

Ação da fluoxetina sobre a dor aguda em ratos submetidos à constrição do nervo ciático*

Fluoxetine action on acute pain in rats submitted to sciatic nerve constriction

Luis Eduardo Guimarães Salinas¹, Marcos Francisco Dias Martins¹, Adriana Aparecida de Souza dos Santos², Oscar César Pires³, Elton Constantino⁴, Irimar de Paula Posso⁵, Naira Correia Cusma Pelógia⁶

* Recebido da Universidade de Taubaté. Taubaté, SP.

RESUMO

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: Os inibidores seletivos da recaptção de serotonina como a fluoxetina, têm sido apontados como alternativa ao uso dos antidepressivos tricíclicos para o tratamento da dor crônica, pela menor incidência de efeitos colaterais. O objetivo deste estudo foi estudar o efeito da serotonina na modulação da dor aguda, pela administração de fluoxetina, por meio do teste da formalina, em ratos, anteriormente submetidos à constrição do nervo ciático.

MÉTODO: Foram estudados 24 ratos Wistar, machos, com peso médio de 300 g, distribuídos em 5 grupos: 1. Controle sem tratamento; 2. Constrição do nervo ciático; 3. Constrição do nervo ciático tratados com 5 mg.kg⁻¹.dia de fluoxetina, por via oral durante 15 dias; 4. Constrição do nervo ciático tratados com 5 mg.kg⁻¹ de reserpina, por via oral a cada 72h e com 5 mg.kg⁻¹.dia de fluoxetina por via oral, durante 15 dias; 5. Constrição do nervo ciático tratados com 5 mg.kg⁻¹ de reserpina por via oral em intervalos de

72h, durante 15 dias. Todos os animais foram submetidos ao teste da formalina modificado após os tratamentos especificados.

RESULTADOS: A resposta na fase I, na fase intermediária e na fase II do teste da formalina não foi alterada pela constrição do ciático. O tratamento com reserpina ou fluoxetina não interferiu com as fases I e intermediária do teste da formalina nos grupos submetidos à constrição do ciático. O número de elevações da pata na fase II do teste da formalina aumentou nos animais tratados com fluoxetina e diminuiu nos animais tratados com reserpina. Nos animais tratados com a associação reserpina e fluoxetina houve redução do número de elevações da pata em comparação com os animais tratados apenas com a fluoxetina.

CONCLUSÃO: O tratamento com fluoxetina aumentou a sensação dolorosa após estímulo agudo em ratos submetidos à constrição do ciático, evidenciando ação algogênica do fármaco neste modelo experimental.

Descritores: Dor, Fluoxetina, Neuropatia, Reserpina, Teste da formalina.

1. Graduando do Curso de Medicina da Universidade de Taubaté. Taubaté, SP, Brasil.

2. Aluna do Curso de Ciências Biológicas da Universidade de Taubaté. Taubaté, SP, Brasil.

3. Professor Assistente Doutor de Farmacologia da Universidade de Taubaté. Taubaté, SP, Brasil.

4. Professor Assistente de Anestesiologia da Universidade de Taubaté. Taubaté, SP, Brasil.

5. Professor Titular de Farmacologia da Universidade de Taubaté. Taubaté, SP, Brasil.

6. Professora Assistente Doutora de Fisiologia da Universidade de Taubaté. Taubaté, SP, Brasil.

Endereço para correspondência:
Dra. Naira Correia Cusma Pelógia
Rua Ipanema, 100. Sapé I
12294-015 Caçapava, SP.
E-mail: cusmapelogia@gmail.com

SUMMARY

BACKGROUND AND OBJECTIVES: Selective serotonin reuptake inhibitors, such as fluoxetine, have been suggested as alternative to tricyclic antidepressants to treat chronic pain, due to the lower incidence of side effects. This study aimed at observing the effects of serotonin on acute pain modulation, by the administration of fluoxetine through the formalin test in rats previously submitted to sciatic nerve constriction.

METHOD: We used 24 male Wistar rats, with mean weight of 300 g and distributed in 5 groups: 1. Control untreated; 2. Sciatic nerve constriction; 3. Sciatic nerve constriction and treated with 5 mg.kg⁻¹.day oral fluoxetine for 15 days; 4. Sciatic nerve cons-

triction treated with 5 mg.kg⁻¹ oral reserpine every 72 hours and with 5 mg.kg⁻¹.day oral fluoxetine for 15 days; 5. Sciatic nerve constriction treated with 5 mg.kg⁻¹ oral reserpine every 72 hours for 15 days. All animals were submitted to modified formalin test after treatment.

