

**OSCAR CÉSAR PIRES**

**Efeitos da naloxona, da metissergida e da fentolamina, por via subaracnóidea, sobre a modulação da dor, através do teste de formalina modificado, em ratos**

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

Área de concentração: Anestesiologia

Orientador: Prof. Dr. Irimar de Paula Posso

São Paulo  
2009

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pires, Oscar César

Efeitos da naloxona, da metissergida e da fentolamina, por via subaracnóideia, sobre a modulação da dor, através do teste de formalina modificado, em ratos / Oscar César Pires . -- São Paulo, 2009.

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

Departamento de Cirurgia.

Área de concentração: Anestesiologia.

Orientador: Irimar de Paula Posso.

Descritores: 1.Ratos 2.Naloxona 3.Metissergida 4.Fentolamina 5.Medição da dor

USP/FM/SBD-421/09

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Joana e Oscar, responsáveis pela minha formação e por todas as minhas conquistas.

A minha companheira de todos os momentos, Marta Regina, pelo incentivo, amor e paciência.

A minha filha, Marta Helena, extensão de minha existência.

Aos meus familiares, pelo carinho e respeito.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Ao Prof. Dr. Irimar de Paula Posso, pela oportunidade, confiança, ensinamentos e amizade verdadeira.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por tudo de bom que sempre me ofereceu.

A Magnífica Reitora da Universidade de Taubaté, Prof. Dra. Maria Lucila Junqueira Barbosa, pelo apoio institucional e pessoal.

A Prof. Dra. Ana Julia Urias dos Santos Araujo, Chefe do Instituto Básico de Biociências da Universidade de Taubaté, pela inestimável contribuição.

Ao Prof. Dr. Hazem Adel Asmawi, pela inestimável ajuda na execução do projeto.

A Prof. Dra. Naira Correa Cusma Pelógia, pelo apoio e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Fisiologia da Universidade de Taubaté, Adriana e Gilmara, por sempre estarem presentes.

Ao Prof. Dr. José Octávio Costa Auler Júnior, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia, pela oportunidade.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia Claudia e Clayton, pela atenção dispensada durante todo o doutorado.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram deste estudo.

# SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Fenômeno doloroso.....	2
1.2 Modulação espinhal da dor.....	2
1.3 Naloxona.....	5
1.4 Metissergida.....	6
1.5 Fentolamina.....	6
1.6 Modelos animais para estudo da dor.....	7
2 OBJETIVO.....	10
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1 Animais utilizados.....	13
3.2 Métodos.....	13
3.2.1 Adaptação.....	13
3.2.2 Procedimento anestésico e administração dos fármacos .....	14
3.2.3 Grupos experimentais.....	18
3.2.3.1 Grupo controle com solução salina.....	18
3.2.3.2 Grupo fentolamina.....	18
3.2.3.3 Grupo naloxona.....	18
3.2.3.4 Grupo metissergida.....	19
3.2.3.5 Grupo fentolamina associada a metissergida.....	19
3.2.4 Indução da dor.....	19
3.2.5 Respostas a injeção de formalina.....	20
3.3 Análise estatística.....	21
4 RESULTADOS.....	22
4.1 Dados do peso e idade.....	23
4.2 Número de elevações da pata durante o teste.....	24
4.2.1 Grupo controle (GC).....	24
4.2.2 Grupo fentolamina (GF).....	25
4.2.3 Grupo naloxona (GN).....	25
4.2.4 Grupo metissergida (GM).....	26
4.2.5 Grupo fentolamina associada a metissergida (GFM).....	26
4.2.6 Médias das elevações da pata em todos os grupos.....	27
4.3 Análise estatística.....	28
5 DISCUSSÃO.....	31
6 CONCLUSÕES.....	37
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
8 ANEXOS	
9 APÊNDICES	

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAPPesq	-	Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa
CCK	-	Colecistocinina
CGRP	-	Peptídeo gene relacionado a calcitonina
CPME	-	Corno posterior da medulla espinhal
GABA	-	Ácido gama amino butírico
GC	-	Grupo controle com solução salina
GF	-	Grupo fentolamina
GFM	-	Grupo fentolamina associada a metissergida
GM	-	Grupo metissergida
GMPc	-	Guanosina 3'5'-monofosfato cíclico
GN	-	Grupo naloxona
IASP	-	International association for the study of pain
L-NAME	-	L-N-metilarginina
NKA	-	Neurocinina A
NKB	-	Neurocinina B
NMDA	-	N-metil-D-aspartato
NMR	-	Núcleo magno da rafe
NO	-	Óxido nítrico
NOS	-	Óxido nítrico sintase
PAG	-	Substância cinzenta periaquedutal
PG	-	Prostaglandinas
SNC	-	Sistema Nervoso central
SP	-	Substância P
SPSS	-	Statistical Package for Social Sciences
UNITAU	-	Universidade de Taubaté
USP	-	Universidade de São Paulo
5-HT	-	Serotonina

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Câmara para ambientalização e realização do estudo.....	14
Figura 2 - Câmara para anestesia.....	16
Figura 3 - Punção subaracnóidea e cateterização do espaço.....	16
Figura 4 - Região dorsal do animal após a sutura da pele.....	17
Figura 5 – Confirmação da localização do cateter no espaço subaracnóideo.....	17
Figura 6 - Injeção de formalina na região dorsal da pata direita traseira.....	20
Figura 7 - Médias das elevações da pata, ao longo do tempo, dos animais do grupo controle com solução salina (GC).....	24
Figura 8 - Médias das elevações da pata, ao longo do tempo, dos animais do grupo fentolamina (GF).....	25
Figura 9 - Médias das elevações da pata, ao longo do tempo, dos animais do grupo naloxona (GN).....	25
Figura 10 - Elevações da pata, ao longo do tempo, dos animais do grupo metissergida (GM).....	26
Figura 11 - Médias das elevações da pata, ao longo do tempo, dos animais do grupo fentolamina associada à metissergida.....	26
Figura 12 - Médias das elevações da pata, ao longo do tempo, dos animais de todos os grupos estudados.....	27
Figura 13 - Médias e desvio padrão do número de elevações da pata, dos grupos, durante a fase I.....	28
Figura 14 - Médias e desvio padrão do número de elevações da pata, dos grupos, durante a fase intermediária.....	29
Figura 15 - Médias e desvio padrão do número de elevações da pata, dos grupos, durante a fase intermediária.....	29



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medidas descritivas do dado paramétrico; idade (dias) dos animais dos cinco grupos de estudo.....	23
Tabela 2 - Medidas descritivas do dado paramétrico; peso (g) dos animais dos cinco grupos de estudo.....	23
Tabela 3 – Medias das elevações da pata, ao longo do tempo, dos animais de todos os grupos estudados.....	27

## RESUMO

Pires OC. Efeitos da naloxona, da metissergida e da fentolamina, por via subaracnóidea, sobre a modulação da dor, através do teste de formalina modificado, em ratos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 47p.

