

Efeito analgésico de longa duração da dipirona sobre a hiperalgesia persistente induzida pela constrição do nervo ciático em ratos: participação do óxido nítrico

Fábio José Reis*, Noeli Pereira Rocha

Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, IBB/UNESP, Botucatu - SP

O efeito analgésico de longa duração da dipirona foi avaliado em um modelo de dor neuropática assim como a participação da via óxido nítrico-GMPc neste mecanismo analgésico. Uma única administração intraplantar de dipirona (80 µg), no 14º dia após a instalação da hiperalgesia neuropática induzida pela constrição do nervo ciático exerceu um efeito analgésico, significativo e de longa duração. A inibição da óxido nítrico sintetase com L-NAME (50 ou 100 µg/pata), ou do óxido nítrico (NO) endógeno com hemoglobina (10 ou 30 µg/pata), bloquearam o desenvolvimento do efeito analgésico da dipirona. A L-arginina (500 µg/pata) reverteu o efeito do L-NAME. Cloreto de metiltionínio (azul de metileno) (500 µg/pata), ODQ (50 µg/pata) (bloqueadores da guanilil ciclase) ou glibenclamida (100, 200 ou 300 µg/pata) (bloqueador de canais de K⁺ sensíveis ao ATP) inibiram o efeito analgésico da dipirona. O nitroprussiato de sódio administrado no 14º dia após a instalação da hiperalgesia neuropática também exerceu efeito analgésico de longa duração, semelhante ao observado com a dipirona. Sugerimos que a ação analgésica periférica e de longa duração da dipirona, neste modelo experimental, ocorra devido a provável dessensibilização dos nociceptores, envolvendo a via óxido nítrico – GMPc e canais de K⁺ sensíveis ao ATP.

Unitermos

- Hiperlgesia neuropática
- Constrição do nervo ciático
- Dipirona
- Óxido nítrico

*Correspondência:

F. J. Reis
Departamento de Cirurgia e Ortopedia
Faculdade de Medicina - UNESP
18618-970 Botucatu - SP, Brazil
E-mail: reisfj@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

A dor neuropática ou crônica pode ser resultante de doenças ou injúrias que acometem diretamente o sistema nervoso periférico, assim como a medula espinhal ou o sistema nervoso central (Devor, Seltzer, 1999). O dano ao tecido nervoso resulta em aumento da sensibilidade aos estímulos dolorosos e também os estímulos

inócuos passam a serem percebidos como dolorosos. Esta hiperlgesia neuropática pode ser devida, em parte, às alterações centrais ou espinhais, porém um componente relevante provavelmente seja a sensibilização dos aferentes primários periféricos (Tracey, Walker, 1995; Baron, 2000). Há evidências da participação do óxido nítrico (NO) na dor neuropática, uma vez que o NO poderia desempenhar um papel no processo de faci-

litação espinal pró-nociceptiva, contribuindo com a geração e manutenção da hiperalgisia neuropática (Yamamoto, Shimoyama, 1993; Meller *et al.*, 1994). Perifericamente, no modelo de dor neuropática por constrição do nervo ciático (CNC), é observado aumento da síntese de NO nas fibras distais à lesão e no neuroma (Levy *et al.*, 1999). Segundo George *et al.* (2005), há aumento dos níveis locais do fator de necrose tumoral (TNF- α), a partir do primeiro dia pós-cirúrgico, o qual permanece até o vigésimo-oitavo dia. No segmento distal à lesão do nervo, ocorre também aumento significativo e de longa duração dos níveis de interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina 10 (IL-10), provavelmente mediados pelos receptores NMDA (Kleinschnitz *et al.*, 2004; Kleinschnitz *et al.*, 2005).

A eficácia dos antiinflamatórios não-esteróides no tratamento da hipersensibilidade que se segue após a injúria de nervos periféricos é controversa, sendo as respostas clínicas consideradas modestas (Fields *et al.*, 1999; MacPherson, 2002). No entanto, Marquez e Ferreira (1987) relataram que infusões locais de dipirona eram capazes de induzir analgesia de longa duração em pacientes portadores de dores neuropáticas intratáveis. Além disso, uma única administração intraplantar de dipirona também foi capaz de bloquear totalmente a hiperalgisia persistente induzida por PGE₂ em ratos (Ferreira *et al.*, 1990). Nos trabalhos citados anteriormente, a administração sistêmica de dipirona não foi efetiva para induzir efeito analgésico significativo nestes modelos de dor crônica.

Embora os fármacos antiinflamatórios e analgésicos não-esteróides atuem inibindo a ciclooxigenase e conseqüentemente a síntese de prostaglandinas (Vane, 1971) e deste modo possam aliviar significativamente as dores de origem inflamatória, este mecanismo de ação não parece efetivo no controle da dor neuropática (Fields *et al.*, 1999). Entretanto, para a dipirona, tem sido sugerido mecanismo de ação analgésico distinto dos outros fármacos antiinflamatórios não-esteróides do tipo do ácido acetilsalicílico. A dipirona parece atuar exercendo bloqueio direto da hiperalgisia inflamatória por PGE₂, supostamente promovendo dessensibilização dos nociceptores periféricos (Lorenzetti, Ferreira, 1985). Este mecanismo de dessensibilização, provavelmente envolve a ativação da via óxido-nítrico – GMPc no nociceptor (Duarte *et al.*, 1992; Lorenzetti, Ferreira, 1996). A ação analgésica de diversos agentes, tais como a morfina, a nitroglicerina, o diclofenaco, a nimesulida, o meloxicam e o ceterolaco também parece depender da ativação endógena da via óxido-nítrico – GMPc para a dessensibilização do nociceptor (Ferreira *et al.*, 1991; Ferreira *et al.*, 1992;

Tonussi, Ferreira, 1994; Islas-Caderra *et al.*, 1999; Aguirre-Bañuelos, Granados-Soto, 2000; Lázaro-Ibáñez *et al.*, 2001).

Portanto, uma vez que o modelo de neuropatia por constrição do nervo ciático em ratos parece simular a condição clínica de compressão crônica de nervos, tais como as que ocorrem na neuropatia por aprisionamento do nervo ciático e seus ramos ou na irritação da raiz espinal por hérnia de disco lombar (Zimmermann, 2001), o objetivo deste trabalho foi o de estabelecer o perfil analgésico da dipirona administrada localmente neste modelo de neuropatia e o possível envolvimento da ativação endógena e periférica da via NO-GMPc.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos utilizados nos experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu, São Paulo, Brasil.

