

Antagonistas Serotoninérgico e Noradrenérgico por via Subaracnoidea aumentam a Resposta Álgica em Ratos

Oscar César Pires, TSA¹, Hazem Adel Ashmawi, TSA², Elton Constantino³, Naira Correa Cusma Pelogia⁴, Irimar de Paula Posso, TSA⁵

Resumo: Pires OC, Ashmawi HA, Constantino E, Pelogia NCC, Posso IP – Antagonistas Serotoninérgico e Noradrenérgico por via Subaracnoidea aumentam a Resposta Álgica em Ratos.

Justificativa e objetivos: Há evidências de que a passagem de informações nociceptivas pelo corno posterior da medula espinhal (CPME) seguindo para níveis rostrais do sistema nervoso central sofre profundas influências excitatórias e inibitórias. A presente pesquisa teve como objetivo comparar os efeitos da metissergida, da fentolamina e da fentolamina associada à metissergida, administrados por via subaracnoidea, sobre as fases I, intermediária e II do teste da formalina modificado em ratos.

Método: Foram utilizados 28 ratos Wistar machos, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n = 7) para receber solução salina (GC), fentolamina (GF), metissergida (GM) ou fentolamina associada à metissergida (GFM) por via subaracnoidea. A dor foi induzida pela administração de formalina na região dorsal da pata posterior direita. O teste foi dividido em três fases; fase I, intermediária e fase II. A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), adotando o nível de significância de 5%.

Resultados: Na fase intermediária, o número de elevações da pata foi significativamente maior nos grupos GF, GM e GFM quando comparados com o grupo GC.

Conclusões: Os resultados sugerem a existência de efeito noradrenérgico e serotoninérgico no sistema inibitório descendente da dor aguda, com a possibilidade de emprego de agonistas serotoninérgicos e α 1-adrenérgicos para controle da dor aguda.

Unitermos: ANATOMIA, Espaço subaracnoideo; ANIMAL, Rato; DOR: Aguda, Avaliação; DROGAS, Vasodilatadores: fentolamina, metissergida.

[Rev Bras Anesthesiol 2011;61(2): 202-210] ©Elsevier Editora Ltda.

INTRODUÇÃO

A nocicepção é um processo bidirecional com trajetos ascendentes e descendentes no sistema nervoso. Sinais da dor processados na periferia passam através do corno posterior da medula espinhal (CPME) em direção aos centros cerebrais e, em resposta, projeções partem do cérebro até o CPME, fazendo várias conexões¹. O sistema proposto como inibitório descendente da dor consiste em áreas do sistema nervoso central (SNC) interligadas com fibras que partem de sistemas corticais e diencefálicos em direção à substância cinzenta periaquedutal (PAG) e periventricular, ricas em encefalinas

e receptores opioides e, a partir dessas, seguem para áreas do bulbo rostroventral, especialmente o núcleo magno da rafe (NMR) e os núcleos adjacentes, os quais, por sua vez, enviam fibras serotoninérgicas e noradrenérgicas, via funículo dorso-lateral, para o corno dorsal da medula e o bulbo, terminando principalmente nas lâminas I, II e V, e inibindo os neurônios nociceptivos, interneurônios e os tratos ascendentes que se projetam rostralmente, inclusive os tratos espinotalâmico, espinoreticular e espinomesencefálico¹⁻³. Portanto, é de se esperar que o aumento da neurotransmissão de noradrenalina, serotonina e de opioides possa ser eficaz no controle da dor.

A fentolamina é um derivado imidazólico que apresenta efeito antagonista competitivo, com afinidade semelhante por ambos os subtipos de receptores adrenérgicos α 1 e α 2, atuando no fenômeno doloroso⁴.

A metissergida, butanolamida do ácido 1-metil-d-lisérgico, é um antagonista não específico dos receptores da serotonina, utilizado em diversos estudos animais sobre a modulação serotoninérgica da dor⁵.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do antagonista adrenérgico fentolamina, do antagonista serotoninérgico metissergida e da associação dos dois antagonistas, por via subaracnoidea em ratos, na modulação da dor induzida pelo teste da formalina modificado.

MÉTODOS

Foram utilizados 28 ratos Wistar machos, pesando entre 220 e 300 gramas, fornecidos e mantidos no biotério de experi-

Recebido do Instituto Básico de Biociências – Universidade de Taubaté, UNITAU.

