JOSÉ OSWALDO DE OLIVEIRA JUNIOR

**Efeito analgésico periférico do tramadol em
modelo de dor pós-operatória em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Anestesiologia

Orientador: Prof. Dr. Hazem Adel Ashmawi

**SÃO PAULO
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira Junior, José Oswaldo de

Efeito analgésico periférico do tramadol em modelo de dor pós-operatória em
ratos / José Oswaldo de Oliveira Junior. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Anestesiologia.

Orientador: Hazem Adel Ashmawi.

Descritores: 1.Dor pós-operatória 2.Limiar da dor 3.Dor nociceptiva
4.Receptores opioides 5.Tramadol 6.Naloxona 7.Ratos

USP/FM/DBD-504/15

“Nenhum é melhor do que todos nós.”

Coelho, 1996

*Aos meus queridos pais, Maria José e José
Oswaldo, em memória.*

*Certo de que se estivessem ainda vivos
estariam felizes por mim.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Hazem Adel Ashmawi, pelo apoio irrestrito, pela generosidade, pela orientação, pela dedicação, pela paciência, pela humildade, pela ajuda inestimável e desmesurada, sem a qual esta tese não seria realizada.

Ao Prof. Dr. Irimar de Paula Posso, pelo incentivo insistente e persistente, pela deflagração concreta do caminho ao meu doutorado, e, pela generosidade, apenas rivalizada pela sua amizade.

À Profa. Dra. Marucia Chacur, que contribuiu com seus ensinamentos, com sua competência e generosidade, abrindo as portas do laboratório do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo na Cidade Universitária, permitindo que pudéssemos realizar os experimentos que utilizaram métodos de biologia molecular.

À bióloga Milena Fernandes de Freitas, pelos suportes técnico e teórico, prestados de modo irrestrito.

Às Dras. Sandra Caires Serrano e Soraya Aurani Jorge Cecílio, pela amizade sincera e pelo apoio, tanto técnico como estratégico, que me permitiram dedicar importantes períodos de tempo ao doutorado e confecção desta tese.

Ao psicólogo José Guilherme Weinstock, pela amizade, companheirismo e auxílio de sempre, e, em todas as etapas deste estudo.

À Dra. Cláudia Carneiro de Araújo Palmeira, pela amizade, e, pela cessão, do tempo de um de seus bens mais preciosos.

Ao técnico Gilberto Nascimento, pela receptividade, pelo apoio, pela competência, pela grande ajuda e solidariedade no LIM-08, nos preparativos e na execução dos experimentos desta tese.

À Carolina Bullara de Andrade, pela colaboração durante sua iniciação científica, pela dedicação, pelo respeito e humildade demonstrados.

À enfermeira e secretária Rosemary Amorim pela dedicação, amizade, fidelidade, organização e competência, qualidades que me proporcionaram a possibilidade de atingir as diversas metas deste projeto.

À Maria Helena Vargas, pelo auxílio, apoio e disponibilidade irrestrita na diagramação final da tese.

À Nilza, companheira de todas as horas, pelo apoio incondicional, pelo amor, pela paciência imensurável, pela generosidade, e, por relevar mais períodos adicionais de ausência em nosso convívio, desta feita dedicados à tese.

À Dona Floripes Aparecida Álvares da Costa pelo amor, companheirismo e reiterados aconselhamentos. Minha segunda mãe.

Ao José Oswaldo de Oliveira Neto, por expressar o melhor de meus genes.

À minha irmã, Maria José de Oliveira, pelo amor, e, pela sua imensa espiritualidade, que sempre me incluiu e contemplou.

Ao Raphael Oswaldo, sempre presente em meus pensamentos, mesmo distante.

Aos meus pais, Maria José e José Oswaldo, ambos em memória, pelo início e embasamento de tudo.

Aos colegas, amigos, do Departamento de Terapia Antálgica, Cirurgia Funcional e Cuidados Paliativos da Escola de Cancerologia Celestino Bourroul da Fundação Antônio Prudente, pelo apoio e reconhecimento.

Aos colegas, amigos, da Equipe de Controle da Dor da Divisão de Anestesia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo acolhimento, pelos ensinamentos e pelo suporte.

Aos colegas, amigos, da Unidade de Neurocirurgia dos Transtornos do Movimento do Hospital Brigadeiro de São Paulo, pela amizade, companheirismo, reconhecimento e suporte.

Aos colegas, amigos, do Grupo Especializado em Dor e do Serviço de Neurocirurgia do Hospital dos Servidores do Estado de São Paulo, pela amizade, companheirismo, reconhecimento e suporte.

Aos doentes, o escopo de todos meus atos.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de gráficos

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	7
1.1	Objetivo Primário	8
1.2	Objetivo Secundário	8
3	REVISÃO DA LITERATURA	9
3.1	O Fenômeno Doloroso	10
3.1.1	Modulação da dor e a sensibilização periférica	12
3.1.2	A Modulação da dor e a sensibilização central	14
3.1.3	As dores aguda e crônica	16
3.2	Modelo de Incisão Plantar	17
3.3	O Estudo do Fenômeno Doloroso e as Dificuldades na Busca das Respostas e de Aplicá-las Quando Delas Dispomos	20
3.4	A Experimentação em Animais	22
3.5	O Fármaco: Tramadol	26
3.5.1	Farmacologia	26
3.5.2	Uso clínico do tramadol por via sistêmica: metabolismo e eliminação	30
3.5.3	Utilização clínica de tramadol no local da lesão	31
3.5.4	Ação analgésica periférica do tramadol	33
3.6	Receptores Opioides	34
3.6.1	Nomenclatura dos Receptores opioides	35
3.6.2	Receptores opioides periféricos	37
3.7	Experiências Prévias do Grupo de Pesquisa ao Qual se Insere o Projeto	40
4	MÉTODOS	42
4.1	Animais	43
4.2	Fármacos	44
4.3	Procedimentos Experimentais	44
4.3.1	Técnica anestésica	44
4.3.2	Técnica da incisão plantar	45
4.3.3	Hiperalgesia mecânica. Mensuração dos limiares de retirada da pata	46
4.3.3.1	Grupos Experimentais de Modelo de Incisão Plantar (IP)	47
4.3.4	Ensaio de Expressão Proteica	50
4.4	Análise Estatística	53

5	RESULTADOS.....	54
5.1	Estudos Comportamentais	55
5.2	Expressão de Receptores Opioides nos Gânglios de Raízes Dorsais	59
6	DISCUSSÃO	62
6.1	Modelo de Incisão Plantar	63
6.2	Tramadol Intraplantar	65
6.3	Pesquisa de Receptores Opioides Periféricos	70
6.4	Os Cuidados Com os Animais dos Experimentos	75
6.4.1	Número mínimo de animais utilizados.....	75
6.4.2	Limitação do estímulo doloroso na pesquisa de hiperalgesia mecânica.....	75
6.4.3	Anestesia	76
6.4.4	Eutanásia	77
6.5	Correções e Sugestões para Ensaios Futuros	78
7	CONCLUSÕES	80
8	ANEXOS	82
9	REFERÊNCIAS.....	86
	APÊNDICE.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(-)M1	- Metabólito um levogiro
(+)M1	- Metabólito um dextrógiro
1º PO	- Primeiro dia pós-operatório
2º PO	- Segundo dia pós-operatório
ACF	- <i>Adjuvante completo de Freund</i>
CFA	- <i>Complete Freund's adjuvant</i>
CONCEA	- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DOP	- Peptídeo opioide delta (<i>Delta opioid peptide</i>)
DOR	- Receptor opioide delta (<i>Delta opioid receptor</i>)
GDR	- Gânglio da raiz dorsal
IASP	- Associação Internacional para o Estudo da Dor
IP	- Incisão plantar
KOP	- Peptídeo opioide (<i>Kappa opioid peptide</i>)
KOR	- Receptor opioide capá (<i>Kappa opioid receptor</i>)
L	- Vertebra lombar
L3-L4	- Terceira vértebra-quarta vértebra
M1	- Metabólito um
MCTI	- Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
MOP	- Peptídeo opioide mu (<i>Mu opioid peptide</i>)
MOR	- Receptor opioide mu (<i>Mu opioid receptor</i>)
mRNA	- Mensageiro do ácido ribonucleico
Nal	- Naloxona
OP	- Peptídeo opioide (<i>Opioid peptide</i>)
OP1	- Primeiro peptídeo opioide clonado (Peptídeo opioide delta)
OP2	- Segundo peptídeo opioide clonado (Peptídeo opioide kappa)
P	- Pain
pKa	- Cologarítmico de constante de dissociação ácida
PO	- Pós-operatório

- ROC - ROK, KOR, Receptor opioide capá (*Receptor opioide kappa*)
- SF - Soro fisiológico / solução de cloreto de sódio a 0,9%
- Subst P - Substância “P” (substância dor)
- T_contra - Tramadol aplicado na região plantar do contralateral (do outro lado) a pata submetida à incisão
- T_homo - Tramadol aplicado no “leito” (cavidade real ou virtual) criado(a) no procedimento cirúrgico. Aplicado no mesmo lado da incisão.

LISTA DE FIGURA

Figura 1 - Formula química do tramadol	27
Figura 2 - Rato Wistar macho.....	43
Figura 3 - Realização do procedimento de incisão plantar em pata de rato.....	45
Figura 4 - Câmara de realização dos estudos comportamentais	46
Figura 5 - Analgesímetro digital para a realização de medições de limiar de retirada da pata aos estímulos mecânico	47
Figura 6 - Laminectomia ampla e foraminectomia múltipla revelando o saco dural com a pinça apontando para o gânglio de raiz dorsal	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Limiar de retirada da pata após estímulo mecânico no modelo de incisão plantar em ratos	56
Gráfico 2 - Análise densitométrica dos níveis de expressão de DOR em gânglio da raiz dorsal após incisão plantar	60
Gráfico 3 - Análise densitométrica dos níveis de expressão de MOR em gânglio da raiz dorsal após incisão plantar	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias e desvios padrão dos limiares de retirada da pata após estímulo mecânico nos grupos. Dados apresentados em gramas (g).....	58
Tabela 2 - Médias e desvios padrões dos valores densitométricos da expressão de DOR em gânglio da raiz dorsal após incisão plantar	59
Tabela 3 - Médias e desvios padrões dos valores densitométricos da expressão de MOR em gânglio da raiz dorsal após incisão plantar	60

RESUMO

Oliveira Jr JO. *Efeito analgésico periférico do tramadol em modelo de dor pós-operatória em ratos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUÇÃO: Tramadol é conhecido como um fármaco analgésico de ação central utilizado no tratamento de dores de intensidades moderada a forte. Efeito analgésico local já foi demonstrado. É, em parte, semelhante ao efeito anestésico local, mas outros mecanismos permanecem desconhecidos. O papel de receptores opioides periféricos na analgesia do tramadol na dor pós-operatória não é conhecido. Neste estudo, foi estudado o papel dos receptores opioides no efeito analgésico local do tramadol em modelo de dor por incisão plantar. **MÉTODOS:** Ratos machos jovens foram submetidos à incisão plantar e no primeiro dia pós-incisão foram divididos em quatro grupos: Grupo IP I-SF/SF - 50 µL de solução de NaCl 0,9% foram injetados na região plantar da pata posterior homolateral à incisão e, 15 minutos depois, novamente injetada a mesma quantidade de solução; Grupo IP II-SF/T_homo - 50 µL de NaCl 0,9% foram injetados na região plantar da pata homolateral e, 15 minutos depois, injetados 50 µL solução contendo 5 mg tramadol; Grupo IP III-SF/T_contra - 50 µL de NaCl 0,9% foram injetados na região plantar da pata contralateral e, 15 minutos depois, 50 µL de solução contendo 5 mg de tramadol; Grupo IP IV-Nal/T_homo - 50 µL de solução contendo 200 µg de naloxona foram injetados na pata homolateral e, 15 minutos depois, 50 µL de solução contendo 5mg de tramadol foi injetada. Antes de receberem as injeções, os limiares de retirada da pata por estímulo mecânico produzido por analgesímetro eletrônico de von Frey foram medidos, e, depois da administração dos fármacos, os limiares de retirada foram avaliados nos tempos 15, 30, 45 e 60 minutos após a administração dos fármacos. O mesmo procedimento foi utilizado no

segundo dia pós-incisão. As expressões proteicas dos receptores opioide δ (DOR) e μ (MOR) foram avaliadas usando técnica de *immunoblotting* de gânglios de raízes dorsais homolaterais (L3, L4, L5 e L6) de grupos de animais sem incisão e após 1, 2, 3 e 7 dias de animais submetidos à incisão plantar. **RESULTADOS:** A incisão plantar gerou marcada hiperalgesia mecânica que foi revertida por tramadol intraplantar nos dois dias. O tramadol intraplantar em pata contralateral não antagonizou a hiperalgesia mecânica, a naloxona antagonizou parcialmente o efeito analgésico do tramadol no primeiro dia pós-incisão, e antagonizou completamente no segundo dia pós-incisão. A expressão proteica de DOR aumentou no 2º, 3º e 7º dias pós-incisão, a expressão de MOR não se modificou. **CONCLUSÕES:** O tramadol apresentou efeito analgésico local após estímulo mecânico e esse efeito foi antagonizado por naloxona no segundo dia pós-incisão. A expressão de DOR aumentou após a incisão plantar.

Descritores: Dor pós-operatória. Limiar da dor. Dor nociceptiva. Receptores opioides. Tramadol. Naloxona. Ratos.

ABSTRACT

Oliveira Jr JO. *Peripheral analgesic effect of tramadol in a postoperative pain model in rats* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

BACKGROUND: Tramadol is known as a central acting analgesic drug used for the treatment of moderate to severe pain. Local analgesic effect was already demonstrated. It is in part due to local anesthetic-like effect, but other mechanisms remain unclear. The role of peripheral opioid receptors in the local analgesic effect in postoperative pain is not known. In this study, we examined the role of peripheral opioid receptors in the local analgesic effect of tramadol in the plantar incision pain model. **METHODS:** Young male Wistar rats were submitted to plantar incision and in the first postoperative day (POD1) were divided into four groups: IP I-SF/SF, 50 μ L of 0.9% NaCl solution were injected in the plantar aspect of the homolateral hindpaw and again after 15 minutes; IP II-SF/T_homo, 50 μ L of 0.9% NaCl solution were injected in the plantar aspect of the homolateral hindpaw and, 15 minutes later, 50 μ L of solution containing 5 mg tramadol were injected in the same hindpaw; IP III-SF/T_contra, 50 μ L of 0.9% NaCl were injected in the plantar aspect of the contralateral hindpaw and, 15 minutes later, 50 μ L of solution containing 5 mg tramadol were injected in the same hindpaw; IP IV-Nal/T_homo, 50 μ L of naloxone (200 μ g) solution were injected in the homolateral hindpaw and 15 minutes later 50 μ L of solution containing 5 mg tramadol were injected. Before receiving the assigned drugs, baseline withdrawal thresholds for mechanical hyperalgesia using electronic von Frey were measured, then, after receiving the assigned drugs, withdrawal thresholds were measured at 15, 30, 45 and 60 min after drug injection. The same procedure was repeated in POD2. μ opioid receptor (MOR) and δ opioid receptor (DOR) protein expressions were evaluated using

immunoblotting after removal of ipsilateral dorsal root ganglia (L3, L4, L5 and L6) in groups of rats non submitted to plantar incision and 1, 2, 3 and 7 days after incision. RESULTS: Plantar incision led to marked mechanical hyperalgesia that was reversed with intraplantar tramadol in both days. Contralateral tramadol did not affect mechanical hyperalgesia and naloxone antagonized partially intraplantar tramadol in POD1, and antagonized completely in POD2. DOR expression in DRGs increased in POD2, POD3 and POD7, MOR expression did not change. CONCLUSIONS: Tramadol presented local analgesic effect after mechanical stimuli and this effect was antagonized by naloxone in the second post incision day. DOR increased expression after plantar incision.

Descriptors: Postoperative pain. Pain thresholds. Nociceptive pain. Opioid receptors. Tramadol. Naloxone, Rats.

1 INTRODUÇÃO

Estudos fisiológicos comparativos mostram que mesmo os mais primitivos organismos têm informações a respeito das características do meio ambiente, sendo capazes de distinguir entre um meio agressivo, um indiferente e um receptivo. A sensação dolorosa certamente contribui de modo fundamental em distingui-los. Sentir dor é crítico para a sobrevivência do indivíduo, e de maneira mais abrangente, filogeneticamente, da própria espécie (Junqueira e Carneiro, 1988; Oliveira Jr., 1994; Almeida, 1999; Araújo e Araújo, 2014).

A dor aguda não é um evento isolado, é sim uma sucessão de eventos de modo linear e não linear, que leva a um estado de hiperatividade defensiva, aumentando a chance de detecção de novos estímulos e otimizando o sistema de defesa. É considerada resposta fisiológica, normal e previsível aos estímulos térmicos, químicos ou mecânicos adversos, caracterizada por curta duração e reversão total do fenômeno com a interrupção do estímulo. Atualmente, é classificada como dor adaptativa (Woolf, 2004; Oliveira *et al.*, 2010).

A dor aguda é um poderoso indutor de estresse e de constituição de estado de alerta. Destarte é associada a uma resposta neuro-humoral caracterizada pelo aumento das concentrações tanto de cortisol como de catecolaminas, resultando em reações de hiperatividade autonômica (Park *et*

al., 2015; Kvetnansky *et al.*, 2013). A percepção de dor aguda é fruto de uma interação complexa que envolve fatores sensitivos, emocionais e comportamentais (Kehlet *et al.*, 2006).

Contrapondo à dor aguda encontramos a crônica, que não representa apenas um sintoma, mas, faz parte de um estado patológico bem definido, ou seja, uma disfunção do sistema somatossensitivo, que persiste além da solução do processo etiológico da mesma. A dor crônica é considerada como não adaptativa, expressa anormalidade no processamento do sinal doloroso, e, possui prognóstico reservado quanto sua resolução.

Os cirurgiões são dentre os médicos aqueles que pretendem tratar o doente provocando deliberadamente um ou mais ferimentos (Stracieri, 2008). A realização de um procedimento cirúrgico tem como objetivo melhorar a saúde do indivíduo. Sua boa prática, direcionada à segurança do doente, reduz seus efeitos indesejáveis, ocasionando a melhor recuperação no período pós-operatório (PO). Um desses efeitos é a dor aguda pós-operatória, considerada, antes de tudo, iatrogênica (Rocha e Moraes, 2010).

O tratamento adequado do desconforto doloroso no pós-operatório gera, obviamente, menor sofrimento e maior satisfação do doente. Também evita alterações adversas respiratórias, hemodinâmicas, e metabólicas, que predisõem o doente à instabilidade cardiovascular, maior consumo energético e proteico, e redução do volume ventilatório. A dor não controlada, especialmente em idosos e naqueles submetidos às cirurgias de maior porte, pode se associar ainda à redução da movimentação, deambulação tardia, trombose profunda (Oliveira *et al.*, 2010).

