

Inibição da Corrente de Cálcio Tipo L por Tramadol e Enantiômeros em Miócitos Cardíacos de Ratos

Inhibition of L-type Calcium Current by Tramadol and Enantiomers in Cardiac Myocytes from Rats

Emiliano Medei², Juliana M. Raimundo¹, José Hamilton M. Nascimento², Margarete M. Trachez³, Roberto T. Sudo¹, Gisele Zapata-Sudo¹

Programa de Desenvolvimento de Fármacos, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro¹; Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro², Rio de Janeiro, RJ; Serviço de Anestesiologia, Universidade Federal Fluminense³, Niterói, RJ, Brasil

Resumo

Fundamento: O tramadol é um analgésico de ação central cujo mecanismo de ação envolve a ativação de um receptor opioide. Anteriormente, mostramos que o tramadol e seus enantiômeros apresentavam um efeito inotrópico negativo sobre o músculo papilar no qual o (+)-enantiômero era mais potente que (-)- e (±)-tramadol.

Objetivo: No presente trabalho, investigamos os efeitos do tramadol e seus enantiômeros na corrente de cálcio tipo L (I_{Ca-L}).

Métodos: Os experimentos foram realizados em miócitos ventriculares isolados de ratos Wistar utilizando a técnica de patch-clamp com configuração de célula inteira.

Resultados: O tramadol (200 μ M) reduziu a amplitude de pico do I_{Ca-L} em potenciais de 0 a +50 mV. Em 0 mV, a I_{Ca-L} foi reduzida em $33,7 \pm 7,2\%$. (+)- e (-)-tramadol (200 μ M) produziram uma inibição semelhante da I_{Ca-L} , na qual a amplitude do pico foi reduzida em $64,4 \pm 2,8\%$ e $68,9 \pm 5,8\%$, respectivamente a 0 mV ($p > 0,05$). O tramadol, (+)- e (-)-tramadol mudaram a inativação de estado estacionário de I_{Ca-L} para potenciais de membrana mais negativos. Além disso, tramadol e (+)-tramadol alteraram significativamente a curva de recuperação dependente de tempo da I_{Ca-L} para a direita e reduziram a recuperação de I_{Ca-L} da inativação. A constante de tempo foi aumentada de $175,6 \pm 18,6$ a $305,0 \pm 32,9$ ms ($p < 0,01$) para o tramadol e de $248,1 \pm 28,1$ ms para $359,0 \pm 23,8$ ms ($p < 0,05$) para o (+)-tramadol. O agonista do receptor μ -opioide (DAMGO) não tem nenhum efeito na I_{Ca-L} .

Conclusão: A inibição da I_{Ca-L} induzida por tramadol e seus enantiômeros não teve relação com a ativação de receptores opioides e poderia explicar, pelo menos em parte, seu efeito inotrópico negativo cardíaco. (Arq Bras Cardiol 2011; 97(4):324-330)

Palavras-chave: Tramadol, canais de cálcio tipo L, miócitos cardíacos, ratos.

Abstract

Background: Tramadol is a centrally acting analgesic, whose mechanism of action involves opioid-receptor activation. Previously, we have shown that tramadol and its enantiomers had a negative inotropic effect on the papillary muscle in which the (+)-enantiomer is more potent than (-)- and (±)-tramadol.

Objective: In this study, we investigated the effects of tramadol and its enantiomers on L-type calcium current (I_{Ca-L}).

Methods: The experiments were carried out in isolated Wistar rat ventricular myocytes by using the whole cell patch clamp technique.

Results: Tramadol (200 μ M) reduced the peak amplitude of I_{Ca-L} at potentials from 0 to +50 mV. At 0 mV, I_{Ca-L} was reduced by $33.7 \pm 7.2\%$. (+)- and (-)-tramadol (200 μ M) produced a similar inhibition of I_{Ca-L} , in which the peak amplitude was reduced by $64.4 \pm 2.8\%$ and $68.9 \pm 5.8\%$, respectively at 0 mV ($p > 0.05$). Tramadol, (+)- and (-)-tramadol shifted the steady-state inactivation of I_{Ca-L} to more negative membrane potentials. Also, tramadol and (+)-tramadol markedly shifted the time-dependent recovery curve of I_{Ca-L} to the right and slowed down the recovery of I_{Ca-L} from inactivation. The time constant was increased from 175.6 ± 18.6 to 305.0 ± 32.9 ms ($p < 0.01$) for tramadol and from 248.1 ± 28.1 ms to 359.0 ± 23.8 ms ($p < 0.05$) for (+)-tramadol. The agonist of μ -opioid receptor DAMGO had no effect on the I_{Ca-L} .

Conclusion: The inhibition of I_{Ca-L} induced by tramadol and its enantiomers was unrelated to the activation of opioid receptors and could explain, at least in part, their negative cardiac inotropic effect. (Arq Bras Cardiol 2011; 97(4):324-330)

Keywords: Tramadol; calcium channels, L-type; myocytes, cardiac; rats.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Gisele Zapata-Sudo •

Programa de Desenvolvimento de Fármacos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Ciências Biomédicas, Bloco J, Sala 14 - 21941-590 - Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: gsudo@farmaco.ufrj.br

Artigo recebido em 04/11/10, revisado recebido em 04/11/10; aceito em 08/04/11.