1. Responsável pelo CET/SBA do Hospital Municipal de São José dos Campos, SP; Doutor em Anestesiologia; Mestre em Farmacologia e Professor de Anestesiologia e Farmacologia – UNITAU

2. Professor Adjunto do Departamento de Medicina do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos; Professor Colaborador do Departamento de Cirurgia Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM/USP) e Laboratório de Investigação Médica – LIM-08 da FM/USP

3. Anestesiologista; Professor de Anestesiologia da UNITAU

4. Professora de Fisiologia e Farmacologia da UNITAU; Doutorado em Farmacologia; Mestre em Farmacologia

5. Professor Associado da Disciplina de Anestesiologia da FM/USP; Professor Titular de Farmacologia da UNITAU

Submetido em 4 de julho de 2010.

Aprovado para publicação em 13 de dezembro de 2010.

Correspondência para:

Dr. Oscar César Pires

Avenida Itália, 1.551 – Rua 13, nº 821

12030-212 – Taubaté, SP, Brasil

E-mail: ocpires@uol.com.br

mentação da universidade, sendo mantidos três animais por compartimento, onde permaneceram por pelo menos 15 dias antes do início do experimento, com vista a uma adequada adaptação. Foram tratados com ração comercial balanceada e água ad libitum, ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura ambiente de $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ (19°C a 25°C).

Para a administração dos fármacos no espaço subaracnoideo, os animais foram anestesiados com o halotano na concentração de 3,0% em fração inspirada de oxigênio de 1,0, administrado por vaporizador calibrado e mantido por tempo necessário para que o animal apresentasse perda dos reflexos posturais e incapacidade de se deslocar na câmara. Nesse momento, o animal foi retirado da câmara e posicionado com a cabeça em uma máscara do tipo cone, por onde recebia a mesma concentração de halotano e oxigênio.

Após a tricotomia, realizou-se uma incisão transversal na linha média do espaço intervertebral acima da penúltima vértebra lombar. Pela incisão, foi realizada punção com agulha Tuohy 22G até o espaço subaracnoideo, identificado pela movimentação reflexa da cauda ou das patas posteriores. Após identificação do espaço subaracnoideo, um cateter de teflon PE-10 foi introduzido pela agulha para a administração dos fármacos. Antes da sutura da pele, o cateter foi fixado na musculatura para que, ao final do procedimento, após o sacrifício dos animais, fosse confirmada sua localização no interior do espaço subaracnoideo.

Os animais foram divididos em quatro grupos de sete ratos cada. Os animais do grupo controle (GC) receberam pelo cateter 10 μL de solução de cloreto de sódio a 0,9% (solução salina); os do grupo fentolamina (GF) receberam 82 nmoles de fentolamina diluídos em 10 μL de solução salina; os do grupo metissergida (GM) receberam 64 nmoles de metissergida em 10 μL de solução salina; e, por último, os do grupo fentolamina associada à metissergida (GFM) receberam 82 nmoles de fentolamina associada a 64 nmoles de metissergida em 10 μL de solução salina. O volume e as doses foram definidos a partir de estudos prévios^{4,6}. Todos os fármacos foram obtidos do laboratório Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO (USA).

A indução da dor foi realizada com injeção de 50 μL de solução de formalina a 2% na região dorsal da pata posterior direita, 25 minutos após a injeção dos fármacos no espaço subaracnoideo.

As elevações da pata não relacionadas à marcha foram registradas no período de 60 minutos, sendo anotado o número parcial de elevações a cada cinco minutos.

O teste foi dividido em três fases: fase I, fase intermediária e fase II. Na fase I, foi anotado o número de elevações nos primeiros cinco minutos; na fase intermediária, foi anotado o número de elevações da pata do sexto ao vigésimo minuto; e, na fase II, foi anotado o número de elevações da pata do vigésimo primeiro ao sexagésimo minuto.

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando a versão 13.0 do programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), adotando o nível de significância 5% (0,05). Para identificar diferenças em cada grupo, aplicou-se o Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon. Para se identificarem as diferenças entre os quatro grupos, foi aplicado o Teste de

Kruskal-Wallis e, quando se verificou diferença entre os grupos, utilizou-se o Teste de Mann-Whitney, a fim de identificar quais grupos diferenciavam-se entre si.

RESULTADOS

Em todos os grupos, observou-se o comportamento bifásico, com uma fase intermediária significativamente diferente das fases I e II (Figura 1). Na fase I, não foram observadas diferenças significativas no número de elevações da pata entre os quatro grupos (Figura 2).