RESULTS: Response in the phase I, intermediate and phase II formalin test was not changed by sciatic nerve constriction. Treatment with reserpine or fluoxetine has not interfered with first and intermediate formalin test phases in the groups submitted to sciatic nerve constriction. The number of flinches in the second formalin test phase has increased in animals treated with fluoxetine and has decreased in animals treated with reserpine. There has been decrease in the number of flinches in animals treated with the association reserpina and fluoxetine as compared to animals treated with fluoxetine alone.

CONCLUSION: Fluoxetine has increased painful sensation after acute stimulation in rats submitted to sciatic nerve constriction, showing the algogenic action of the drug in this experimental model.

Keywords: Fluoxetine, Formalin test, Neuropathy, Pain, Reserpine.

INTRODUÇÃO

Os fármacos que inibem a captação de 5-hidroxitriptamina (5-HT), os inibidores seletivos da captação de serotonina (ISRS) não interferem em outros neurotransmissores além da serotonina¹. A fluoxetina, o protótipo do grupo, é um inibidor seletivo da captação da serotonina no córtex cerebral, neurônios serotoninérgicos e nas plaquetas. Não inibe a captação de outros neurotransmissores, não tendo afinidade pelos receptores adrenérgicos, muscarínicos, colinérgicos, H₁-histamínicos, serotoninínicos ou dopamínicos².

O cloridrato de fluoxetina tornou-se um dos antidepressivos mais utilizados no tratamento de alguns transtornos neurológicos devido a sua importância farmacológica e terapêutica, além de relativa ausência de reações adversas graves; e baixo potencial de abuso. As reações adversas mais comuns relacionadas à fluoxetina, mesmo em doses terapêuticas, são: boca seca, sudorese, cefaleia, diarreia, sonolência e insônia³.

Diversos estudos sobre a utilização dos ISRS em modelos experimentais de dor em animais obtiveram como resultado uma provável interação destes fármacos com o sistema opioide endógeno ou potencialização do efeito analgésico mediado pelas vias serotoninérgicas e/

ou noradrenérgicas⁴. Além disto, os ISRS podem atuar indiretamente sobre a dor, pois também promovem um modesto aumento nos níveis de endorfinas⁵.

O objetivo deste estudo foi estudar o efeito da serotonina na modulação da dor aguda, pela administração de fluoxetina, por meio do teste da formalina, em ratos anteriormente submetidos à constrição do nervo ciático.

MÉTODO

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Taubaté (UNITAU), declaração de aprovação nº 003/2009, foram utilizados 24 ratos Wistar machos, pesando entre 300 e 350 g, fornecidos pelo Biotério da UNITAU e mantidos em número de 5 animais por compartimento no laboratório de Farmacologia da UNITAU, onde permaneceram por pelo menos 15 dias antes do início do experimento, para adequada adaptação, sendo permitido o acesso à ração balanceada comercial e água *ad libitum*. A luminosidade foi controlada com ciclo claro-escuro de 12h e temperatura ambiente de 22 ± 3° C (19° a 25° C). Para realização dos procedimentos experimentais foram obedecidas as Normas Éticas da *International Association for Study of Pain* (IASP), que regulam experimentos realizados em animais (Committee for Research and Ethical Issues of the IASP, 1983). Somente animais com aspecto sadio foram utilizados na pesquisa.

Os animais foram aleatoriamente divididos em 5 grupos, de acordo com o tratamento farmacológico: 1. Grupo controle (C) – sem intervenção cirúrgica (n = 4); 2. Grupo constrição do ciático (CC) - os animais foram submetidos à constrição do nervo ciático (n = 6); 3. Grupo reserpina (CC + R) - os animais foram submetidos à constrição do ciático e tratados com reserpina (5 mg.kg⁻¹) por via oral (VO) em intervalos de 72h, durante 15 dias (n = 4); 5. Grupo fluoxetina (CC + F) - os animais foram submetidos à constrição do nervo ciático e tratados diariamente com fluoxetina (5 mg.kg⁻¹) VO, durante 15 dias (n = 4); 5. Grupo fluoxetina + reserpina (CC + FR) - os animais foram submetidos à constrição do nervo ciático e tratados com reserpina (5 mg.kg⁻¹) VO em intervalos de 72h, durante 15 dias e com amitriptilina (5 mg.kg⁻¹) VO, diariamente, durante 15 dias (n = 4).