O alívio da dor pós-operatória previne, a longo prazo, a cronificação da dor e sua temível persistência patológica no período pós-operatório tardio (Perkins e Kehlet, 2000; Gottschalk e Raja, 2004; Kehlet *et al.*, 2006; Voscopoulos e Lema, 2010).

Estima-se que no mundo sejam realizadas 234,2 milhões de cirurgias a cada ano (Weiser *et al.*, 2008). No Brasil, em 1995 foram realizadas 2.374.785 cirurgias não cardíacas, enquanto que doze anos depois, em 2007, esse número subiu para 2.859.801 cirurgias e foram realizadas 1.232.627 cesáreas (Yu, 2010).

A dor pós-operatória é condição clínica que tem tratamentos adequados e eficazes, entretanto a prevalência de pacientes que apresentam dor moderada ou forte ainda é alta. Entre 50% e 70% dos pacientes sentem dor moderada ou forte ao longo do período pós-operatório (Pavlin *et al.*, 2002; Apfelbaum *et al.*, 2003).

Dados mais recentes da Sociedade Americana de Anestesiologia, mostraram que, em 2012, 78,2% dos pacientes referiam dor nas primeiras 24 horas do período pós-operatório, onde 27,1% sentiram dor forte, 58,3% dor moderada (American Society of Anesthesiologists Task Force on Acute Pain Management, 2012).

A dor pós-operatória apresenta algumas características particulares. Sempre há correlação espacial e temporal com a incisão cirúrgica, possui início precoce, tem provável duração limitada e tende a ser mais intensa no início, diminuindo ao longo do processo de cicatrização. A dor incisional pós-operatória é uma forma singular de dor aguda que apresenta dois

componentes, periférico e central (Pogatzki-Zahn *et al.*, 2007). Ocorre a sensibilização local (hiperalgesia primária) a estímulos mecânicos e térmicos, que indica a ocorrência de sensibilização periférica no aferente primário (Zahn e Brennan, 1999).

O desenvolvimento de modelos experimentais para o estudo da dor pós-operatória se fez necessário para facilitar o entendimento dos mecanismos geradores e de manutenção da dor pós-operatória, de maneira a facilitar a instituição de tratamentos mais eficazes para o controle dessa morbidade e de outras dela originadas (Kang e Brennan, 2013).

O modelo de incisão plantar tem sido utilizado para avaliação de hiperalgesia primária e secundária após diferentes estímulos (mecânico, térmico e químico), alterações na excitabilidade neuronal na medula espinhal, efeito de opioides e anestésicos locais por via intratecal (Brennan *et al.*, 1997; Zahn *et al.*, 1997; Zahn e Brennan, 1999; Vandermeulen e Brennan, 2000; Xu *et al.*, 2009).

O estudo dos efeitos periféricos de fármacos utilizados normalmente por via sistêmica, e, reconhecidos pelas suas ações centrais, como o tramadol, testados no modelo de incisão plantar, pode contribuir com a elucidação de algumas lacunas de nosso conhecimento sobre a dor pós-operatória.

O tramadol se constitui em uma boa opção para esse estudo, pois se trata de um fármaco peculiar. Exerce dois mecanismos de ação distintos e complementares: atividade opioidérgica de baixa intensidade e atividade monoaminérgica (noradrenérgica e serotoninérgica) não opioidérgica sobre

as vias de controle inibitório descendentes (Driessen *et al.*, 1993). Na periferia, recentemente, foram demonstradas sua ação anestésica local, com o bloqueio percutâneo sensitivo e motor do nervo ciático de roedores (Sousa *et al.*, 2012), e, sua ação analgésica não mediada por receptores opioides no período inicial da dor pós-operatória (Sousa e Ashmawi, 2015). Essas características do tramadol ensejam oportunidades de pesquisa singulares.

2 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Primário

Identificar a existência de ação analgésica opioide periférica do tramadol em modelo dor pós-operatória (incisão plantar) em ratos.

1.2 Objetivo Secundário

Avaliar a expressão periférica de receptores opioides μ (MOR) e δ (DOR) em gânglios das raízes dorsais lombares de ratos no modelo de dor pós-operatória (incisão plantar).

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O Fenômeno Doloroso

Segundo Todd (1992) “...a dor é atemporal, inelutável e desconcertantemente impossível de definir”. Ainda segundo autor, há um consenso coletivo que faz um ser humano sofrer solidário com a dor real ou potencial de outro. Essa sensação solidária humana chega até mesmo ser estendida a indivíduos de outras espécies. Sons (como gritos e choro) e imagens (como mímicas, lágrimas, ferimentos expostos), mesmo sem a expressão de uma só palavra, podem ser interpretados como associados à presença de dor, e causar impacto intenso naquele que ouve e vê. A sensação dolorosa é considerada como a essência humana que penetra, que atinge, que fere, que disciplina, que zomba, durante a jornada do berço ao túmulo. O solidário é atingido em nível profundo de suas sensibilidades onde o testemunho pode representar um paradoxo entre maldição e bênção imposta sobre a trindade humana de nascimento, existência e morte.

A dor é percebida como vivência pessoal íntima e dependente do estado de ânimo. O universo dos sentidos faz parte da existência subjetiva de modo tão intenso que, filosoficamente, só existe o indivíduo, e o “ambiente” nada é senão o produto de seu espírito (Todd, 1992; Oliveira, 1994).

A Associação Internacional Para o Estudo da Dor (IASP) define dor como a experiência sensitiva e emocional desagradável decorrente ou

descrita em termos de lesões reais ou potenciais ou ambas (Merskey e Bogduk, 1994).

A dor aguda é considerada a resposta fisiológica, normal e previsível aos estímulos térmicos, químicos ou mecânicos adversos, caracterizada por curta duração e reversão total do fenômeno com a interrupção do estímulo; e, sobretudo, conserva o valor biológico de preservação já citado. Recentemente, a dor aguda foi classificada como dor adaptativa pela sua função protetora que oportuniza a defesa contra lesões ou a cicatrização de lesões ocorridas (Woolf, 2004; Fong e Schug, 2014).

Contrapondo à dor aguda encontramos a dor crônica, que não representa apenas um sintoma, mas faz parte de um estado patológico bem definido, ou seja, uma disfunção do sistema somatossensitivo, que persiste além da solução do processo etiológico da mesma. A dor crônica é considerada como não adaptativa e expressa nitidamente anormalidade no processamento do sinal doloroso.

A dor aguda não é um evento isolado, é sim uma sucessão de eventos de modo linear e não linear, que leva a um estado de hiperatividade defensiva, aumentando a chance de detecção de novos estímulos e otimizando o sistema de defesa. A dor aguda é um tipo de dor classificada como adaptativa, pois contribui para a preservação da integridade do organismo. Uma das suas mais importantes características é a total reversão das alterações a ela imputadas, a partir da interrupção da estimulação (Fong e Schug, 2014).

A dor aguda é um poderoso indutor de estresse e de constituição de estado de alerta. Destarte é associada a uma resposta neuro-humoral caracterizada pelo aumento das concentrações tanto de cortisol como de

catecolaminas, resultando em reações de hiperatividade autonômica (Kvetnansky *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2015). A percepção de dor aguda é fruto de uma interação complexa que envolve fatores sensitivos, emocionais e comportamentais (Kerns e Jensen, 2006).

3.1.1 Modulação da dor e a sensibilização periférica

A capacidade de detectarmos estímulos dolorosos, processá-los e a eles adequadamente reagirmos não é estável, uniforme ou imutável. Ao contrário, podemos afirmar que essa capacidade modulatória é extremamente dinâmica, e, pode ocorrer em todas as instâncias do sistema nervoso, periférico e central (Basbaum e Fields, 1978).

A sensibilização periférica é um exemplo dessa modulação dinâmica. Nossos receptores dolorosos possuem limiares acima dos quais a intensidade dos estímulos dolorosos é reconhecida, e conseqüentemente transduzida. Esses limiares são modificados na dependência da concentração de substâncias chamadas de algio gênicas ou de mediadores inflamatórios. A maioria dessas substâncias é fruto direto de lesões celulares ou resposta de liberação das mesmas pelas células sobreviventes que foram expostas a estímulos vigorosos potencialmente danosos. No entanto, algumas substâncias algio gênicas podem ser liberadas pelos nociceptores que chegam a um patamar elevado de sensibilização, e, além de reduzir ainda mais os limiares dos nociceptores, induzem à respostas bioquímicas das células vizinhas (incluindo nociceptores de neurônios vizinhos), até dos próprios neurônios que as secretam (Oliveira *et al.*, 2010; Mantyh, 2014).

A secreção das substâncias algio gênicas pelos nociceptores pode ocorrer como resposta a estímulos diretos (nociceptivo) e indiretos (aumento das substâncias algio gênicas periféricas) ou ainda por via antidrômica, por sinalização de outro ponto do sistema nervoso, inclusive central, mesmo sem estímulo periférico em vigência. As substâncias secretadas pelos nociceptores (entre elas as neurocininas A, B e substância P, o polipeptídeo relacionado com o gene da calcitonina e a somatostatina), não se limitam a atuar aumentando a sensibilidade dolorosa, causando (pela vasodilatação e mudança da permeabilidade vascular) também edema e rubor, completando a clássica tríade flogística, e se constituindo na inflamação neurogênica (Gerdle *et al.*, 2014).

A prostaglandina E_2 , fruto da degradação do ácido aracdônico, proveniente principalmente de restos de membrana celular, se destaca entre as demais substâncias algio gênicas pela potência com que sua elevação reduz o limiar dos nociceptores. Ao contrário da bradicinina que estimula o nociceptor, a ação predominante da prostaglandina E_2 é a de sensibilizá-lo, e, somente em combinação com outras substâncias algio gênicas pode conseguir a produção de estimulação dolorosa química. Quando em concentrações baixas, o inverso é verdadeiro, a sensibilização periférica e a intensidade da dor ficam reduzidas (Woof, 2004; Oliveira *et al.*, 2010; Pillon, 2014; Tréchet e Jouzeau, 2014).

Nas vesículas dos terminais do sistema nervoso autônomo simpático além de catecolaminas encontramos prostaglandinas, que são liberadas com a chegada de potenciais de ação ortodrômicos, ou seja, centrífugos ao

sistema nervoso central, em resposta a reflexos axônio-axonais, ou ainda pelo estímulo da sopa inflamatória intersticial (Woof, 2004; Pilon, 2014; Tréchet e Jouzeau, 2014).

A exocitose dos terminais simpáticos embora seja antagonista à vasodilatação é sinérgica ao estado de hiperatividade reforçando a sensibilização periférica, age como amplificadora da sensação dolorosa na periferia. O bloqueio simpático periférico, invariável e inespecificamente, se associa a uma atenuação da dor (Birklein e Schlereth, 2015).

3.1.2 A Modulação da dor e a sensibilização central

Outro exemplo de modulação da dor ocorre na sensibilização central, conceito surgido no início da década de 1980 e consolidado na de 1990, que compreende um aumento da função neuronal individual (celular) e de circuitos nociceptivos (multicelular) causados por incremento da excitabilidade da membrana e da eficácia sináptica, e também por uma redução da inibição e da plasticidade do sistema nervoso somatossensitivo em resposta a uma inflamação periférica, atividade anormal ou lesão nervosa (Coderre *et al.*, 1993; Gebhart, 1993). Ocorre depois de um estímulo nociceptivo intenso ou repetitivo. Em ausência de lesão tecidual, o estado de alerta, de limiar diminuído à dor, retorna, gradativamente, com o tempo, ao seu estado inicial menos ativado. O mesmo ocorre na presença inicial de lesão tecidual após a resolução ou restauro das mesmas (Lluch *et al.*, 2014; Ingvar 2015).

O sistema pode retornar a um estado exagerado de alerta em condições nas quais o risco de uma nova lesão se torna elevado como no

caso da detecção de novos estímulos nociceptivos intensos, repetidos e ainda persistentes.

Essa sensibilização é expressão da plasticidade sináptica que ocorre no sistema nervoso central, deflagrada por estímulos nociceptivos persistentes. Há um estado de facilitação, potenciação, aumento e/ou amplificação. Há redução de influências inibitórias nos neurônios sensitivos do corno dorsal e alterações sinápticas e intracelulares que culminam com a produção permanente de sinalização de presença de estímulos dolorosos na via, mesmo na ausência de verdadeira estimulação periférica, isto é, de modo espontâneo (Ossipov *et al.*, 2010; Ingvar, 2015).

Neurônios nociceptivos de segunda ordem que possuem comportamento dinâmico e ajustável na dependência de seu nível de sensibilização habilitam sinapses antes silenciosas que recebem estímulos não dolorosos e também estímulos originários de outras áreas do corpo fora do território representado pelo segmento medular no qual ele se encontra. Esses neurônios considerados unidades de convergência, recrutados pela sensibilização, são responsáveis tanto pelas dores referidas (dores em que o local da queixa é distante do local em que é aplicado o estímulo) como pela presença de alodinia (dor a partir de estímulo não doloroso). Embora essa situação possa ocorrer em estado hiperalerta sem comprometimento da integridade do sistema somático sensitivo, nos quadros crônicos há mudanças genéticas celulares que causam sua persistência e refratariedade aos tratamentos (Fong e Schug, 2014).

3.1.3 As dores aguda e crônica

A diferença entre as dores agudas e as crônicas, paradoxalmente, não está diretamente na questão do tempo de duração em si, e sim no grau de sensibilização do sistema nervoso em cada uma delas. Mais que isso, está na reversibilidade, ou não, das alterações ocorridas no sistema nervoso, e, conseqüentemente, se relaciona com o prognóstico de sua evolução e na utilidade de serem sentidas.

A dor crônica é considerada como aquela que persiste após o tempo normalmente esperado para uma determinada lesão ou estimulação. Aquela que persiste após o período normal de cura ou de restauro. Na prática, corresponde a uma faixa de tempo entre poucas semanas e seis meses. A dor crônica, ao contrário da aguda, não possui utilidade protetora e para o médico migra da situação de mero sintoma para a de doença em si própria. É considerada um tipo de dor não adaptativa, pois não contribui com a preservação da integridade do organismo.

A dor aguda é relacionada com bom prognóstico terapêutico e tratada com o objetivo de cura, enquanto a crônica é refratária, possui mau prognóstico terapêutico e o objetivo principal do seu tratamento é a melhora da qualidade de vida de seu portador (Gaynor e Muir, 2014).

3.2 Modelo de Incisão Plantar

A dor pós-operatória ainda é fator de alta morbidade e desconforto. Existe grande corpo de evidências indicando que o tratamento apropriado e adequado da dor aguda pós-operatória diminui a morbidade após cirurgia, melhora o estado do paciente, assim como reduz o custo total do tratamento (Kehlet e Holte, 2001; Kehlet e Wilmore, 2002). É conhecido também que o alívio da dor pós-operatória previne, a longo prazo, a cronificação da dor ou persistência patológica no período pós-operatório (Gottschalk e Raja, 2004; Kehlet *et al.*, 2006; Voscopoulos e Lema, 2010, Lavand'homme, 2011).

O desenvolvimento de novas técnicas de tratamento e de fármacos para analgesia pós-operatória tem sido constante, mas, mesmo com esse progresso, a presença de dor pós-operatória ainda é problema enfrentado por parte importante da população submetida a procedimentos cirúrgicos. No primeiro dia do período pós-operatório entre 22 e 41% dos pacientes referem dor moderada ou intensa (Dolin *et al.*, 2002) e 50 a 70% dos pacientes ainda manifestam dor moderada ou forte ao longo do período pós-operatório (Pavlin *et al.*, 2002; Apfelbaum *et al.*, 2003).

A condição de tratamento inadequado continua se mantendo nos tempos mais atuais e, em 2012, 78,2% dos pacientes referiam dor nas primeiras 24 horas do período pós-operatório, onde 27,1% sentiram dor forte, 58,3% dor moderada (American Society of Anesthesiologists Task Force on Acute Pain Management, 2012).

O desenvolvimento de modelos experimentais para o estudo da dor pós-operatória se fez necessário para facilitar o entendimento dos

mecanismos geradores e de manutenção da dor pós-operatória, de maneira a facilitar a instituição de tratamentos mais eficazes para o controle dessa morbidade. Vários são os modelos experimentais e laboratoriais descritos de dor pós-operatória em animais. Dentre eles estão a ovariectomia em ratas (Lascelles *et al.*, 1995), a laparotomia subcostal (Martin *et al.*, 2004) e a toracotomia em ratos (Buvanendran *et al.*, 2004).

O modelo mais consagrado e, a partir do qual, foi obtido maior conhecimento sobre a fisiopatologia e mecanismos da dor pós-operatória, foi o modelo de incisão plantar descrito por Brennan *et al.* (1996). A partir dele, foi verificado que a dor pós-operatória experimental apresenta componente de dor espontânea e dor evocada ou provocada. Este comportamento é semelhante ao observado na prática clínica, quando os pacientes operados apresentam dor espontânea durante o repouso, geralmente de curta duração, de intensidade moderada e com boa resposta aos opioides e anti-inflamatórios não esteroidais. Ao mesmo tempo, é observada a ocorrência de dor relacionada ao movimento, como tosse, mobilização ou deambulação. Esta dor é mais intensa, prolongada e de tratamento mais difícil (Pogatzki-Zahn *et al.*, 2007) e equivale à dor observada após a estimulação térmica ou mecânica na região da incisão plantar.

A liberação de mediadores inflamatórios após lesão tecidual faz parte da resposta inflamatória, mas também ocorre isquemia do tecido lesado com aumento da produção de lactato tecidual (Kim *et al.*, 2007) e diminuição do pH (Woo *et al.*, 2004) na área incisional. Respostas semelhantes à inflamação são induzidas pela lesão tecidual operatória e são,

provavelmente, diferentes daquela induzida por substância irritativa como a formalina ou carragenina (Brennan *et al.*, 2005).

A dor incisional pós-operatória é uma forma singular de dor aguda que apresenta dois componentes, periférico e central (Pogatzki-Zahn *et al.*, 2007). Ocorre a sensibilização local (hiperalgesia primária) a estímulos mecânicos e térmicos, que indica a ocorrência de sensibilização periférica no aferente primário (Kress e Reeh, 1996; Zahn e Brennan, 1999).

Os mecanismos mais importantes na sensibilização periférica são a liberação de mediadores inflamatórios, isquemia e acidose local (Woo *et al.*, 2004). O componente central da dor incisional ocorre em função do fenômeno de sensibilização central e é percebido como a hiperalgesia, chamada de hiperalgesia secundária, que ocorre na região circunjacente à incisão cirúrgica e que está ligada à sensibilização dos neurônios de segunda ordem presentes no corno dorsal da medula, principalmente nas lâminas I, II e V de Rexed (Zahn e Brennan, 1999).