Na fase intermediária, o número de elevações da pata foi significativamente maior nos grupos GF, GM e GFM quando comparados com o grupo GC, porém não houve diferença quando houve comparação, entre si, dos grupos GF, GM e GFM (Figura 3), embora o número de elevação da pata tenha sido maior no grupo GFM, em que os antagonistas serotoninérgico e noradrenérgico foram associados, do que nos grupos GF e GM, em que eles foram usados isoladamente.

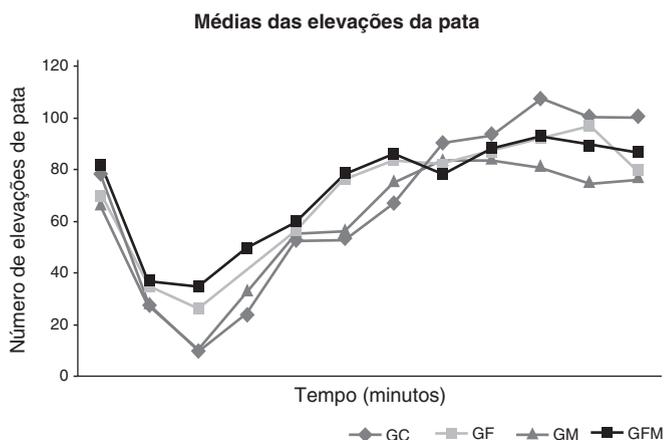


Figura 1. Média do Número de Elevações da Pata durante todas as Fases do Teste de Formalina Modificado em todos os Grupos.

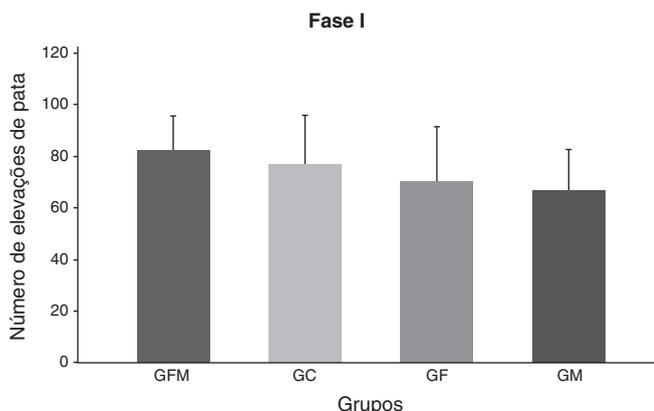


Figura 2. Médias e Desvio Padrão do Número de Elevações de Pata nos Grupos durante a Fase I do Teste da Fromalina Modificado. Sem diferença estatística significativa entre os grupos.

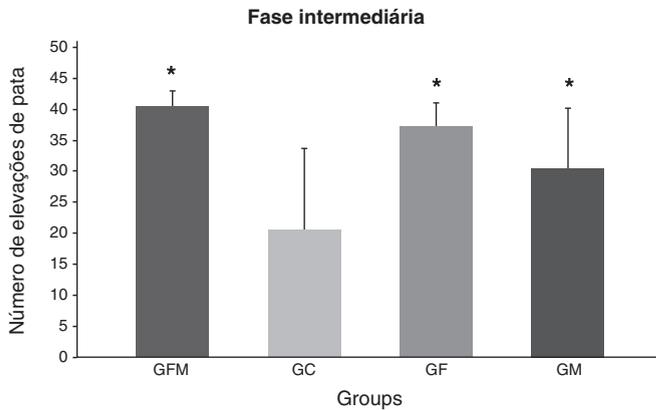


Figura 3. Médias e Desvio Padrão do Número de Elevações de Pata nos Grupos durante a Fase Intermediária do Teste da Formalina Modificado.

* Diferença estatística entre os grupos GC x GFM ($p = 0,025$); GC x GF ($p = 0,025$); e GC x GM ($p = 0,047$).

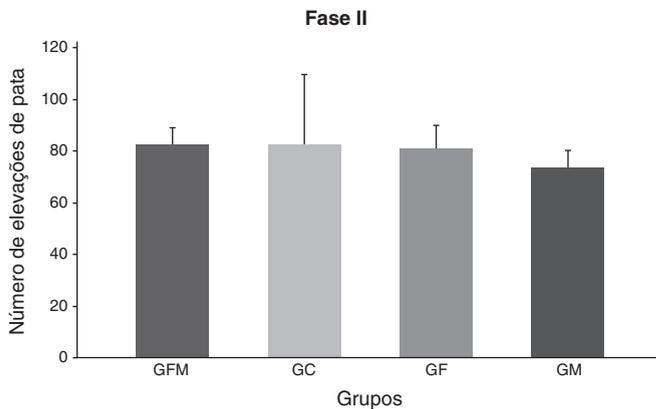


Figura 4. Médias e Desvio Padrão do Número de Elevações de Pata nos Grupos durante a Fase II do Teste da Formalina Modificado.