Todos os animais, exceto os do grupo C, foram submetidos à constrição do nervo ciático, na pata direita, sob anestesia com halotano (3 vol %). O nervo ciático direito do animal foi exposto e um segmento de 5 a 7 mm foi

dissecado. Quatro ligaduras com fio de sutura *catgut* cromado 4-0 tipo C, com intervalos de 1 mm entre si, foram realizadas ao redor do nervo⁶.

Após a constrição do nervo ciático e tratamento farmacológico, todos os animais, tratados e controles, foram submetidos ao teste para percepção da sensibilidade. O teste consiste no toque da região plantar da pata traseira direita (tratada) e esquerda (controle) dos animais com filamentos de espessura padronizada com uso de filamentos de Von Frey⁷. O levantar da pata ao toque indica sensibilidade. A espessura do filamento é anotada e os resultados são analisados estatisticamente. Os animais foram submetidos ao teste de Von Frey 15 dias após a constrição do ciático. Foram feitas duas medidas, em intervalos de 3 dias. Depois do teste de Von Frey, todos os animais foram submetidos ao teste da formalina modificado injetada na pata com a constrição do nervo ciático.

Teste da formalina modificado - antes do procedimento o animal foi colocado em uma câmara de vidro de 30 x 30 x 30 cm, por 15 minutos, para ambientar ao local de estudo. Atrás da câmara foi colocado um espelho, em ângulo de 45°, para facilitar a visualização das elevações de patas em todas as direções.

O teste consistiu na injeção de 50 µL da solução de formalina a 2% no dorso da pata traseira dos ratos produzindo resposta nociceptiva bifásica. Foi feita a contagem do número de elevações da pata durante 60 minutos. A fase I correspondeu ao número de elevações da pata durante os primeiros 5 min após a injeção. A fase II correspondeu ao número de elevações da pata durante a partir dos 21 até os 60 min após a injeção, e a fase intermediária correspondeu ao número de elevações da pata dos 6 aos 20 min após a injeção. A fase I foi interpretada como sendo devida à ativação aguda dos nociceptores periféricos, enquanto a fase II como resultante da resposta inflamatória aguda ou pela sensibilização central. Ao período entre as duas fases da resposta nociceptiva foi identificado como fase de inatividade, e atribuído o envolvimento de um mecanismo antinociceptivo central⁸.

Todas as elevações da pata não relacionadas à marcha foram consideradas, independente do tempo que permaneceu elevada. A contagem foi realizada continuamente durante 60 min e a cada 5 min era anotado o número parcial de elevações.

Para análise estatística dos resultados obtidos, foi utilizada Análise de Variância para amostras independentes, seguida do teste de Bonferroni. Adotou-se o nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

A constrição do nervo ciático não alterou a resposta na fase I, na fase intermediária e na fase II do teste da formalina. (Gráfico 1).

O tratamento com a reserpina, fluoxetina ou com a associação reserpina e fluoxetina não interferiu com as fases I e intermediária do teste da formalina nos grupos submetidos à constrição do ciático (Gráfico 2).

Na fase II do teste da formalina, o tratamento com fluoxetina aumentou o número de elevações da pata em comparação com o grupo sem tratamento. O tratamento com reserpina reduziu o número de elevações da pata em comparação com o grupo sem tratamento. Nos animais tratados com a associação reserpina e fluoxetina houve redução do número de elevações da pata em comparação com os animais tratados apenas com a fluoxetina (Gráfico 3).

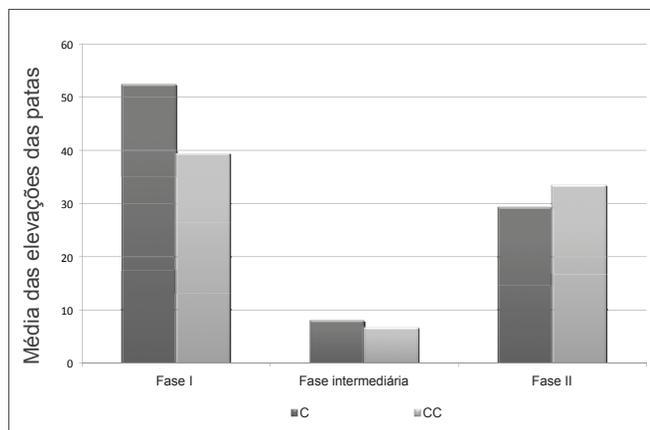


Gráfico 1 – Média das elevações da pata direita dos ratos dos grupos controle e constrição do nervo ciático.