O modelo de incisão plantar tem sido utilizado para avaliação de hiperalgesia primária e secundária após diferentes estímulos (mecânico, térmico e químico), alterações na excitabilidade neuronal na medula espinhal, efeito de opioides e anestésicos locais por via intratecal (Brennan *et al.*, 1997; Zahn *et al.*, 1997; Zahn e Brennan, 1999).

3.3 O Estudo do Fenômeno Doloroso e as Dificuldades na Busca das Respostas e de Aplicá-las Quando Delas Dispomos

No início do século passado, em 1905, Einstein, em seu artigo “A eletrodinâmica dos corpos em movimento” solucionou, a partir de dois postulados, problemas com os quais alguns físicos de sua época estavam se defrontando. Dentre essas questões, podemos destacar a não validade do princípio da relatividade galileana para o eletromagnetismo. Nesse contexto, deve-se acrescentar o caráter absoluto atribuído ao éter, meio aceito como aquele que sustentava a propagação das ondas eletromagnéticas. Outros cientistas, como Lorentz e Poincaré, já haviam se questionado a respeito desses temas, mas, os caminhos escolhidos e por eles elaborados para esclarecê-los foram menos revolucionários e ao mesmo tempo mais tortuosos do que os de Einstein (Holton e Elkana, 1997; Ron, 2004 e 2010). Einstein defendeu que o princípio da relatividade estabelecido por Galileu deveria ser mais abrangente, ou melhor, válido para todas as leis da Física, e não apenas para as da Mecânica. Ao mesmo tempo, rejeitou o éter, como meio de propagação luminosa necessária, e, de modo mais amplo considerou supérfluo assumir um meio material que sustentasse a propagação das ondas eletromagnéticas. Estabeleceu, ainda, que o conceito de repouso absoluto não correspondia a nenhuma propriedade dos fenômenos mecânicos ou eletrodinâmicos (Einstein, 1999).

Ao assumir essas considerações, Einstein precisou alterar conceitos estabelecidos e vivenciados no senso comum como os de tempo e espaço (Clarage, 2013). A história se encarregou de documentar os desatinos de boa parte da classe científica que se perfilou contra o alemão.

Até os dias de hoje, há debates sobre o que ensinar sobre Física aos nossos estudantes secundários. Os abnegados professores de Física lutam contra preconceitos para aprovar e ministrar dentro do currículo oficial conceitos que já datam de mais de um século (Andreia *et al.*, 2007).

Esse breve levantamento do famoso cientista alemão não pretendeu explicar o seu trabalho, mas fazer uma rápida descrição de alguns dos problemas que uma teoria no campo da Física, a da relatividade restrita resolveu e alguns dos que ela apresentou.

No estudo do fenômeno doloroso encontramos dificuldades semelhantes que se renovam a cada momento. Grande parte de nosso tempo é dedicada à tarefa didática necessária para dirimir dúvidas e afastar paradigmas preconceituosos.

Nas consultas médicas, temos que esclarecer que, às vezes, antidepressivos são prescritos como analgésicos e não como antidepressivos; que um analgésico anti-inflamatório clássico como o ácido acetilsalicílico é prescrito exclusivamente como preventivo de infartos cerebrais e/ou cardíacos e não como analgésico; que ao prescrevermos um opiáceo não estamos comunicando um prognóstico reservado e condenando o doente a um fim próximo, nem ao uso ininterrupto desse fármaco pela dependência inexorável.

Nos retornos das consultas encontramos uma população heterogênea composta, em seus extremos, de um lado, por doentes e ou acompanhantes, que foram realmente bons receptores dos novos conhecimentos e os aceitaram, e, de outro lado, por outros que simplesmente os ignoraram.

Assim, como alguns doentes e cuidadores se mostram impermeáveis aos esclarecimentos, nós, médicos também nos comportamos de modo semelhante, durante décadas, como surdos funcionais ao ouvirmos de nossos doentes que às vezes os comprimidos de amitriptilina, tramadol ou mexilitina grudavam na língua e que deixavam sensação de adormecimento, formigamento, analgesia ou anestesia no local. Nada demais com respeito aos comprimidos de mexilitina, um análogo da lidocaína (um conhecido anestésico local), mas, com respeito aos outros dois fármacos citados...

As ações, analgésica e anestésica, já estavam lá, nos relatos e testemunhos de nossos doentes, e, provavelmente, desde o lançamento ao mercado da forma oral do tramadol, em meados dos anos 80.

3.4 A Experimentação em Animais

A necessidade humana em entender como o organismo funciona levou ao incremento das pesquisas utilizando animais de experimentação. Juntamente com essa prática começou a preocupação sobre a moralidade envolvida e o sofrimento dos animais.

A questão dos direitos dos animais e a sua utilização em pesquisas vêm sendo discutida desde o século XVII, não apenas agora e em casa.

O filósofo Jeremy Bentham, em 1789, parecia não se opor à experimentação animal e questionava sobre os pretensos direitos daqueles que, na sua opinião (de acordo com a concepção não apenas dele, mas da maioria de seus pares, naquela época), não poderiam raciocinar, falar ou sofrer. Claude Bernard, em 1865, defendia que experimentos fossem feitos

sempre em animais, alegando que se era dado o direito de usá-los para serviços caseiros e alimentação, por que não também a serviço da ciência, de forma útil para a humanidade (Parodi, 2009; Izmirli *et al.*, 2010).

Surgiram discussões também sobre o valor da experimentação animal, especificamente para o esclarecimento do que ocorre no ser humano, uma vez que as diferenças entre as espécies por si só representam dificuldades para uma perfeita translação de resultados obtidos.

Marshal escreveu que a pesquisa que utiliza experimentação animal deveria ser evitada se a informação necessária pudesse ser obtida através de observação; se o objetivo do mesmo não estiver claramente definido e/ou não puder ser atingido; se os autores não possuírem formação e informação suficiente sobre o trabalho de seus predecessores e pares no sentido de evitar repetição desnecessária; se a execução não puder ser feita com o mínimo possível de sofrimento dos animais; e se as circunstâncias não pudessem ser criadas para promover os resultados mais claros possíveis, o que diminuiria a necessidade de repetição de experimentos (Hall, 1847).

A primeira contribuição teórica significativa para minimizar os aspectos éticos negativos da experimentação animal foi feita no final da década de 1950, com o conceito dos três "R" (do inglês: "*Reduction, Replacement e Refinement*"). O primeiro "R" corresponde ao uso do menor número possível de animais consistente com a obtenção dos objetivos do estudo; o segundo corresponde à substituição dos experimentos com animais por outros, quando os objetivos científicos puderem ser alcançados sem a utilização dos mesmos; e, finalmente, o terceiro, que seria atingir um

refinamento da condução dos experimentos científicos para assegurar o mínimo possível de sofrimento ou estresse para os animais envolvidos na pesquisa (Matfield, 1996).

A redução máxima de animais que participarão em um determinado estudo, que corresponde ao primeiro dos três “R”, é um dos desafios com os quais lidamos em estatística para a escolha do chamado tamanho amostral mínimo. Amostras desnecessariamente grande acarretam desperdício de tempo e de dinheiro, além da possibilidade de proporcionar desconforto em um número maior de animais. As amostras excessivamente pequenas podem levar a resultados não confiáveis.

O debate público sobre a experimentação em animais vivos continuou, particularmente fora do Brasil, o que pressionou a definição de uma legislação que pudesse prevenir a crueldade com animais (Baumans, 2004).

As primeiras iniciativas para regulamentar a pesquisa com animais de laboratório no Brasil surgiram durante o governo Getulio Vargas. Somente após quatro décadas, uma lei foi publicada estabelecendo “normas para a prática didático-científica da vivissecção de animais”, sem, no entanto, ter sido regulamentada mesmo após sua aprovação pelo Congresso Nacional (Schnaider e Souza, 2003).

No início do século XXI, a oposição às pesquisas com animais experimentais começou a aumentar no Brasil e foram apresentados diversos projetos municipais e estaduais que tentavam impedir totalmente o uso de animais de experimentação em pesquisas científicas. Muitos desses projetos causaram graves prejuízos à pesquisa científica e a saúde humana (Rollin, 2006).

O projeto Arouca, e, posteriormente, a Lei Arouca, contribuíram para uma regulamentação mais efetiva e adequada (Tinoco, 1998). Uma de suas peças fundamentais foi a criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), ligado ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, com competências para expedir e fazer cumprir normas relativas à utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica; credenciar instituições brasileiras para a criação ou utilização de animais em ensino e pesquisa científica; e, monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa (Bonella, 2009).

Cumprindo com suas finalidades, o CONCEA está estabelecendo as normas para uso e cuidados com animais para ensino e pesquisa em consonância com as convenções internacionais das quais o Brasil é signatário (Albuquerque, 2015).

Sabemos que a utilização das práticas experimentais para elucidação do fenômeno doloroso que envolve animais, necessita continuamente avaliação e reavaliação. Na área de pesquisa do fenômeno doloroso, o próprio fulcro do estudo, a dor, limita a obtenção de situações completamente ausentes de desconforto, estresse ou mesmo dor. A criatividade e o dever ético dos pesquisadores devem ser movidos a minimizar ao máximo tais fatores potencialmente nocivos.

Interesses científicos se associam aos humanitários para redução do sofrimento impingido aos animais de laboratório, pois as respostas obtidas durante o trabalho são também por ele influenciada. Os preceitos éticos, relacionados à condição de vida e bem-estar dos animais durante todos os

estágios de projetos, devem ser levados em consideração pelos autores e também pelo controle destes projetos por meio de comitês de ética das instituições de pesquisa (Baumans, 2004).

A experimentação animal ainda é considerada uma das principais formas de pesquisas médicas, e, o progresso científico está longe de poder substituí-la integralmente por métodos alternativos (Gomes *et al.*, 2014).

3.5 O Fármaco: Tramadol

A indicação do tramadol encontra espaço tanto no controle das dores crônicas como das agudas. Trata-se de um opioide especial classificado como fraco em comparação com o padrão: morfina. Seu mecanismo de ação analgésica transcende o mediado pela estimulação dos receptores opioides e inclui sua interferência na recaptura de aminas neurotransmissoras nas vias supressoras da dor no sistema nervoso central. O tramadol também possui ação periférica local que é objeto do presente trabalho.

3.5.1 Farmacologia

O tramadol é análogo da codeína sintetizado em 1962 pela empresa farmacêutica Grünenthal GmbH, fundada havia, na ocasião há apenas 16 anos, em 1946, na Alemanha do pós-guerra (Pedersen *et al.*, 2006).

Sua comercialização ocorreu apenas em 1977, na própria Alemanha, na forma injetável. A forma oral foi comercializada quase duas décadas depois (McMillan *et al.*, 2008; Almeida, 2009).

Figura 1 - Formula química do tramadol

Também identificado como (1RS,2RS) – 2 - [(dimetilamino)-metil] – 1 (3 -metoxiphenil) - ciclohexanol, o tramadol é um fármaco analgésico de ação central, utilizado para tratamento de dores moderadas e intensas, agudas ou crônicas e bastante difundido no tratamento da dor pós-operatória (Rawal *et al.*, 2001), da dor neuropática (Sindrup *et al.*, 1999), de dor musculoesquelética, nas condições álgicas em emergências clínicas e da dor oncológica (Mishra *et al.*, 2008).

A indicação do uso do tramadol nessas condições baseia-se no mecanismo de ação central, sendo habitualmente administrado por via oral e venosa, embora a ação analgésica possa ocorrer quando da administração por outras vias.

A estrutura química do tramadol é próxima àquela da codeína. Apresenta o grupamento metil na parte fenólica da molécula que lhe rende certa atividade agonista para receptores opioides μ , δ e κ . Sua afinidade por receptores μ opioides é muito reduzida, cerca de 6000 vezes inferior à morfina, 100 vezes inferior ao dextropropoxifeno e 10 vezes inferior à codeína (Bamigbade e Langford, 1998).

Após administração por qualquer via, tanto em animais como em humanos, o tramadol é metabolizado no fígado no derivado desmetilado (o-desmetil-tramadol) (M1) que é farmacologicamente ativo e cuja afinidade por receptores μ é 200 vezes superior à molécula original (Raffa *et al.*, 1992). O efeito da passagem hepática é de incremento da analgesia promovida pela ação deste derivado.

O tramadol é comercializado sob a forma de mistura racêmica de dois enantiômeros (dextro+ e levógiro-), que apresentam diferentes propriedades farmacológicas, sobretudo no que diz respeito à afinidade por receptores opioidérgicos, possuindo, no entanto, atividade sinérgica e complementar que resulta em efeito analgésico (Raffa *et al.*, 1992). A atividade antinociceptiva desta mistura é desprezível, sendo o metabolismo pelo sistema de citocromos, o fator determinante responsável pela analgesia induzida pelo fármaco (Garrido *et al.*, 2003).

O metabolismo hepático do tramadol origina metabólitos levógiros e dextrógiros que acompanham, respectivamente, os enantiômeros originais, tanto em estrutura química quanto em função.

O tramadol exerce dois mecanismos de ação distintos e complementares: atividade opioidérgica de baixa intensidade e atividade monoaminérgica não opioidérgica sobre as vias de controle inibitório descendentes.

In vitro, o tramadol tanto se fixa aos receptores opioidérgicos quanto inibe a recaptação de noradrenalina e serotonina em concentrações semelhantes (Driessen *et al.*, 1993).

O aumento da concentração extraneuronal de noradrenalina e serotonina, ocorre por interferência na recaptação destes neurotransmissores em autorreceptores da fenda sináptica (Driessen *et al.*, 1993; Bamigbade *et al.*, 1997), que lhe confere ação analgésica e antidepressiva (Berrocoso *et al.*, 2006).

As ações opioidérgicas e não opioidérgicas do tramadol ocorrem sinergicamente sobre as vias descendentes inibitórias, reduzindo a atividade de neurônios de segunda ordem da medula espinhal. Tais vias originam-se em alguns núcleos no tronco cerebral, como no núcleo da rafe, na substância cinzenta periaquedutal, na porção ventromedial do bulbo, no *locus ceruleus* e nas vias reticuloepinhais. Estas se projetam sobre a medula espinhal reduzindo a condução de estímulos dolorosos em animais e humanos (Goffaux *et al.*, 2007).

O tramadol aumenta a efetividade das vias descendentes inibitórias à medida que induz o aumento da concentração de neurotransmissores inibitórios no corno dorsal da medula espinhal.

A mistura racêmica de tramadol [(+) M1 e (-) M1] é mais eficaz que os respectivos metabólitos isolados. O (+) M1 induz a liberação de noradrenalina na fenda sináptica, enquanto o (-) M1 inibe a recaptação deste neurotransmissor. Tal mecanismo determina o sinergismo da mistura racêmica (Garrido *et al.*, 2000).

Náuseas e vômitos, contudo, têm maior incidência com a forma dextrógira, sendo a mistura racêmica, portanto, superior em eficácia e tolerância aos enantiômeros isolados (Gentili e Chauvin, 2004).

3.5.2 Uso clínico do tramadol por via sistêmica: metabolismo e eliminação

Estudos em voluntários sadios relatam alívio da hiperalgesia induzida por estimulação elétrica e do reflexo R III em membros inferiores com tramadol 100 mg por via oral. A naloxona administrada por via endovenosa antagoniza apenas parcialmente a analgesia induzida pelo tramadol enquanto a ioimbina, antagonista $\alpha 2$ -adrenérgico, abole quase completamente a analgesia. Em animais, o antagonismo do efeito analgésico opioide do tramadol com naloxona produz resultados contraditórios. Em alguns estudos, a naloxona bloqueia completamente a analgesia pelo tramadol, enquanto em outros, esta inibição ocorre parcialmente (Dayer *et al.*, 1997). Kayser *et al.* (1991) referem aproximadamente 30% de inibição do efeito do tramadol pela naloxona.

Além da ação analgésica mista, o tramadol apresenta reduzida afinidade por receptores opioides, com mínimo potencial para indução de dependência física. Tais características associadas à necessidade de biotransformação hepática e atividade agonista monoaminérgica tornam o fármaco pouco suscetível ao abuso de medicamentos (Dayer *et al.*, 1997).

A biodisponibilidade do tramadol administrado por via oral é elevada (70% a 90%) e não tão rápida (15 a 45 minutos). Após múltiplas doses, a biodisponibilidade se aproxima de 100%, provavelmente por saturação do sistema de primeira passagem hepática. A administração concomitante a alimentos aumenta a disponibilidade, sendo recomendada por via oral, dose semelhante à dose venosa, administrada três a quatro vezes ao dia em humanos.

O início de ação aparece após 30 a 45 minutos da administração oral ou venosa, devido à necessidade de metabolização hepática do tramadol para a plena atividade analgésica. Isto se deve ao fato de que, além do predomínio do componente monoaminérgico sobre o opioidérgico, o metabólito M1 tem participação importante na analgesia desencadeada pelo tramadol. Este metabólito resulta da desmetilação da molécula original pelo sistema de citocromo P450 (CYP2D6) hepático, que é pouco funcionante em cerca de 6% a 8% dos indivíduos caucasianos, tornando-os pouco responsivos ao efeito analgésico do tramadol (Poulsen *et al.*, 1996). Por outro lado, pequena parcela da população (ao redor de 1%) apresenta duplicação genética do codificador desta enzima, tornando esses indivíduos metabolizadores rápidos do tramadol, fato este que pode acarretar não somente aumento dos efeitos analgésicos, mas também de efeitos adversos decorrentes do excessivo metabolismo do fármaco (Kirchheiner *et al.*, 2008).

3.5.3 Utilização clínica de tramadol no local da lesão

O tramadol administrado por via intradérmica promove analgesia em voluntários estudados com a utilização de modelo de dor cutânea (Pang *et al.*, 1998).

A possibilidade de utilizar o tramadol por injeção local em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos de pequeno porte, como herniorrafias inguinais em crianças (Demiraran *et al.*, 2006), é motivo de interesse de muitos pesquisadores clínicos, devido ao seu possível mecanismo de ação local ao ser injetado no subcutâneo.

O tramadol associado a anestésicos locais, aumenta o tempo de analgesia (Altunkaya *et al.*, 2004) e do bloqueio motor (Kaabachi *et al.*, 2009) em pacientes submetidos a bloqueios do plexo braquial. Associado à lidocaína, tramadol reduz a dose total de anestésico local utilizado na técnica de anestesia venosa regional (Acalovschi *et al.*, 2001) e aumenta o tempo para a solicitação da primeira dose de analgésicos após infiltração direta na incisão de herniorrafia inguinal em crianças (Demiraran *et al.*, 2006). Kesimci *et al.* (2007), contudo, não comprovaram tais resultados utilizando ropivacaína.