Animais

Ratos machos Wistar (UNESP, Brasil), pesando entre 180 e 200 g. Os animais foram acondicionados em gaiolas (n = 4), mantidos em um ciclo claro escuro de 12 horas, temperatura ambiente de 25 ± 1 °C e acesso à ração e água *ad libitum*.

Procedimento cirúrgico

A neuropatia foi induzida nos animais de acordo com o método descrito por Bennett e Xie (1988). Sob anestesia com pentobarbital sódico (45 mg/kg, intraperitoneal), o nervo ciático direito do rato foi exposto e um segmento de 5 – 7 mm foi dissecado. Quatro ligaduras com fio de sutura cat-gut cromado 4-0 tipo C, frouxas o suficiente para não interromper a vascularização epineural superficial, com intervalos de 1 mm entre si, foram realizadas ao redor do nervo. O tecido incisionado foi suturado em camadas, com fio de sutura de algodão 4-0. Em todos os animais, o nervo ciático do lado esquerdo também foi exposto e manipulado, porém não foram colocadas as ligaduras, sendo que este constituiu o lado controle da cirurgia (falso-operado).

Teste nociceptivo

O efeito antinociceptivo dos compostos testados foi avaliado através do teste de pressão na pata, descrito por Randall e Sellito (1957). Um aumento contínuo da pressão

mecânica foi exercido pelo aparelho Basile Analgesymeter® (Ugo Basile, Itália), sobre o dorso da pata traseira do animal, até o reflexo de retirada ser observado. O limiar nociceptivo é definido como a força em gramas aplicada à pata do animal no momento em que este exibe o reflexo de retirada. O limiar sensorial basal foi mensurado em cada grupo de animais, imediatamente no pré-operatório e nos tempos de 7, 14, 21, 28 dias de pós-operatório. Os animais exibiram hiperalgesia mecânica já no sétimo dia de pós-operatório.

Fármacos

Os seguintes compostos foram testados: anti-inflamatório não-esteróide: dipirona sódica (Dip) (Hoechst®); inibidor da óxido nítrico sintase (NOS), éster metílico da L^γ-nitro-L-arginina (L-NAME) (Sigma, St. Louis, MO). L-arginina (Sigma, St. Louis, MO); inativador do óxido nítrico endógeno, a hemoglobina (Hb) (Sigma, St. Louis, MO); cloreto de metiltionínio (MB) (Merck) e a ¹H-[1,2,4]oxadiazol-[4,3-a]quinolaxin-1-one (ODQ) (Sigma, St. Louis, MO), dois inibidores da guanilil ciclase (GC); bloqueador de canais de potássio sensíveis ao ATP, glibenclamida (GLY) (Sigma, St. Louis, MO); doador de NO, o nitroprussiato de sódio (SNP) (Sigma, St. Louis, MO). Os fármacos foram dissolvidos em NaCl a 0,9%, exceto a glibenclamida, a qual foi dissolvida em Tween 80.

A administração dos fármacos foi realizada por via intra-plantar (i.pl.), na pata traseira direita dos animais. O volume administrado em todos os tratamentos foi de 0,1 mL pata⁻¹. Administrações de solução salina ou veículo foram realizadas nos grupos controles. Os tratamentos foram realizados no 14º dia pós cirúrgico.

Análise estatística

Os resultados foram submetidos ao teste de Análise de Variância (ANOVA, para comparação de mais de duas amostras), seguidos do teste de Tukey-Kramer, para comparações múltiplas. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média. Os níveis de significância foram **p<0,01 e *p<0,05.

RESULTADOS

Após a cirurgia de constrição do nervo ciático, observa-se em todos os animais um aumento na intensidade de hiperalgesia mecânica, avaliada a partir do 7º dia após a CNC. Este estado de hiperalgesia neuropática permanece por, no mínimo, 28 dias.

Efeito do bloqueio da síntese de NO sobre o desenvolvimento da analgesia de longa duração da dipirona em ratos com hiperalgesia neuropática

Uma única administração intraplantar de dipirona (80 mg pata⁻¹) (Ferreira *et al.*, 1990) no 14º dia após a CNC induziu um efeito analgésico significativo, de longa duração (P<0,01) no 28º dia após a CNC, em relação ao grupo controle (Sal: 254,0±28,0 g; Dip: 62,0±12,0 g). A administração concomitante de L-NAME (50 - 100 µg pata⁻¹) e dipirona (80 mg pata⁻¹), no 14º dia após a CNC, promoveu redução dose-dependente no desenvolvimento da analgesia de longa duração da dipirona, sendo observada redução significativa no 28º dia após a CNC (Dip+L-NAME: 254,0±14,0 g e Dip: 62,0±12,0 g; P<0,01). A administração de L-NAME (50 mg pata⁻¹) no 14º dia após a CNC não alterou o desenvolvimento da hiperalgesia neuropática (Figura 1).

A L-arginina (500 µg pata⁻¹) bloqueou o efeito do L-NAME (50 mg pata⁻¹) (P<0,05), possibilitando a instalação da analgesia de longa duração da dipirona (Dip: 114,0±14,0 g; Dip+L-NAME: 246,0±18,0 g; Dip+L-NAME+L-Arg: 116,0±10,0 g) (Figura 2). Os fármacos foram administrados concomitantemente no 14º dia após a CNC, pela via intraplantar. A administração de L-Arg (500 mg pata⁻¹) não alterou o desenvolvimento da hiperalgesia neuropática (Figura 2).