CC = grupo controle; CC = grupo constrição do ciático.

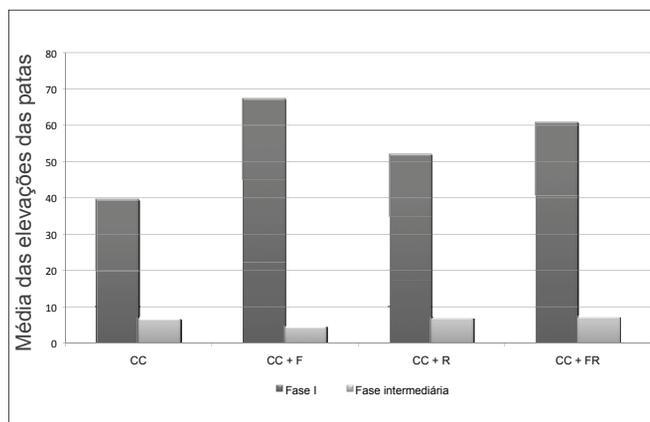


Gráfico 2 – Média das elevações da pata direita de ratos submetidos à constrição do ciático não tratados e tratados com reserpina, fluoxetina ou reserpina e fluoxetina nas fases I e intermediária do teste da formalina.

CC = grupo constrição do ciático; CC+F = grupo fluoxetina; (CC+R) = grupo fluoxetina+reserpina; CC+FR = grupo fluoxetina+reserpina

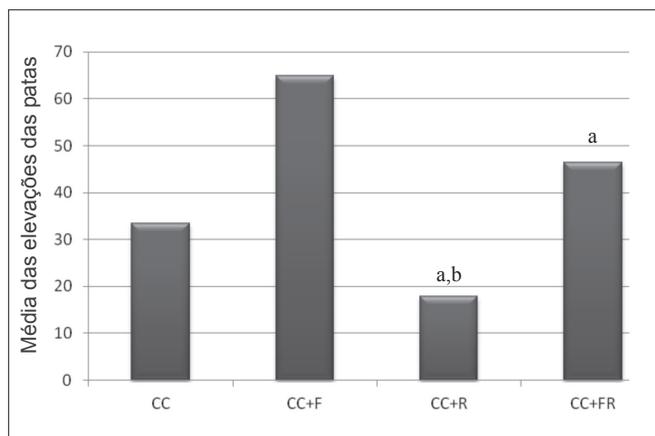


Gráfico 3 – Média das elevações da pata direita de ratos submetidos à constrição do ciático não tratados e tratados com reserpina, fluoxetina ou reserpina+fluoxetina na fase II do teste da formalina.

CC = grupo constrição do ciático; CC+F = grupo fluoxetina; (CC+R) = grupo fluoxetina+reserpina; CC+FR = grupo fluoxetina+reserpina

a = $p < 0,05$ em comparação com os CC ou CC+FR.

b = $p < 0,05$ em comparação com CC+F.

DISCUSSÃO

Apesar do teste da formalina também provocar lesão tecidual e ativação da resposta inflamatória, a ligadura do ciático parece envolver mecanismos de plasticidade neuronal, que podem aumentar a sensibilidade dos nociceptores aos mediadores da resposta inflamatória aguda⁹, este fato não foi constatado no presente estudo, já que a resposta na fase I, na fase intermediária e na fase II do teste da formalina não foi alterada pela constrição do ciático, pois a resposta do grupo C e do grupo CC não diferiu.

O tratamento com reserpina ou fluoxetina não interferiu com as fases I e intermediária do teste da formalina nos grupos submetidos à constrição do ciático.

A primeira fase do teste da formalina está relacionada com a nocicepção⁸. O tratamento com reserpina manteve esta resposta. Estes resultados estão de acordo com os apresentados em estudo anterior, em que animais intactos, sem procedimento cirúrgico, tratados com reserpina, apresentaram padrão de resposta inalterado na primeira fase do teste, o que permitiu inferir que o fármaco não interfere com a transdução do sinal doloroso¹⁰. A reserpina não parece interferir com a transdução do sinal doloroso e com a via descendente inibitória da dor no modelo de constrição do nervo ciático.

