48, p. 421-427, 1992.
- TONUSSI, C.R.; FERREIRA, S.H. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 251, p. 173-179, 1994.
- TORTORICI, V.; VANEGAS, H. Putative role of medullary off- and on- cells in the antinociception produced by dipyron (metamizol) administered systemically or microinjected into PAG. **Pain**, v. 57, p. 197-205, 1994.
- TORTORICI, V.; VÁSQUEZ, E.; VANEGAS, H. Naloxone partial reversal of the antinociception produced by dipyron microinjected into the periaqueductal gray of rats. Possible involvement of medullary off- and on- cells. **Brain Res.**, v. 725, p. 106-110, 1996.
- UEDA, M.; OYAMA, T.; KURASHI, Y.; AKAIKE, A.; SATOH, M. Alpha2-adrenoceptor-mediated inhibition of capsaicin-evoked release of glutamate from rat spinal dorsal horn slices. **Neurosci. Lett.**, v. 188, p. 137-139, 1995.
- VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature**, v. 231, p. 232-235, 1971.
- VANE, J.R.; BOTTING, R.M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Inflamm. Res.**, v. 44, p. 1-10, 1995.
- VANE, J.R.; BOTTING, R.M. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **Scand. J. Rheumatol.**, v. 25, n. 102, p. 9-21, 1996.
- VANEGAS, H.; TORTORICI, V.; EBLEN-ZAJJUR, A.; VÁSQUEZ, E. PAG-microinjected dipyron (metamizol) inhibits responses of spinal dorsal horn neurons to natural noxious stimulation in rats. **Brain Res.**, v. 759, n. 1, p. 171-174, 1997.
- VAZ, Z.R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. C. Antinociceptive action of 2-(4-Bromobenzoyl)-3-Methyl-4,6-Dimethoxy Benzofuran, a novel Xanthoxylene derivative on chemical and thermal models of nociception in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 278, p. 304-312, 1996.
- VITALE, G.; PINI, L.A.; OTTANI, A.; SANDRINI, M. Effect of acetylsalicylic acid on formalin test and on serotonin system in the rat brain. **Gen. Pharmacol.**, v. 31, p. 753-758, 1998.

- VLASKOVSKA, M.; SURCHEVA, S.; OVCHAROV, R. Importance of endogenous opioids and prostaglandins in the action of analgin (metamizole) and verapamil. **Farmakol. Toksikol.**, v. 52, n. 3, p. 25-9, 1989.
- VON VOIGTLANDER, P.F.; LEWIS, R.A.; NEFF, G.L. Kappa opioid analgesia is dependent on serotonergic mechanisms. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 231, p. 270-274, 1984.
- XIE, W.; CHAPMAN, J.G.; ROBERTSON, D.L. et al. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 2692-2696, 1991.
- XU, X.-M.; HAJIBEIJE, A.; TAZAWA, D. LOOSE-MITCHEL, D.; WANG, L.-H.; WU, K.K. Characterization of human prostaglandin H synthase genes. **Adv. Prost. Thromb. Leukoc. Res.**, v. 23, p. 105-107, 1995.
- ZHOU, S.; BONASSERA, L.; CARLTON, S.M. Peripheral administration of NMDA, AMPA or KA results in pain behaviors in rats. **Neuroreport**, v. 7, p. 895-900, 1996.
- WANG, L.-H.; HAJIBEIGE, A.; XU, X.-M.; LOOSE-MITCHELL, D.; WU, K.K. Characterization of the promoter of human prostaglandin H synthase-1 gene. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 190, n. 2, p. 406-411, 1993.
- WILLIAMS, T.J.; PECK, M.J. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. **Nature**, v. 270, p. 530-532, 1977.
- WOLFF, D.J.; DATTO, G.A. Identification and characterization of a calmodulin-dependent nitric oxide synthase from GH3 pituitary cells. **Biochem. J.**, v. 285, p. 201-205, 1992.
- YAMAMOTO, T.; YAKSH, T.L. Comparison of the antinociceptive effects of pre- and post-treatment with intrathecal morphine and MK-801, a NMDA antagonist, on the formalin test in the rat. **Anesthesiology**, v. 77, p. 757-763, 1992a.
- YAMAMOTO, T.; YAKSH, T.L. Spinal pharmacology of thermal hyperesthesia induced by constriction injury of sciatic nerve. II. Excitatory amino acid antagonists. **Pain**, v. 49, p. 121-128, 1992b.
- YAMAMOTO, T.; SHIMOYAMA, N; MIZUGUCHI, T. Nitric oxide synthase inhibitor blocks spinal sensitization induced by formalin injection into the rat paw. **Anesth. Anal.**, v. 77, p. 886-890, 1993.