A associação de tramadol à lidocaína (Kaabachi *et al.*, 2009) melhora a analgesia, prolonga o bloqueio motor, mas aumenta o tempo de latência do bloqueio de plexo braquial em pacientes submetidos a cirurgia de mão. Em cirurgia urológica, tramadol associado à bupivacaína prolonga o tempo de latência, mas não a duração do bloqueio peridural caudal em crianças (Prosser *et al.*, 1997). Em discectomias lombares, o tramadol por infiltração incisional diminuiu os escores de dor no primeiro dia de pós-operatório (Ozyilmaz *et al.*, 2012). A associação de tramadol à bupivacaína, em bloqueio locorregional de membro inferior, melhorou a qualidade e a duração da analgesia em pacientes submetidos à cirurgia ortopédica ou em herniorrafia inguinal (Kumar *et al.*, 2009; Giraldes *et al.*, 2015).

3.5.4 Ação analgésica periférica do tramadol

A utilização clínica do tramadol como adjuvante a anestésicos locais baseia-se em estudos experimentais que evidenciam bloqueio da condução neural com a administração desta substância.

O tramadol possui uma ação agonista débil sobre os MORs (Raffa *et al.*, 1992) e possui também outras ações como a inibição de recaptação de serotonina e norepinefrina (Berrocoso *et al.*, 2006) e, talvez a inibição de canais de sódio dependente de voltagem (Haeseler *et al.*, 2006), inibição de canais de potássio retificadores retardados (RICP) (Tsai *et al.*, 2006), e de receptores ionotrópicos GABA-A e NMDA (Hara *et al.*, 2005). O tramadol, ao contrário do seu metabólito M₁, reduz os potenciais de ação induzidos por estímulo elétrico em nervos isolados de rãs (Katsuki *et al.*, 2006).

A aplicação direta de tramadol sobre o nervo ciático reduz de modo relacionado à dose tanto a amplitude, quanto a velocidade de condução de potenciais evocados somatosensoriais na medula espinhal de ratos (Tsai *et al.*, 2001).

O tramadol, assim como a lidocaína, reduz a amplitude dos potenciais de ação de nervos ciáticos lesados de modo relacionado à concentração da solução e à frequência dos estímulos. A lidocaína, contudo, induz redução destes potenciais em menores concentrações que o tramadol (Mert *et al.*, 2006). Sousa *et al.* (2012) demonstraram efeito local semelhante ao de anestésico local em nervos ciáticos de ratos em modelos de dor induzidas por formalina e de incisão plantar.

O efeito analgésico local do tramadol demonstrado em diversos outros experimentos foi semelhante ao efeito anestésico local (Tsai *et al.*, 2001; Mert, *et al.* 2002 e 2006; Haeseler *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2012).

3.6 Receptores Opioides

Alguns fármacos, como os opioides, manifestam atividade biológica em concentrações diminutas, sendo, por isso, classificados como estruturalmente específicos. O efeito produzido por eles é atribuído a interação com uma substância receptora específica. Como resultado desta interação, o fármaco forma um complexo com o componente celular, que recebeu o nome de receptor. A ideia da existência de receptores precedeu as evidências encontradas na pesquisa laboratorial dos mesmos (Pert e Snyder, 1973). Três características suportaram hipoteticamente a existência dos receptores: a alta potência de certas substâncias que conseguem respostas a partir de doses infinitesimais; a presença de especificidade química (mesmo entre isômeros ópticos); e, finalmente, a especificidade biológica que resulta respostas diferentes em tecidos ou órgão diferentes. Como a maioria dos agonistas opiáceos são seletivos, mas não específicos, é esperado um amplo espectro de respostas ou comportamentos devido à ativação de diferentes receptores opioides (Pert e Snyder, 1973; Taylor *et al.*, 2015).

3.6.1 Nomenclatura dos Receptores opioides

A combinação da clonagem e das técnicas de biologia molecular permitiu progressos importantes no conhecimento sobre a estrutura e função dos receptores dos neurotransmissores e outros mensageiros químicos. Assistimos um grande aumento da importância dos biólogos dentro da comunidade científica, daqueles que se dedicam à pesquisa dos receptores opioides.

A partir de pesquisas com preparados de íleo de roedores foram identificados três receptores da classe dos opioides e foram nomeados com letras gregas de acordo com a correspondente inicial de cada substância específica utilizada para estimulá-lo (Martin *et al.*, 1976). Foi denominado receptor μ (mu) ao receptor ativado pela morfina; κ (kappa) aquele responsivo a cetociclazocina e; σ (sigma) pela substância SKF 10047.

O receptor sigma não se revelou como verdadeiro receptor da classe dos opioides. Estudos subsequentes falharam em demonstrar a existência do receptor do tipo sigma (Brownstein, 1993).

Em 1980, um novo tipo de receptor opioide foi descoberto, inicialmente, em ratos *vas deferens*, e, foi denominado receptor δ (delta). Com isso, a classificação dos receptores opioides, proposta pelos farmacologistas voltou a ser composta de três tipos: δ , κ e μ (Pert e Snyder, 1973; Kosterlitz *et al.*, 1980).

O receptor δ foi o primeiro a ser clonado em laboratório. Possui como agentes agonistas principais a encefalina (deltorfina) cuja seletividade é baixa, mas possui alta afinidade, e também o SIOM, derivado da naltrexona, mais seletivo e potente. Antagonizando tal substância, encontra-se o

naltrindol, também derivado da naltrexona, sendo este, o primeiro a ser sintetizado em laboratório (Kosterlitz *et al.*, 1980).

Nos receptores κ , o primeiro agonista identificado foi a cetociclazocina e como antagonista possui a nor-binaltorfimina, de potente ação (Emmerson *et al.*, 1994).

Nos receptores μ , o primeiro agonista identificado foi a morfina, e como antagonista, a naloxona (Emmerson *et al.*, 1994).

Os biólogos que atuam na área da biologia molecular defenderam a mudança na nomenclatura estabelecida pelos farmacologistas. A proposta trocava as letras gregas δ , κ e μ pelas respectivas siglas inglesas DOR (receptor de opioide delta, em português), KOR (receptor de opioide kappa, em português) e MOR (receptor de opioide mu, em português).

No entanto, tal nomenclatura ainda continuou sendo fonte de controvérsias. Os farmacologistas, nos meados da década de 1990, representados pela International Union of Pharmacologists propuseram uma nova nomenclatura de acordo com a sequência histórica de clonagem dos receptores. Os receptores seriam nomeados por OP (sigla inglesa para peptídeo opioide), seguidos de um número subscrito referente a ordem cronológica de clonagem e, quando necessário, uma letra a seguir para os subtipos. Sendo assim os receptores DOP (DOR) passaram a ser denominados OP1, KOP (KOR) seriam descritos como OP2 e assim sucessivamente (Dhawan *et al.*, 1996).

Somente levo-isômeros rotatórios dos opioides possuem atividade opiácea comprovada. Em humanos, os genes que codificam a transcrição

destes receptores estão localizados da seguinte maneira: no cromossomo 1 para os DORs, no braço longo do cromossomo 8 para os KORs, e, por fim os MORs são codificados pelo cromossomo 3 (Dhawan *et al.*, 1996).

Todos os receptores são acoplados à proteína G e todos inibem a adenililcilase reduzindo indiretamente a concentração do íon livre de cálcio, inibindo a exocitose dos mediadores químicos da via sensitiva dolorosa.

A ativação dos MORs aumenta a condutância do íon potássio, hiperpolarizando os neurônios centrais e aferentes primários. A ativação dos receptores kappa e delta fecha canais de cálcio.

3.6.2 Receptores opioides periféricos

Receptores opioides são detectados nos níveis pré, pós e extrasináptico. No sistema nervoso periférico foram encontrados receptores opioides nas fibras nervosas sensitivas e simpáticas da pele e das articulações, nos plexos submucosos intestinais, na bexiga urinária e canais deferentes. No sistema digestório, receptores opioides se expressam em condições normais e recebem a denominação de receptores opioides constitutivos, no entanto, em outras estruturas, como a pele e as articulações, apenas se expressam depois de uma lesão tissular a partir das alterações inflamatórias decorrentes (Stonski e Cullen, 2007).

A ação analgésica dos opiáceos pode ocorrer periféricamente no local da lesão, no corno posterior da medula espinhal e nas regiões mais proximais do tronco cerebral.

A maioria dos trabalhos envolve o estudo do efeito sistêmico do opioide, considerando o efeito analgésico periférico limitado (Stein *et al.*, 2003; DeHaven-Hudkins e Dolle, 2004; Riviere, 2004).

Agonistas opioides de MOR, DOR e KOR apresentam ação dose dependente anti-hiperálgica em modelos de dores inflamatórias (Stein *et al.*, 1989).

Os agonistas de MOR apresentaram efeito reversor da hiperalgesia mediada pela bradicinina e prostaglandina E2 (Taiwo e Levine, 1991).

Alguns estudos clínicos demonstraram o efeito antálgico potente e duradouro dos opioides após administração local, como intrarticular após cirurgia de joelho (Stein *et al.*, 1991 e 1999), dor no doente queimado (Moiniche *et al.*, 1993), dor visceral (Duckett *et al.*, 1997), osteoartrite (Likar *et al.*, 1997), artrite reumatoide (Stein *et al.*, 1999), e dor dentária (Likar *et al.*, 1998).

Os receptores opiáceos são produzidos nos cariossomas dos neurônios sensitivos situados nos gânglios sensitivos das raízes dorsais e, de modo antidrômico, migram para a periferia, e de modo ortodrômico, para o sistema nervoso central ao longo de suas fibras (Fields *et al.*, 1980; Hassan *et al.*, 1993; Coggeshall *et al.*, 1997).

Na periferia, a inflamação leva à produção de peptídeos opioides pelas células imunes, que provavelmente também atuam sobre os nociceptores das fibras nervosas aferentes, reduzindo a dor que de outra forma seria percebida. Os receptores opiáceos da região do corno dorsal poderiam atuar em nível pré-sináptico, reduzindo a liberação de substância P. Durante uma lesão há aumento da transcrição do RNA mensageiro,

transporte por microtúbulos dos receptores opioides, aumentando a concentração dos mesmos no GRD, assim como a ligação da proteína G ao MOR (Truong *et al.*, 2003).

Em modelos de dor neuropática a expressão desses receptores é contraditória pelo aumento dos MORs, porém é observada a diminuição do número de células com expressão de MORs funcionantes (Truong *et al.*, 2003).

Os receptores do opioide endógeno delta (DORs) produzem, em média, respostas de tolerância mais pronunciadas quando comparadas com os MORs, o que limita o uso de seus ligantes exógenos (fármacos agonistas) na prática clínica. No entanto, os DORs possuem uma grande variedade de ligantes (Zaki *et al.*, 1996) associadas às respectivas tolerâncias também variadas, o que lhes confere situação de alvo para novas pesquisas. Esta variedade também confere aos DORs a possibilidade, na dependência do ligante escolhido, de exercer efeito analgésico detectável em modelos de dor aguda, em especial nos períodos precoces, e, mais recentemente, até mesmo em modelos de dor crônica (Charfi *et al.*, 2014).

Os opioides inibem a transmissão excitatória glutamatérgica da periferia, ativando receptores opioides acoplados à proteína G nos terminais centrais de neurônios primários aferentes na substância gelatinosa da medula, resultando em antinocicepção. A ativação de receptores opioides nos terminais periféricos dos neurônios primários aferentes inibe a produção de potenciais de ação em resposta a estímulos nociceptivos periféricos, levando a antinocicepção. Os transportadores de aminoácidos excitatórios

regulam a concentração extracelular de glutamato e exercem papel de importância na prevenção da neuroexcitotoxicidade. A ativação de DOR incrementa a ação dos transportadores de aminoácidos excitatórios, como o glutamato e o aspartato (Liang *et al.*, 2014).

Agonistas do DOR administrados por via sistêmica bloqueiam a antinocicepção mediada pela ativação do KOR, o que colocam os agonistas dos DORs como fármacos com potencial para serem usados na reversão de comportamentos de dependência e depressão induzidos pela ativação do receptor KOR (Taylor *et al.*, 2015).

3.7 Experiências Prévias do Grupo de Pesquisa ao Qual se Insere o Projeto

O presente trabalho faz parte de uma linha de pesquisa de estudo dos efeitos periféricos de fármacos utilizados normalmente por via sistêmica, e, conhecidos pelas suas ações centrais.

Fármacos antagonistas de receptor de histamina H1, pirilamina, cetirizina e prometazina, apresentam efeito analgésico local em modelo de dor induzida pela formalina (Ashmawi *et al.*, 2003 e 2009), mas não os antagonistas de receptor de histamina H2, cimetidina, ranitidina e famotidina (Deutsch *et al.*, 2011).

Posteriormente, foi observado que o tramadol também apresenta efeitos analgésicos periféricos (Sousa *et al.*, 2008) que se mostraram semelhantes aos efeitos de anestésicos locais, através de bloqueio percutâneo sensitivo e motor do nervo ciático de ratos (Sousa *et al.*, 2012).

O efeito analgésico do tramadol utilizado por infiltração local em pata de rato no modelo de dor induzida por incisão plantar não era mediado por receptores opioides na primeira hora pós-incisão plantar (Sousa e Ashmawi, 2015).

A observação do fato da não mediação opioide imediatamente à incisão motivou o estudo do papel dos receptores opioides nos momentos seguintes à incisão plantar.

4.1 Animais

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), número 188/2010 (Anexo A). Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos, pesando entre 280 (oito semanas de idade) e 380 g (11 semanas de idade), alojados aos pares em compartimentos, com ciclo claro-escuro de 12 horas. Água e alimento foram fornecidos *ad libitum* (Figura 2).

Figura 2 - Rato Wistar macho

Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da FMUSP e os experimentos comportamentais realizados no LIM-08 da FMUSP. Os animais foram tratados de acordo com diretrizes éticas para investigações de dor experimental em animais acordados da IASP (Zimmermann, 1983).

Ao final dos experimentos comportamentais em modelos de dor pós-operatória e da coleta de material para detecção e avaliação da expressão de receptores opioides periféricos, os animais foram eutanasiados sob anestesia geral inalatória (isoflurano a 4%) por choque hipovolêmico induzido durante os procedimentos, em conformidade com as Diretrizes de 2013, sobre Eutanasia do CONCEA; e, depois também descartados conforme legislação.

4.2 Fármacos

O cloridrato de tramadol e o cloridrato de naloxona foram gentilmente cedidos pela Cristália Prod. Quim. Farm. (São Paulo, SP, Brasil).

4.3 Procedimentos Experimentais

4.3.1 Técnica anestésica

A anestesia geral para realização dos procedimentos foi feita com isoflurano em concentrações que variam entre 2% e 4%, dissolvido em O₂ a 100%. A indução da anestesia foi feita em câmara e a manutenção através de máscara bucal e nasal para ratos.

A avaliação da profundidade da anestesia geral foi feita pelo monitoramento de movimentos das patas, coloração das mucosas, patas, frequência respiratória e volume corrente.

4.3.2 Técnica da incisão plantar

A incisão plantar foi realizada conforme descrita por Brennan *et al.* (1996), sob anestesia geral com isoflurano a 2%.

A técnica de assepsia e antissepsia abrangeu toda a pata, com especial atenção para a região plantar, e, foi feita com iodopovidona degermante e em seguida com iodopovidona em solução aquosa.

Foi feita uma incisão longitudinal de 1 cm na planta da pata traseira direita com lâmina de bisturi número 15, iniciando-se a 0,5 cm da margem do calcanhar até o início dos pododáctilos.

A profundidade da incisão atingiu a musculatura plantar, que foi divulsionada e teve sua inserção mantida. Após hemostasia por pressão digital, a ferida cirúrgica foi suturada com fio de mononylon 5-0 e o fornecimento do anestésico, suspenso (Figura 3).

Figura 3 - Realização do procedimento de incisão plantar em pata de rato

4.3.3 Hiperalgesia mecânica. Mensuração dos limiares de retirada da pata

Os animais foram colocados em câmara confeccionada em acrílico transparente, com dimensões de 21x27x15 cm, cujo assoalho foi uma tela plástica com aberturas de 10x10 mm (Figura 4).

Figura 4 - Câmara de realização dos estudos comportamentais

O conjunto ficou elevado a uma altura de cerca de 20 cm da superfície e espelhos posicionados sob a câmara de teste para facilitar a visualização da pata do animal.

Após período de adaptação ao local das medições, foram realizadas medidas de limiar de retirada da pata após estímulo mecânico utilizando-se analgesímetro digital - Von Frey (Insight Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil) (Figura 5).

Figura 5 - Analgesímetro digital para a realização de medições de limiar de retirada da pata aos estímulos mecânico

O estímulo foi aplicado na região plantar da pata posterior direita. Em cada tempo para medição foram obtidas cinco medidas, cada medida com intervalos de dois minutos, calculando-se a média das mesmas.

4.3.3.1 Grupos Experimentais de Modelo de Incisão Plantar (IP)

Os ratos foram divididos em grupos, compostos pelo mínimo de oito e máximo de 10 animais, que receberam tramadol ou solução fisiológica a 0,9% no leito cirúrgico da criação da lesão mecânica; tramadol e depois naloxona no leito cirúrgico da criação da lesão mecânica; e, tramadol ou solução fisiológica a 0,9% na pata contralateral à pata lesada.

Os animais foram testados para hiperalgesia mecânica antes da incisão (valores basais) e a cada 15 minutos na primeira hora após o despertar da anestesia após a incisão plantar e a cada 15 minutos por uma hora após o despertar da anestesia geral para administração dos fármacos após 24 horas e 48 horas da incisão plantar.

O detalhamento dos procedimentos nos quatro grupos é dado a seguir:

Grupo IP I-SF/SF: Solução fisiológica a 0,9% (SF 0,9%)
apenas/incisão plantar

- Sob anestesia geral, realizou-se a incisão plantar, e, em seguida, o despertar do animal.
- Vinte e quatro horas após, novamente, sob anestesia geral, realizou-se punção da loja incisional e injeção de 50 µL de SF 0,9%. Após 15 minutos, ainda sob anestesia geral, repetiu-se a injeção de 50 µL de SF 0,9% no mesmo local, e o despertar do animal.
- Quarenta e oito horas depois da incisão plantar, novamente sob anestesia geral, foram injetados 50 µL de SF 0,9% no mesmo local. Aguardados 15 minutos, foi repetida, ainda sob anestesia geral, a injeção de 50 µL de SF 0,9% na mesma região, e, a seguir despertado o animal.

Grupo IP II-SF/T_homo: Tramadol 5mg/incisão plantar

- Sob anestesia geral, realizou-se a incisão plantar, e depois o despertar do animal.
- Vinte e quatro horas depois, novamente, sob anestesia geral, foi puncionada a loja muscular plantar e injetados 50 µL de SF 0,9% na região. Aguardados 15 minutos, ainda sob anestesia geral, 5 mg de tramadol no volume de 50 µL foram injetados no mesmo local, e, a seguir despertado o animal.
- Quarenta e oito horas depois da incisão plantar, sob anestesia geral, foram injetados 50 µL de SF 0,9% na mesma região. Aguardados 15

minutos, e ainda sob anestesia geral foram injetados 5 mg em 50 μ L de tramadol na mesma região, e depois despertado o animal.