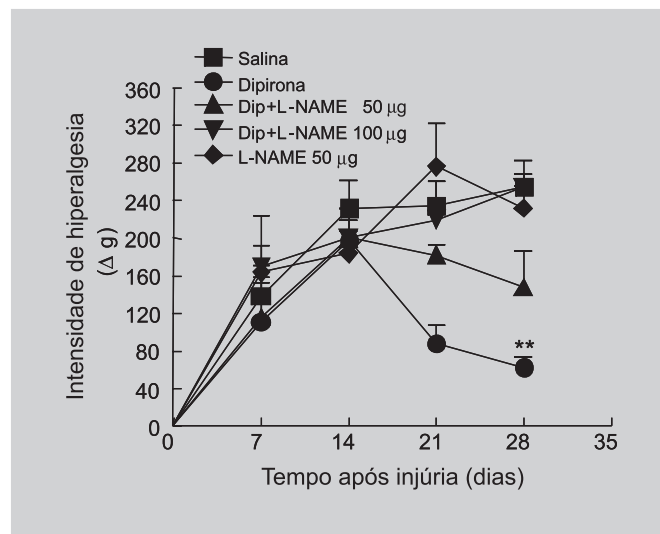


FIGURA 1 - Efeito da administração intraplantar de dipirona (80 µg pata⁻¹) e/ou um bloqueador da NO sintase, L-NAME (50-100 µg pata⁻¹) sobre o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica de ratos submetidos a CNC no teste de pressão da pata (n=6 por grupo). Os resultados são expressos como média ± e.p. média. **P<0,01; comparando-se o grupo tratado com dipirona com os grupos tratados com Dip+L-NAME (100 µg pata⁻¹), com L-NAME (50 µg pata⁻¹) somente e com salina (0,1 mL pata⁻¹).

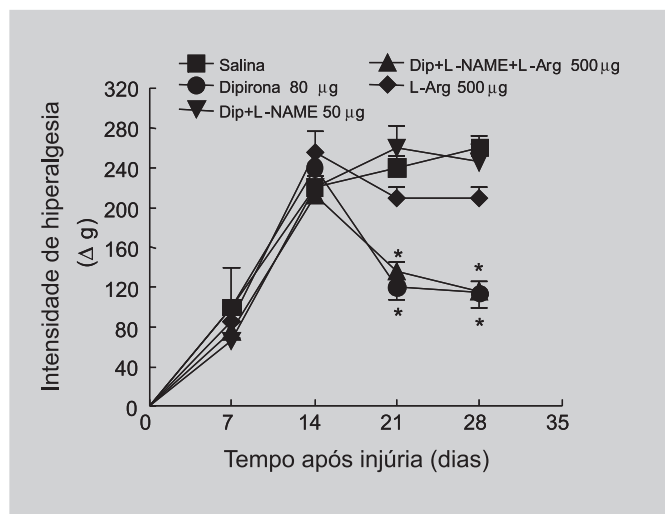


FIGURA 2 - Efeito da administração intraplantar concomitante de L-Arg ($500 \mu\text{g pata}^{-1}$) e L-NAME ($50 \mu\text{g pata}^{-1}$) sobre a antinocicepção induzida pela dipirona ($80 \mu\text{g pata}^{-1}$) no desenvolvimento da hiperalgesia mecânica de ratos submetidos a CNC no teste de pressão da pata ($n=6$ por grupo). Os resultados são expressos como média \pm e.p. média. * $P < 0,05$; comparando-se o grupo tratado com dipirona com os grupos tratados com Dip+L-NAME ($50 \mu\text{g pata}^{-1}$) ou com salina ($0,1 \text{ mL pata}^{-1}$) e os grupos tratados concomitantemente com L-Arg ($500 \mu\text{g pata}^{-1}$) e L-NAME ($50 \mu\text{g pata}^{-1}$) com o grupo tratado com L-NAME ($50 \mu\text{g pata}^{-1}$) ou com salina ($0,1 \text{ mL pata}^{-1}$).

Efeito da inativação do óxido nítrico endógeno extracelular periférico sobre o desenvolvimento do efeito analgésico de longa duração da dipirona em ratos com hiperalgesia neuropática

A administração periférica (i.pl.) de hemoglobina (10 ou 30 mg pata^{-1}) (Duarte *et al.*, 1992) conjuntamente com a dipirona (80 mg pata^{-1}), no 14° dia após a CNC, promoveu redução dose-dependente no desenvolvimento da analgesia de longa duração da dipirona (Sal: $248,0 \pm 10,0 \text{ g}$; Dip: $116,0 \pm 14,0 \text{ g}$; Dip+Hb10 mg: $220,0 \pm 10,0 \text{ g}$; Dip+Hb30 mg: $230,0 \pm 10,0 \text{ g}$), sendo considerada significativa para a administração de Hb na dose de 30 mg ($P < 0,01$) (Figura 3).

Participação da ativação da via NO-GMPc no desenvolvimento da analgesia de longa duração da dipirona na hiperalgesia neuropática

Ocorre significativa inibição no desenvolvimento da analgesia de longa duração da dipirona após o bloqueio da enzima guanilil ciclase e conseqüentemente da ativação da

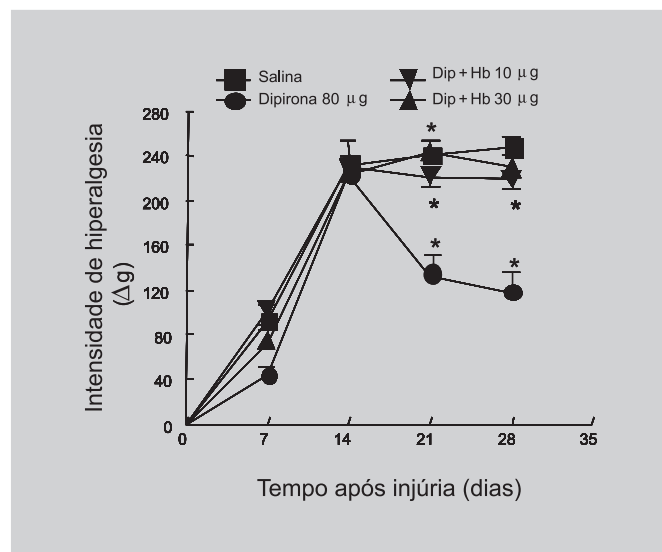


FIGURA 3 - Efeito da administração intraplantar de dipirona ($80 \mu\text{g pata}^{-1}$) e ou um seqüestrante de NO, Nb ($10 - 30 \mu\text{g pata}^{-1}$) sobre o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica de ratos submetidos a CNC no teste de pressão da pata ($n=8$ por grupo). Os resultados são expressos como média \pm e.p. média. * $P < 0,05$; comparando-se o grupo tratado com dipirona com os grupos tratados com Dip+Hb ($10 - 30 \mu\text{g pata}^{-1}$).