SUMMARY

1 – This study was aimed at investigating further the mechanisms involved in the antinociception caused by dipyron, given by intraperitoneal (i.p.), intraplantar (i.pl.), intrathecal (i.t.) or intracerebroventricular (i.c.v.) routes in various models of chemical and thermal nociception in mice. We also assessed, by use of neurochemical procedures, whether dipyron can affect constitutive and induced nitric oxide synthase activity or glutamate receptor binding.

2 – Dipyron (90.0 – 720.0 $\mu\text{mol/kg}$, i.p.), caused significant dose-related inhibition of both phases of formalin-induced nociception (2.5%/20 μL). The calculated mean ID_{50} values for effects were 154.5 and 263.7 $\mu\text{mol/kg}$, respectively. When co-injected locally in association with formalin, dipyron (0.1 – 30.0 $\mu\text{mol/paw}$) also produced dose-related inhibition of both phases of nociceptive responses on the formalin test, its effect being more potent (about 2-fold) and more efficacious against the second phase. The calculated mean ID_{50} values were 2.6 and 1.2 $\mu\text{mol/paw}$, respectively. Given either by i.c.v. (0.09 – 1.8 $\mu\text{mol/site}$) or i.t. routes (0.3 – 3.0 $\mu\text{mol/site}$), dipyron produced dose-dependent and equipotent inhibition of both phases of the formalin-induced licking. The calculated mean ID_{50} values for these effects were 0.4 and 1.3 $\mu\text{mol/site}$ against the first phase and 0.4 and 0.9 $\mu\text{mol/site}$ against the second phase of the formalin response, respectively. However, independent of the route of administration used, dipyron had no significant effect on the paw oedema associated with the inflammatory phase of the formalin test.

3 – Dipyron, given i.p. (30.0 – 360.0 $\mu\text{mol/kg}$), i.pl. (0.1 – 30.0 $\mu\text{mol/paw}$), i.t. (0.3 – 3.0 $\mu\text{mol/site}$) or i.c.v. (0.09 – 1.8 $\mu\text{mol/site}$), significantly and dose-dependently inhibited capsaicin-induced nociception (1.6 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$). The calculated mean ID_{50} values for these effects were: 207.6 $\mu\text{mol/kg}$, 2.2 $\mu\text{mol/paw}$, 0.4 $\mu\text{mol/site}$ and 0.14 $\mu\text{mol/site}$, respectively.

4 - The i.pl. injection of glutamate (0.3 - 60.0 $\mu\text{mol/paw}$) elicited a dose-dependent noxious stimulus in mice, characterised by behaviour of licking, shaking, biting or elevating the injected paw. The nociceptive response induced by i.pl. injection of glutamate was well evident in the first 15 min, decreasing between 15 - 30 min and was almost absent 30 - 40 min later. The mean ED_{50} for these effects (calculated between 0 - 15 min) were 2.6 $\mu\text{mol/paw}$. The maximal licking response (84.8 ± 13.2 s) was observed at a concentration of 30 $\mu\text{mol/paw}$ of glutamate. The maximal nociceptive behaviour remained 15 min after the glutamate injection, and this time was used in subsequent tests. Furthermore, i.pl. injection of glutamate also caused a dose-related increase in paw volume, with a mean ED_{50} value of 0.5 $\mu\text{mol/paw}$ and the maximal oedema formation of 70.5 ± 3.9 mg at a concentration of 10 $\mu\text{mol/paw}$.

5 - Dipyron, when administered by i.p. (90.0 - 540.0 $\mu\text{mol/kg}$), i.pl. (1.0 - 30 $\mu\text{mol/paw}$), i.t. (0.3 - 3.0 $\mu\text{mol/site}$) or i.c.v. (0.1 - 1.8 $\mu\text{mol/site}$) routes dose-dependently prevented glutamate-induced nociception (30.0 $\mu\text{mol/paw}$, i.pl.). The estimated mean ID_{50} values obtained for these effects were: 118.6 $\mu\text{mol/kg}$, 6.3 $\mu\text{mol/paw}$, 1.2 $\mu\text{mol/site}$ and 0.3 $\mu\text{mol/site}$, respectively. Independent of the route of administration used, dipyron failed in reducing significantly the paw oedema caused by the i.pl. glutamate-injection.

6 – Dipyron (0.3 – 1.2 mmol/kg, i.p.), given 30 min prior, caused a significant increase of the latency response in both the hot-plate and tail-flick assays. Under similar conditions, morphine

(26.6 $\mu\text{mol/kg}$, s.c.), used as reference drug and given 30 min before, caused significant and marked antinociceptive effects in both models.