Aferentes nociceptivos primários se projetam da periferia para o corno posterior da medula espinhal onde ativam grande número de neurônios de segunda ordem e de projeção. Há evidências de que a passagem de informações nociceptivas pelo CPME seguindo para níveis rostrais do sistema nervoso central, sofre profundas influências excitatórias e inibitórias. A presente pesquisa teve como objetivo comparar os efeitos dos antagonistas de opióides (naloxona), de serotonina (metissergida) e de noradrenalina (fentolamina), administrados por via subaracnóidea, sobre as fases I, intermediária e II do teste da formalina modificado, em ratos. Para tanto, foram utilizados 35 ratos wistar machos, pesando entre 220 e 300 gramas, distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (n = 7) para receber solução salina (GC), fentolamina (GF), naloxona (GN), metissergida (GM) ou fentolamina associada a metissergida (GFM). A indução da dor foi realizada com administração de solução de formalina na região dorsal da pata posterior direita. Todas as elevações da pata, não relacionadas à marcha foram consideradas e a contagem foi realizada continuamente durante o período de 60 minutos. O teste foi dividido em três fases; fase I, intermediária e fase II, sendo que a fase I compreendeu o número de elevações durante os primeiros 5 minutos, a fase intermediária do sexto ao vigésimo minuto e a fase II, do vigésimo primeiro ao sexagésimo minuto. A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada utilizando o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), adotando o nível de significância de 5%. Para as variáveis: peso, idade e fase I do teste, os grupos foram estatisticamente semelhantes. Nos cinco grupos estudados, a fase intermediária diferenciou-se das outras duas, enquanto que as fases I e II foram estatisticamente semelhantes. Para a variável fase intermediária foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos GF, GM e GFM quando comparados com os grupos GC e GN, e para a variável fase II foi encontrada diferença significativa entre o grupo GN em comparação a todos os outros grupos. No presente estudo, a metissergida e a fentolamina se mostraram eficazes em inibir o efeito modulador espinhal da dor, sugerindo efeito noradrenérgico e serotoninérgico inibitório da transmissão nociceptiva espinhal, sem haver efeito somatório ou potencializador quando utilizados em associação. Entretanto, estes efeitos não foram observados com naloxona, e assim um efeito opióide modulador espinhal, na interfase do teste não ficou estabelecido. Durante a fase II, a naloxona causou redução da resposta nociceptiva à formalina, corroborando a hipótese de que exerça atividade sobre os receptores k-opiáceos .

Descritores: ratos, naloxona, metissergida, fentolamina, medição da dor.

## SUMMARY

Pires OC. Effects of naloxone, methysergide and phentolamine, via subarachnoid, on pain modulation through a modified formalin test in rats. [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 47p.

Primary nociceptive afferents are projected from the periphery to the dorsal horn of the spinal cord, where they activate a large number of second-order and spinal projection neurons. There are evidences that the passage of nociceptive information through the posterior horn of the spinal cord towards rostral levels of the central nervous system (CNS) are under profound excitatory and inhibitory influences. This research had as objective to compare the effects of the naloxone, methysergide and phentolamine, administered by intrathecal route, under phases I, II and intermediary of the modified formalin test in rats. Therefore, 35 male Wistar rats between 220 and 300 grams, randomly distributed in five groups (n = 7) to receive saline solution (GS), phentolamine (GF), naloxone (GN), methysergide (GM) or phentolamine associated to methysergide (GFM) were used. The induction of pain was performed with administration of formalin solution in the dorsal region of the posterior right paw. All paw lifting, not related to the march, were taken into account and the count was continuously performed during the 60 minute period. The test was divided into three phases: phase I, intermediary and phase II, whereas phase I comprised the number of elevations during the first five minutes, the intermediary phase from the sixth to the twentieth minute, and phase II, the number of elevations from the twentieth first minute up to the sixtieth minute to the sixtieth minute. The statistical analysis of the results obtained was performed using the program SPSS (Statistical Package for Social Sciences), adopting a 5% significance level. For the variables: Weight, age and phase I of the test, the groups were statistically similar. In the five studied groups, the intermediary phase was different from the other two, while phases I and II were statistically similar. For the intermediary phase variable it was found a statistically significant difference among groups GF, GM, GFM when compared with groups GS and GN, and for the phase II variable it was found significant difference between group GN when compared with groups GC, GF, GM and GFM. In this study, methysergide, a non-selective antagonist of receptors 5-HT and phentolamine, a non-selective adrenoceptor antagonist, were effective in inhibiting the spinal pain modulating effect, suggesting inhibitory noradrenergic and serotonergic effect of spinal nociceptive transmission. However, such effects were not noticed with naloxone, and thus, a modulating spinal opioid effect was not established in the test interphase. During phase II of the formalin test, naloxone causes the decrease of nociceptive response to formalin, suggesting that the  $\kappa$ -opiate receptors are involved in naloxone-induced analgesia.

Descriptors: rats, naloxone, methysergide, phentolamine, pain measurement.

# **INTRODUÇÃO**

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 Fenômeno doloroso**

O fenômeno doloroso é uma das mais importantes e complexas experiências humanas, apresentando características individuais, idiossincrásicas e aspectos ligados à cultura individual.

O Comitê de Taxonomia da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP – International Association for the Study of Pain) conceitua dor como “uma experiência, sensorial ou emocional, desagradável associada à lesão tecidual real ou potencial” (Merskey, 1979).

## **1.2 Modulação espinhal da dor**

Aferentes nociceptivos primários, representados pelas fibras A delta ( $A\delta$ ) mielinizadas e C não mielinizadas, são fibras sensoriais de baixo limiar para excitabilidade que se projetam da periferia para o corno posterior da medula espinhal (CPME) onde ativam grande número de neurônios internúcleares de segunda ordem e neurônios de projeção da medula. As fibras C terminam nas lâminas I, II e V do CPME, enquanto as fibras  $A\delta$  terminam nas lâminas I, II, V e X (Byers e Bonica, 2001).

Há evidências de que a passagem de informações nociceptivas pelo CPME seguindo para níveis rostrais do sistema nervoso central (SNC) sofre profundas influências excitatórias e inibitórias. A elucidação da farmacologia destes sistemas

modulatórios tem orientado para apreciação da habilidade de receptores específicos (Budai, 2000).