Introdução

O tramadol (1RS, 2RS), -2- [(dimetilamino) - metil] -1-(3-metoxifenil) - cloridrato de ciclohexanol é um analgésico sintético de ação central, com eficácia comparável a codeína, pentazocina ou dextropropoxifeno, quando utilizado para o alívio da dor¹. O mecanismo de sua ação analgésica envolve uma combinação de ligação aos receptores μ -opioide. Esse duplo mecanismo de ação levou a uma descrição do tramadol como um agente opioide "atípico"². O tramadol ((\pm)-tramadol) é formulado como uma mistura racêmica de (-) e (+)-tramadol com diferentes ações farmacológicas. O (+)-tramadol possui alta afinidade com receptores μ -opioide, inibindo preferencialmente a recaptção da serotonina e promovendo um aumento na liberação de serotonina. No entanto, o (-)-tramadol possui baixa afinidade com receptor μ -opioide e inibe a recaptção de norepinefrina³. As ações complementares e sinérgicas dos dois enantiômeros melhoram o perfil analgésico da mistura racêmica⁴. O principal metabólito do tramadol, o *O*-desmetiltramadol contribui para o efeito analgésico porque possui uma afinidade 300 vezes maior com receptores μ -opioide que o tramadol⁵. Evidenciou-se que o tramadol afeta os receptores 5-HT⁶, muscarínico^{7,8}, nicotínico⁹, NMDA e GABA_A¹⁰. Além disso, os canais do K⁺ dependente de tensão e do Na⁺ estão envolvidos no efeito antinociceptivo e anestésico do tramadol, respectivamente^{11,12}. Há informações limitadas sobre os efeitos do tramadol em sistemas que não sejam o sistema nervoso central. Ademais, poucos estudos compararam os efeitos do tramadol e seus enantiômeros. Em um estudo anterior, mostramos que o tramadol e seus enantiômeros induziam o relaxamento da aorta pré-contráida de ratos, que foi estereosseletiva de (+)-tramadol¹³. Além disso, mostramos que o tramadol reduziu a contratilidade do músculo cardíaco de ratos¹³. O possível mecanismo envolvido no fenômeno poderia ser a inibição da corrente de cálcio tipo L (I_{Ca-L}), relacionada com a ativação de um receptor que modula a I_{Ca-L} e/ou com um efeito direto no canal.

Para avaliar o papel dos canais de Ca²⁺ tipo L na ação inotrópica negativa cardíaca do tramadol e seus enantiômeros, investigamos os seus efeitos sobre as corrente de Ca²⁺ tipo L (I_{Ca-L}) em miócitos ventriculares de ratos. As comparações entre esses compostos foram conduzidas utilizando a concentração (200 μ M), que tinha induzido efeito inotrópico negativo em músculos cardíacos de ratos¹³.

Métodos

O Comitê de Cuidados e Usos de Animais na Universidade Federal do Rio de Janeiro aprovou os protocolos utilizados.

Isolamento de cardiomiócitos

Os corações de ratos Wistar machos (250-350 g) foram rapidamente removidos e montados em um sistema Langendorff modificado. Eles foram perfundidos retrogradamente através da aorta durante 5 min. a 10 ml.min⁻¹ com solução de Tyrode oxigenada (em mM: 132,0 NaCl, 1,0 CaCl₂, 1,2 MgCl₂, 4,0 KCl, 10,0 HEPES, e 5,0 glicose; pH 7,3) a 33-35 °C. Os

miócitos ventriculares foram enzimaticamente isolados após uma perfusão de 10 min. com solução nominalmente livre de Ca²⁺ contendo colagenase tipo II (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ; 150 U/mL). A enzima foi lavada por perfusão com solução de Tyrode livre de Ca²⁺. Os miócitos isolados foram mantidos em solução de Kb (em mM: 1,0 de MgCl₂, 30,0 de KCl, 10,0 de KH₂PO₄, 10,0 de HEPES, 10,0 de glicose, 70,0 de ácido glutâmico, 0,3 de EGTA, 20,0 de taurina; pH de 7,3) em temperatura ambiente até o uso. Eles foram colocados na câmara de registro montada sobre a mesa de um microscópio invertido (Axiovert 40 CFL, Zeiss) e perfundidos em 5 ml.min⁻¹ com solução de Tyrode a 35 °C.

Estudos eletrofisiológicos

Os registros de correntes Ca²⁺ foram obtidos usando a configuração de célula inteira da técnica de patch-clamp¹⁴ através de um amplificador Axopatch de 200B (Axon Instruments, Cidade de Foster, CA). Os pulsos de tensão foram gerados pelo software pClamp e uma interface digital (Digidata 1200, Axon Instruments, Cidade de Foster, CA). As micropipetas foram preparadas com capilares de vidro borossilicato e apresentavam resistência de 4-7 M Ω , quando preenchidos com solução de pipeta (em mM: 110,0 CsCl, 5,0 ATP-Mg, 0,1 GTP, 10,0 EGTA, 10,0 HEPES e 30,0 TEA-Cl; pH de 7,1). As correntes foram filtradas com filtros de passagem baixa a 1 KHz e digitalizados a 2 KHz. As relações corrente-tensão foram determinadas através de degrau de tensão de 500 ms partindo de um potencial de membrana de -40 mV para potenciais de teste que variavam de -50 a +60 mV, em incrementos de 10 mV durante 500 ms 5 min. antes e depois da perfusão com tramadol de 200 μ M. O valor de pico de I_{Ca-L} foi expresso relativamente à capacitância celular (pA/pF) e apresentado como uma média \pm EPM. As curvas de ativação em estado estacionário (*d*) e inativação em estado estacionário (*f*) foram equipadas com uma função de Boltzmann: *d* (ou *f*) = 1/[1 + exp((V_m - V_{0,5})/k)], na qual V_m era o potencial de membrana, V_{1/2} era o potencial de meia ativação/inativação máxima e k, o fator de inclinação.

Substâncias

O tramadol racêmico e seus enantiômeros foram generosamente doados pela Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos (Itapira, São Paulo, Brasil) e foram dissolvidos em água destilada a uma concentração de estoque de 50 mM. A colagenase tipo II, taurina, cloreto de tetraetilamônio (TEA-Cl), HEPES, ácido glutâmico, EGTA, CsCl, MgATP, GTP e tetrodotoxina (TTX) foram adquiridos da Sigma.