7 - Dipyron, given i.p. (3.0 – 30.0 $\mu\text{mol/kg}$), i.c.v. (30.0 – 300.0 nmol/site) or i.t. (9.0 – 90.0 nmol/site), dose-dependently inhibited glutamate-induced hyperalgesia (100 nmol/site, i.t.). The calculated mean ID_{50} values (estimated at 5 min) were: 9.0 $\mu\text{mol/kg}$, 93.9 nmol/site and 28.7 nmol/site, respectively.

8 – The antinociceptive action caused by dipyron was not influenced by naloxone, L-arginine, phaclofen, glibenclamide, DL-p-chlorophenylalanine hydrochloride, pertussis toxin, or by adrenalectomy, when assessed against the formalin assay. Its analgesic action was not associated with non-specific effects such as muscle relaxation or sedation of animals.

9 – Dipyron (10.0 – 1000.0 μM) produced modest but significant inhibition of [^3H] glutamate binding in cerebral cortical membranes from both mice and rats. However, dipyron (3.0 – 90.0 μM) had no significant effect on constitutive and induced nitric oxide synthase activity.

10 – It is concluded that dipyron produces dose-dependent peripheral, spinal and supraspinal antinociception when assessed in the neurogenic models of nociception induced by formalin, capsaicin and glutamate in mice. Its antinociceptive effect seems unlikely to involve the interaction with L-arginine-nitric oxide pathway, serotonin system, activation of G_i protein sensitive to pertussis toxin, interaction with ATP sensitive potassium channels, GABA_B receptors, or the release of endogenous glucocorticoids. In contrast, its antinociceptive action seems to involve, at least in part, an inhibition of the glutamatergic receptor binding and/or action or direct modulation of the hyperalgesic actions of the excitatory aminoacids.

Índice Remissivo

[PH]

glutamato	x, 29, 30, 58, 65
L-arginina	28, 30, 57
L-citrulina	28, 57

A

Aanonsen	19, 21, 64
Abbate	10, 14, 63
ácido	
acético	12, 13
acetil salicílico	2, 7
araquidônico	2, 63, 65
arilalcanólico	2
hidroxieicotetraenóico	3
adjuvante completo de Freund	64
adrenérgicos	11, 69
adrenoceptor	
α_1	26, 69
α_2	27, 69
agranulocitose	5
Akman	12, 13, 14, 61
aminoácido excitatório	x, 21, 62, 63, 64, 65, 70, 71
aminofenazona	2, 5, 9
AMPA	63, 64
analgina	5
Análise estatística	31
anticonvulsivante	14
Appieton	3, 4
Arellano	5
artrite	11
aspartato	62, 63
aspirina	14, 62
Associação Médica Americana	5
azul de metileno	10, 13

B

Bentley	69
binding	x, 29, 58, 82, 83
Bredt	28

C

cainato	63, 64
canais de K_{ATP}	25, 51, 68
Carlsson	8, 9, 14, 61, 62, 65, 69
Cashman	3
Caterina	62
c-Fos	13
CGRP	62
Chambers	11, 14
choques anafiláticos	5
ciclooxigenase	3, 4, 10, 63
ciclooxigenase-1	3
ciclooxigenase-2	3, 4, 5
clonidina	27, 30, 54, 56, 69
Coderre	62, 70
coluna espinhal	10
Corrêa	18, 62, 63

D

De Campos	9, 14
derivados	
do ácido antranílico	2
do p-aminofenol	2
do pirazol	2
pirazolônicos	5
dexametasona	11, 61
Dicionário	5
Dickenson	63, 68
diclofenaco	6, 14
dióis	3
discrasias sangüneas	5
DL-p-clorofenilalanina	x, 23, 30, 45, 47, 67
Doretto	14
Dray	68
drogas antiinflamatórias não esteroidais	2, 4, 7, 13, 14, 63
Duarte	10, 12, 14
Dubuisson	17
Dumuis	65
Dunnett	31

E

Eddy	20
eicosanóides	69
Eisenberg	70
epóxidos lipídicos	3

F

faclofen	x, 24, 30, 48, 50, 67
fenazona	2, 5
fenilefrina	26, 30, 54, 56, 69
Ferreira	7, 9, 11, 12, 66, 69
Ferreira	
Juliano	19, 21, 64
Sérgio	4, 7, 9, 11, 12, 14, 63, 66, 68, 70
fibras C	8, 63
Flower	69
formação reticular	12
formalina	ix, x, 15, 16, 17, 18, 23, 24, 25, 26, 27, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 59, 60, 62, 63, 66, 67, 68, 69, 70, 71
fosfolipase	2, 65
Fu3	