Diferença estatística significativa entre os grupos GM x GFM ($p = 0,013$) e GM x GF ($p = 0,035$).

O grupo GM apresentou um número menor de elevações de pata do que os grupos GF e GFM, porém essa diferença também não foi estatisticamente significativa.

Na fase II, não se observaram diferenças significativas quando houve comparação dos grupos GF, GM e GFM com o grupo GC, porém, quando comparado com os grupos GF e GFM, o grupo GM apresentou uma redução do número de elevações da pata estatisticamente significativa (Figura 4).

DISCUSSÃO

O teste da formalina é um antigo modelo experimental de dor em animais pela injeção de solução diluída de formalina na concentração entre 0,5 e 5,0% na região dorsal da pata traseira de ratos produzindo resposta nociceptiva bifásica, consistente em uma primeira fase, nos primeiros cinco minutos após a injeção, e, em uma segunda fase, que tem início após o vigésimo minuto e se estende por 40 a 60 minutos. A primeira fase é interpretada como decorrente da ativação direta dos

nociceptores periféricos, enquanto a segunda é interpretada como resultante da resposta inflamatória aguda e da sensibilização central. O período entre as duas fases da resposta nociceptiva é identificado como fase de inatividade, sendo atribuído a este um mecanismo antinociceptivo central⁷⁻⁹. Estudo de revisão sobre o teste da formalina concluiu que esse teste apresenta vantagens consideráveis sobre outros testes utilizados, e é considerado o modelo padrão para o estudo da nocicepção animal¹⁰. Em comparação com outros agentes indutores de dor, a formalina produz resposta espontânea mais consistente, oferecendo o benefício da resposta bifásica com grande potencial para o estudo da dor aguda¹¹.

O número de elevações da pata foi utilizado para a quantificação do comportamento doloroso induzido pela formalina por apresentar correlação importante com o teste da formalina clássica e com as alterações cardiovasculares em resposta à dor causada pela injeção da formalina na pata. Traz uma correlação confiável do comportamento doloroso em animais conscientes e não submetidos à restrição física¹¹⁻¹⁷. Não são muitos os dados presentes na literatura sobre o papel de receptores serotoninérgicos ou noradrenérgicos do SNC na mediação da resposta a dor causada pela formalina.

Várias são as doses de fentolamina e de metissergida utilizadas por via subaracnoidea em ratos, sendo utilizadas neste estudo doses já descritas e habitualmente utilizadas por outros autores^{4,18,19}.

O pentobarbital, o diazepam e o álcool inibiram a redução da nocicepção existente na fase intermediária do teste de formalina, supondo o envolvimento de receptores GABA_A⁹. Por outro lado, estudo eletrofisiológico em ratos anestesiados com tiopental sódico e submetidos à secção medular mostrou comportamento bifásico evidente, sugerindo que o controle da dor provocada pela formalina não depende de mecanismo gabaérgico²⁰.

No presente estudo, encontramos aumento no número das elevações da pata durante a fase intermediária nos grupos GF, GM e GFM, o que revela o envolvimento de vias serotoninérgicas e noradrenérgicas no sistema inibitório descendente da dor. Em conformidade com os resultados obtidos neste estudo, o envolvimento da serotonina (5-HT) na modulação descendente da dor também foi evidenciado pela inibição de sua síntese por p-chlorophenylalanina, a lesão eletrolítica do núcleo magno da rafe e o emprego de 5,6-dihydroxytryptamina, uma neurotoxina serotoninérgica²¹. Outro estudo apontou redução da resposta nociceptiva à formalina em todas as fases com o uso do agonista serotoninérgico α -metil-5-HT²².