Grupo IP III-SF/T_contra: Tramadol 5 mg na pata contralateral/incisão plantar

- Sob anestesia geral, realizou-se a incisão plantar, e em seguida o despertar do animal.
- Vinte e quatro horas após, sob anestesia geral, foi puncionada a região plantar da pata contralateral à pata lesada cirurgicamente e, injetados 50 μ L de SF 0,9% na região. Após 15 minutos, ainda sob anestesia geral, foram injetados 5mg de tramadol, em 50 μ L de volume, na região intraplantar da pata contralateral, e despertado o animal.
- Quarenta e oito horas depois da incisão plantar, sob anestesia geral, foi puncionada a região plantar da pata contralateral à pata lesada cirurgicamente e, injetados 50 μ L de SF 0,9% na região. Após 15 minutos, ainda sob anestesia geral, foram injetados 5 mg de tramadol, em 50 μ L de volume, na região intraplantar da pata contralateral, e despertado o animal.

Grupo IP IV-Nal/T_homo: Naloxona 200 μ g ipl, tramadol 5 mg ipl, incisão plantar

- Sob anestesia geral, foi realizada a incisão plantar, e depois o animal foi despertado.
- Vinte e quatro horas após, também sob anestesia geral, 200 μ g de naloxona, dissolvida em 50 μ L foi injetada na loja incisional. Após 15

minutos, 5 mg de tramadol em 50 μ L foram injetados na mesma região, e despertado o animal.

- Quarenta e oito horas após, também sob anestesia geral, 200 μ g naloxona em 50 μ L foi injetada na loja incisional. Após 15 minutos, 5 mg de tramadol em 50 μ L foram injetados na mesma região, e o animal foi despertado.

4.3.4 Ensaios de Expressão Proteica

As análises de expressão proteica de DOR e KOR foram realizadas em amostras contendo um *pool* de dois animais. Os grupos experimentais foram:

- **Grupo sem incisão:** sem incisão.
- **Grupo 1º PO:** primeiro dia pós-incisão plantar.
- **Grupo 2º PO:** segundo dia pós-incisão plantar.
- **Grupo 3º PO:** terceiro dia pós-incisão plantar.
- **Grupo 7º PO:** sétimo dia pós-incisão plantar.

Os tecidos retirados foram os gânglios da raiz dorsal (GRD) correspondentes à porção lombar da medula espinal, sendo eles: L3, L4, L5 e L6 - lado homolateral à incisão plantar. Os animais foram decapitados sob anestesia inalatória com isoflurano, e os GRDs foram rapidamente removidos e homogeneizados por sonicador em tampão de extração contendo TRIS 100 mM, pH 7,4, EDTA 10 mM, PMSF 2 mM, e 10 μ g/mL de aprotinina, além de 5 μ g de um mix inibidor de protease (ROCHE) (Figura 6).

Figura 6 - Laminectomia ampla e foraminectomia múltipla revelando o saco dural com a pinça apontando para o gânglio de raiz dorsal

Após extração, os homogenatos foram centrifugados a 11.500xg durante 20 minutos, e a concentração de proteína do sobrenadante foi determinada utilizando o ensaio de proteína de Bradford, usando a curva de albumina como um padrão (Bradford, 1976), sendo todas as amostras dosadas em triplicatas em aparelho de espectrofotometria (Biotek).

Os materiais foram diluídos em um volume de tampão Laemmli (BioRad) equivalente ao volume da amostra, contendo 0,001 mg/mL de DTT. As amostras foram posteriormente fervidas em banho-maria por cinco minutos e armazenadas em freezer -80°C até a continuidade dos experimentos. Posteriormente, amostras contendo 30 µg de proteína foram aplicadas em um gel de poliacrilamida a 12% e submetidas à eletroforese em corrente contínua de 120V em um aparelho de transferência (Bio-Rad), durante uma hora e

meia. Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Millipore, 0,2 µm de diâmetro) em sistema Semi-Dry (BioRad) por 45 minutos, a 20V. Após a transferência, as membranas foram tratadas, durante duas horas à temperatura ambiente, com uma solução de bloqueio contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, Brasil) em tampão Tris-Salina (Tris 10 mM e NaCl 0,15 M, 2% de TWEEN 20, pH 7,5), por duas horas. Posteriormente, as membranas foram lavadas em tampão por 10 minutos, três vezes consecutivas. Estas membranas foram então incubadas com anticorpos monoclonais de rato contra MOR ou (μ) e DOR ou (δ) (ambos 1: 250 - Santa Cruz Biotechnology, Inc.) por 18 horas, a 4 °C.

Em seguida, as membranas foram lavadas e incubadas durante duas horas à temperatura ambiente com um anticorpo secundário conjugado com peroxidase feito em cabra, anti-coelho (para MOR), diluído a 1: 5000 (Jackson ImmuResearch, Laboratories, Inc.) e um feito em burro, anti-cabra (para KOR), igualmente diluído a 1: 5000 (Jackson Immuno Research, Laboratories, Inc.).

Em todos os experimentos o anticorpo para β -actina (feito em rato, 1: 15000, Sigma-Aldrich, EUA) foi usado como um controle interno. A ligação anticorpo específico foi visualizada usando kit de quimioluminescência (Millipore). As membranas foram reveladas em dispositivo UVITEC® [Aliança Chroma] e as bandas reveladas foram analisadas densitometricamente usando o programa NHI-Scion Image (ImageJ versão 1.44, de domínio público <http://rsb.info.nih.gov>). A análise dos dados foi feita pela média das

diferenças percentuais entre os diferentes grupos experimentais. A correção foi realizada pela densidade óptica para a β -actina, considerando as amostras dos animais controle como o padrão para a normalização dos resultados.

4.4 Análise Estatística

A hipótese de distribuição normal foi verificada com o teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis quantitativas foram apresentadas descritivamente em tabelas contendo média e desvio padrão. As médias das variáveis foram avaliadas com análise de variância para medidas repetidas. Quando os efeitos de grupo ou tempo foram significantes, prosseguiu-se as análises com o teste de Tukey. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5.1 Estudos Comportamentais

Foram utilizados nesta parte do estudo 35 animais divididos nos quatro grupos. Todos os animais foram testados previamente à realização da incisão (valores basais), 24 horas após a realização da incisão plantar (1º PO) e 48 horas após a incisão plantar (2º PO).

Os animais de todos os grupos apresentaram valores basais de limiares de retirada altos, iguais ou próximos do valor de intensidade máximo aplicado, equivalentes a 60 g. Todos os animais apresentaram hiperalgesia mecânica nas medidas realizadas no 1ºPO e 2º PO antes da administração dos fármacos utilizados (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Limiar de retirada da pata após estímulo mecânico no modelo de incisão plantar em ratos

* - Diferença entre IP II-SF/T_homo e os outros grupos, ‡ - diferença entre IP II-SF/T_homo e IP IV-Nal/T_homo.

Houve diminuição do limiar de retirada da pata nos momentos basais de 1º PO e 2º PO em todos os grupos. Nos grupos IP I-SF/SF e IP III-SF/T_contra, os animais permaneceram hiperalgésicos durante todo o período. No grupo IP II-SF/T_homo, os animais apresentaram hiperalgesia em todos os momentos depois da administração do tramadol. No grupo IP IV-Nal_T_homo, a hiperalgesia mecânica foi mais pronunciada durante o 1º PO e foi revertida por naloxona no 2º PO.

Os resultados dos limiares de retirada de pata após estímulo mecânico estão descritos Anexo B. O grupo IP I-SF/SF, apresentou comportamento de hiperalgesia mecânica durante todo o período do estudo.

O grupo IP II-SF/T_homo apresentou hiperalgesia mecânica nas medidas basais no 1º PO e 2º PO. No 1º PO após a administração de tramadol, os limiares de retirada da pata aumentaram durante os tempos de observação (15, 30, 45 e 60 minutos). No 2º PO, o mesmo fato se observou, com redução da hiperalgesia mecânica nos tempos 15, 30, 45 e 60 minutos.

O grupo IP III-SF/T_contra apresentou hiperalgesia mecânica durante todas as medidas no 1º PO e 2º PO.

O grupo IP IV-Nal/T_homo apresentou comportamento diferente dos outros grupos. No 1º PO houve hiperalgesia mecânica na medida basal, e nos tempos seguintes houve antagonismo parcial do efeito analgésico do tramadol. No 2º PO também houve hiperalgesia inicial, que se manteve nos tempos seguintes (15, 30, 45 e 60 minutos), de forma diferente ao ocorrido no 1º PO. As médias e desvios padrões são apresentados no Anexo B.

Tabela 1 - Médias e desvios padrão dos limiares de retirada da pata após estímulo mecânico nos grupos. Dados apresentados em gramas (g)

	Grupo IP I SF/SF		Grupo IP II SF/T_homo		Grupo IP III SF/T_contra		Grupo IP IV NaI/T_homo	
	Média (g)	Desvio Padrão (g)	Média (g)	Desvio Padrão (g)	Média (g)	Desvio Padrão (g)	Média (g)	Desvio Padrão (g)
Basal	56,5	3,6	56	0	56,1	3,5	54,9	5,8
1º PO - Basal	11,9	2,3	21,2	6,9	9,9	0,6	10	3,6
1º PO - 15 min	8,6	6,2	45,4	9,8	10,7	1,1	30,3	15,5
1º PO - 30 min	7,5	2,5	45,5	3,5	11,9	0,8	28,8	19,1
1º PO - 45 min	9,5	0,6	52,8	17	12,6	0,1	26,1	15,7
1º PO - 60 min	9,6	2,8	44,8	11,7	11,7	0,4	16,9	10,8
2º PO - Basal	13,7	0,4	23,1	7,7	13,4	2,1	13,7	4,7
2º PO - 15 min	8,3	1,4	40,4	4,9	13,2	0,3	14,9	7,6
2º PO - 30 min	11,7	3,7	37,2	12,8	14,4	1,3	9,4	3,3
2º PO - 45 min	10,9	1,2	35	17	16,9	6,4	9,8	3,8
2º PO - 60 min	11	5,2	34,5	13,2	13,4	10,2	7,3	4,1

5.2 Expressão de Receptores Opioides nos Gânglios de Raízes Dorsais

Foram realizadas análises dos níveis de proteínas de DOR e MOR nos gânglios das raízes dorsais de L3, L4, L5 e L6 homolaterais à pata que sofreu a incisão. Nesta fase do estudo foram utilizados 40 animais. As análises foram realizadas nos tempos, sem incisão, 1º PO, 2º PO, 3º PO e 7º PO.

A expressão de DOR aumentou no 1º PO, 2º PO, 3º PO e 7º PO. No 1º PO, o aumento na expressão foi em torno de 30%, mas não significativo, no 2º PO, o aumento foi em torno de 49%, significativo, no 3º PO, de 52%, significativo e no 4º PO, foi de 54% e significativo em relação à expressão basal (Gráfico 2 e Tabela 2).

Tabela 2 - Médias e desvios padrões dos valores densitométricos da expressão de DOR em gânglio da raiz dorsal após incisão plantar

DOR	Média	Desvio padrão
Sem incisão	100,03	14,49
1º PO	132,40	0,50
2º PO	149,03	1,47
3º PO	152,07	9,55
7º PO	154,80	9,60

Gráfico 2 - Análise densitométrica dos níveis de expressão de DOR em gânglio da raiz dorsal após incisão plantar

A média normalizada entre os grupos é apresentada. Os valores do grupo controle são considerados como 100%. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão de 8 animais por grupo.

A expressão proteica de MOR aumentou 11% no 1º PO, valor não significativo, 34% no 2º PO, 18% no 3º PO e 33% no 7º PO, mas as diferenças não alcançaram significância (Gráfico 3 e Tabela 3).

Tabela 3 - Médias e desvios padrões dos valores densitométricos da expressão de MOR em gânglio da raiz dorsal após incisão plantar

DOR	Média	Desvio padrão
Sem incisão	100,23	6,96
1º PO	111,85	22,13
2º PO	139,9	27
3º PO	118,6	24,74
7º PO	132,22	36,36

Gráfico 3 - Análise densitométrica dos níveis de expressão de MOR em gânglio da raiz dorsal após incisão plantar

A normalização com β -actina foi feita e não houve alteração significativa nos seus níveis de expressão ao longo do tempo.

6.1 Modelo de Incisão Plantar

O presente projeto teve como objetivo principal aprofundar o estudo dos mecanismos da analgesia periférica do tramadol. Para isso optou-se, na escolha do modelo experimental, pelo modelo de incisão plantar, modelo de dor pós-operatória.

Trata-se de uma linha que procura desenvolver e utilizar modelos experimentais de dor que tenham proximidade com situações presentes na prática clínica. Entretanto, a maioria dos modelos experimentais em dor, como de formalina, carragenina, adjuvante completo de Freund (ACF), placa quente, ácido acético intraperitoneal e vários outros, tende, de maneira geral, a ser distante da realidade cotidiana.

Estes modelos têm, de forma geral, apenas um mecanismo gerador de dor, por exemplo, inflamação, estímulo térmico e estímulo ácido, o que torna mais fácil a realização de estudos fisiopatológicos em dor. Por outro lado, como são situações inexistentes na prática clínica, pode ocorrer a dificuldade em se transpor os resultados clínicos em uma situação artificial e controlada para situações ou problemas normalmente encontrados na prática clínica diária.

A utilização desta linha de modelos pode ter impacto no desenvolvimento de fármacos analgésicos. Existem exemplos de fármacos que provocaram efeito analgésico adequado em roedores, mas não o

reprisaram quando testados em humanos. O antagonista de receptor de neurocinina-1 (MK-869) foi testado em modelo de dor inflamatória e de lesão de nervo e quando foi testado em humanos, não apresentou efeito analgésico (Hill, 2000). A ralfinamida, potente bloqueador de canal de sódio Nav 1.7 havia sido testada em modelos de placa quente, de formalina, de adjuvante completo de Freund e de constrição de nervo ciático com sucesso (Veneroni *et al.*, 2003), porém, falhou em seres humanos e voltou a estudos de fase I e II (Bauer *et al.*, 2010).

Essa questão da translação dos resultados obtidos em situações "artificiais" para a resolução dos problemas "reais" enfrentados pelos profissionais responsáveis pelo tratamento da dor tem suscitado forte debate no meio científico sobre a validade e necessidade de modelos animais e como melhorar a confiabilidade dos resultados obtidos para seu uso na avaliação e tratamento da dor (Mogil, 2009; Mogil *et al.*, 2010).

Aqui, optamos pela utilização do modelo de incisão plantar (Brennan *et al.*, 1996), modelo clássico de dor pós-operatória, desenvolvido há 19 anos, que procura mimetizar a situação real da dor pós-operatória, flagelo enfrentado por milhões de seres humanos todos os anos. O modelo permite a observação dos dois principais componentes da dor pós-operatória, o que ocorre em repouso e o que ocorre associado ao movimento, denominadas, respectivamente, dor espontânea e evocada (Brennan, 2011).

Os modelos que se aproximam de situações reais, por outro lado, também trazem consigo problemas, como o número maior de variáveis envolvidas no fenômeno, o que pode dificultar a interpretação dos resultados.

No modelo de incisão plantar, a extensão e profundidade da incisão, a extensão da lesão do músculo plantar e o tipo de sutura feita na pele podem ser fatores que interferem e dificultam a correta interpretação dos resultados.

A presença de diferentes mecanismos relacionados à gênese da dor pós-operatória, também constitui fonte de dificuldades. A dor pode apresentar componente isquêmico importante (Woo *et al.*, 2004), estar relacionada com o aumento de lactato com diminuição do pH local (Kim *et al.*, 2007) e apresentar, de modo simultâneo, sensibilização neuronal periférica e central (Brennan, 2011).

6.2 Tramadol Intraplantar

O efeito analgésico periférico do tramadol foi, de modo reiterado, demonstrado ao longo dos últimos quatorze anos. Foi novamente demonstrado no presente estudo, onde o uso de tramadol no leito cirúrgico (IP II-SF/T_homo) levou a um aumento nos limiares de retirada da pata no 1º PO e 2º PO, o que não ocorreu no grupo de animais onde o tramadol foi administrado na pata contralateral à incisão (IP III-SF/T_contra). O achado afasta efeito sistêmico detectável (possivelmente central) e efeitos de outras substâncias oriundas da passagem hepática do fármaco em estudo.

Um dos mecanismos de ação periférica do tramadol demonstrado foi a ação semelhante ao anestésico local, que foi mostrado em nosso laboratório (Sousa *et al.*, 2008 e 2012; Sousa e Ashmawi, 2015) e por outros grupos (Tsai *et al.*, 2001; Mert *et al.*, 2002 e 2006).

O efeito anti-inflamatório periférico do tramadol também já foi demonstrado em modelo de carragenina intraplantar, com diminuição de edema e da hiperalgisia mecânica (Bianchi *et al.*, 1999). A ação anti-inflamatória central foi demonstrada com diminuição do nível da prostaglandina E2 no líquido cefalorraquidiano após utilização de tramadol em modelo de dor por ACF intraplantar (Bianchi *et al.*, 2007).

Sendo o tramadol, um agonista opioide, a possibilidade de a ação analgésica local do fármaco ser mediada por opioide vem sendo testada e foi o objetivo principal deste estudo.

Anteriormente, mediação opioide não foi encontrada com estímulo doloroso fásico, como o estímulo térmico (Mert *et al.*, 2007) ou inflamatório (Bianchi *et al.*, 1999), estímulo doloroso induzido por formalina intraplantar (Sousa *et al.*, 2012) e também na primeira hora após a incisão plantar (Sousa e Ashmawi, 2015). Em todos esses modelos e tipos de estímulo doloroso, a analgesia periférica do tramadol não foi antagonizada pela naloxona.

Em função da observação que ocorre aumento da expressão de receptores μ (MOR/ROM) nos dias subsequentes à administração de carragenina intraplantar (Ji *et al.*, 1995), mesmo cessando o estímulo doloroso da carragenina, testamos a hipótese que, sendo, a dor pós-operatória um processo mais longo, poderia haver mediação opioide tardia, apesar de não ocorrer a mediação imediata, até uma hora pós-incisão (Sousa e Ashmawi, 2015).

Desta maneira, avaliamos a mediação opioide nos primeiro e segundo dias do período pós-incisão plantar.

No primeiro dia pós-incisão, o tramadol intraplantar (IP II-SF/T_homo) induziu aumento dos limiares de retirada da pata, similares aos observados no período pré-incisional.