Análise estatística

Os dados foram apresentados como média \pm SEM. As comparações entre grupos foram realizadas utilizando a ANOVA DE UM FATOR com o teste de comparação múltipla de Bonferroni (pares de coluna selecionados). Enquanto as comparações intragrupo foram realizadas utilizando medidas repetidas de ANOVA DE UM FATOR com o teste de comparação múltipla de Bonferroni (pares de coluna selecionados). As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando p < 0,05.

Resultados

Efeito do tramadol e enantiômeros na relação corrente-tensão de I_{Ca-L}

A figura 1A mostra um traçado representativo de correntes de Ca^{2+} internas registrado de miócitos ventriculares de ratos a 0 mV na ausência e presença de (\pm)-tramadol de 200 μ M (Fig. 1 acima) e seus enantiômeros (Fig. 1 meio e abaixo). Os valores médios de I_{Ca-L} em diferentes potenciais (-50 a 60 mV) foram plotados em curvas I-V antes e depois do tratamento com (\pm)- (Fig. 1B acima), (+)- (Fig. 1B no meio) e (-)-tramadol (Fig. 1B abaixo). Após a perfusão de cada enantiômero, a amplitude do pico de I_{Ca-L} foi significativamente ($p < 0,05$) reduzida em potenciais mais despolarizados do que -20 mV, enquanto, com o (\pm)-tramadol, a redução foi significativa em potenciais mais positivos do que 0 mV ($p < 0,05$). O (\pm)-tramadol inibiu significativamente a amplitude do pico de I_{Ca-L} que foi reduzido em $33,7 \pm 7,2\%$ a 0 mV. Não houve diferença na inibição da corrente de pico induzida pela enantiômeros, (+)-tramadol ($64,4 \pm 2,8\%$) e (-)-tramadol ($68,9 \pm 5,8\%$). No entanto, a inibição da I_{Ca-L} induzida pelos

dois enantiômeros foi significativamente maior do que a induzida pela (\pm)-tramadol ($p < 0,01$ vs (+)-tramadol; $p < 0,001$ (-)-tramadol). A redução foi parcialmente revertida após uma lavagem de 10 minutos.

Efeito do tramadol e enantiômeros na ativação de I_{Ca-L}

As curvas de ativação foram construídas com base na relação corrente-tensão, dividindo a amplitude da I_{Ca-L} em cada potencial pela força motriz (Fig. 2). O (\pm)-tramadol diminuiu o $V_{1/2}$ da curva de ativação em estado estacionário da I_{Ca-L} sem mudanças no valor de k. Na condição de controle, $V_{1/2}$ era de $-17,5 \pm 2,1$ mV e k era de $4,2 \pm 0,2$ mV e, na presença do (\pm)-tramadol, $V_{1/2}$ era de $-21,0 \pm 2,2$ mV ($p < 0,05$) e k era de $3,6 \pm 0,3$ mV ($p > 0,05$). Por outro lado, os enantiômeros não alteraram a curva de ativação em estado estacionário de I_{Ca-L} (Tab. 1).

* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$ comparado com o controle no mesmo grupo (medidas repetidas de ANOVA DE UM FATOR com pares de coluna selecionados comparados com o teste de Bonferroni). # $p < 0,01$, & $p < 0,001$ comparado com (\pm)-tramadol, comparação entre grupos (ANOVA DE UM FATOR com teste de comparação