Neurotransmissores, aminoácidos e neuropeptídeos são liberados pelos terminais dos aferentes primários no CPME, onde atuam na modulação da transmissão nociceptiva. Entre outros se destacam os aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato, os neurotransmissores e neuropeptídeos, incluindo as taquicininas substância P (SP), neurocinina A (NKA), neurocinina B (NKB), peptídeo gene relacionado à calcitonina (CGRP), colecistocinina (CCK), somatostatina, óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PG), galanina, encefalinas e endorfinas (Carvalho e Lemônica, 1998; Terman e Bonica, 2001).

Neurônios de faixa ampla e dinâmica do CPME exercem um mecanismo de grande importância na fisiopatologia da dor conhecido como sensibilização central, que reflete uma potenciação dependente da frequência de suas respostas à repetida estimulação das fibras aferentes C. A somação temporal de estímulos induzidos por aferente nociceptivo C leva a uma sensibilização central dos neurônios nociceptivos do CPME que se manifesta por redução do limiar de estimulação, elevação na frequência de descargas espontâneas destes neurônios, recrutamento de outros circuitos sinápticos resultando em expansão de seu campo receptivo e exagerada resposta a estímulos somatosensoriais, mecânicos e térmicos podendo se manifestar no paciente como alodínia e hiperalgesia. Dois mediadores, liberados pelos terminais das fibras aferentes C na medula, que se destacam no fenômeno da sensibilização central são o glutamato que atua sobre os receptores NMDA (N-Metil-D-Aspartato) e a SP que atua nos receptores NK-1. Assim, o bloqueio de potenciais lentos na medula, por antagonistas dos receptores

NMDA ou de antagonistas dos receptores de neurocinina, previne o fenômeno da sensibilização central (Coderre e Melzack, 1992).

A somatostatina, presente em pequenas células do gânglio da raiz dorsal e terminais de aferentes nas lâminas I e II da medula espinhal, têm sua liberação incrementada após estimulação térmica nóxica resultando em hiperpolarização neuronal e redução da estimulação espontânea, o que sugere efeito inibitório no corno dorsal. Não obstante, a administração por via subaracnóidea pode desenvolver disfunção motora e paralisia, efeitos não observados com os análogos sintéticos octreotida e vapreotida (Rang e Urban, 1995).

A CCK é encontrada em diversos aferentes das lâminas I e II da medula espinhal e sua administração por via subaracnóidea antagoniza os efeitos analgésicos dos opióides através dos receptores mu ( $\mu$ ), o que sugere interação com o sistema opióide endógeno, inibindo-o (Rang e Urban, 1995).

Embora o papel do NO na nocicepção não esteja totalmente esclarecido, a estimulação de receptores NMDA e de receptores colinérgicos muscarínicos ativa a NO sintase (NOS) com conseqüente liberação de NO que promoverá aumento dos níveis de guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) intracelular resultando em hiperalgesia térmica. Assim, a administração intratecal de L-NAME, um inibidor da NOS ou a inibição da guanilato ciclase pelo azul de metileno atenuam a hiperalgesia térmica mediada pelos receptores NMDA (Budai, 2000).

Após sofrer as influências da modulação do CPME alguns impulsos nociceptivos passam diretamente ou através de interneurônios para as células do corno anterior e anterolateral onde estimulam neurônios somatomotores e pré-

ganglionares simpáticos, provocando resposta nociceptiva segmentar autonômica reflexa. Outros impulsos nociceptivos são transmitidos para neurônios que fazem sinapse com neurônios do trato espinotalâmico e outros sistemas ascendentes que convergem para o tronco encefálico e estruturas supraespinhais onde promovem respostas reflexas suprassgmentares e corticais (Byers e Bonica, 2001).

### **1.3 Naloxona**

A naloxona, um congenero da oximorfona que difere estruturalmente desta pela substituição do grupo metila ligado ao átomo de nitrogênio por um grupo alila, foi o primeiro antagonista do receptor opiáceo amplamente utilizado em pesquisas e na prática clínica. Por muitos anos foi considerada antagonista puro, cujos efeitos mediados exclusivamente pela interação com o receptor  $\mu$ -opiáceo. Como consequência dessa crença, muitos efeitos biológicos foram rotulados como opiáceo ou não opiáceo de acordo com sua reversão pela naloxona (Watkins e Mayer, 1982).

Entretanto, com a descoberta de substâncias semelhantes aos opiáceos no SNC e em outros tecidos, envolvidas com fenômenos fisiológicos, outras possibilidades terapêuticas têm sido sugeridas à naloxona. Entre estas possibilidades, além do tratamento da depressão respiratória está o tratamento do estado de choque séptico e hipovolêmico, de injúria da medula espinhal, overdose de drogas, parada cardíaca e, inúmeras outras condições patológicas tais como



esquizofrenia, psicose orgânica, discinesia tardia, constipação idiopática, fogachos do climatério, etc (Milne e Jhamandas, 1984).

Estudos também sugerem efeito analgésico da naloxona, em animais, após tratamento agudo e crônico (Bianchi e Panerai, 1993; Walker et al., 1991). Estes efeitos benéficos observados com a utilização de naloxona, em uma variedade de estados fisiopatológicos, são baseados na premissa de que existe atividade do sistema opiodérgico em cada um deles (Milne e Jhamandas, 1984).

#### **1.4 Metissergida**

A metissergida, butanolamida do ácido 1-metil-d-lisérgico, é um congênere da metilergonovina que apresenta ação antagonista não específica dos receptores da serotonina. Entre os efeitos produzidos estão a inibição da liberação de histamina pelos mastócitos, efeito profilático sobre a migrânea atuando nos receptores 5-HT<sub>2B</sub>, inibindo a liberação de neuropeptídeos inflamatórios como a substância P e o peptídeo gene relacionado a calcitonina nos aferentes sensoriais do trigêmio (Johnson et al., 2003). Vem sendo utilizada para o tratamento da várias condições mediadas pela ação da serotonina, tais como a profilaxia da enxaqueca e de outras cefaléias vasculares, tratamento de diarréia e da má absorção em pacientes com tumores carcinóides e em diversos estudos animais sobre a modulação serotoninérgica da dor (Mochizucki, 2004).

#### **1.5 Fentolamina**

A fentolamina é um antagonista alfa-adrenérgico competitivo pertencente ao grupo imidazolina, não seletivo, com eficácia semelhante sobre os receptores alfa1 ( $\alpha_1$ ) e alfa 2 ( $\alpha_2$ ). A fentolamina pode também bloquear receptores 5-HT, canais de potássio ( $K^+$ ) e causar liberação de histamina pelos mastócitos (Mc Pherson, 1993). Sua utilização clínica atual se restringe ao manejo perioperatório da hipertensão associada ao feocromocitoma e também para reversão dos efeitos deletérios secundários ao extravasamento de fármacos alfa-agonistas, tais como norrenalina e dopamina, em tecidos orgânicos. Os efeitos adversos que mais comumente ocorrem são hipotensão arterial e taquicardia secundária ao bloqueio da ativação de baroreceptores e ao bloqueio alfa-2 pré-sináptico, resultando em inibição da liberação de noradrenalina (Subhani et al., 2001).