via NO-GMPc. A administração concomitante de cloreto de metiltionínio (500 mg pata^{-1}) (Lorenzetti, Ferreira, 1996) e dipirona (80 mg pata^{-1}), no 14° dia após a CNC (Figura 4), inibiu o desenvolvimento da analgesia de longa duração da dipirona, sendo observada redução significativa no 21° dia após a CNC (Sal: $220,0 \pm 30,0 \text{ g}$ Dip+Cloreto de metiltionínio: $174,0 \pm 12,0 \text{ g}$ e Dip: $56,0 \pm 14,0 \text{ g}$; $P < 0,05$). Além disso, a administração concomitante de ODQ (50 mg pata^{-1}) (Lorenzetti, Ferreira, 1996) e dipirona (80 mg pata^{-1}), no 14° dia após a CNC, também inibiu o desenvolvimento da analgesia de longa duração da dipirona (Figura 5), sendo observada redução significativa no 21° dia após a CNC (Sal: $254,0 \pm 18,0 \text{ g}$ Dip+ODQ: $216,0 \pm 12,0 \text{ g}$ e Dip: $120,0 \pm 11,0 \text{ g}$; $P < 0,05$).

Efeito do bloqueio de canais de K^+ sensíveis ao ATP sobre o desenvolvimento da analgesia de longa duração da dipirona na hiperalgesia neuropática

Realizou-se nos animais com hiperalgesia neuropática pré-tratamento, no 14° dia após a CNC, com glibenclamida ($100, 200$ ou 300 mg pata^{-1}) (Rodrigues, Duarte, 2000), 5 minutos antes da administração de dipirona (80 mg pata^{-1}). A glibenclamida foi capaz de bloquear de forma dose dependente o desenvolvimento da

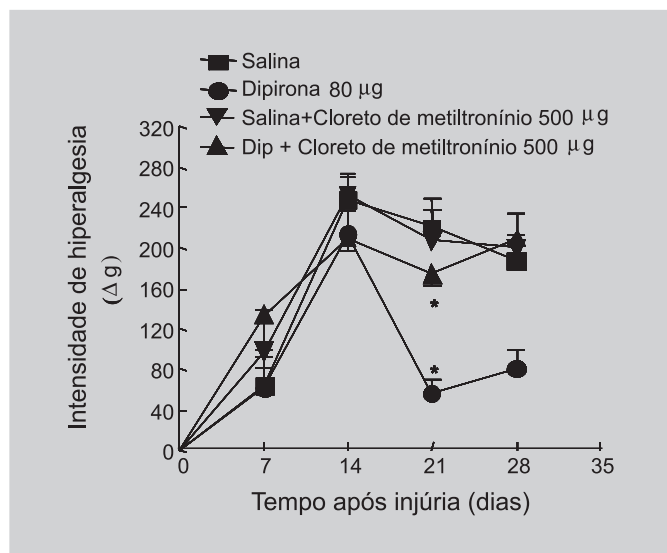


FIGURA 4 - Efeito da administração intraplantar de dipirona ($80 \mu\text{g pata}^{-1}$) e/ou um inibidor da GC, azul de metileno ($500 \mu\text{g pata}^{-1}$) sobre o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica de ratos submetidos a CNC no teste de pressão da pata ($n=8$ por grupo). Os resultados são expressos como média \pm e.p. média. $*P < 0,05$; comparando-se o grupo tratado com dipirona com os grupos tratados com Dip+cloreto de metiltronínio ($500 \mu\text{g pata}^{-1}$), cloreto de metiltronínio ($500 \mu\text{g pata}^{-1}$) ou salina ($0,1 \text{ mL pata}^{-1}$).

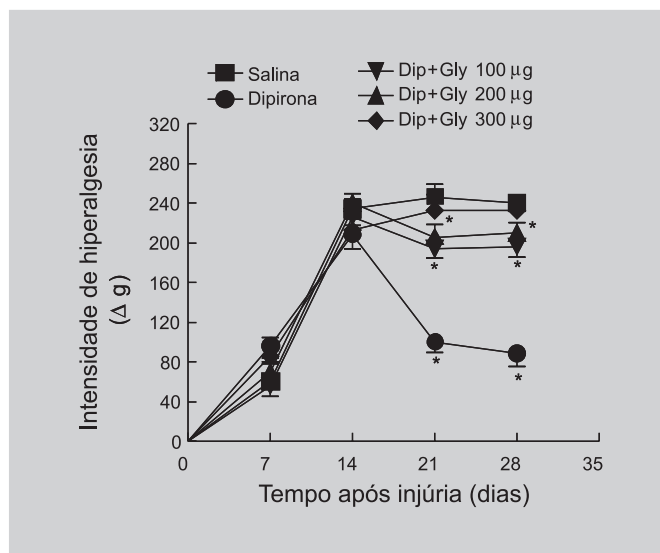


FIGURA 6 - Efeito da administração intraplantar de dipirona ($80 \mu\text{g pata}^{-1}$) e/ou um bloqueador de canais de potássio sensíveis ao ATP, Gly ($100\text{-}200\text{-}300 \mu\text{g pata}^{-1}$) sobre o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica de ratos submetidos a CNC no teste de pressão da pata ($n=8$ por grupo). Os resultados são expressos como média \pm e.p. média. $*P < 0,05$; comparando-se o grupo tratado com dipirona com os grupos tratados com Dip+Gly ($100, 200, 300 \mu\text{g pata}^{-1}$) ou com salina ($0,1 \text{ mL pata}^{-1}$).