A administração de fluoxetina não alterou o número das elevações da pata durante a fase intermediária do teste da formalina, na ausência ou na presença de reserpina, indicando que este fármaco não interfere com a resposta da via descendente inibitória da dor neste modelo ex-

perimental. Estes resultados indicam que, a depleção de noradrenalina, serotonina e dopamina pode não interferir com a transdução do sinal doloroso e tampouco com a antinocicepção central, características das fases descritas, neste modelo experimental.

Observou-se aumento do número de elevações da pata direita na fase II, após o tratamento com fluoxetina. Estes dados apontam para um efeito algogênico da fluoxetina, em condições agudas, com hiperalgesia pré-existente.

Descrições para a ação da fluoxetina na dor são conflitantes. A fluoxetina demonstrou ação antinociceptiva periférica no teste inflamatório da formalina e em modelo de dor neuropática, resultado diferente do observado no presente estudo¹¹; em estudos realizados em modelos de camundongos *Knockout* para neurônios serotoninérgicos no tronco cerebral evidenciaram que o envolvimento da serotonina no mecanismo de ação de fármacos antidepressivos varia com o tipo de dor. O efeito analgésico dos ISRS durante teste térmico de dor foi muito reduzido ou ausente nestes camundongos, sugerindo que o bloqueio da recaptação da serotonina esteja envolvido no efeito analgésico agudo dos antidepressivos¹². Em outro estudo, o efeito analgésico da duloxetine em modelos de dor persistente em roedores não foi afetado pela perda de neurônios serotoninérgicos, sugerindo um papel essencial da norepinefrina na analgesia induzida por antidepressivos em condições dolorosas crônicas¹³. Revisão que incluiu 59 estudos controlados aleatórios, o efeito analgésico de antidepressivos com placebo foi comparado em pacientes com neuropatia diabética e não foram encontradas evidências de que a fluoxetina fosse mais eficaz que o placebo para o alívio da dor¹⁴. Essa afirmação está de acordo com o resultado evidenciado na fase I e fase intermediária do presente estudo, porém diferente da fase II, já que nessa a fluoxetina aumentou a sensação dolorosa nos modelos experimentais, que apresentaram aumento no número de elevações da pata.

Como o tratamento com fluoxetina aumentou o número de elevações da pata na fase II do teste da formalina e houve redução com a reserpina, pode-se inferir que alterações na síntese/liberação de neurotransmissores, como serotonina, podem induzir adaptações na modulação central, que são manifestadas como alterações da sensibilidade. O aumento da resposta à formalina nos animais tratados com reserpina e fluoxetina aponta em favor desta hipótese.

A fluoxetina não demonstrou efeito sobre a dor causada em ratos da raça Wistar no teste de estimulação elétrica e térmica¹, entretanto aumentou a resposta motora à dor induzida. Dados experimentais sugerem que a adminis-

tração aguda de ISRS pode exacerbar um tipo agudo de dor. Além disso, o grupo fluoxetina apresentou maior número de elevações da pata em resposta à dor na fase II do teste da formalina, que é a fase inflamatória tendo, portanto, comportamento pró-inflamatório¹⁰. Essas conclusões estão de acordo com os resultados obtidos no presente estudo.

A ação da serotonina nos seus diversos subtipos de receptores é capaz de modular diferentes sinais, que dependem principalmente do tipo de receptor acoplado, número de receptores na célula, interação proteica, número e tipo de proteína G expressa nas membranas celulares¹⁰.

A ativação dos receptores 5-HT_{1A} pode apresentar efeitos paradoxais, desencadeando tanto efeito analgésico quanto hiperalgésico. Este receptor pré-sináptico está amplamente distribuído no sistema nervoso central, bem como em tecidos periféricos, atuando principalmente por meio da ativação da proteína Gi/o que é inibitória, com inibição da adenilciclase, inclusive no hipocampo e neurônios corticais. A ação hiperalgésica seria decorrente da inibição parcial da liberação de opioides no corno dorsal da medula, diminuindo a modulação da dor pelo sistema inibitório descendente da dor. Isto se dá pelo bloqueio apenas na liberação de encefalinas, que em associação com as dinorfinas, ativaria o sistema opioide. Pode também, por meio da ativação da proteína Gi/o inativar os canais de cálcio voltagem-dependentes inibir a liberação de opioides. Por outro lado, foi demonstrado também que, os receptores 5-HT_{1A} medulares mediam efeitos antinociceptivos, por interação com as vias descendentes do NMR¹⁰. Pode-se também associar a hiperalgesia encontrada em nosso estudo, na segunda fase do teste da formalina, com uma possível interação da serotonina com receptores do tipo 5-HT₂, presentes em grande quantidade no córtex somatossensorial e pré-frontal. Este receptor está acoplado à proteína G, que por meio da ativação da fosfolipase C produz dois segundos mensageiros, que são diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP₃). O DAG é um cofator de ativação da proteinocinase C, com facilitação da transmissão glutamatérgica em neurônios no corno dorsal da medula e o IP₃ promove mobilização das reservas de cálcio, levando, assim, a hiperexcitabilidade dos motoneurônios e dos reflexos medulares¹⁰. Esses argumentos apresentam uma possível explicação para os resultados encontrados neste estudo¹⁰.