## **1.6 Modelos animais para estudo da dor**

Para o estudo da dor em animais são observadas alterações fisiológicas e motoras que se aproximam dos comportamentos de vocalização e fuga que ocorrem no ser humano. No estudo da dor aguda, são descritos três tipos de testes comportamentais: a) reflexos simples de retirada; b) comportamentos intencionais, voluntários complexos e; c) modelos de lesão tecidual (Dubner, 1995).

Reflexos simples de retirada são baseados em estímulos físicos de alta intensidade com experiência nociceptiva de curta duração produzindo comportamento doloroso também de curta duração, com possibilidade de não ativação dos mecanismos moduladores, além da hipótese de que a modulação da

dor tônica no sistema nervoso central ocorra de forma diferente à da dor física (Tjolsen et al., 1992).

Para dor aguda de duração mais prolongada, os modelos de lesão tecidual produzem respostas que mais se aproximam das condições da dor clínica em seres humanos, com lesão tecidual e reação inflamatória. São descritos vários modelos de lesão tecidual, como: a) injeção de carragenina em pata de rato (Noguchi et al., 1991; Buritova et al., 1995; Chapman et al., 1995, Honoré et al., 1996); b) injeção de adjuvante completo de Freund intraplantar ou intraarticular em ratos (Iadarola et al., 1988b; Przewlocka et al., 1992) e; c) injeção de formalina na pata de ratos (D'Armour e Smith, 1941; Dubuisson e Dennis, 1977). Os modelos com carragenina ou adjuvante completo de Freund produzem dor por tempo mais prolongado, enquanto a formalina produz padrões de respostas que duram aproximadamente 60 minutos. Nestes testes, as alterações são restritas ao local da administração, com ausência de sinais de doença ou de alterações sistêmicas (Iadarola et al., 1988a).

O teste de formalina vem sendo cada vez mais utilizado como modelo de nocicepção por produzir respostas que mais se aproximam das condições de dor clínica em seres humanos (Abbott, et al., 1995).

O teste consiste na injeção de solução diluída de formalina, na concentração entre 0,5 e 5,0%, no dorso da pata traseira de ratos produzindo resposta nociceptiva bifásica, consistindo em uma primeira fase durante os primeiros 5 minutos após a injeção e em uma segunda fase iniciando após o vigésimo minuto e se estendendo por 40 a 60 minutos. A primeira fase é interpretada como devido à ativação aguda dos nociceptores periféricos, enquanto

a segunda como resultante da resposta inflamatória aguda ou da sensibilização central. O período entre as duas fases da resposta nociceptiva é identificado como fase de inatividade, sobre a qual é atribuído o envolvimento de um mecanismo antinociceptivo central (Henry et al., 1999; Franklin e Abbott, 1993).

No teste de formalina clássico as observações para determinar respostas nociceptivas são classificadas em 4 categorias: 0 – postura indistinguível da pata contralateral; 1 – pequena ou nenhuma elevação da pata evitando colocar seu peso sobre a mesma; 2 – elevação da pata e nenhum contato com a superfície; 3 – lambedura, mordida ou tremor da pata. O tempo de duração da ocorrência de cada categoria também é medido. Este escore é proporcional à concentração de formalina administrada (Abbott et al., 1995).

Um adicional que pode ser útil durante a interfase do teste da formalina em ratos é a vocalização ultrassônica, refletindo um estado afetivo que acontece devido à ação de neurotransmissores envolvidos, entretanto merece maior atenção e avaliação para que seja válido (Oliveira e Barros, 2006).

Pela dificuldade para observação e associação de todos os escores, do tempo de ocorrência e da concentração de formalina, outras formas de avaliação têm sido utilizadas. A quantificação do número de elevações da pata, do animal em estudo, é um método simples e diretamente proporcional à concentração de formalina que tem sido utilizado em substituição ao teste convencional (Wheller-Aceto et al., 1990; Doak e Sawynok, 1997; Granados-Soto et al., 1997; Ashmawi et al., 2003; Sousa A et al., 2008).

## **OBJETIVO**

## **2 OBJETIVO**

A presente pesquisa tem como objetivo comparar os efeitos da naloxona, da metissergida e da fentolamina, administrados por via subaracnóidea, sobre as fases do teste da formalina modificado, em ratos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Animais utilizados**

Foram utilizados 35 ratos Wistar machos, pesando entre 220 e 300 gramas, fornecidos e mantidos no Biotério de Experimentação da Universidade de Taubaté (UNITAU), mantidos em número de três animais por compartimento, onde permaneceram, por pelo menos quinze dias antes do início do experimento, para adequada adaptação, tratados com ração balanceada comercial e água “ad libitum”, ciclo claro-escuro de doze horas e temperatura ambiente variando entre  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$  (19 a  $25^{\circ}\text{C}$ ).

Para realização dos procedimentos experimentais foram obedecidas Normas Éticas da IASP, que regula experimentos realizados em animais (Committee for Research and Ethical Issues of the IASP, 1983) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Experimentação Animal da UNITAU, nº 002/04 (Anexo A) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa CAPPesq do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, nº 040/05 (Anexo B). Todos os experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Fisiologia da UNITAU.

### **3.2 Métodos**

#### **3.2.1 Adaptação**



Antes do procedimento anestésico os animais foram individualmente colocados, por 15 minutos, em uma câmara de vidro de 25 x 25 x 25 cm, para ambientalização ao local de estudo. Atrás da câmara era colocado um espelho, para facilitar a visualização das elevações de patas, em todas as direções (figura 1).



Figura 1. Câmara para ambientalização e contagem do número de elevações da pata.

### **3.2.2 Procedimento anestésico e administração dos fármacos**

Para obter indução anestésica suave, os animais foram colocados em uma câmara de vidro transparente com medidas de 15 x 25 x 15 cm, dotada de cobertura transparente para possibilitar visualização do animal, e com orifício na parte anterior e posterior para permitir entrada e saída de oxigênio (O<sub>2</sub>), gases

anestésicos e gás carbônico respectivamente (figura 2). O agente halogenado utilizado na indução anestésica foi o halotano (Tanohalo®, Cristália, Itapira, Brasil), na concentração de 3,0% em fração inspirada de oxigênio ( $FiO_2$ ) de 1,0, administrado por vaporizador calibrado e mantido por três minutos, tempo necessário para que o animal apresentasse perda dos reflexos posturais e incapacidade de se deslocar na câmara. Neste momento o animal era retirado da câmara e posicionado com a cabeça embutida em uma máscara por onde era administrado halotano a 3% em oxigênio como na câmara, e com o abdome sobre um cilindro plástico (seringa de 50cc).