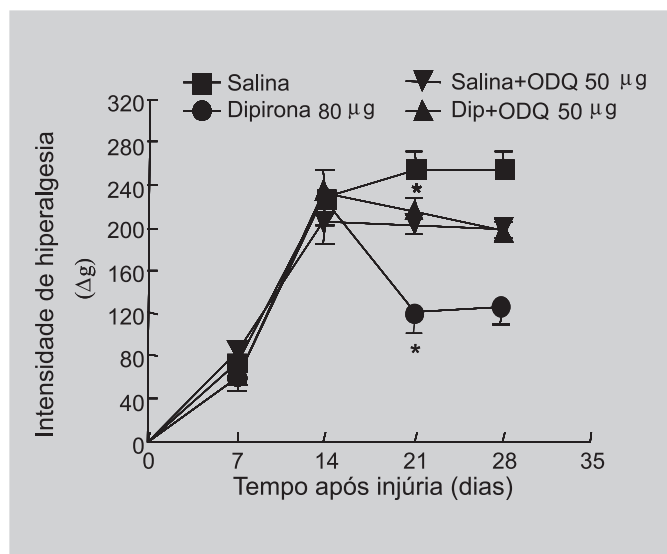


FIGURA 5 - Efeito da administração intraplantar de dipirona ($80 \mu\text{g pata}^{-1}$) e ou um inibidor da GC, ODQ ($50 \mu\text{g pata}^{-1}$) sobre o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica de ratos submetidos a CNC no teste de pressão da pata ($n=8$ por grupo). Os resultados são expressos como média \pm e.p. média. $*P < 0,05$; comparando-se o grupo tratado com dipirona com os grupos tratados com Dip+OQD ($50 \mu\text{g pata}^{-1}$), OQD ($50 \mu\text{g pata}^{-1}$) ou salina ($0,1 \text{ mL pata}^{-1}$).

analgesia de longa duração da dipirona (Sal: $240,0 \pm 8,0 \text{ g}$; Dip: $88,0 \pm 12,0 \text{ g}$; Dip+Gly100 mg: $196,0 \pm 10,0 \text{ g}$; Dip+Gly200 mg: $210,0 \pm 10,0 \text{ g}$; Dip+Gly300 mg: $232,0 \pm 14,0$; $P < 0,05$) (Figura 6).

Efeito da administração local de um doador de óxido nítrico sobre a hiperalgesia mecânica neuropática

Na Figura 7 observa que uma única administração local de SNP (500 mg pata^{-1}) (Soares *et al.*, 2000), no 14º dia após a CNC, induziu efeito analgésico significativo e de longa duração sobre a hiperalgesia mecânica neuropática, avaliado até o 28º dia após a CNC (Sal: $220,0 \pm 12,0 \text{ g}$; SNP: $110,0 \pm 10,0 \text{ g}$; $P < 0,05$).

DISCUSSÃO

Os efeitos analgésicos, antiinflamatórios e anti-piréticos dos fármacos antiinflamatórios não-esteróides são atribuídos à inibição da enzima ciclooxigenase e, portanto, ao bloqueio da síntese de prostaglandinas (Vane, 1971). Contudo, a possibilidade de um efeito central da dipirona em relação à inibição da síntese de PGE_2 tem sido aventada (Shimada *et al*, 1994; McCormack, Brune, 1991).

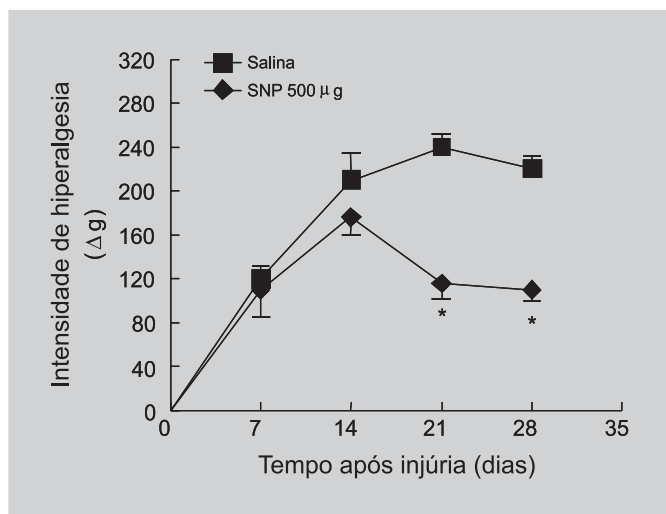


FIGURA 7 - Efeito da administração intraplantar de SNP (500 μg pata⁻¹) sobre o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica de ratos submetidos a CNC no teste de pressão da pata (n=5 por grupo). Os resultados são expressos como média \pm e.p. média. * $P < 0,05$; comparando-se o grupo tratado com SNP com o grupo tratado com salina (0,1 mL pata⁻¹).

No entanto, na neuropatia por secção parcial do nervo ciático, demonstrou-se a importância da prostaglandina E_2 no desenvolvimento da hiperalgesia e alodinia. A administração intraplantar de indometacina, piroxicam ou antagonista de receptor EP_1 até o sexto dia após a cirurgia (Syriatowicz *et al.*, 1999) ou a administração intratecal de indometacina no primeiro dia após a cirurgia (Zhao *et al.*, 2000) atenuaram a hiperalgesia mecânica/térmica e a alodinia, respectivamente. Entretanto, Zhao *et al.* (2000) não obtiveram efeito analgésico com a administração intratecal de indometacina no 14º dia pós cirúrgico, ou seja, após o estabelecimento do quadro de alodinia. Estes autores sugerem um papel importante para os prostanóides apenas na fase de instalação (e não na fase de manutenção) da alodinia em que os níveis espinhais de ciclooxigenase-2 estão elevados (até o terceiro dia). Mais recentemente, estes dados foram confirmados, uma vez que o piroxicam, administrado pela via intratecal, também foi ineficaz em reverter a alodinia já instalada, neste mesmo modelo experimental (Ma, Eisenach, 2002a).

Esta ação antinociceptiva, periférica e de longa duração de uma única dose de dipirona, observada neste trabalho, demonstra perfil analgésico diferente deste fármaco em relação aos demais fármacos antiinflamatórios/analgésicos não-esteróides.

Com relação ao possível mecanismo de ação analgésica da dipirona, Lorenzetti e Ferreira (1985) demons-

traram o bloqueio direto da hiperalgesia inflamatória por PGE_2 , provavelmente decorrente da dessensibilização dos nociceptores periféricos previamente sensibilizados por este mediador. Na hiperalgesia inflamatória por carragenina, já foi demonstrado que a analgesia periférica induzida pela acetilcolina (Duarte *et al.*, 1990), assim como pela dipirona (Duarte *et al.*, 1992) na hiperalgesia por PGE_2 em ratos, provavelmente seria mediada via liberação de NO.