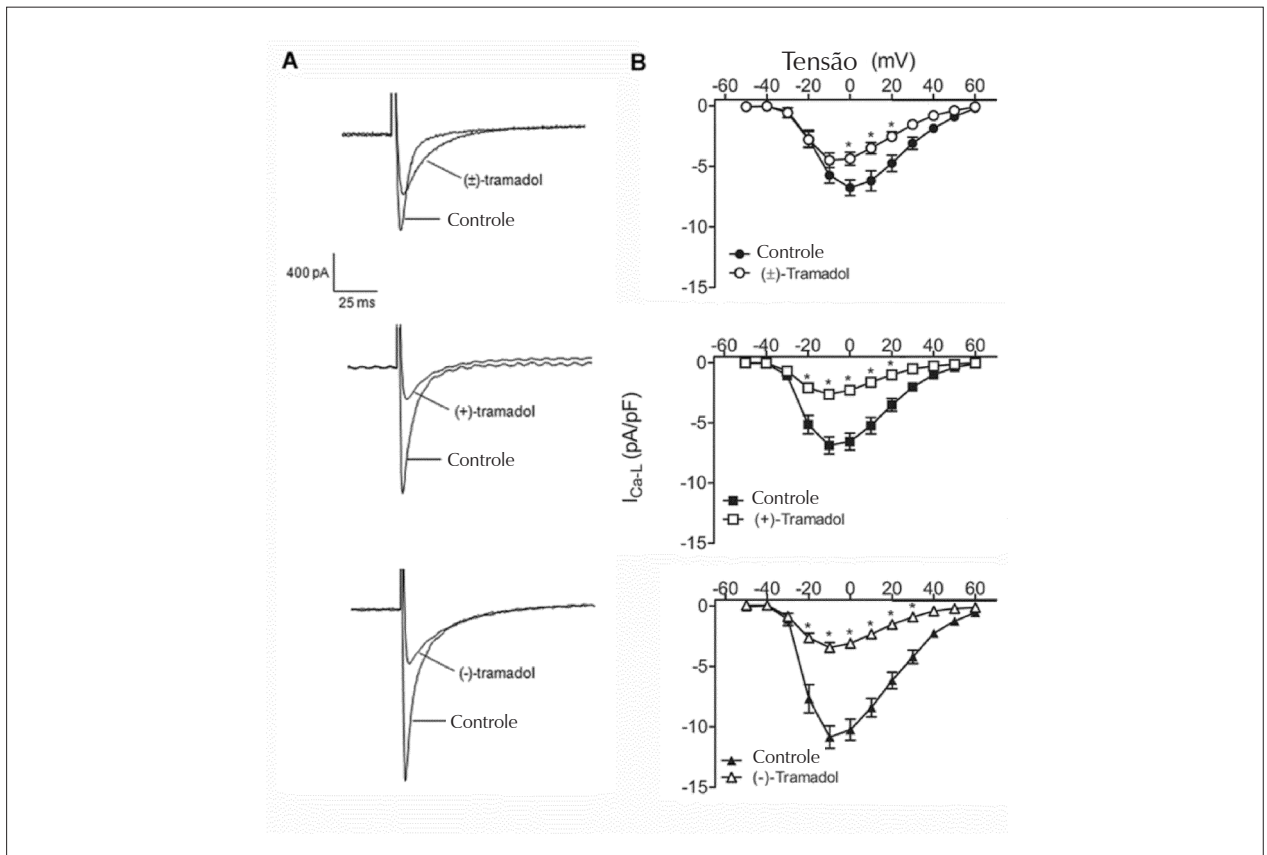


Fig. 1 – Efeitos do tramadol e enantiômeros na corrente de Ca^{2+} tipo L (I_{Ca-L}) em miócitos ventriculares isolados de ratos. Em A, a corrente representativa traça um pulso despolarizante de -40 a 0 mV, na Ausência e Presença de (\pm) - (superior), (+) - (média) e (-)-tramadol (inferior). Em B, as relações corrente-tensão de I_{Ca-L} obtidas antes e depois de 5 min. de perfusão (\pm) - (superior), (+) - (média) e (-)-tramadol (inferior) (200 mM) de -50 a * $p < 0,05$ vs. condição de controle. As comparações intragrupo foram realizadas utilizando medidas repetidas de ANOVA DE UM FATOR com o teste de comparação múltipla de Bonferroni (pares de coluna selecionados).

múltipla de Bonferroni de todos os pares de colunas). $V_{1/2}$ - potencial de meia ativação/inativação máxima; k - fator de inclinação.

Efeito do tramadol e enantiômeros na ativação de I_{Ca-L}

A inativação em estado estacionário da I_{Ca-L} foi medida utilizando um protocolo de pulso duplo clássico. Foram aplicadas etapas de pré-condicionamento de 1600 ms, de -60 a +60 mV, em intervalos de 10 mV a partir de um potencial de membrana de -40 mV, seguidas de um pulso de teste de 600 ms a 0 mV. A corrente de pico induzida por pulsos de teste foi normalizada à corrente máxima e plotada relativamente ao potencial de pré-condicionamento. O (\pm)-tramadol e seus enantiômeros alteraram as curvas de inativação em estado estacionário para potenciais mais negativos (Fig. 3) e mudou o $V_{1/2}$ da inativação (Tab. 1).

Na verdade, o $V_{1/2}$ da inativação dos enantiômeros era significativamente diferente quando comparado com (\pm)-tramadol ((+)-tramadol $p < 0,01$ e (-)-tramadol $p < 0,001$ comparado com (\pm)-tramadol). No entanto, apenas o (-)-tramadol alterou o valor de k (controle, $3,8 \pm 0,1$ mV; (-)-Tramadol, $4,9 \pm 0,3$ mV; $p < 0,01$). Não foram observadas diferenças na média do valor de k entre os grupos.

Efeito do tramadol e enantiômeros na recuperação de I_{Ca-L} da inativação

Os efeitos do (\pm)-tramadol e seus enantiômeros na cinética de recuperação da I_{Ca-L} da inativação foram estudados utilizando um protocolo de pulso duplo que consiste em um pré-pulso de 500 ms a 0 mV, seguido de um pulso de teste de 500 ms a 0 mV, depois de um intervalo interpulsos variável (0 a 2.500 ms) de um potencial de membrana de -40 mV, a cada 10 s. O (\pm)- e (+)-tramadol alterou a curva de recuperação dependente do tempo para a direita e retardou a recuperação da inativação (Fig. 4). A recuperação da inativação poderia ser ajustada a um exponencial simples, onde a constante de tempo (t) era aumentada de $175,6 \pm 18,6$ ms a $305,0 \pm 32,9$ ms ($p < 0,01$) para (\pm)-tramadol e de $248,1 \pm 28,1$ ms a $359,0 \pm 23,8$ ms ($p < 0,05$) para (+)-tramadol. O (-)-tramadol não modificou o período para a recuperação da I_{Ca-L} . Não foram observadas diferenças na média do valor da constante de tempo (t) entre os grupos.

Efeito do agonista do receptor μ -opióide (DAMGO) na I_{Ca-L} dos cardiomiócitos dos ratos

No presente trabalho, nossos resultados mostraram que o tramadol e seus enantiômeros inibem a I_{Ca-L} . O possível

Tabela 1 – Efeitos do tramadol e seus enantiômeros na cinética de ativação e inativação da I_{Ca-L}

	Ativação		Inativação	
	$V_{1/2}$ (mV)	k (mV)	$V_{1/2}$ (mV)	k (mV)
Controle	$-17,5 \pm 2,1$	$4,2 \pm 0,2$	$-35,9 \pm 1,4$	$3,8 \pm 0,4$
(\pm)-Tramadol	$-21,0 \pm 2,2^*$	$3,6 \pm 0,3$	$-39,8 \pm 1,4^*$	$4,0 \pm 0,3$
Controle	$-21,9 \pm 1,7$	$3,8 \pm 0,3$	$-42,3 \pm 1,2$	$3,6 \pm 0,4$
(+)-Tramadol	$-24,2 \pm 1,3$	$3,8 \pm 0,2$	$-47,3 \pm 1,5^{***\#}$	$4,7 \pm 0,4$
Controle	$-20,9 \pm 1,3$	$3,8 \pm 0,3$	$-41,1 \pm 1,3$	$3,8 \pm 0,1$
(-)-Tramadol	$-22,9 \pm 1,7$	$4,0 \pm 0,3$	$-50,2 \pm 1,5^{**\&}$	$4,9 \pm 0,3^{**}$

* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$ comparado com o controle no mesmo grupo (medidas repetidas de ANOVA DE UM FATOR com pares de coluna selecionados comparados com o teste de Bonferroni). # $p < 0,01$, & $p < 0,001$ comparado com (\pm)-tramadol, comparação entre grupos (ANOVA DE UM FATOR com teste de comparação múltipla de Bonferroni de todos os pares de colunas). $V_{1/2}$ - potencial de meia ativação/inativação máxima; k - fator de inclinação.

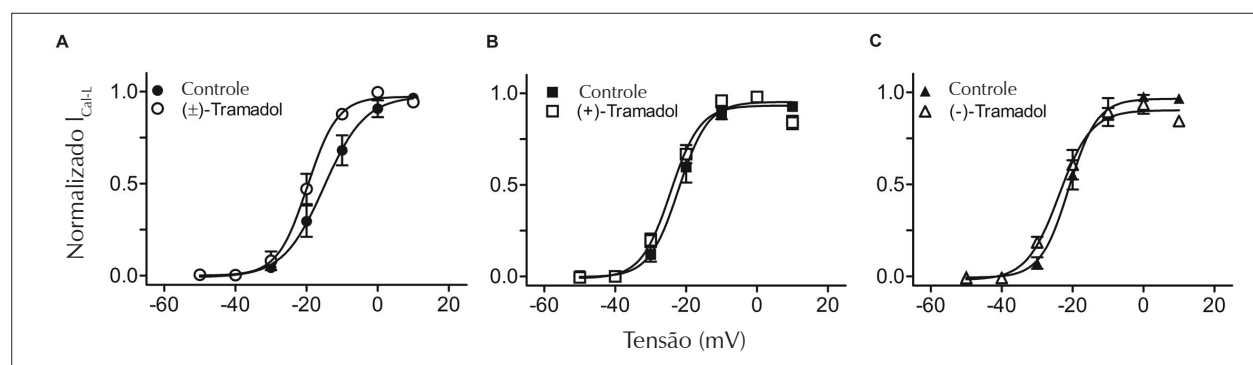


Fig. 2 – Efeitos do tramadol e enantiômeros na cinética de acionamento em estado estacionário. As curvas de ativação de tensão de I_{Ca-L} foram obtidas a partir da relação corrente-tensão, na ausência e presença de $200 \mu\text{M}$ (\pm)-, (+)- e (-)-tramadol (A, B e C, respectivamente). Apenas o (\pm)-tramadol alterou a tensão da curva de meia ativação. As comparações intragrupo foram realizadas utilizando medidas repetidas de ANOVA DE UM FATOR com o teste de comparação múltipla de Bonferroni (pares de coluna selecionados).

mecanismo envolvido nesse efeito poderia ser um resultado da ativação dos receptores μ -opioides. Para verificar essa hipótese, efetuamos testes para averiguar se o agonista do receptor μ -opioides (DAMGO) modulava a I_{Ca-L} em cardiomiócitos de ratos. Dessa forma, a figura 5 mostra que o DAMGO não tem nenhum efeito sobre as correntes de cálcio ativadas por pulsos despolarizantes a 0 mV (Controle: $-449,7 \pm 4,4$ pA vs DAMGO: $-416,9 \pm 2,7$ pA; $n = 3$; $p > 0,05$).

Discussão

No presente trabalho, nossos dados mostraram a diferença na eficácia dos enantiômeros tramadol para inibir a I_{Ca-L} (~60%) quando comparados com a mistura racêmica (~30%). Em contraste, no nosso trabalho anterior, o efeito inotrópico negativo sobre os músculos papilares de ratos observados a 200 μ M apresentou a seguinte ordem de potência (IC50): (+)-tramadol > (-)-tramadol > (\pm)-tramadol¹³. Essa diferença entre as respostas da célula e do tecido poderia

ser devida a uma possível inibição da recapturação de monoamina pelo tramadol e seus enantiômeros no músculo papilar estimulado eletricamente. Demonstrou-se que a liberação acionada eletricamente da noradrenalina pelas terminações nervosas simpáticas no músculo cardíaco isolado e a amplitude da contração são diminuídas por anestésicos locais¹⁵. Diferentes atividades do tramadol foram designadas como estereosseletivas, incluindo a ativação do receptor opioide^{3,16}, a inibição da recapturação de monoamina^{17,18}, o efeito analgésico³ e o relaxamento vascular^{13,19}. No entanto, o presente estudo demonstrou que os enantiômeros do tramadol (200 μ M) diminuíram I_{Ca-L} (~60%), indicando um bloqueio específico de um não enantiômero de canais de Ca^{2+} do tipo L. O tramadol racêmico produziu uma inibição de menor porte da I_{Ca-L} (~30%) quando comparado aos seus enantiômeros, o que poderia ser correlacionado com a pequena potência do racêmico na redução da contratilidade cardíaca¹³. O tramadol e os enantiômeros alteraram de maneira diferente a cinética do I_{Ca-L} . O (\pm)- e (+)-tramadol