O cateter subaracnóideo foi introduzido usando uma modificação do método descrito por Yaksh e Rudy (1976), que introduz 8,5 cm de um cateter de polietileno (PE 10), no espaço subaracnóideo em sentido caudal, através de uma incisão na membrana atlanto-occipital. Neste estudo, para introdução do cateter, a região lombar foi depilada para posteriormente se proceder a incisão transversal na linha media no espaço intervertebral acima da penúltima vértebra lombar, através da qual foi realizada punção, com agulha 22G de Tuohy até o espaço subaracnóideo, identificado por movimentação reflexa da cauda, para passagem de cateter de teflon PE-10 de forma que excedesse em 1,0 cm o bisel da agulha, por onde os fármacos ou a solução fisiológica a 0,9% (solução salina) eram injetados, conforme o grupo a que pertencia o animal (figura 3). Anteriormente à sutura da pele com fio de nylon 4-0 (figura 4), o cateter foi fixado no subcutâneo para que ao final do experimento, após o sacrifício do animal com tiopental sódico, se procedesse à secção da coluna lombar e sua localização confirmada visualmente (figura 5).



Figura 2. Câmara para anestesia.



Figura 3. Punção subaracnóidea e cateterização do espaço.



Figura 4. Região dorsal do animal após a sutura da pele.

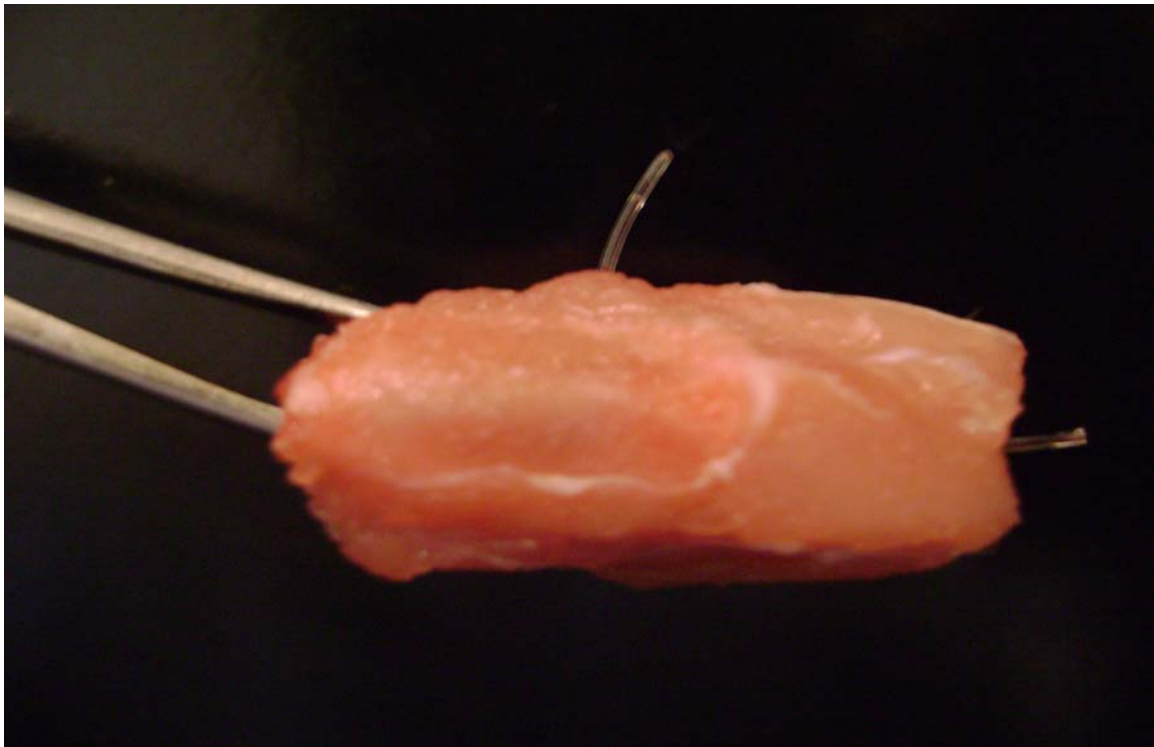


Figura 5. Confirmação da localização do cateter no espaço subaracnóideo.

### **3.2.3 Grupos experimentais**

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 5 grupos (n = 7). O volume da solução foi definido a partir de estudos prévios de Calejesan et al. (1998), a dose de metsergida foi definida a partir de estudos de Danzebrink e Gebhart. (1991) e Obata et al. (2001) e as doses de fentolamina e naloxona foram definidas a partir de estudos de Liu et al. (1999). Os fármacos foram adquiridos do laboratório Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO (USA). Os fármacos foram dissolvidos em solução salina e, utilizadas em período máximo de uma semana, após o preparo.

#### **3.2.3.1 Grupo controle com solução salina (GC)**

Cada animal recebeu, imediatamente após o procedimento anestésico (3 minutos), injeção de 10 µl de solução salina esteril por via subaracnóidea.

#### **3.2.3.2 Grupo fentolamina (GF)**

Cada animal recebeu, imediatamente após o procedimento anestésico, injeção de 10 µl de solução contendo 26 µg (82nmoles) de fentolamina (cloridrato) em solução salina estéril por via subaracnóidea.

#### **3.2.3.3 Grupo naloxona (GN)**

Cada animal recebeu, imediatamente após o procedimento anestésico, injeção de 10 µl (42nmoles) de solução contendo 17 µg de naloxona (cloridrato) em solução salina estéril por via subaracnóidea.

#### **3.2.3.4 Grupo metissergida (GM)**

Cada animal recebeu, imediatamente após o procedimento anestésico, injeção de 10 µl de solução contendo 30 µg (64nmoles) de metissergida (maleato) em solução salina estéril por via subaracnóidea.

#### **3.2.3.5 Grupo fentolamina associada a metissergida (GFM)**

Cada animal recebeu, imediatamente após o procedimento anestésico, injeção de 10 µl de solução contendo 26 µg (82nmoles) de fentolamina (cloridrato) associado a 30 µg (64nmoles) de metissergida (maleato) em solução salina estéril por via subaracnóidea.

#### **3.2.4 Indução da dor**

Foi realizada com administração de 50 µl de solução de formalina a 2%, na região dorsal da pata posterior direita (figura 6), 25 minutos após a administração dos fármacos ou da solução salina, de acordo com D` Armour e Smith (1941).