Marquez e Ferreira (1987) descreveram efeito analgésico potente da dipirona sobre dor crônica, em um estudo clínico piloto. Dores crônicas intratáveis em humanos, predominantemente devido à desaferentação, foram aliviadas a partir de infusões regionais de dipirona, sendo que o efeito analgésico foi relevante e de longa duração, permanecendo por até dois meses.

Este possível mecanismo de dessensibilização dos nociceptores periféricos, independente da inibição da síntese de prostaglandinas, parece também ser responsável pela analgesia local induzida pelo diclofenaco (Tonussi, Ferreira, 1994) e pela morfina e *N*-metilmorfina na hiperalgesia aguda por PGE_2 (Ferreira *et al.*, 1990).

Similar ao verificado em nosso estudo, a dipirona e a *N*-metilmorfina administradas localmente, exercem efeito analgésico de longa duração sobre a hiperalgesia persistente por PGE_2 (Ferreira *et al.*, 1990). Estes mesmos autores também observaram que a morfina administrada sistemicamente no modelo experimental de hiperalgesia persistente por PGE_2 apenas exerceu efeito transitório.

No modelo de alodinia induzida por secção parcial do nervo ciático, observou-se efeito analgésico de longa duração (5 dias) do cetorolaco intraplantar (Ma, Eisenach, 2002 a,b). No entanto, a administração sistêmica (ip ou im) deste antiinflamatório e analgésico induziu apenas analgesia de curta duração (Ma, Eisenach, 2002 b).

A inibição da síntese de NO com L-NAME, em doses que não alteraram o desenvolvimento da hiperalgesia neuropática por constrição do nervo ciático nos controles, reduziu de maneira dose-dependente a instalação do efeito analgésico de longo tempo da dipirona. Este efeito inibitório do L-NAME sobre a analgesia da dipirona foi bloqueado pela administração intraplantar concomitante de L-arginina. A L-arginina, por sua vez, não alterou a hiperalgesia neuropática persistente nos controles.

A hemoglobina (Hb), um composto que atua inativando o NO endógeno extracelular gerado tanto pela NOSc ou NOSi, quando administrado concomitantemente à dipirona também bloqueou a instalação do efeito analgésico local e de longa duração da dipirona.

Estes resultados corroboram a hipótese de que a síntese de NO, periféricamente, pode estar relacionada com o efeito analgésico local da dipirona, assim como já tem sido verificado para outros analgésicos em distintos modelos experimentais, tais como a própria dipirona e o mirceno na hiperalgesia aguda induzida por PGE₂ (Duarte *et al.*, 1992); o diclofenaco na hiperalgesia inflamatória (Tonussi, Ferreira, 1994); a morfina, na hiperalgesia por PGE₂ e no teste da formalina (Ferreira *et al.*, 1991; Granados-Soto *et al.*, 1997); o meloxicam (Aguirre-Bañuelos, Granados-Soto, 2000) e o ceterolaco (Lázaro-Ibáñez *et al.*, 2001), no teste da formalina.

Embora o NO, periféricamente, parece estar median-do a ação analgésica de diversos fármacos, a sua participação nos processos nociceptivos ainda não está clara. O bloqueio da síntese de NO na coluna espinhal e a conseqüente diminuição de sua concentração pode realçar o efeito central analgésico de agonistas opióides no teste da formalina em ratos (Machelska *et al.*, 1997). Além disso, o L-NAME, um bloqueador da NOS, também pode evocar um efeito antinociceptivo direto no sistema nervoso central no teste da formalina em camundongos (Moore *et al.*, 1991). Sugere-se, também, a participação do NO na hiperalgesia mecânica periférica induzida por bradicinina (Nakamura *et al.*, 1996).

Yamamoto e Shimoyama (1993) demonstraram que NO poderia desempenhar um papel no processo de facilitação espinhal observada no modelo de hiperalgesia neuropática induzida a partir da constrição do nervo ciático. Desta forma, a síntese de NO na medula espinhal e no sistema nervoso central estaria associada à nocicepção. Periféricamente, neste mesmo modelo de dor neuropática, é observado aumento da síntese de NO a partir da estimulação da enzima NOSi no neuroma e nas fibras distais à lesão, sugerindo-se participação do NO na patogênese da hiperalgesia neuropática (Levy *et al.*, 1999).

Ainda com relação à participação do NO na dor neuropática, tem sido demonstrado que a sua produção espinhal contribui com a geração e manutenção da hiperalgesia térmica (Meller *et al.*, 1996).

Entretanto, o papel do NO nos processos periféricos não está claro, uma vez que alguns autores relatam papel pró-nociceptivo (Meller, Gebhart, 1994), enquanto outros autores descrevem ação antinociceptiva. Neste sentido, Mashimo *et al.* (1995) relataram que a administração intravenosa de nitroglicerina pode aliviar a dor espontânea e a causalgia em humanos. No modelo de injúria por constrição do ciático em animais, a administração intratecal do NO em altas concentrações parece não exercer nenhum efeito ou pequeno efeito nociceptivo, enquanto em baixas concentrações induz diminuição da alodinia dinâmica (Souza, Prado, 2001).

No entanto, a L-arginina, o precursor da síntese de NO, parece possuir efeito dual no processo nociceptivo no SNC. Este composto poderia atuar como substrato na via quitorfina – Met-enkefalina, causando efeito antinociceptivo, ou atuar ativando a via NO – GMPc, realçando o processo nociceptivo ao nível central (Kawabata *et al.*, 1993).

A liberação local de NO poderia ativar a enzima guanilil ciclase, aumentando a síntese de GMPc ao nível do nociceptor periférico (KAWABATA *et al.*, 1993). Uma vez que a dipirona pode ativar a síntese de NO periféricamente, a ativação da via arginina – NO – GMPc provavelmente seria responsável pelo efeito analgésico da dipirona (Duarte *et al.*, 1992; Lorenzetti, Ferreira, 1996). De fato, a diminuição da síntese de GMPc com o bloqueio da enzima guanilil ciclase pelo cloreto de metiltionínio ou ODQ bloqueou o desenvolvimento do efeito analgésico de longa duração da dipirona.

Há evidências na literatura de que o NO pode ativar diferentes tipos de canais de potássio em diversos tecidos (Armstead, 1996; Edwards, Weston, 1993). Sugere-se que a ativação de canais de potássio sensíveis ao ATP, induzida pelo NO poderia ser mediada pelo aumento dos níveis de GMPc.