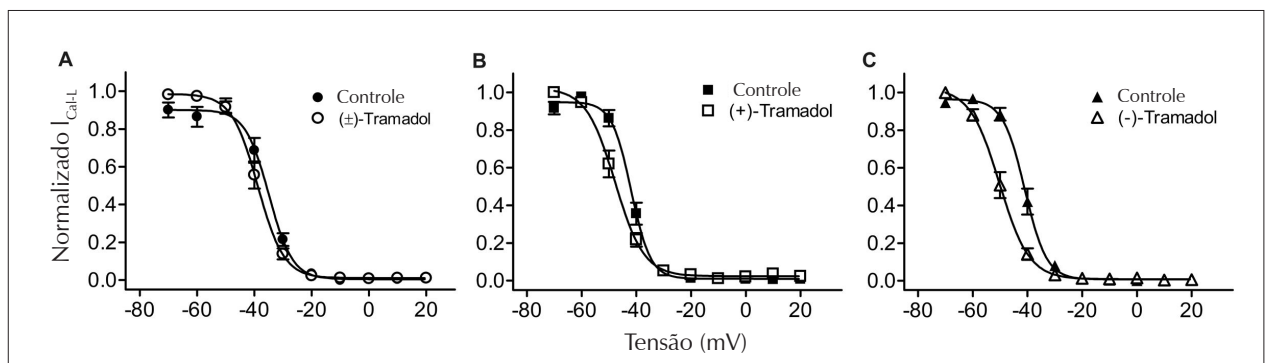


Fig. 3 – Efeitos do tramadol e enantiômeros na cinética de inativação em estado estacionário. As curvas de inativação de tensão de I_{Ca-L} foram obtidas utilizando um protocolo de pulso duplo, que consistia nos pulsos de tensão de condicionamento para potenciais de membrana de -60 a 60 mV seguido por um pulso de teste a 0 mV. As correntes de pulso de teste foram normalizadas a um valor máximo. Em A, B e C, as curvas de inativação em estado estacionário de I_{Ca-L} foram obtidas na ausência e presença de (\pm)-, (+)- e (-)-tramadol (200 μ M), respectivamente. Note a alteração da curva de inativação em estado estacionário de I_{Ca-L} para potenciais negativos. As comparações intragrupo foram realizadas utilizando medidas repetidas de ANOVA DE UM FATOR com o teste de comparação múltipla de Bonferroni (pares de coluna selecionados).

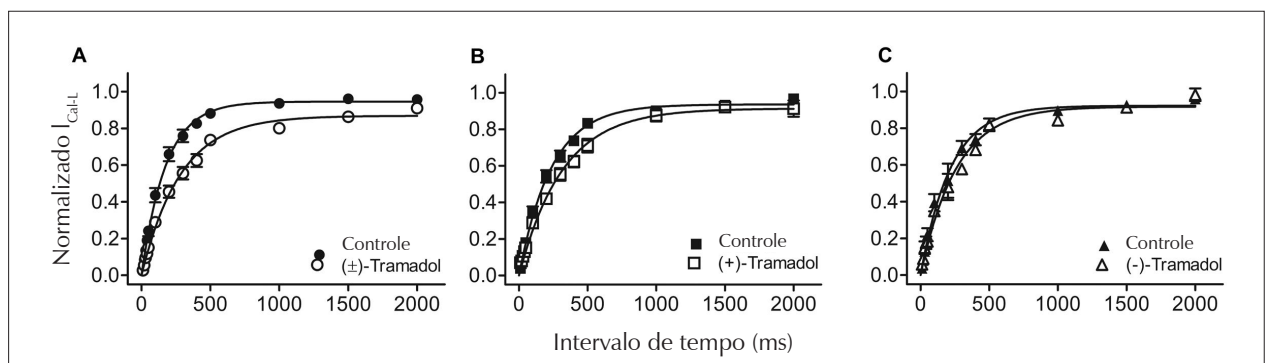


Fig. 4 – Efeitos do tramadol e enantiômeros na recuperação de I_{Ca-L} da inativação. A recuperação de I_{Ca-L} da inativação foi determinada utilizando um protocolo de pulso duplo, que consistia em dois pulsos a 0 mV com um intervalo interpulsos variável (0-2.500 ms), na ausência e presença de 200 μ M (\pm)-, (+)- e (-)-tramadol (A, B e C, respectivamente). O período para recuperação de I_{Ca-L} foi significativamente alterado por (\pm)-, (+)-tramadol. As comparações intragrupo foram realizadas utilizando medidas repetidas de ANOVA DE UM FATOR com o teste de comparação múltipla de Bonferroni (pares de coluna selecionados).