G

GABA	
GABA _A	67
GABA _B	x, 24, 48, 67, 71, 83
gânglios da raiz dorsal	62
Gladtko	5
glicocorticóides	x, 4, 26, 54, 70
glutamatoix, x	15, 16, 19, 21, 30, 38, 39, 40, 41, 43, 44, 58, 59, 60, 62, 63, 65, 70, 71
guanilato ciclase	10, 13

H

Haley	62, 64
Hammond	67
Hernandez	66
Hudspith	63
Hunskaar	61
Hylden	15

I

ladarola	1
ibuprofeno	2, 6
incapacitação motora	12
indometacina	2, 7, 9, 11, 14, 61
Insel	2
ioimbina	27, 30, 54, 56, 69

J

Jackson	19, 64
Jones	13, 14, 61
Juránek	64

K

Kewitz	5
Knowles	27
Korolkovas	2, 5
Kujubu	3, 4

L

L-arginina	x, 11, 12, 13, 14, 25, 28, 30, 51, 52, 57, 68, 71
Larregina	5
Laursen	16
Lawand	65
leucotrienos	3, 69
Liu	64, 71
L-nitro-N-arginina	13
Lorenzetti	7, 12, 14, 65, 68
Lowry	27, 29

M

Machalett	5
Malcangio	67
Maimberg	63
Mao	68, 70
Marquez	9
Masferrer	3
medula ventromedial rostral	11
Meller	13, 68
metabotrópico	63
metamizol	5
metampirona	5
Millan	67
Miyamoto	4
Moore	13
morfina	x, 8, 9, 13, 20, 21, 23, 24, 25, 30, 42, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 53, 62, 65, 66, 67, 68
Murray	64
MY5445	10

N

Nakanishi	63
naioxona	x, 12, 23, 30, 45, 46, 66
não-NMDA	63, 64, 65
naproxeno	61
Näsström	64
Neugebauer	10, 14, 62, 65
neurocinina A	62
neurônios bulboespinhais	13
Newmann Keuls	31
N ^G -monometil-L-arginina	10, 12
N ^G -nitro-L-arginina	25, 68
NMDA	63, 64, 65, 68, 71
noramidopirina	5
noramidopirinometanossulfonato sódico	5
núcleo	
magno da rafe	13, 67
próprio da comissura posterior	12
ventral do tálamo	9

O

Ocaña	68
Omote	63
Organização Mundial de Saúde	5
óxido	
nitríco	ix, x, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 25, 27, 51, 57, 62, 68, 71
nitríco sintase	ix, x, 13, 25, 27, 51, 57, 68

P

paracetamol	2, 7, 9
pirazolônico	
5-pirazolona	5
placa quente	ix, 12, 19, 20, 21, 42, 43, 61
Planas	6
prazosin	26, 30, 54, 56, 69
procaína	8
proteína Gi	x, 24, 48, 66, 71

R

Raffa	25, 68
receptores vanilóides	62
Ren	64
Rosland	22
rota-rod	22, 45, 66
Rusin	71

S

Sakurada	13, 18, 62, 63
salicilato de lisina	9
salicilatos	2
Santos	x, 24, 25, 27, 63, 68
Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária	6
serotonina	23, 45, 67
Shewade	68
Shibata	17, 63
Shimada	10, 14, 63
Simmons	4
sistema	
adrenérgico	26, 54

gabaérgico	24, 48
nervoso central	7, 10, 14, 22, 60
nervoso periférico	7
opióide	23, 45
serotoninérgico	x, 23, 45, 67, 71
Sistema Único de Saúde	6
Smith	4, 20
Solomon	5
Souza	29
Steffen	6, 61
substância	
cinzenta periaquedutal	8, 10, 12, 67
P	62, 64, 71
sulpirina	5

T

Taber	67
<i>tail flick</i>	ix, 8, 11, 12, 13, 19, 20, 42, 61, 69
Tasker	69
Tatsuo	11
Taylor	13
Tempel	6
Teoh	63
Tonussi	66, 68
Tortorici	10, 12, 14, 61, 62, 65
toxina pertussis	x, 24, 30, 48, 49, 66, 71
tromboxanos	2, 69

U

Ueda	69
------	----

V

Vane	2, 3, 4, 5
Vanegas	10, 13, 14, 61, 62, 65
Vaz	17, 23, 24, 25, 26, 27, 62, 63, 67, 68
verapamil	9
Vitale	67
Vlaskovska	9, 12, 14
Von	67

W

Wang	3
Williams	5
Wolff	28

X

Xie	3
Xu	4

Y

Yamamoto	13, 62
----------	--------

Z

Zhou	64
------	----