Figura 6. Injeção de formalina na região dorsal da pata direita traseira.

### **3.2.5 Respostas à injeção de formalina**

Todas as elevações da pata, não relacionadas à marcha foram consideradas, independente do tempo em que a mesma permanecia elevada.

A contagem foi realizada continuamente durante o período de 60 minutos, anotando o número parcial de elevações a cada 5 minutos em formulário próprio (Apêndice 1).

O teste foi dividido em três fases; fase I, intermediária e fase II, sendo que a fase I compreendeu o número de elevações da pata durante os primeiros 5 minutos, a fase intermediária compreendeu o número de elevações da pata do sexto ao vigésimo minuto e a fase II, compreendeu o número de elevações da pata do vigésimo primeiro ao sexagésimo minuto.

### **3.3 Análise estatística**

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada utilizando o programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), em sua versão 13.0, adotando o nível de significância de 5% (0,05), ou seja, quando o valor da significância calculada ( $p$ ) for menor do que 5% (0,05), observamos uma diferença dita 'estatisticamente significativa' e quando o valor da significância calculada ( $p$ ) for igual ou maior do que 5% (0,05) observamos uma diferença dita 'estatisticamente não-significante'.

Para verificar possíveis diferenças entre as três fases de observação, quando comparadas concomitantemente foi utilizado o Teste de Friedman. Ao encontrar diferenças estatisticamente significantes entre as fases, para os cinco grupos, foi aplicado o Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon, para identificar quais fases de observação diferenciam-se entre si, em cada grupo estudado.

Com o objetivo de verificar possíveis diferenças entre os cinco grupos, nas variáveis; idade, peso e número de elevações da pata nas fases I, intermediária e II, foi aplicado o Teste de Kruskal-Wallis. Existindo diferença estatisticamente significativa entre os grupos, foi aplicado o Teste de Mann-Whitney, para identificar quais grupos diferenciavam-se entre si.



## **RESULTADOS**

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Dados do peso e idade

Tabela 1. Medidas descritivas do dado paramétrico idade (dias) dos animais dos cinco grupos de estudo.

Animal	IDADE (dias)				
	GC	GF	GM	GN	GFM
01	150	150	144	145	149
02	150	151	145	151	149
03	150	143	152	151	151
04	151	158	152	158	152
05	158	158	165	165	158
06	158	165	166	144	158
07	165	171	166	166	165
<b>MÉDIA</b>	<b>154,6</b>	<b>156,6</b>	<b>155,7</b>	<b>154,3</b>	<b>154,6</b>

Tabela 2. Medidas descritivas do dado paramétrico peso (g) dos animais dos cinco grupos de estudo.

Animal	PESO (gramas)				
	GC	GF	GM	GN	GFM
01	254	251	237	251	237
02	260	238	242	238	253
03	244	255	257	248	243
04	252	270	264	245	254
05	248	247	249	254	259
06	260	259	267	280	267
07	278	287	284	279	295
<b>MÉDIA</b>	<b>256,6</b>	<b>258,1</b>	<b>257,1</b>	<b>256,4</b>	<b>258,3</b>

## 4.2 Número de elevações da pata durante o teste

### 4.2.1 Grupo controle (GC)

As medidas descritivas do número de elevações da pata, ao longo do tempo, dos animais de todos os grupos estão dispostas nas tabelas 1, 2, 3, 4 e 5 do Apêndice B e suas médias representadas nas figuras 7, 8, 9, 10 e 11.

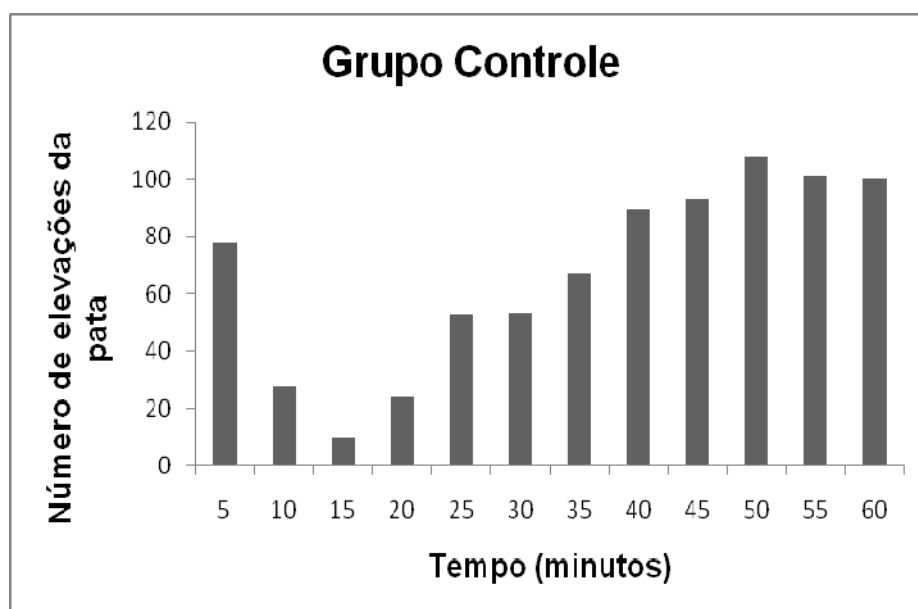


Figura 7. Médias do número de elevações da pata, ao longo do tempo, dos animais do grupo controle (GC).

#### 4.2.2 Grupo fentolamina (GF)

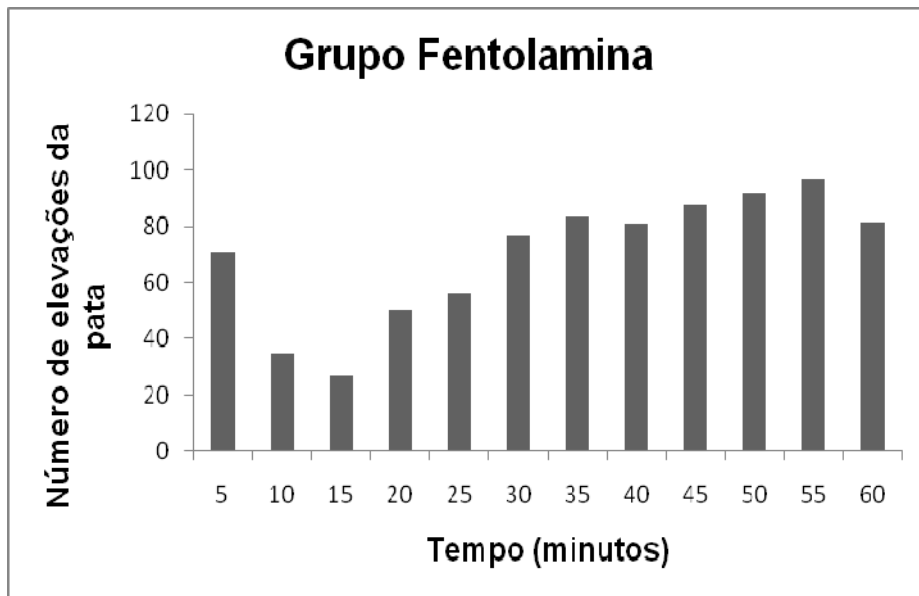


Figura 8. Médias do número de elevações da pata, ao longo do tempo, dos animais do grupo fentolamina (GF).