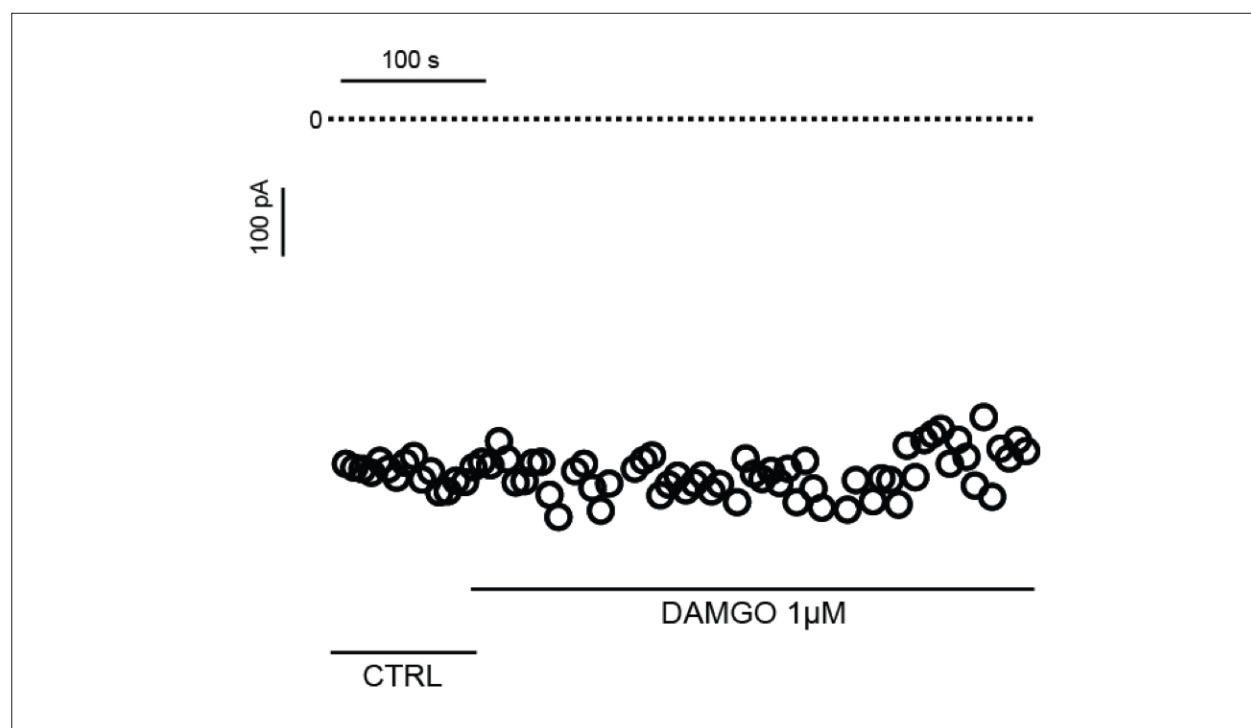


Fig. 5 – O agonista do receptor μ -opióide (DAMGO) não tem nenhum efeito na I_{Ca-L} . A figura 5 mostra um experimento representativo no qual o período da I_{Ca-L} foi registrado por pulsos despolarizantes a 0 mV na condição de controle e após DAMGO. O DAMGO não modifica a I_{Ca-L} .

alterou a curva de inativação em estado estacionário da I_{Ca-L} para os potenciais de membrana mais negativos e retardou significativamente a recuperação de I_{Ca-L} da inativação. O (-)-tramadol alterou substancialmente apenas a inativação da I_{Ca-L} . Os efeitos do tramadol na I_{Ca-L} podem estar relacionados com a ativação de um receptor que modula a I_{Ca-L} e/ou a um efeito direto sobre o canal. No entanto, o efeito do tramadol na I_{Ca-L} parece não estar relacionado à ativação dos receptores opióides. O tramadol se liga preferencialmente a m-receptores, que foram demonstradas estar ausentes no coração de mamíferos²⁰⁻²³. De fato, os nossos resultados não mostraram efeito do antagonista de m-receptor DAMGO na I_{Ca-L} cardíaca. Além disso, foi demonstrado que os efeitos cardíacos dos opióides poderiam ser ou não dependentes de receptores opióides. Constatou-se que os efeitos da morfina sobre as correntes iônicas em miócitos cardíacos eram independentes do receptor opióide²⁴ ou eram mediados por receptores de d e k²⁵. No entanto, reconhece-se que o seu efeito cardioprotetor advém da ativação de receptores de d^{26,27}. Estudos vêm mostrando que os opióides como o dextropropoxifeno, petidina e a leucina encefalina reduzem a I_{Ca-L} mas que apenas a redução induzida pelo agonista do receptor de d (leucina encefalina) era bloqueada pela naxolona^{28,29}. Os efeitos do tramadol em outras correntes iônicas também sugere um efeito direto nos canais de Ca^{2+} do tipo L. Haeseler e cols.¹² mostraram que o tramadol, o sufentanil e o fentanil, mas não a morfina, bloqueiam os canais de Na^+ neuronais expressos heterogeneamente por $NaV_{1.2}$. É importante notar que a potência para bloquear a corrente de sódio era independente da potência do respectivo

receptor opióide do composto. Também há relatos de que o tramadol bloqueia a corrente de K^+ retificadora tardia (I_{KIDR}) nas células neuronais NG108-15 de uma forma dependente de concentração³⁰. Conforme observado em nosso estudo para a I_{Ca-L} , o tramadol alterou a curva de inativação em estado estacionário da IK_{KIDR} para potenciais mais negativos³⁰.

Conclusão

A eficácia dos enantiômeros do tramadol na inibição da I_{Ca-L} foi o dobro do observado com o (\pm)-tramadol e esse efeito parece não estar relacionado com a ativação de receptores opióides.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda. (BR), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, BR), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes, BR), Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB, BR), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj, BR) pelo apoio financeiro e pelas bolsas de estudos da Capes (para JMR) e CNPq (para GZS, RTS). Nenhum dos autores possui qualquer conflito de interesse ou interesse financeiro na divulgação.

Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi parcialmente financiado pelo CNPq, CAPES e FAPERJ.

Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Doutorado de Juliana M. Raimundo pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Referências