O uso de naloxona levou, no primeiro dia, à diminuição dos limiares de retirada da pata quando comparados com o uso isolado de tramadol (IP II-SF/T_homo e IP IV-Nal_T_homo), ou seja, houve um antagonismo parcial do efeito analgésico periférico do tramadol.

O antagonismo parcial encontrado sugere fortemente que o efeito analgésico periférico do tramadol contempla um mecanismo opioide. Acreditamos que o efeito analgésico observado nesse grupo seja decorrente do efeito anestésico local do fármaco. Assim, o efeito analgésico do tramadol no 1º PO possui pelo menos dois mecanismos diferentes e possivelmente complementares que atuam naquele momento: o anestésico local e o mediado por opioide.

No segundo dia pós-incisão plantar, o comportamento dos grupos mostrou algumas modificações. O grupo IP II-SF/T_homo ainda apresentou aumento dos limiares de retirada da pata, mas em valores menores que os observados no 1º PO.

A naloxona antagonizou parcialmente o efeito do tramadol intraplantar no 1º PO e totalmente no 2º PO. O resultado foi surpreendente quando nos baseamos em estudos anteriores conduzidos em nosso próprio laboratório, nos quais o efeito analgésico local foi bastante intenso, consistente e persistente na primeira hora pós-operatória.

Nos outros estudos o efeito anestésico local perdurou durante todo o período de observação de 60 minutos nos modelos de incisão plantar e de

injeção de formalina (Sousa *et al.*, 2008 e 2012) e não foram antagonizados com o uso de naloxona, permanecendo os animais com analgesia quando utilizado em bloqueio de nervo ou canais de sódio e localmente (Tsai *et al.*, 2001; Mert, *et al.*, 2002; Haeseler, *et al.*, 2006; Mert, 2006; Sousa *et al.*, 2008 e 2012).

Talvez a não observação do efeito anestésico local, que foi parcial no primeiro dia pós-operatório e total no segundo pós-operatório esteja relacionada ao ambiente de acidose tecidual relacionada à reação inflamatória que ocorre no local manipulado cirurgicamente e demonstrado no modelo de incisão plantar (Woo *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007) dificultando a ação anestésica local do tramadol, de modo similar ao que ocorre com os anestésicos locais (Meechan, 1999; Ueno *et al.*, 2008). A reação inflamatória, presente no 1º PO, vai se tornando mais intensa no 2º PO. Assim, no segundo dia pós-operatório, mesmo na provável ausência do efeito anestésico local, houve analgesia mediada opioide, antagonizada pela naxolona.

A constante de dissociação (pKa) dos fármacos determina a quantidade existente na forma ionizada em um determinado pH. Quanto maior o pKa em relação ao pH do meio, maior a quantidade de substância em sua forma não ionizada. No pH fisiológico (7,4) todos os anestésicos locais (AL) apresentam sua forma ionizada em maior proporção, visto que o pKa de todos os AL é maior que 7,4. A lidocaína possui pKa de 7,9, por isso em pH fisiológico apenas 25% do fármaco apresenta-se na sua forma não-ionizada. A bupivacaína possui pKa de 8,1, por isso em pH fisiológico haverá

uma fração ainda menor da forma não-ionizada, aproximadamente 15% (Lagan e McClure, 2004). A constante de dissociação (pK_a) do cloridrato de tramadol é maior ainda: 9,41...

O fármaco para produzir efeito de anestésico local deve atravessar a membrana lipídica da célula para no meio intracelular atuar nos canais de sódio. A porção não-ionizada atravessa a membrana mais facilmente que a ionizada. Assim, a substância com maior fração não-ionizada em pH fisiológico alcança seu sítio efector de forma mais rápida. Isso explica porque a lidocaína tem menor tempo de latência que a bupivacaína. Talvez também explique a ausência, em nosso estudo, da ação analgésica detectável do tramadol, similar àquela dos anestésicos locais (Lagan e McClure, 2004).

Os tecidos inflamados, com infecção ou ferimentos por traumatismos, tendem a ser mais ácidos que o habitual, com redução no pH local em relação ao fisiológico presente em condições hígidas. Em situações patológicas há menor fração não-ionizada do fármaco e por isso o efeito será mais lento e reduzido (Lagan e McClure, 2004).

Outro fator que pode ter influência no resultado analgésico é a vasodilatação presente em tecidos inflamados que pode representar maior fluxo sanguíneo local, levando à redução do tempo de permanência do fármaco no local e reduzindo sua ação sobre os terminais neuronais (Scott *et al.*, 2004; Wallach *et al.*, 2014).

No tecido lesado, células que perderam a integridade de seu envoltório (membrana celular), deixam de conter os solutos citoplasmáticos e os liberam ao interstício. O íon cálcio, que em condições normais se concentra

prioritariamente no meio intracelular, é liberado para o extracelular. Acredita-se que o incremento da concentração extracelular de cálcio ionizado (ou livre) possa aumentar a analgesia periférica do tramadol de modo independente do efeito anestésico local do fármaco. A concentração do cálcio também condiciona a possibilidade da ocorrência de exocitose periférica dos próprios nociceptores modulando tanto a inflamação neurogênica como a liberação de aminoácidos excitatórios. No entanto, esse efeito analgésico isolado é considerado fraco e secundário (Mert *et al.*, 2007).

6.3 Pesquisa de Receptores Opioides Periféricos

A expectativa real é que após estímulo doloroso na periferia, a expressão dos receptores opioides periféricos seja modificada, no entanto, as expressões de receptores opioides no corno da raiz dorsal não são uniformes e podem variar em função do mecanismo gerador de dor.

As dificuldades técnicas incluíram a quantidade de material colhida de cada espécime a ser processada em laboratório.

Quando o alvo do estudo se restringe ao gânglio da raiz dorsal, como é o caso do nosso trabalho, o material obtido é tão exíguo que muitas vezes não atinge a massa proteica mínima para o exame. Um de nossos artifícios para atingir a massa mínima de 30µg para ser aplicada no gel de suporte da eletroforese, foi o de incluir em cada amostra examinada, o material de dois espécimes, ou seja, de dois animais de mesmo grupo.

A pesquisa de receptores opioides periféricos em modelo de dor pós-operatória, como a escolhida em nosso atual estudo, a técnica de incisão

plantar, não havia sido realizada anteriormente, enquanto os resultados obtidos com outras técnicas são incongruentes e controversas quando analisados em conjunto.

No modelo de dor induzida por carragenina, que é um modelo de inflamação clássico, foi descrito um aumento da expressão de MOR e diminuição nas expressões de DOR e KOR nos gânglios de raízes dorsais lombares ao longo de três dias pós-administração intraplantar (Ji *et al.*, 1995).

Em estudos em modelos de dores mais crônicas, modelo de dor inflamatória por ACF e modelo de dor neuropática por constrição de nervo ciático, não houve variação nos níveis de mRNA de MOR e DOR após a ACF, e houve aumento da expressão de MOR e diminuição na expressão de DOR após constrição de nervo ciático ao longo dos 14 dias de observação (Obara *et al.*, 2009). Tais dados são compatíveis com os observados por outro grupo que também observou aumento na expressão de MOR proximalmente à área onde foi realizada a constrição do nervo ciático (Truong *et al.*, 2003).

Outro estudo não encontrou alterações nos níveis de receptores opioides (μ) nos gânglios das raízes posteriores em modelo de ligadura de raízes de L5 e L6, e detectou diminuição na expressão de MOR no corno dorsal da medula, mas não houve alteração na expressão de MOR nos GDR correspondentes (Porreca *et al.*, 1998).

A expressão dos receptores opioides (MOR e DOR) foi alvo de trabalho que detectou os RNAs mensageiros nos neurônios do gânglio da

raiz dorsal e na substância cinzenta do corno posterior da medula de ratos. Dentro da própria medula espinhal os neurônios de diferentes tamanhos mostraram diferentes padrões de expressão. Neurônios pequenos e grandes expressaram os receptores opioides (MOR e DOR) mas a maioria das células que expressaram os respectivos mRNAs são pequenas. Alguns neurônios expressam ambos receptores. Os achados corroboram a origem ganglionar (GDR), pelo menos parcial, dos receptores opioides δ e μ medulares e periféricos. Finalmente, tanto DOR como MOR no corno dorsal da medula são originários, pelo menos em parte, a partir de neurônios do GRD. O estudo incluiu ratos que não receberam estímulo nociceptivo e relatou que a quantidade de receptores delta no GRD é maior do que a de MOR (Wang e Wessendorf, 2001).

No presente estudo, notou-se aumento significativo na expressão de DOR a partir do segundo dia, mantendo-se até o final dos sete dias maior que antes da incisão. Esse dado parece em consonância com o maior antagonismo do efeito opioide pela naloxona no segundo dia pós-incisão.

Ao mesmo tempo, não foi observada elevação de MOR ao longo dos sete dias pós-incisão, apesar de ter ocorrido mediação opioide no efeito analgésico do tramadol injetado localmente.

Estudando os resultados de Ji *et al.* (1995), Porreca *et al.* (1998) e de Truong *et al.* (2003), onde foram estudados modelos de carragenina, modelo de inflamação aguda, adjuvante completo de freund, modelo de inflamação crônica e de constrição de nervo ciático e ligadura de raízes lombares, observa-se que, em relação à expressão de MOR e DOR, não há um padrão

em modelo de dor inflamatória, com aumento de expressão de receptores opioides após carragenina e não alteração na expressão após adjuvante completo de Freund e o mesmo se observou nos modelos de dor neuropática, com aumento na expressão de MOR e diminuição de DOR no modelo de constrição de nervo ciático, mas sem alteração na expressão de MOR no modelo de ligadura de raízes lombares.

A fisiopatologia da dor pós-operatória é complexa. A incisão cirúrgica leva à sensibilização de nociceptores periféricos, principalmente por estímulos térmicos, mecânicos e químicos. Tais nociceptores estão, normalmente, presentes em fibras A δ e C, ligados à transdução e condução do estímulo doloroso até o sistema nervoso central. Paralelamente à sensibilização, ocorre a conversão de nociceptores mecânicos insensíveis (ou silentes), localizados em fibras A δ , em nociceptores sensíveis a estímulos mecânicos (Zahn e Brennan, 1999; Hamalainen *et al.*, 2002; Pogatzki *et al.*, 2002). Todos esses mecanismos estão relacionados às alterações na função neuronal, periférica ou central, que são observados na forma de hiperalgesia periférica e central.

Durante longo período, a dor pós-operatória foi classificada como sendo basicamente de origem inflamatória (Cousins e Power, 1999), também em função de alterações locais como diminuição de pH e aumento de lactato (Woo *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2007). Os novos conhecimentos acumulados permitem propor mudanças nessa forma de classificá-la. As sensibilizações periférica e central podem ser encaradas como fenômenos fisiopatológicos que configuram disfunções transitórias no funcionamento

neuronal, conferindo componente neuropático na gênese da pós-operatória. À luz da atual definição de dor neuropática da IASP, entretanto, a dor pós-operatória não pode ser classificada como dor neuropática, já que não há lesão ou doença do sistema somático-sensitivo (Jensen *et al.*, 2011).

Assim, o aumento na expressão de DOR no gânglio da raiz dorsal observado após a incisão plantar na pata pode estar associado ao componente de disfunção neuronal que ocorre no aferente primário após a lesão tecidual causada pela incisão. E a não variação na expressão de MOR pode estar associada ao caráter mais inflamatório, observado após inflamações mais crônicas (induzida pelo adjuvante completo de Freund), que também ocorre na incisão plantar.

Não há como se estabelecer se o componente opioide da analgesia induzida pelo tramadol intraplantar e, a consequente, reversão da mesma após o uso da naloxona, devem-se mais a ação sobre MOR e/ou DOR com os dados aqui obtidos. O aumento na expressão de DOR favorece a hipótese de ação sobre esses receptores, entretanto, níveis basais de ambos receptores estão presentes antes da incisão e não pode ser descartada ação sobre MOR, mesmo sem haver indução no aumento de sua expressão.

6.4 Os Cuidados Com os Animais dos Experimentos

6.4.1 Número mínimo de animais utilizados

A opção pelo número mínimo de animais por grupo de oito ratos parece ter sido adequada e foi adotada após escolhermos um limite máximo para um erro amostral aceitável. O erro alfa escolhido foi de 0,05 correspondendo a um grau de confiança de 95% e a um valor crítico ($Z_{\alpha/2}$) igual a 1,96. A uniformidade dos animais, todos da mesma linhagem, mesmo sexo, com pesos e idades semelhantes, também reduziu as diferenças entre os grupos (Levine *et al.*, 2000).

6.4.2 Limitação do estímulo doloroso na pesquisa de hiperalgesia mecânica

Nos experimentos comportamentais mensuramos os limiares de retirada da pata traseira direita após estímulo mecânico através do analgesímetro digital de Von Frey.

A retirada da pata afasta a região plantar da ponta do instrumento de pressão e aciona a documentação digital da última e mais elevada estimulação.

Os valores foram obtidos em gramas, a carga máxima foi limitada em 60 gramas para evitar danos teciduais e sofrimento desnecessários.

6.4.3 Anestesia

A experimentação animal ainda é considerada uma das principais formas de pesquisas médicas, e, o progresso científico está longe de poder substituí-la integralmente por métodos alternativos.

Na área de pesquisa do fenômeno doloroso, o próprio fulcro do estudo, a dor, limita a obtenção de situações completamente ausentes de desconforto, estresse ou mesmo dor.

A anestesiologia é dentre todas as áreas médicas aquela que foi desenvolvida com a finalidade precípua de tratar a dor, inicialmente, a dor prevista, a dor com hora marcada, a dor provocada pelo procedimento cirúrgico.

Não seria admissível que nesse trabalho desenvolvido no programa de pós-graduação promovido pela disciplina de Anestesiologia da FM da USP fossem menosprezados quaisquer desconfortos evitáveis. Assim são justificados os cuidados com as reiteradas intervenções anestésicas descritas detalhadamente no item Material e Métodos.

Ao seguirmos os preceitos éticos e determinações legais relacionados à condição de vida e bem-estar dos animais durante os experimentos também obtivemos vantagens na realização dos mesmos. As aplicações de solução fisiológica, cloridrato de tramadol e naloxona, foram feitas sob anestesia geral, o que reduz não apenas o desconforto ao rato do experimento, como facilita, pela imobilidade fornecida, a própria punção e resultado final da infiltração com o volume, apesar de exíguo, não ultrapassando os limites de desígnio, ou seja, o compartimento criado pela incisão plantar.

6.4.4 Eutanásia

A aprovação do estudo pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em si só constitui segurança de condução ética em relação aos animais.

Os animais foram tratados de acordo com diretrizes éticas para investigações de dor experimental em animais acordados da IASP (Zimmermann, 1983).

No Laboratório de Anestesiologia (LIM-8) da FMUSP, ao final dos experimentos comportamentais em modelos de dor pós-operatória os animais foram eutanasiados sob anestesia geral inalatória (isoflurano a 4%) por choque hipovolêmico induzido por punção cardíaca percutânea. No laboratório do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biológicas da USP, antes da coleta de material para detecção e avaliação da expressão de receptores opioides periféricos, os animais foram eutanasiados por decapitação sob anestesia geral com isoflurano (utilizando equipamento de uso específico e realizada por pessoal treinado). Ambos os procedimentos feitos em conformidade com as diretrizes de 2013 sobre Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal: CONCEA; e, depois também descartados conforme legislação.

6.5 Correções e Sugestões para Ensaios Futuros

Clinicamente, as queixas dolorosas são mais frequentes e associadas a valores de intensidade mais fortes nos primeiros dois dias depois do procedimento cirúrgico. Os doentes, nesse período requerem maior consumo de analgésicos. No laboratório, nesse mesmo período, a intensidade de hiperalgesia também é comparativamente maior, decaindo a seguir (Andrade, 2000). Nos resultados obtidos com a detecção de receptores periféricos de opioides δ e μ concluímos que novos ensaios poderiam se estender por um período maior até o retorno das expressões aos níveis pré-incisão, uma vez que as expressões desses receptores detectadas perduram por pelo menos sete dias, e no caso dos DOR (ROD/ROC) mostram aumento significativo a partir do segundo dia e se mantiveram aumentados até o sétimo dias pós-operatórios.

Novos ensaios para detecção e mensuração de proteínas específicas, como os receptores opioides, além de utilizarem controles negativos de carregamento (como a β actina) das amostras estudadas, poderão também utilizar controles positivos. O controle duplo pode garantir com melhor eficiência que a mesma quantidade de proteína tenha sido aplicada em cada sítio de análise; a transferência das proteínas, do gel para a membrana, com eficiência igual entre as diferentes amostras; e, a incubação com o anticorpo e a detecção uniforme do sinal nos diversos sítios.

A avaliação do pH e da concentração de eletrólitos na loja criada pela incisão plantar, por métodos de microdiálise ou assemelhados, pode esclarecer alguns dos mecanismos discutidos a respeito da ação analgésica periférica do tramadol.

A inclusão de novas avaliações comportamentais associadas à hiperalgesia mecânica, como a hiperalgesia térmica e guarda de pata também podem ser realizadas (Brennan *et al.*, 1996)

O incremento da colaboração entre a Faculdade de Medicina (LIM-8) e o Instituto de Ciências Biológicas (Laboratório de Dor do Departamento de Anatomia) que já produziu a padronização do ensaio que nos permitiu a detecção da expressão de receptores opioides e a confecção de curva tempo/resposta dessa expressão (inédita no modelo de dor pós-operatória), promete produção científica profícua.

7 CONCLUSÕES

a) O tramadol exerceu analgesia por ação opioide local, no 2º dia pós-incisional, em modelo dor pós-operatória (incisão plantar) em ratos.

b) A detecção da expressão periférica de receptor opioide δ mostrou elevação de valores durante os primeiros sete dias de período pós-operatório, enquanto a expressão de receptor opioide μ não se alterou.