#### 4.2.3 Grupo naloxona (GN)

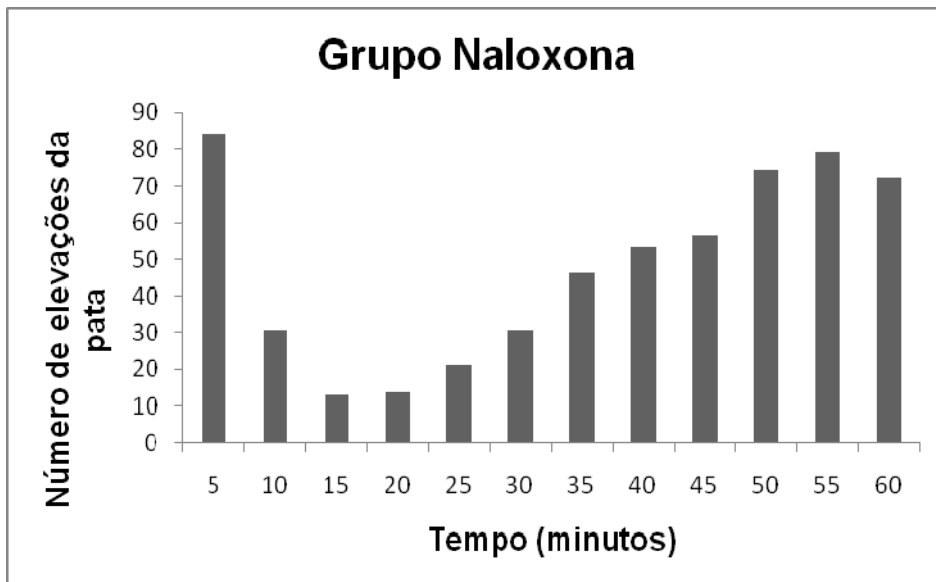


Figura 9. Médias do número de elevações da pata, ao longo do tempo, dos animais do grupo naloxona (GN).

#### 4.2.4 Grupo metissergida (GM)

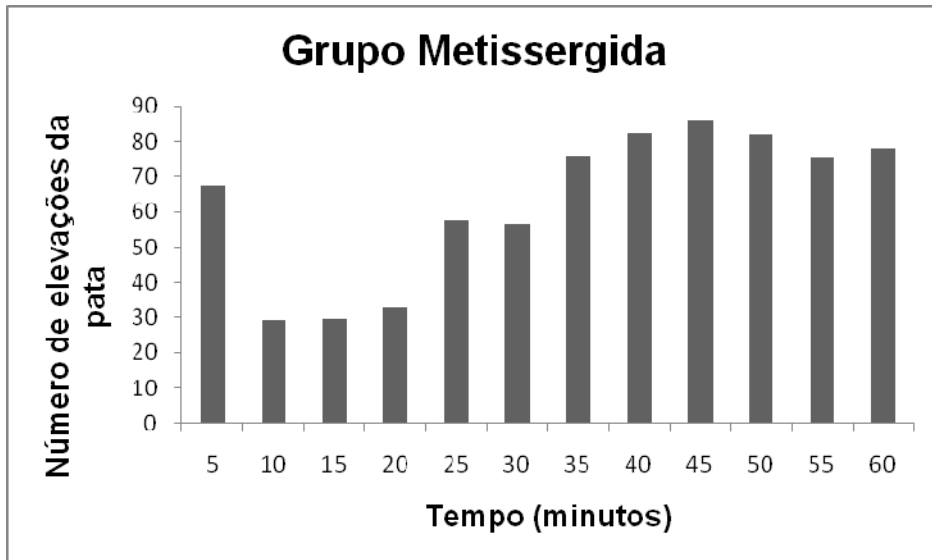


Figura 10. Médias do número de elevações da pata, ao longo do tempo, dos animais do grupo metissergida (GM).

#### 4.2.5 Grupo fentolamina associada à metissergida (GFM)

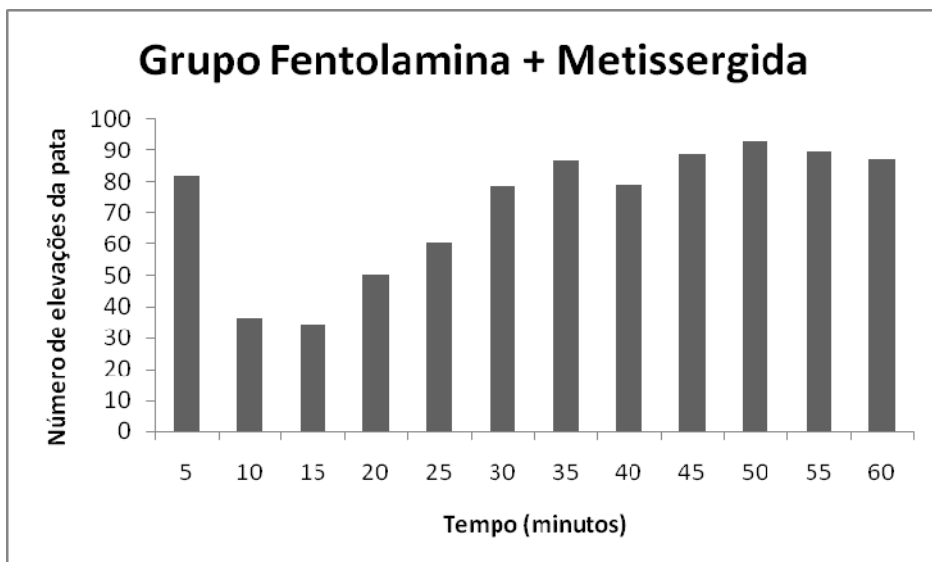


Figura 11. Médias do número de elevações da pata, ao longo do tempo, dos animais do grupo fentolamina associada a metissergida (GFM).