1. Raffa RB, Friderichs E, Reimann W, Shank RP, Codd EE, Vaught JL. Opioid and non-opioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an atypical opioid analgesic. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;260(1):275-85.
2. Garrido MJ, Valle M, Campanero MA, Calvo R, Trocóniz IF. Modeling of the in vivo antinociceptive interaction between an opioid agonist, (+)-O-desmethyltramadol, and a monoamine reuptake inhibitor, (-)-O-desmethyltramadol, in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;295(1):352-9.
3. Raffa RB, Friderichs E, Reimann W, Shank RP, Codd EE, Vaught JL, et al. Complementary and synergistic antinociceptive interaction between the enantiomers of tramadol. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993;267(1):331-40.
4. Grond S, Sablotzki A. Clinical pharmacology of tramadol. *Clin Pharmacokinet*. 2004;43(13):879-923.
5. Gillen C, Haurand M, Kobelt DJ, Wnendt S. Affinity, potency and efficacy of tramadol and its metabolites at the cloned human m-opioid receptor. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2000;362(2):116-21.
6. Ogata J, Minami K, Uezono Y, Okamoto T, Shiraishi M, Shigematsu A, et al. The inhibitory effects of tramadol on 5-hydroxytryptamine type 2c receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Anesth Analg*. 2004;98(5):1401-6.
7. Shiraishi M, Minami K, Uezono Y, Yanagihara N, Shigematsu A. Inhibition by tramadol of muscarinic receptor-induced responses in cultured adrenal medullary cells and in *Xenopus laevis* oocytes expressing cloned M1 receptors. *J Exp Pharmacol Ther*. 2001;299(1):255-60.
8. Shiga Y, Minami K, Shiraishi M, Uezono Y, Murasaki O, Kaibara M, et al. The inhibitory effects of tramadol on muscarinic receptor-induced responses in *Xenopus* oocytes expressing cloned M3 receptors. *Anesth Analg*. 2002;95(5):1269-73.
9. Shiraishi M, Minami K, Uezono Y, Yanagihara N, Shigematsu A, Shibuya I. Inhibitory effects of tramadol on nicotinic acetylcholine receptors in adrenal chromaffin cells and in *Xenopus* oocytes expressing $\alpha 7$ receptors. *Br J Pharmacol*. 2002;136(2):207-16.
10. Hara K, Minami K, Sata T. The effects of tramadol and its metabolite on glycine, g-aminobutyric acid_A and N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Anesth Analg*. 2005;100(5):1400-5.
11. Yalcin I, Aksu F. Involvement of potassium channels and nitric oxide in tramadol antinociception. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005;80(1):69-75.
12. Haeseler G, Foadi N, Ahrens J, Dengler R, Hecker H, Leuwer M. Tramadol, fentanyl and sufentanil but not morphine block voltage-operated sodium channels. *Pain*. 2006;126(1-3):234-44.
13. Raimundo JM, Sudo RT, Pontes LB, Antunes F, Trachez MM, Zapata-Sudo G. In vitro and in vivo vasodilator activity of racemic tramadol and its enantiomers in Wistar rats. *Eur J Pharmacol*. 2006;530(1-2):117-23.
14. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*. 1981;391(2):85-100.
15. Joseph A, Montague R, Effendi AR, Urbanska RA, Vogel S, Winnie AP, et al. Effect of bupivacaine and levobupivacaine on exocytotic norepinephrine release from rat atria. *Anesthesiology*. 2005;102(5):977-84.
16. Lai J, Ma SW, Porreca F, Raffa RB. Tramadol, M1 metabolite and enantiomer affinities for cloned human opioid receptors expressed in transfected HN9.10 neuroblastoma cells. *Eur J Pharmacol*. 1996;316(2-3):369-72.
17. Bamigbade TA, Davidson C, Langford RM, Stamford JA. Actions of tramadol, its enantiomers and principal metabolite, O-desmethyltramadol, on serotonin (5-HT) efflux and uptake in the rat dorsal raphe nucleus. *Br J Anaesth*. 1997;79(3):352-56.
18. Halfpenny DM, Callado LF, Hopwood SE, Bamigbade TA, Langford RM, Stamford JA. Effects of tramadol stereoisomers on norepinephrine efflux and uptake in the rat locus coeruleus measured by real time voltammetry. *Br J Anaesth*. 1999;83(6):909-15.
19. Shin IW, Sohn JT, Park KE, Chang KC, Choi JY, Lee HK, et al. A supraclinical dose of tramadol stereoselectively attenuates endothelium-dependent relaxation in isolated rat aorta. *Anesth Analg*. 2006;103(2):366-71.
20. Krumins SA, Faden AI, Feuerstein G. Opiate binding in rat hearts: modulation of binding after hemorrhagic shock. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985;127(1):120-8.
21. Ventura C, Bastagli L, Bernardi P, Calderara CM, Guarnieri C. Opioid receptors in rat cardiac sarcolemma: effect of phenylephrine and isoproterenol. *Biochim Biophys Acta*. 1989;987(1):69-74.
22. Zhang WM, Jin WQ, Wong TM. Multiplicity of kappa opioid receptor binding in the rat cardiac sarcolemma. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28(7):1547-54.
23. Wittert G, Hope P, Pyle D. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;218(3):877-81.
24. Hung CF, Tsai CH, Su MJ. Opioid receptor independent effects of morphine on membrane currents in single cardiac myocytes. *Br J Anaesth*. 1998;81(6):925-31.
25. Xiao GS, Zhou JJ, Wang GY, Cao CM, Li GR, Wong TM. In vitro electrophysiologic effects of morphine in rabbit ventricular myocytes. *Anesthesiology*. 2005;103(2):280-6.
26. Ela C, Barg J, Vogel Z, Hasin Y, Eilam Y. Distinct components of morphine effects on cardiac myocytes are mediated by the k and d opioid receptors. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29(2):711-20.
27. McPherson BC, Yao Z. Signal transduction of opioid-induced cardioprotection in ischemia-reperfusion. *Anesthesiology*. 2001;94(6):1082-8.
28. Xiao RP, Spurgeon HA, Capogrossi MC, Lakatta EG. Stimulation of opioid receptors on cardiac ventricular myocytes reduces L type Ca²⁺ channel current. *J Mol Cell Cardiol*. 1993;25(6):661-6.
29. Wu C, Fry CH, Henry J. The mode of action of several opioids on cardiac muscle. *Exp Physiol*. 1997;82(2):261-72.
30. Tsai TY, Tsai YC, Wu SN, Liu YC. Tramadol-induced blockade of delayed rectifier potassium current in NG108-15 neuronal cells. *Eur J Pain*. 2006;10(7):597-601.