Esperávamos encontrar um efeito aditivo ou potencializador sobre o número de elevações da pata com a utilização da associação dos antagonistas serotoninérgico e noradrenérgico. Houve maior número de elevações no grupo GFM, porém sem significância estatística em comparação com os grupos GF e GM, com este apresentando um número menor de elevações de pata, também sem significância estatística. Esses dados sugerem que a dose de fentolamina utilizada foi suficientemente elevada para inibir quase por completo o sistema descendente adrenérgico e que a dose de metissergida não foi tão elevada a ponto de inibir integralmente a via descendente serotoninérgica.

gica, porém a associação dos dois fármacos parece ter sido suficiente para a inibição da atividade inibitória descendente serotoninérgica e noradrenérgica. O uso de doses logaritmicamente menores poderia evidenciar com mais propriedade esse efeito dos antagonistas serotoninérgico e noradrenérgico, fentolamina e metissergida, bem como de sua associação na inibição da atividade inibitória descendente serotoninérgica e noradrenérgica, pois os dados desta pesquisa permitem inferir que, apesar de terem sido usadas doses já avaliadas por outros autores^{4,18,19}, elas podem ter sido elevadas para a elucidação de aspectos controversos da atividade inibitória descendente serotoninérgica e noradrenérgica.

Não obstante, um estudo realizado em vários modelos de dor encontrou efeito antinociceptivo da metissergida na segunda fase do teste da formalina e sugere que se deve à liberação reduzida de glutamato e da substância P dos neurônios primários aferentes na medula espinhal, causada pelo bloqueio dos receptores 5-HT₂ prévio à inflamação periférica²³. Por outro lado, o papel inibitório de vias noradrenérgicas foi evidenciado no modelo de retirada da cauda, onde a fentolamina e ioimbina levaram a um aumento da corrente elétrica de estimulação do núcleo retículo lateral para a ativação do sistema descendente inibitório²⁴.

Outro estudo encontrou redução da resposta nociceptiva, do teste da formalina, com ioimbina, um antagonista adrenergico relativamente seletivo para os receptores α_2 e serotoninérgicos 5-HT_{1A}, permitindo inferir envolvimento direto dos receptores α_1 na modulação da nocicepção da fase II do teste da formalina, já que esta ocorreu com a fentolamina, um antagonista inespecífico dos receptores α_1 e α_2 ²⁵.

Neste estudo, durante a fase II, relativa ao teste de formalina modificado, houve diferença significativa da resposta nociceptiva quando comparados os grupos fentolamina e fentolamina associada à metissergida com o grupo metissergida, o que pode ser explicado pelo efeito antagonista da fentolamina nos receptores α_2 , promovendo um efeito α_1 .

Os resultados obtidos apontaram aumento da resposta álgica com o emprego dos antagonistas noradrenérgico e serotoninérgico por via subaracnoidea em ratos, o que sugere a existência de efeito noradrenérgico e serotoninérgico no sistema inibitório descendente da dor aguda e permite evidenciar a importância de pesquisar neste e em outros modelos de dor os agonistas que possam apresentar efeito analgésico, possibilitando, assim, seu emprego no controle da dor aguda. Não obstante, alguns estudos realizados por outro pesquisador da instituição que se encontram em andamento, adotando outros modelos experimentais de dor, deverão confirmar esses achados.

REFERÊNCIAS / REFERENCES

01. D'Mello R, Dickenson AH – Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth*, 2008;101:8-16.
02. Vanegas H, Schaible HG – Descendent control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res Rev*, 2004;295-309.
03. Mason P – Deconstructing endogenous pain modulation. *J Neurophysiol*, 2005;94:1659-1663.