Anexo A - Aprovação CAPPesq

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 15.09.10, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **188/10** intitulado: "**Efeito Analgésico Periférico do Tramadol**", apresentado pelo **Departamento de Cirurgia**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei No 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Hazem a Ashmawi

Pesquisador (a) Executante: José Oswaldo de Oliveira Junior

CEP-FMUSP, 15 de setembro de 2010.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Eduardo Massad
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo B - Dados de limiares de retirada da pata dos animais

Grupo IP I-SF/SF após estímulo mecânico (dados apresentados em gramas)

	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5	Rato 6	Rato 7	Rato 8	Rato 9
Basal	60	59,9	53,6	50,8	57,8	56,7	54,9	59,9	54,9
1º PO Basal	16,2	17,8	11,3	3,8	7,2	10,3	16,2	11,8	12,9
1º PO 15 min	14,3	8,9	11,5	5,3	9,1	7,1	7	8,5	5,6
1º PO 30 min	6,2	9,6	6,2	4,7	8,3	8,9	6,7	7,2	9,8
1º PO 45 min	9,7	9,3	6,5	8,3	9,8	16,9	5,3	10,8	8,9
1º PO 60 min	9,5	6,3	5,1	15,6	6,9	9,9	5,8	14,2	13,5
2º PO Basal	12,3	15,6	7,9	24,6	17,7	11,3	12,5	9,8	11,8
2º PO 15 min	11,8	11,3	8,2	8,8	8,1	5,2	4,8	6,7	9,8
2º PO 30 min	12,6	8,8	8,2	18,4	11,8	17,7	10,2	10,5	7,4
2º PO-45min	8,6	8,9	7,2	9,4	14,2	12,1	19,4	11	6,9
2º PO 60 min	11,8	11,3	6,4	7,6	9	14,1	12,4	7,4	19,2

Grupo IP-II SF/T_homo (sados apresentados em gramas)

	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5	Rato 6	Rato 7	Rato 8	Rato 9
Basal	49,6	58,76	59,08	57,23	47,82	54,53	59,7	59,68	57,72
1º PO Basal	10,84	16,68	16,12	16,8	21,88	15,6	35,58	37	20,62
1º PO 15 min	46,4	60	34,53	52,9	34,5	38,8	48,77	60	32,57
1º PO 30 min	39,63	52,73	33,03	53,47	36,37	49,87	39,87	60	44,57
1º PO 45 min	58,57	52,27	48,4	56,97	45,2	59,17	60	60	34,57
1º PO 60 min	60	59,23	23,33	43,2	36,87	45,2	45,97	52,6	37,13
2º PO Basal	23,63	29,86	20,45	29,86	16,35	21,35	28,38	25,53	12,75
2º PO 15 min	39,03	32,3	19,8	43,77	36,7	59,57	58,27	28,33	46,03
2º PO 30 min	33,63	41,43	26	24,9	23,33	58,57	53,73	21,1	51,8
2º PO-45min	22,4	24,43	29,77	28,5	25,9	56,5	57,7	23,3	46,5
2º PO 60 min	22,13	41,67	24,23	40,03	29,77	60	45,97	22,33	24,1

Grupo IP-III SF/T_contra (dados apresentados em gramas)

	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5	Rato 6	Rato 7	Rato 8	Rato 9
Basal	56,6	60	59,9	47,3	46,7	60	56,3	56,5	61,6
1º PO Basal	9,8	7,6	7,3	7,9	8,5	12,4	14,9	9,8	10,6
1º PO 15 min	8,9	7,9	9,9	15,4	9,7	15,1	11,2	10,8	7,3
1º PO 30 min	9,6	8,6	12,9	11,2	11,5	21,8	12,3	10,5	8,5
1º PO 45 min	10,9	7,8	17,7	19,3	8,5	21,7	7,1	9,5	10,8
1º PO 60 min	11,1	12	11,2	10,9	12,8	19,2	11,3	5,2	11,6
2º PO Basal	12,3	5,4	11,1	18,8	16,6	15,2	8,5	17,3	15,2
2º PO 15 min	14,9	15,6	8,8	13,1	9,9	10,9	11,6	19,3	14,5
2º PO 30 min	9,8	11,3	13,1	17,1	18,8	11,9	13,1	22,5	11,6
2º PO-45min	12,5	12,6	10,2	11	23,6	15,9	18	26,5	21,5
2º PO 60 min	6,2	5,4	9,7	10,4	13,2	13,8	12,2	29	20,6

Grupo IP IV-Nal/T_homo (dados apresentados em gramas)

	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5	Rato 6	Rato 7	Rato 8
Basal	60	57,2	60	46,8	53,7	55,5	60	45,9
1º PO Basal	6,9	13,4	8,7	16,5	4,8	10,3	9,3	10,4
1º PO 15 min	30,6	49,9	48,6	23,3	18,2	44,2	17,6	10,2
1º PO 30 min	52,6	58,6	20,3	19,9	25,6	37,2	10,3	6,1
1º PO 45 min	45,2	47,9	19,8	13,8	39,8	19,4	15,2	7,7
1º PO 60 min	35,8	18,4	10,6	12,7	30,9	7,4	11,2	8,3
2º PO Basal	8,3	8,2	17,8	19,4	17,7	12,5	14,8	8,2
2º PO 15 min	28,6	23,6	7,8	15,3	10,9	15,4	9,2	8,7
2º PO 30 min	13	8,4	4,3	13,5	11,5	7,3	10,4	6,4
2º PO-45min	11,8	10,2	4,9	14,9	14,6	7	8,3	6,2
2º PO 60 min	6,8	6,6	5,8	16,4	8,9	6,4	4,4	2,8

Acalovschi I, Cristea T, Margarit S, Gavrus R. Tramadol added to lidocaine for intravenous regional anesthesia. *Anesth Analg*. 2001; 92:209-14.

Albuquerque LVC. A ética e a experimentação animal à luz do Direito Brasileiro e da União Europeia [dissertação]. Ciências Jurídico-Políticas. Faculdade de Direito da Universidade de Coimbra. Portugal, 2015.

Almeida FPPCP. *Determinação de tramadol e amitriptilina em saliva por Lc-Ms, sua aplicação em amostras de condutores no âmbito de um projecto de investigação europeu* [dissertação]. Medicina Legal e Ciências Forenses, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra. 2009; 192p.

Almeida JM. *Embriologia veterinária comparada*. Guanabara Koogan, 1999.

Altunkaya H, Ozer Y, Kargi E, Ozkocak I, Hosnuter M, Demirel CB, Babuccu O. The postoperative analgesic effect of tramadol when used as subcutaneous local anesthetic. *Anesth Analg*. 2004; 99:1461-4.

American Society of Anesthesiologists Task Force on Acute Pain Management. Practice guidelines for acute pain management in the perioperative setting. An updated report by the American Society of Anesthesiologists Task Force on Acute Pain Management. *Anesthesiology*. 2012; 116:248-73.

Andrade MP. Dor pós-operatória: conceitos básicos de fisiopatologia e tratamento. *Rev Dor*. 2000; 2(2):n.i.

Andreia G, Braga M, and Reis JC. Teoria da relatividade restrita e geral no programa de mecânica do ensino médio: uma possível abordagem. *Rev Bras Ens Fis*. 2007; 29:575-83.

Apfelbaum JL, Chen C, Mehta SS, Gan TJ. Postoperative pain experience: results from a national survey suggest postoperative pain continues to be under managed. *Anesth Analg*. 2003; 97:534-40.

Araújo LAL, Araújo AM. Michel Foucault e as condições de possibilidade do evolucionismo de Darwin. *Filosofia e História da Biologia* 9.2, 2014; 185-97.

Ashmawi HA, Braun LM, Sousa AM, Posso IP. Efeito analgésico de antagonistas do receptor da histamina H1 em modelo de dor provocada por formalina em ratos. *Rev Bras Anesthesiol*. 2009; 59:461-70.

Ashmawi HA, Chambergo FS, Palmeira CAP, Posso, IP. Effects of pyrilamine and cimetidine on mRNA cfos expression and nociceptive behaviour in rats. *Anesth Analg*. 2003; 97:541-6.

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; 79:352-6.

Bamigbade TA, Langford RM. The clinical use of tramadol hydrochloride. *Pain Rev.* 1998; 5:155-82

Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. *Ann Neurol.* 1978; 4:451-62.

Bauer M, Bliesath H, Leuratti C, Lackner E, Dieterle W, Müller M, Brunner M. Disposition and metabolism of ralfinamide, a novel Na-channel blocker, in healthy male volunteers. *Pharmacology.* 2010; 86:297-305.

Baumans V. Use of animals in experimental research: an ethical dilemma? *Gene Ther.* 2004; 11:S64-6.

Berrocoso E, Roja-Corrales, MO, Mico, JA. Differential role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors on the antinociceptive and antidepressant effect of tramadol in mice. *Psychopharmacology.* 2006;1 88:111-8.

Bianchi M, Martucci C, Ferrario P, Franchi S, Sacerdote P. Increased tumor necrosis factor-alpha and prostaglandin E₂ concentrations in the cerebrospinal fluid of rats with inflammatory hyperalgesia: the effects of analgesic drugs. *Anesth Analg.* 2007; 104:949-54.

Bianchi M, Rossoni G, Sacerdote P, Panerai AE. Effects of tramadol on experimental inflammation. *Fundam Clin Pharmacol.* 1999; 13:220-5.

Birklein F, Schlereth T. Complex regional pain syndrome significant progress in understanding. *Pain.* 2015; 156:S94-S103.

Bonella AE. Animais em laboratórios e a lei Arouca. *Scientiae Studia*. 2009; 7(3):507-14.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72:248-54.

Brennan TJ, Umali EF, Zahn PK. Comparison of pre versus post-incision administration of intrathecal bupivacaine and intrathecal morphine in a rat model of postoperative pain. *Anesthesiology*. 1997; 87:1517-28.

Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain*. 1996; 64:493-501.

Brennan TJ, Zahn PK, Pogatzki-Zahn EM. Mechanisms of incisional pain. *Anesthesiol Clin North America*. 2005; 23:1-20.

Brennan TJ. Pathophysiology of postoperative pain. *Pain*. 2011; 152:S33-S40.

Brownstein MJ. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:5391-3.

Buvanendran A, Kroin JS, Kerns JM, Nagalla SN, Tuman KJ. Characterization of a new animal model for evaluation of persistent post thoracotomy pain. *Anesth Analg*. 2004; 99:1453-60.

Charfi I, Nagi K, Mnie-Filali O, Thibault D, Balboni G, Schiller PW, Trudeau LE, Pineyro G. Ligand-and cell-dependent determinants of internalization and cAMP modulation by delta opioid receptor (DOR) agonists. *Cel Mol Life Sci*. 2014; 71:1529-46.

Clarage JB. *The Pythagorean Roots of Introductory Physics*. Science and Education. 2013; 22:527-42.

Coderre TJ, Katz J, Vaccarino AL, Melzack R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: Review of clinical and experimental evidence. *Pain*. 1993; 52: 259-85.

Coggeshall RE, Zhou S, Carlton SM. Opioid receptors on peripheral sensory axons. *Brain Res*. 1997; 764:126–32.

Cousins M, Power I. Acute and Postoperative Pain, in: Wall, PD; Melzack R (eds). *Textbook of pain*. Churchill Livingstone, 4th ed, 1999, 447-91.

Dayer P, Desmeules J, Collart L. Pharmacologie du tramadol. *Drugs*. 1997; 53(Supl 2):18-26.

DeHaven-Hudkins DL, Dolle RE. Peripherally restricted opioid agonists as novel analgesic agents. *Curr Pharm Des*. 2004; 10:743-57.

Demiraran Y, Ilce Z, Kokaman B, Bozkurt P. Does tramadol wound infiltration offer an advantage over bupivacaine for postoperative analgesia in children following herniotomy? *Pediatr Anaesth*. 2006; 16:1047-50.

Deutsch F, Ashmawi HA, Palmeira CCA, Posso IP. Efeito analgésico de antagonistas do receptor da histamina H2 em modelo de dor provocada por formalina em ratos. *Rev Dor*. 2011; 12:240-4.

Dhawan BN, Cesselin F, Raghubir R, Reisine T, Bradley PB, Portoghesi PS, Hamon M. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev*. 1996; 48:567-92.

Dolin SJ, Cashman JN, Bland JM. Effectiveness of acute postoperative pain management: I. Evidence from published data. *Br J Anaesth*. 2002; 89(3):409-23.

Driessen B, Reinmann W, Giertz H. Effects of the central analgesic tramadol on the uptake and release of noradrenaline and dopamine in vitro. *Br J Pharmacol*. 1993; 108:806-11.

Duckett JW, Cangiano T, Cubina M, Howe C, Cohen D. Intravesical morphine analgesia after bladder surgery. *J Urol*. 1997; 157:1407-9.

Einstein A. *A teoria da relatividade especial e geral*. Rio de Janeiro: Contraponto, 1999.

Emmerson PJ, Liu MR, Woods JH, Medzihradsky F. Binding affinity and selectivity of opioids at mu, delta and kappa receptors in monkey brain membranes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994; 271:1630-7.

Fields HL, Emson PC, Leigh BK, Gilbert RF, Iversen LL. Multiple opiate receptor sites on primary afferent fibres. *Nature*. 1980; 284:351-3.

Fong A, Schug SA. Pathophysiology of Pain: A Practical Primer. *Plast Reconstr Surg*. 2014; 134:8S-14S.

Garrido MJ, Sayar O, Segura C, Rapado J, Dios-Vieitez MC, Renedo MJ, Troconiz IF. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic modeling of the antinociceptive effects of (+)-tramadol in the rat: role of the cytochrome P4502D activity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 305:710-8.

Garrido MJ, Valle M, Campanero MA, Calvo R, Trokoniz IF, Modeling of the in vivo interaction between an opioid agonist, (+)-o-desmethyltramadol, and a monoamine reuptake inhibitor, (-)-o-desmethyltramadol, in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000; 295:352-9.

Gaynor JS, Muir III WW. *Definitions of terms describing pain. Handbook of Veterinary Pain Management*. 3^a ed. Nova Yorke: Mosby, 2014.

Gebhart GF. Descending modulation of spinal nociceptive processing. *Schmerz*. 1993; 7:216-25.

Gentili ME, Chauvin M. *Tramadol et prise en charge de la douleur. Conférences d'actualisation, 2004*. 460 Congrès national d'anesthésie et de réanimation, Paris: Elsevier, Paris, 2004.

Gerdle B, Kristiansen J, Larsson B, Saltin B, Sogaard K, Sjogaard G. Algogenic substances and metabolic status in work-related Trapezius Myalgia: a multivariate explorative study. *BMC Musculoskeletal Disord*. 2014; 15:357.

Giraldes AL, Sousa AM, Slullitel A, Guimarães GM, Santos MG, Pinto RE, Ashmawi HA, Sakata RK. Tramadol wound infiltration is not different from intravenous tramadol in children: a randomized controlled trial. *J Clin Anesth*. 2015 Oct 1. pii: S0952-8180(15)00258-5. doi: 10.1016/j.jclinane.2015.08.009. [Epub ahead of print]

Goffaux P, Redmond WJ, Rainville P, Marchand S. Descending analgesia – when the spine echoes what the brain expects. *Pain*. 2007; 130:137-43.

Gomes MCA, Fonseca CC, Alves GES, Maldonado IRDSC, Lima LM, Benjamin LDA. A bioética e as atividades didático-científicas com animais [tese]. Viçosa: Faculdade de Veterinária de da Universidade Federal,,2014. 216.

Gottschalk A, Raja SN. Severing the link between acute and chronic pain: the anesthesiologist's role in preventive medicine. *Anesthesiology*. 2004; 101:1063-5.

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; 126:234-44.

Hall M. On experiments in physiology, as a question of medical ethics. *Lancet*. 1847; 49(1220):58-60.

Hamalainen MM, Gebhart GF, Brennan TJ. Acute effect of an incision on mechanosensitive afferents in the plantar rat hindpaw. *J Neurophysiol*. 2002; 87:712-20.

Hara K, Minami K, Sata T. The effects of tramadol and its metabolite on glycine, gamma-aminobutyric acidA, and N-methyl-D-aspartatereceptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Anesth Analg*. 2005; 100(5):1400-5.

Hassan AH, Ableitner A, Stein C, Herz A. Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. *Neuroscience*. 1993; 55:185-95.

Hill R. NK1 (substance P) receptor antagonists--why are they not analgesic in humans? *Trends Pharmacol Sci* .2000; 21:244-6.

Holton G, Elkana Y. *Albert Einstein historical and cultural perspectives*. Nova York: Dover Publications, 1997.

Ingvar M. Learning mechanisms in pain chronification—teachings from placebo research. *Pain*. 2015; 156(Suppl 1):S18-S23.

Izmirli S, Aldavood SJ, Yasar A, Phillips CJ. Introducing ethical evaluation of the use of animals in experiments in the Near East. *Altern Lab Anim*. 2010; 38:331-6.

Jensen TS, Baron R, Haanpää M, Kalso E, Loeser JD, Rice AS, Treede RD. A new definition of neuropathic pain. *Pain*. 2011; 152:2204-5.

Ji RR, Zhang Q, Law PY, Low HH, Elde R, Hökfelt T. Expression of mu, delta, and Kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan induced inflammation. *J Neurosci*. 1995; 15:8156-66.

Junqueira LCU, Carneiro J. *Noções básicas de citologia, histologia e embriologia*. Nobel, 1988.

Kaabachi O, Ouezini R, Koubaa W, Ghrab W, Zargouni A, Abdelaziz AB. Tramadol as an adjuvant to lidocaine for axillary brachial plexus block. *Anesth Analg*. 2009; 108:367-70.

Kang S, Brennan TJ. Plantar incision model: a preclinical model for postoperative pain. In: Handwerker HO, Arendt-Nielsen L (Eds.) *Pain models: translational relevance and applications*. Whashington, DC: IASP Press, 2013.

Katsuki R, Fujita T, Koga A, Liu T, Nakatsuka T, Nakashima M, Kumamoto E. Tramadol, but not its major metabolite (mono-O-demethyl tramadol) depresses compound action potentials in frog sciatic nerves. *Br J Pharmacol*. 2006; 149:319-27.

Kayser V, Besson JM, Reinmann W. Effects of the analgesic agent tramadol in normal and arthritic rats: comparison with the effects of different opioids, including tolerance and cross-tolerance to morphine. *Eur J Pharmacol*. 1991; 195:35-47.

Kehlet H, Holte K. Effect of postoperative analgesia on surgical outcome. *Br J Anaesth*. 2001; 87:62-72.

Kehlet H, Jensen TS, Woolf CJ. Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. *Lancet*. 2006; 367:1618-25.

Kehlet H, Wilmore DW. Multimodal strategies to improve surgical outcome. *Am J Surg*. 2002; 183:630-41.

Kerns RD, Jensen MP, Nielson WR. *Motivational issues in pain self-management*. In: Proceedings of the 11th World Congress on Pain, 2006. p. 555-66.

Kesimci E, Gozdemir M, Kanbak O. Tramadol does not prolong the effect of ropivacaine 7,5 mg/ml for axillary brachial plexus block. *Acta Anaesth Scand*. 2007; 51:736-41.

Kim TJ, Freml L, Park SS, Brennan TJ. Lactate concentrations in incisions indicate ischemic-like conditions may contribute to postoperative pain. *J Pain*. 2007; 8:59-66.

Kirchheiner J, Keulen JT, Bauer S, Roots I, Brockmöller J. Effects of CYP2D gene duplication on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of tramadol. *J Clin Psychopharmacol*. 2008; 28:78-83.

Kosterlitz HW, Lord JA, Paterson SJ, et al. Effects of changes in the structure of enkephalins and of narcotic analgesic drugs on their interactions with mu- and delta-receptors. *Br J Pharmacol*. 1980; 68:333-42.

Kress M, Reeh PW. More sensory competence for nociceptive neurons in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93:14995-7.