Alguns autores sugerem que a morfina, atuando em receptores opióides periféricos, também ative a via NO – GMPc, induzindo efeito analgésico periférico (Duarte *et al.*, 1990; Granados-Soto *et al.*, 1997), o qual provavelmente seja devido a ativação de canais de potássio sensíveis ao ATP, uma vez que a glibenclamida, um bloqueador de canais de K⁺ sensíveis ao ATP, inibe este efeito analgésico periférico da morfina (Rodrigues, Duarte, 2000). Em nosso trabalho, o desenvolvimento da analgesia de longa duração da dipirona também foi bloqueado pela glibenclamida.

Uma vez que a dipirona poderia atuar a partir da indução da geração espontânea local de NO, estudamos o efeito do nitroprussiato de sódio (NPS), um doador de NO, sobre a hiperalgesia neuropática por constrição do nervo ciático. O NPS, administrado pela via intraplantar, reduziu a hiperalgesia persistente por CNC. O efeito analgésico obtido com a administração local de NPS também foi de longa duração, sendo semelhante ao obtido com a dipirona.

Estes resultados confirmam outros dados da literatura referentes à ação analgésica periférica do nitroprussiato de sódio e de outros doadores de NO (Ferreira *et al.*, 1992; Soares *et al.*, 2000).

Nossos dados, portanto, nos permitem sugerir que o efeito analgésico periférico de longa duração da dipirona sobre a hiperalgesia persistente já instalada por constrição do nervo ciático, possa ser devido à ativação da via arginina – NO - GMPc - canais de K⁺ sensíveis ao ATP, provavel-

mente, induzindo dessensibilização dos terminais nociceptivos no neurônio sensorial primário. Este mecanismo pode ser também responsável pela manutenção deste quadro antinociceptivo de longa duração. Com relação à ação prolongada da dipirone, a duração desta analgesia periférica é muito maior do que o esperado, devido à meia-vida curta (3 horas) deste fármaco no organismo. Este fato parece interessante do ponto de vista de uma possível utilidade clínica em dores crônicas.

ABSTRACT

Long term analgesic effect of dipyrone on the persistent hyperalgesia induced by chronic constriction injury of sciatic nerve in rats: involvement of nitric oxide

The long term analgesic effect of dipyrone was evaluated on a model of neuropathic pain and the role of nitric oxide/GMPc pathway in this antinociceptive mechanism. One intraplantar dipyrone administration (80 mg), at 14th day after the chronic constriction injury of the sciatic nerve, induced a significant and long term analgesic effect. The inhibition of nitric oxide synthase (NOS) with L-NAME (50 or 100 mg/paw) or scavenging of the endogenous NO with hemoglobin (10 or 30 mg/paw) inhibited the development of the dipyrone analgesia. L-arginine (500 mg/paw) could revert the effect of L-NAME. Methylene blue (500 mg/paw) or ODQ (50 mg/paw) (blockers of guanyl cyclase), or glybenclamide (100, 200 or 300 mg/paw) (blocker of ATP-sensitive K⁺ channels) inhibited the development of dipyrone analgesia. The sodium nitroprussiate administered at 14th day after the chronic constriction injury of the sciatic nerve also induced a long term analgesic effect similar to that of dipyrone. Our data may support the suggestion that the peripheral and the long term analgesic action of dipyrone on this model experimental occurs due to a probable nociceptor desensitisation with involvement of activation of the nitric oxide-cGMP pathway, followed by an opening of ATP-sensitive K⁺ channels.

UNITERMS: *Neuropathic hyperalgesia. Chronic constriction injury. Dipyrone. Nitric oxide.*

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE-BUÑUELOS, P.; GRANADOS-SOTO, V. Evidence for the participation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the antinociceptive action of meloxicam in the formalin test. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 395, p. 9-13, 2000.
- ARMSTED, W. M. Role of ATP sensitive K⁺ channels in cGMP mediated pial artery vasodilation. *Am. J. Physiol.*, v.270, p. H423-H426, 1996.
- BARON, R. Peripheral neuropathic pain: from mechanisms to symptoms. *Clin. J. Pain*, v.16, n. 2, p.12-20, 2000.
- BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, v.33, p.87-107, 1988.
- DEVOR, M.; SELTZER, Z. Pathophysiology of damaged nerves in relation to chronic pain. In: WALL, P. D.; MELZACK, R. (Eds). *Textbook of pain*. 4. ed. Edinburg: Churchill Livingstone, 1999. p. 59-84.
- DUARTE, I. D.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide - cGMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, v.186, p.289-293, 1990.
- 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.
- EDWARDS, G.; WESTON, A. H. The pharmacology of ATP – sensitive K⁺ channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v.33, p.597-637, 1993.
- FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; DE CAMPOS, D. I. Induction, blockade and restoration of a persistent hypersensitive state. *Pain*, v.42, p.365-371, 1990.
- FERREIRA, S. H.; DUARTE, I. D.; LORENZETTI, B. B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur. J. Pharmacol.*, v.201, p.207, 1991.
- FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; FACCIOLI, L. H. Blockade of hyperalgesia and neurogenic oedema by topical application of nitroglicerine. *Eur. J. Pharmacol.*, v.217, p.207, 1992.