04. Liu RJ, Zhang RX, Qiao JT et al. – Interrelations of opioids with monoamines in descending inhibition of nociceptive transmission at the spinal level: an immunocytochemical study. *Brain Res*, 1999;830:183-190.
05. Mochizuki D – Serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors in animal models of pain. *Hum Psychopharmacol*, 2004;19:S15-S19.
06. Calajesan AA, Chang HC, Zhuo M – Spinal serotonergic receptors mediate of a nociceptive reflex by subcutaneous formalin injection into hindpaw in rats. *Brain Res*, 1998;798:46-54.
07. Dubuisson D, Dennis SG – The formalin test: A quantitative study of analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 1977;4:161-174.
08. Abbott FV, Franklin KBJ, Westbrook RF et al. – The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain*, 1995;60:91-102.
09. Franklin KBJ, Abbott FV – Pentobarbital, diazepam and ethanol abolish the interphase diminution of pain in the formalin test: evidence for pain modulation by GABA_A receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, 1993;46:661-66.
10. Tjolsen A, Beerge O, Hunskaar S et al. – The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 1992;51:5-17.
11. Wheller-Aceto H, Porreca F, Cowan A – The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. *Pain*, 1990;40:229-238.
12. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H et al. – Modified formalin test: characteristic bifasic pain response. *Pain*, 1989;38:347-352.
13. Taylor BK, Peterson MA, Basbaum AI – Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. *J Neurosci*, 1995;15:7575-7584.
14. Doak GJ, Sawynok J – Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. *Neuroscience*, 1997;80:939-949.
15. Parada CA, Tambeli CH, Cunha FQ et al. – The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience*, 2001;102:937-944.
16. Ashmawi HA, Chambergo FS, Palmeira CCA et al. – The effects of pyrilamine and cimetidine on mRNA c-Fos expression and nociceptive flinching behavior in rats. *Anesth Analg*, 2003;97:541-546.
17. Sousa A, Franco PAB, Ashmawi HA et al. – Efeito analgésico local do tramadol em modelo de dor provocada por formalina em ratos. *Rev Bras Anestesiologia*, 2008; 371-379.
18. Danzebrink RM, Gebhart GF – Evidence that spinal 5-HT₁, 5-HT₂ and 5-HT₃ receptor subtypes modulate responses to noxious colorectal distension in the rat. *Brain Res*, 1991;538:64-75.
19. Obata H, Saito S, Sasaki M et al. – Antiallodynic effect of intrathecal administered 5-HT₂ agonists in rats with nerve ligation. *Pain*, 2000;90:173-79.
20. Henry JL, Yashpal K, Pitcher GM et al. – Physiological evidence that the "interphase" in the formalin test is due to active inhibition. *Pain*, 1999;82:57-63.
21. Basbaum AI – Descending control of pain transmission: possible serotonergic-enkephalinergic interactions. *Adv Exp Med Biol*, 1981;133:177-189.
22. Sasaki M, Obata H, Saito S et al. – Antinociception with intratecal α -methyl-5-hydroxytryptamine, a 5-hydroxytryptamine_{2A/2C} receptor agonist, in two rat models of sustained pain. *Anesth Analg*, 2003;96:1072-1078.
23. Ki-Myung C, Seong-Soo C, Ki-Jung H et al. – Antinociceptive effects of methysergide in various pain models. *Pharmacology*, 2003;101:69-93.
24. Gebhart GF, Ossipov MH – Characterization of inhibition of the spinal nociceptive Tail-Flick Reflex in the rat from the medullary lateral reticular nucleus. *Neuroscience*, 1986;6:701-713.
25. Shanon HE, Lutz EA – Yoimbine produces antinociception in the formalin test in rats: involvement to serotonin_{1A} receptors. *Psychopharmacology*, 2000;149:93-97.

Resumen: Pires OC, Ashmawi HA, Constantino E, Pelogia NCC, Posso IP – Antagonistas Serotoninérgico y Noradrenérgico, por la Vía Subaracnoidea que aumentan la repuesta Álgica en Ratones.

Justificativa y objetivos: Existen evidencias de que el paso de informaciones nociceptivas por el cuerno posterior de la médula espinal (CPME), y que continúa hacia niveles rostrales del sistema nervioso central, sufre profundas influencias excitatorias e inhibitorias. La presente investigación quiso comparar los efectos de la metisergida, de la fentolamina y de la fentolamina asociada a la metisergida, administrados por vía subaracnoidea, sobre las fases I, intermedia y II del test de la formalina modificado en ratones.

Método: Fueron utilizados en el experimento, 28 ratones Wistar machos, distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos ($n = 7$), para recibir una solución salina (GC), fentolamina (GF), metisergida (GM) o fentolamina asociada a la metisergida ((GFM). El dolor fue inducido por la administración de formalina en la región dorsal de la pata posterior derecha. El test fue dividido en tres fases: fase I, intermedia y

fase II. El análisis estadístico de los resultados fue hecho utilizando el programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), [Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales], adoptando el nivel de significancia de un 5%.

Resultados: En la fase intermedia, el número de elevaciones de la pata fue significativamente mayor en los grupos GF, GM y GFM cuando se comparó con el grupo GC.

Conclusiones: Los resultados nos sugieren la existencia de un efecto noradrenérgico y serotoninérgico en el sistema inhibitorio descendiente del dolor agudo, con la posibilidad del uso de agonistas serotoninérgicos y α 1-adrenérgicos para el control del dolor agudo.

Descriptorios: ANATOMIA, Espacio subaracnoideo; ANIMALE, Ratones; DOLOR, Aguda, Avaliación; FÁRMACO, Vasodilatadores: fentolamina, metisergida.