Kumar M, Batra YK, Panda NB, Rajeev S. Tramadol added to bupivacaine does not prolong analgesia of continuous psoas compartment block. *Pain Practice*. 2009; 9:43-50.

Kvetnansky R, Xiaojiong L, Ziegler MG. Stress-triggered changes in peripheral catecholaminergic systems. *Adv Pharmacol*. 2013; 68:359-97.

Lagan G, McClure HA. Review of local anaesthetic agents. *Current Anaesth Crit Care*. 2004; 15:247-54.

Lascelles BD, Waterman AE, Cripps PJ, Livingston A, Henderson G. Central sensitization as a result of surgical pain: investigation of the pre-emptive value of pethidine for ovariohysterectomy in the rat. *Pain*. 1995; 62:201-12.

Lavand'homme P. The progression from acute to chronic pain. *Curr Opin Anesthesiol*. 2011; 24:545-50.

Levine DM, Berenson ML, Stephan D. *Estatística: teoria e aplicações usando Microsoft Excel em português*. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

Liang J, Chao D, Sandhu HK, Yu Y, Zhang L, Balboni G, Kim DH, Xia Y. δ -Opioid receptors up-regulate excitatory amino acid transporters in mouse astrocytes. *Br J Pharmacol*. 2014; 171:5417-30.

Likar R, Schäfer M, Paulak F, Sittl R, Pipam W, Schalk H, Geissler D, Bernatzky G. Intraarticular morphine analgesia in chronic pain patients with osteoarthritis. *Anesth Analg*. 1997; 84:1313-7.

Likar R, Sittl R, Gragger K, Pipam W, Blatnig H, Breschan C, Schalk HV, Stein C, Schäfer M. Peripheral morphine analgesia in dental surgery. *Pain*. 1998; 76:145-50.

Lluch E, Torres R, Nijs J, Van Oosterwijck J. Evidence for central sensitization in patients with osteoarthritis pain: a systematic literature review. *Eur J Pain*. 2014; 18:1367-75.

Mantyh PW. The neurobiology of skeletal pain. *Eur J Neurosci*. 2014; 39:508-19.

Martin TJ, Buechler NL, Kahn W, Crews JC, Eisenach JC. Effects of laparotomy on spontaneous exploratory activity and conditioned of operant responding in the rat - A model for postoperative pain. *Anesthesiology*. 2004; 101:191-203.

Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE. The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinaldog. *J Pharmacol Exp Ther*. 1976; 197(3):517-32.

Matfield M. The ethics of animal research. *Exp Anim*. 1996; 45:209-15.

McMillan CJ, Livingston A, Clark CR, Dowling PM, Taylor SM, Duke T, Terlinden R. Pharmacokinetics of intravenous tramadol in dogs. *Can J Vet Res*. 2008; 72:325-31.

Meechan JG. How to overcome failed local anaesthesia. *Br Dent J*. 1999; 186(1):15-20.

Merskey H, Bogduk N. *Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms*. Seattle: IASP Press; 1994.

Mert T, Gunes Y, Gunay I. Local analgesic efficacy of tramadol following intraplantar injection. *Eur J Pharmacol*. 2007; 858:68-72.

Mert T, Gunes Y, Guven M, Gunay I, Ozcengiz D. Comparison of nerve conduction blocks by an opioid and a local anesthetic. *Eur J Pharmacol*. 2002; 439:77-81.

Mert T, Gunes Y, Ozcengiz D, Gunay I, Polat S. Comparative effects of lidocaine and tramadol on injured peripheral nerves. *Eur J Pharmacol*. 2006; 543:54-62.

Mishra S, Bhatnagar S, Gupta D, Nirwani Goyal G, Jain R, Chauhan H. Management of neuropathic pain following WHO analgesic ladder: a prospective study. *Am J Hosp Palliat Care*. 2008; 25:447-51.

Mogil JS, Davis KD, Derbyshire SW. The necessity of animal models in pain research. *Pain*. 2010; 151:12-7.

Mogil JS. Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci*. 2009; 10:283-94.

Moiniche S, Dahl JB, Kehlet H. Peripheral antinociceptive effects of morphine after burn injury. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1993; 37:710-2.

Obara I, Parkitna JR, Korostynski M, Makuch W, Kaminska D, Przewlocka B, Przewlocki R. Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain. *Pain*. 2009; 141:283-91.

Oliveira CMB, Issy AM, Sakata RK. Fisiopatologia da dor pós-operatória. *RBM*. 2010; 67:415-8.

Oliveira Jr JO. Dor oncológica. *Acta Oncol Bras*. 1994; 14:11-5.

Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F. Central modulation of pain. *J Clin Invest*. 2010; 120:3779-87.

Ozyilmaz K, Ayoglu H, Okyay RD, Yurtlu S, Koksall B, Hanci V, Erdogan G, Turan IO. Postoperative analgesic effects of wound infiltration with tramadol and levobupivacaine in lumbar disk surgeries. *J Neurosurg Anesthesiol*. 2012; 24:331-5.

Pang WW, Mok MS, Chang DP, Huang MH. Local anesthetic effect of tramadol, metoclopramide, and lidocaine following intradermal injection. *Reg Anesth Pain Med*. 1998; 23:580-3.

Park J, Bucher ES, Budygin EA, Wightman RM. Norepinephrine and dopamine transmission in 2 limbic regions differentially respond to acute noxious stimulation. *Pain*. 2015; 156:318-327.

Parodi AL. Ethical issue in animal experimentation. *Bull Acad Natl Med*. 2009; 193:1737-45.

Pavlin DJ, Chen C, Penaloza DA, Polissar NL, Buckley FP. Pain as a factor complicating recovery and discharge after ambulatory surgery. *Anesth Analg.* 2002; 95:627-34.

Pedersen RS; Damkier P; Brosen K, Møller M, Thayssen P, Bjerre M, Kragh-Sørensen P, Klitgaard NA, Sindrup E, Hole P, Brinklø M. Enantioselective pharmacokinetics of tramadol in CYP2D6 extensive and poor metabolizers. *Eur J Clin Pharmacol.* 2006; 62:513-21.

Perkins FM, Kehlet H. Chronic pain as an outcome of surgery. A review of predictive factors. *Anesthesiology.* 2000; 93:1123-33.

Pert CB, Snyder SH. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science.* 1973; 179:1011-4.

Pillon F. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens. *Actualités Pharmaceutiques.* 2014; 53:43-6.

Pogatzki EM, Gebhart GF, Brennan TJ. Characterization of Delta- and C-fibers innervating the plantar rat hindpaw one day after an incision. *J Neurophysiol.* 2002; 87:721-31.

Pogatzki-Zahn E M, Zahn PK, Brennan TJ. Postoperative pain-clinical implications of basic research. *Best Pract Res Clin Anesthesiol.* 2007; 1:3-13.

Porreca F, Tang QB, Bian D, Riedl M, Elde R, Lai J. Spinal opioid mu receptor expression in lumbar spinal cord of rats following nerve injury. *Brain Res.* 1998; 795:197-203.

Poulsen L, Arendt-Nielsen L, Brosen K. The hypoalgesic effect of Tramadol in relation to CYP2D6. *Clin Pharmacol Ther.* 1996; 60:636-44.

Prosser DP, Booker PD, Murray A. Caudal tramadol for postoperative analgesia in paediatric hypospadias surgery. *Br J Anaesth.* 1997; 79:293-6.

Raffa RB, Friderichs E, Reinmann W. Opioid and non-opioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an atypical opioid analgesic. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992; 260:275-85.

Rawal N, Allvin R, Amilon A, Ohlsson T, Hallén J. Postoperative analgesia at home after ambulatory hand surgery: a controlled comparison of Tramadol, Metamizol, and Paracetamol. *Anesth Analg.* 2001; 92:347-51.

Riviere PJ. Peripheral kappa-opioid agonists for visceral pain. *Br J Pharmacol.* 2004; 141:1331-4.

Rocha LS, Moraes MW. Assistência de enfermagem no controle da dor da sala de recuperação anestésica. *Rev Dor.* 2010; 11:254-8.

Rollin BE. The regulation of animal research and the emergence of animal ethics: a conceptual history. *Theor Med Bioethics.* 2006; 27(4):285-304.

Ron JMS. Einstein, la relatividad y las matemáticas. *La Gaceta de la RSME.* 2004; 7:153-84.

Ron JMS. *La relación histórica de España con la ciencia ha sido complicada y en general insatisfactoria. Como cabe esperar en una relación de tal tipo, es posible identificar situaciones y momentos muy diferentes, algunos de amarga frustración, y otros de ilusionada, aun que también crítica, esperanza. Uno de esos momentos, en el que se combinó la frustración con la esperanza de un traspasar fronteras: Un siglo de intercambio científico entre España y Alemania.* 2010, 293p.

Schnaider TB, C Souza. Aspectos éticos da experimentação animal. *Rev Bras Anesthesiol.* 2003; 53(2): 278-85.

Scott A, Khan KM, Cook JL, Duronio V. What is "inflammation"? Are we ready to move beyond Celsus? *Br J Sports Med.* 2004; 38(3):248-9.

Sindrup SH, Andersen G, Madsen C, Smith T, Brøsen K, Jensen TS. Tramadol relieves pain and allodynia in polyneuropathy: a randomized, double-blind, controlled trial. *Pain.* 1999; 83:85-90.

Sousa AM, Ashmawi HA, Costa LS, Posso IP, Slullitel A. Percutaneous sciatic nerve block with tramadol induces analgesia and motor blockade in two animal pain models. *Braz J Med Biol Res.* 2012; 45:147-52.

Sousa AM, Ashmawi HA. Local analgesic effect of tramadol is not mediated by opioid receptors in early postoperative pain in rats. *Rev Bras Anesthesiol.* 2015; 65:186-90.

Sousa AM, Franco PAB, Ashmawi HA, Posso IP. Efeito analgésico local do tramadol em modelo de dor provocada por formalina em ratos. *Rev Bras Anesthesiol*. 2008; 58:371-9.

Stein A, Yassouridis A, Szopko C, Helmke K, Stein C. Intraarticular morphine versus dexamethasone in chronic arthritis. *Pain* .1999; 83:525-32.

Stein C, Comisel K, Haimerl E, Yassouridis A, Lehrberger K, Herz A, Peter K. Analgesic effect of intraarticular morphine after arthroscopic knee surgery. *N Engl J Med*. 1991; 325:1123-6.

Stein C, Millan MJ, Shippenberg TS, Peter K, Herz A. Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation - evidence for involvement of mu-receptors, delta-receptors and kappa-receptors. *J Pharmacol Exp Ther* .1989; 248:1269-75.

Stein C, Schafer M, Machelska H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat Med*. 2003; 9:1003-8.

Stonski E, Cullen C. Receptor opioide periférico; su utilidad clínica. *Rev Argent Anesthesiol*. 2007; 65:143-58.

Stracieri LDS. Cuidados e complicações pós-operatórias. *Medicina*. 2008, 4:465-8.

Taiwo YO, Levine JD. Kappa- and delta-opioids block sympathetically dependent hyperalgesia. *J Neurosci*. 1991; 11:928-32.

Taylor AMW, Roberts KW, Pradhan AA, Akbari HA, Walwyn W, Lutfy K, Carroll FI, Cahill CM, Evans CJ. Anti-nociception mediated by a κ opioid receptor agonist is blocked by a δ receptor agonist. *Br J Pharmacol*. 2015; 172:691-703.

Tinoco IAP. Lei Arouca: Avanço ou retrocesso? *Revista dos Tribunais*. 1998.

Todd EM. Pain: Historical Perspectives In: Aronoff GM. *Evaluation and treatment of chronic pain*. 2ª Ed. 1992, 1:1-9.

Tréchet P, Jouzeau JY. Bases chimiques et pharmacologiques des AINS. *Rev Fr Allergol*. 2014; 54:212–7.

Truong W, Cheng C, Xu QG, Li XQ, Zochodne DW. Mu opioid receptors and analgesia at the site of a peripheral nerve injury. *Ann Neurol*. 2003; 53:366-75.

Tsai TY, Tsai YC, Wu SN, Liu YC. Tramadol-induced blockade of delayed rectified potassium current in NG 108-15 neuronal cells. *Eur J Pain*. 2006; 10:597-601.

Tsai YC, Chang PJ, Jou IM. Direct Tramadol application on sciatic nerve inhibits spinal somatosensory evoked potentials in rats. *Anesth Analg*. 2001; 92:1547-51.

Ueno T, Tsuchiya H, Mizogami M, Takakura K. Local anesthetic failure associated with inflammation: verification of the acidosis mechanism and the hypothetic participation of inflammatory peroxynitrite. *J Inflamm Res*. 2008; 1:41-8.

Vandermeulen EP, Brennan TJ. Alterations in ascending dorsal horn neurons by a surgical incision in the rat foot. *Anesthesiology*. 2000; 93:1294-302.

Veneroni O, Maj R, Calabresi M, Faravelli L, Fariello RG, Salvati P. Anti-allodynic effect of NW-1029, a novel Na(+) channel blocker, in experimental animal models of inflammatory and neuropathic pain. *Pain*. 2003; 102:17-25.

Voscopoulos C, Lema M. When does acute pain become chronic? *Br J Anaesth*. 2010; 105Suppl 1:69-85.

Wallach D, Kang TB & Kovalenko A. Concepts of tissue injury and cell death in inflammation: a historical perspective. *Nat Rev Immunol*. 2014; 14(1):51-9.

Wang H, Wessendorf MW. Equal proportions of small and large DRG neurons express opioid receptor mRNAs. *J Comp Neurol*. 2001; 429:590-600.

Weiser TG, Regenbogen SE, Thompson KD, Haynes AB, Lipsitz SR, Berry WR, Gawande AA. An estimation of the global volume of surgery: a modelling strategy based on available data. *Lancet*. 2008; 372:139-44.

Woo YC, Park SS, Subieta AR, Brennan TJ. Changes in tissue pH and temperature after incision indicate acidosis may contribute to postoperative pain. *Anesthesiology*. 2004; 101:468-75.

Woolf CJ. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann Intern Med*. 2004; 140:441-51.

Xu J, Richebe P, Brennan TJ. Separate groups of dorsal horn neurons transmit spontaneous activity and mechanosensitivity one day after plantar incision. *Eur J Pain*. 2009; 13:820-8.

Yu PC. [tese]. *Registro nacional de operações não cardíacas: aspectos clínicos, cirúrgicos, epidemiológicos e econômicos*. São Paulo, Faculdade de Medicina. 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5131/tde-31082010-184101/>>. Acesso em 15 out 2015.

Zahn PK, Brennan TJ. Primary and secondary hyperalgesia in a rat model for human postoperative pain. *Anesthesiology*. 1999; 90: 863-72.

Zahn PK, Gysbers D, Brennan TJ. Effect of systemic and intratecal morphine in a rat model of postoperative pain. *Anesthesiology*. 1997; 86:1066-77.

Zaki PA, Bilsky EJ, Vanderah TW, Lai J, Evans CJ, Porreca F. Opioid receptor types and subtypes: the delta receptor as a model. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1996; 36:379-401.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigation for experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983; 16:109-10.

APÊNDICE

Apêndice A - Pôster apresentado durante o 15º Congresso da IASP, 2014

ROLE OF PERIPHERAL OPIOID RECEPTORS ON THE LOCAL ANALGESIC EFFECT OF TRAMADOL AFTER PLANTAR INCISION IN RATS

J. O. Oliveira Jr, C. B. de Andrade, H. A. ASHMAWI

LIM 8 (Laboratory of Medical Investigation number eight) Experimental Anesthesia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SAO PAULO, Brazil

Aim of Investigation:

Local analgesic effect of tramadol has been described before and is partly due to local anesthetic like effect of tramadol. Although peripheral opioid receptors are present, little is known about their role in tramadol's local effect in postoperative pain analgesia. This study aimed to evaluate the role of peripheral opioid receptor in the local analgesic effect of tramadol in a model of postoperative pain, the plantar incision model in rats.

Methods (1):

- 1 All procedures were performed according to the institution committee for research and according to ethical issues of IASP. Male Wistar rats weighing 200-250g were used in the study.
- 2 Under general anesthesia all animals were submitted to plantar incision in the hindpaw.
- 3 After were tested for mechanical hyperalgesia assessed by withdrawal thresholds with electronic anesthesiometer on postoperative day (POD) 1 and 2.

Methods (2):

Animals were tested for baseline values before incision, baseline values no POD1 and 2 before injections and 15, 30, 45 and 60 minutes after injections. Animals were divided into four groups of 9 animals each:

- 1 SF-SF, 50µl of 0.9% NaCl in the perineuronal area and 15 minutes later, 50µl of 0.9% NaCl in the same local;
- 2 SF-Tram-ipl, 50µl of 0.9% NaCl in the perineuronal area and 15 minutes later, 50µl of 5mg tramadol in the same local;
- 3 SF-Tram-cl, 50µl of 0.9% NaCl in the contralateral hindpaw and 15 minutes later, 50µl of 5mg tramadol in the same local;
- 4 Nal-Tram-ipl, 50µl of 250 µg of naloxone in the perineuronal area and 15 minutes later, 50µl of 5mg tramadol in the same local.

Results:

SF-Tram-ipl lead to increase in the withdrawal thresholds for mechanical stimuli, similar to baseline values, SF-Tram-cl withdrawal thresholds were similar to SF-SF with marked hyperalgesia on both days, and in Nal-Tram-ipl group, it was observed an increase in the withdrawal thresholds in this group on both days of observations.

Getting the analgesic effect

Results of four groups data:

Conclusions:

Tramadol presented an analgesic effect in the postoperative pain model of plantar incision in rats. This effect is local and mediated by peripheral opioid receptors.

References:

1. Alkhalaf H, Omer T, Ezzamel M, et al. Tramadol: A review of its pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2012;37(1):1-15.
2. Boman T, Wadström B, Wadström B, et al. Tramadol: A review of its pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2012;37(1):1-15.
3. Pines J, Pines J, Pines J, et al. Tramadol: A review of its pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2012;37(1):1-15.
4. Haddad M, Haddad M, Haddad M, et al. Tramadol: A review of its pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2012;37(1):1-15.
5. Kaur M, Kaur M, Kaur M, et al. Tramadol: A review of its pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2012;37(1):1-15.
6. Kaur M, Kaur M, Kaur M, et al. Tramadol: A review of its pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2012;37(1):1-15.
7. Kaur M, Kaur M, Kaur M, et al. Tramadol: A review of its pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2012;37(1):1-15.
8. Kaur M, Kaur M, Kaur M, et al. Tramadol: A review of its pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2012;37(1):1-15.
9. Kaur M, Kaur M, Kaur M, et al. Tramadol: A review of its pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2012;37(1):1-15.
10. Kaur M, Kaur M, Kaur M, et al. Tramadol: A review of its pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2012;37(1):1-15.