- FIELDS, H. L.; BARON, R.; ROWBOTHAM, M. C. Peripheral neuropathic pain: an approach to management. In: WALL, P. D.; MELZACK, R. (Eds). *Textbook of pain*. 4. ed. Edinburg: Churchill Livingstone, 1999. p.1523-1534.
- GEORGE, A.; BUEHL, A.; SOMMER, C. Tumor necrosis factor receptor 1 and 2 proteins are differentially regulated during Wallerian degeneration of mouse sciatic nerve. *Exp. Neurol.*, v.192 n. 1, p.163-166, 2005.
- GRANADOS-SOTO, V.; RUFINO, M. O.; LOPES, L.D.G.; FERREIRA, S. H. Evidence for the involvement of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 340, p. 177-180, 1997.
- ISLAS-CADENA, M.; AGUIRRE-BANUELOS, P.; GRANADOS-SOTO, V. Evidence for the participation of nitric oxide – cyclic GMP pathway in the antinociceptive effect of nimesulide. *J. Pharmacol. Toxicol.*, v.42, p.87-92, 1999.
- KAWABATA, A.; UMEDA, N.; TAKAGI, H. L-Arginine exerts a dual role in nociceptive processing in the brain: involvement of the Kyotorphin-Met-enkephalin pathway and NO-cyclic GMP pathway. *Br. J. Pharmacol.*, v. 109, p. 73-79, 1993.
- KLEINSCHNITZ, C.; BRINKHOFF, J.; ZELENKA, M.; SOMMER, C.; STOLL, G. The extent of cytokine induction in peripheral nerve lesions depends on the mode of injury and NMDA receptor signalling. *J. Neuroimmunol.*, v. 149, n.12, p.77-83, 2004.
- KLEINSCHNITZ, C.; BRINKHOFF, J.; SOMMER, C.; STOLL, G. Contralateral cytokine gene induction after peripheral nerve lesions: dependence on the mode of injury and NMDA receptor signalling. *Brain Res. Mol.*, v. 136, n. 12, p. 23-28, 2005.
- LÁZARO-IBÁÑEZ, G. G.; TORRES-LÓPES, J. E.; GRANADOS-SOTO, V. Participation of the nitric oxide – cyclic GMP – ATP – sensitive K⁺ channel pathway in the antinociceptive action of ketorolac. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 426, p. 39-44, 2001.
- LEVY, D.; HÖKE, A.; ZOCHODNE, D. W. Local expression of the inducible nitric oxide synthase in an animal model of neuropathic pain. *Neurosci. Lett.*, v. 260, p.207-209, 1999.
- LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Mode of analgesic action of dipyrone : 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 neurones contributes to dipyrone - induced spinal and peripheral analgesia. *Inflamm. Res.*, v.45, p.308-311, 1996.
- MA, W.; EISENACH, J. C. Role for both spinal cord COX-1 and COX-2 in maintenance of mechanical hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Brain Res.*, v.937, p. 94-99, 2002 a.
- MA, W.; EISENACH, J. C. Morphological and pharmacological evidence for the role of peripheral prostaglandins in the pathogenesis of neuropathic pain. *Eur. J. Neurosci.*, v.15, p. 1037-1047, 2002 b.
- MACHELSKA, H.; LABUZ, D.; PRZEWLOCKI, R.; PRZEWLOCKA, B. Inhibition of nitric oxide syntase enhances antinociception mediated by Um, delta and Kappa opioid receptors in acute and prolonged pain in the rat spinal cord. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 282, p. 977-984, 1997.
- MacPHERSON, R. D. New directions in pain management. *Drugs Today*, v.38, p. 135-145, 2002.
- MARQUEZ, J. O.; FERREIRA, S. H. Regional dipyrone nociceptor blockade: a pilot study. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.20, p.441-444, 1987.
- MASHIMO, T.; PAK, M.; INAGAKI, Y.; YOSHIYA, I. Effects of intravenous regional administration of vasodilators: guanethidine, *nicardipine*, *nitroglycerine* and *prostaglandin E2* in a patient with *causalgia*. *Pain Clin.*, v.8, p.255-261, 1995
- McCORMACK, K.; BRUNE, K. Dissociation between the antinociceptive and anti - inflammatory effects of the nonsteroidal anti - inflammatory drugs. *Drugs*, v. 41, p. 533-547, 1991.
- MELLER, S. T.; CUMMINGS, C. P.; TRAUB, R. J.; GEBHART, G. F. The role of nitric oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenan in the rat. *Neuroscience*, v. 60, p. 367-374, 1994.

- MELLER, S. T.; GEBHART, G. F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain*, v. 52, p. 127-136, 1993.
- MOORE, P. K.; OLUYOMI, A. O.; BABBEDGE, P.; WALLACE, P.; HART, S. L. L-N-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br. J. Pharmacol.*, v. 102, p. 198-202, 1991.
- NAKAMURA, A.; FUJITA, M.; SHIOMI, H. Involvement of endogenous nitric oxide in the mechanism of bradikinin-induced peripheral hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol.*, v. 117, p. 407-412, 1996.
- RANDALL, L.; SELITTO, J.J. A method for the measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Archs. Int. Pharmacodyn.*, v.111, p.409-419, 1957.
- RODRIGUES, A. R.; DUARTE, I. D. G. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K⁺ channels. *Br. J. Pharmacol.*, v. 127, p.110-114, 2000.
- SHIMADA, S. G.; OTTERNESS, I. G.; STITT, J. T. A study of the mechanism of action of the mild analgesic dipyrene. *Agents Actions*, v.41, p.188-192, 1994.
- SOARES, A. C.; LEITE, R.; TATSUO M. A. K. F.; DUARTE, I. D. G. Activation of ATP-sensitive K⁺ channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. *Eur. J. Pharmacol.*, v.400, p.67-71, 2000.
- SOUZA, A. M.; PRADO, W. A. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res.*, v. 897, p. 9-19, 2001.
- SYRIATOWICZ, J.; HU, D.; WALKER, J. S.; TRACEY, D. J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of prostaglandins. *Neuroscience*, v. 94, p. 587-594, 1999.
- TONUSSI, C. R.; FERREIRA, S. H. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 251, p. 173-179, 1994.
- TRACEY, D. J.; WALKER, J. S. Pain due to nerve damage: are inflammatory mediators involved? *Inflamm. Res.*, v. 44, p. 407-411, 1995.
- VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat., New Biol.*, v.231, p.232-235, 1971.
- YAMAMOTO, T.; SHIMOYAMA, N.; MIZUGUCHI, T. Role of the injury discharge in development of thermal hyperesthesia after sciatic nerve constriction injury in the rat. *Anesthesiology*, v.79, p.993-1002, 1993.
- ZHAO, Z.; CHEN, S. R.; EISENACH, J. C.; BUSIJA, D. W.; PAN, H. L. Spinal cyclooxygenase-2 is involved in development of allodynia after nerve injury in rats. *Neuroscience*, v.97, p.743-748, 2000.
- ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. *Eur. J. Pharmacol.*, v.429, p.23-37, 2001.

Recebido para publicação em 28 de setembro de 2005
Aceito para publicação em 19 de novembro de 2006