Dessa forma, a fluoxetina não tem influência na fase I e na fase intermediária do teste da formalina. Não obstante, na fase II do teste, o aumento dos níveis de seroto-

nina, obtido pela administração de fluoxetina aos ratos, piorou a dor, o que ficou demonstrado pelo aumento do número de elevações da pata. Vale ressaltar que, quando se depletou a noradrenalina e a dopamina, administrando reserpina previamente à fluoxetina, obteve-se melhora da dor aguda, resultado que deve ser mais bem investigado em estudos futuros.

CONCLUSÃO

O tratamento com fluoxetina aumentou a sensação dolorosa após estímulo agudo em ratos submetidos à constrição do ciático, evidenciando ação algogênica do fármaco neste modelo experimental.

REFERÊNCIAS

1. Silva DK, Andrade FM. Farmacogenética de inibidores seletivos de recaptção de serotonina: uma revisão. *Rev Psiquiatr Sul* 2008;30(Suppl 1).
2. Pedroso RA, Celich KLS. Dor: quinto sinal vital, um desafio para o cuidar em enfermagem. *Texto & Contexto Enferm* 2006;15(2):270-6.
3. Suarez WT, Sartori ER, Batista EF, et al. Determinação turbidimétrica em fluxo de cloridrato de fluoxetina em formulações farmacêuticas. *Quím Nova* 2009;32(9):2396-400.
4. Duman EN, Kesin M, Kadioglu M, et al. Possible involvement of opioidergic and serotonergic mechanisms in antinociceptive effect of paroxetine in acute pain. *J Pharmacol Sci* 2004;94(2):161-5.
5. Navinés R, Martin-Santos R, Gómez-Gil E, et al. Interaction between serotonin 5-HT_{1A} receptors and β -endorphins modulates antidepressant response. *Prog Neuro-Psych Biol Psych* 2008;32(8):1804-9.
6. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988;33(1):87-107.
7. Pitcher GM, Ritchie J, Henry JL. Paw withdrawal threshold in the von Frey hair test is influenced by the surface on which the rat stands. *J Neurosci Methods* 1999;87(2):185-93.
8. Abbott FV, Franklin KB, Westbrook RF. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. *Pain* 1995;60(1):91-102.
9. Cusma Pelógia NC, Machado BG, Briet de Almeida FC, et al. Efeitos da amitriptilina sobre a modulação da dor aguda, em ratos submetidos à ligadura do nervo ciático. *Rev Dor* 2011;12(3):245-9.
10. Marton BCV, Honda FCS, Pires OC, et al. Efeito do

tratamento com reserpina sobre a dor aguda em ratos submetidos ao teste da formalina modificado. Rev Dor 2009;10(4):325-30.

11. Sawynok J, Esser MJ, Reid AR. Peripheral antinociceptive actions of desipramine and fluoxetine in an inflammatory and neuropathic pain test in the rat. Pain 1999;82(2):149-58.

12. Pliego L A. Reuptake inhibitors of serotonin and noradrenaline in the management of pain of diabetic neuropathy. Neurol Arg 2010;2(3):180-8.

13. Iyengar S, Webster AA, Hemrick-Luecke SK, et al. Efficacy of duloxetine, a potent and balanced serotonin-

-noradrenaline reuptake inhibitor in persistent pain models in rats. J Pharmacol Exp Ther 2004;311(2):576-84.

14. Lynch ME. Antidepressants as analgesics: a review of randomized controlled trials. J Psychiatry Neurosci 2001;26(1):30-6.

15. Dirksen R, Van Lijstelaar EL, Van Rijn CM. Selective serotonin reuptake inhibitors may enhance responses to noxious stimulation. Pharmacol Biochem Behav 1998;60(3):719-25.

Apresentado em 03 de novembro de 2011.

Aceito para publicação em 27 de fevereiro de 2012.