#### 4.2.6 Médias das elevações da pata em todos os grupos

Tabela 3. Médias do número de elevações da pata, ao longo do tempo, dos animais de todos os grupos estudados.

GRUPOS	TEMPO (minutos)											
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
GS	77,7	27,6	10,1	23,9	52,6	53,1	67,1	89,3	93,1	107,6	101,0	100,3
GF	70,4	34,7	26,6	50,3	55,9	76,7	83,4	81,0	87,3	91,6	97,0	81,3
GN	84,0	30,7	13,1	13,9	21,0	30,6	46,3	53,4	56,6	74,6	78,9	72,3
GM	67,4	29,3	29,6	32,9	57,6	56,3	75,9	82,4	85,6	81,9	75,7	78,1
GFM	82,1	36,3	34,6	50,4	60,3	79,0	87,0	79,1	88,6	93,1	89,6	87,3

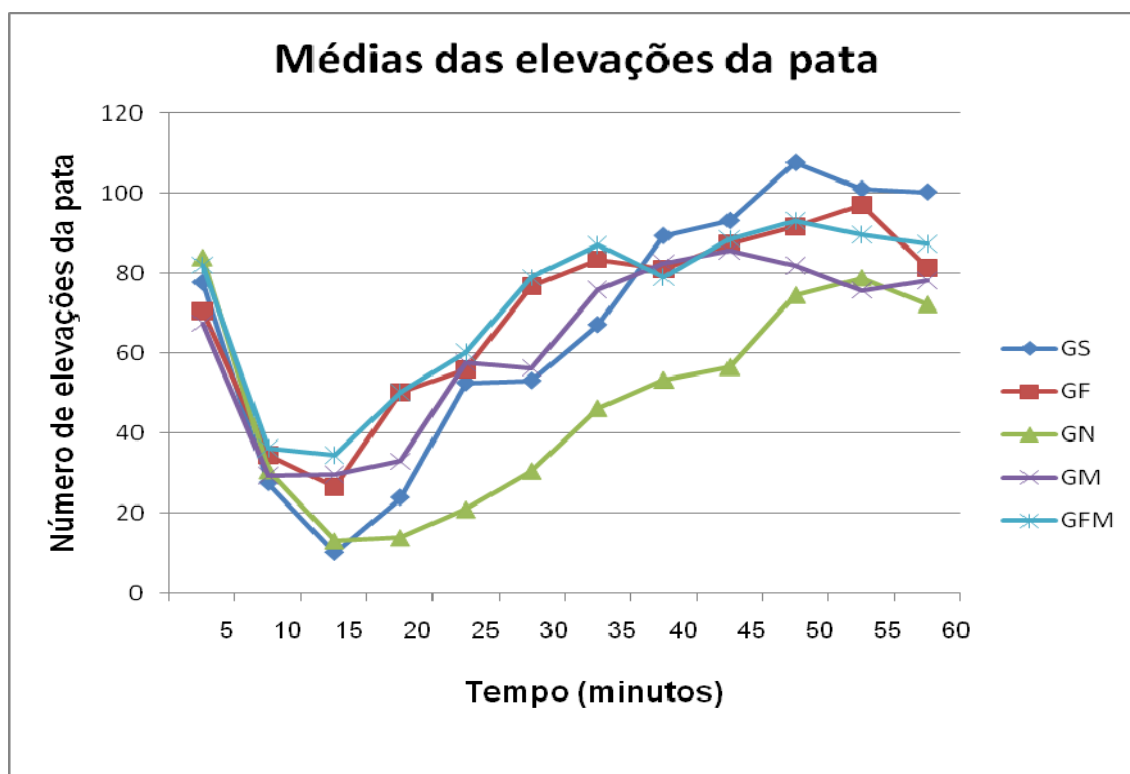


Figura 12. Médias do número de elevações da pata, ao longo do tempo, dos animais de todos os grupos estudados.

### 4.3 Análise estatística

Inicialmente foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis para comparar, entre os grupos, as variáveis: idade, peso, número de elevações da pata durante as fases: I, intermediária e II (tabelas 1, 2, 3, 4 e 5, Apêndice C).

Para as variáveis: peso, idade e “fase I” (figura 13), os grupos foram estatisticamente semelhantes. Para as variáveis “fase intermediária” e “fase II” foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre os cinco grupos (tabelas 4 e 5, Apêndice C) e aplicou-se o Teste de Mann-Whitney, para identificar quais grupos diferenciam-se entre si, quando comparados par a par (tabelas 1 e 2, Apêndice D), figuras 14, 15.

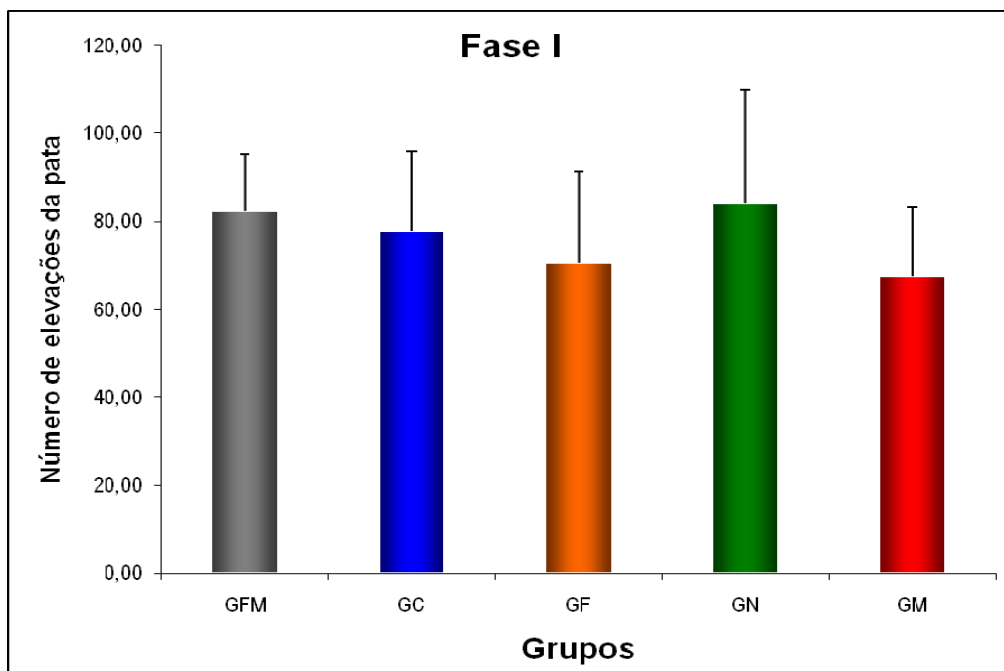


Figura 13. Médias e desvio padrão do número de elevações da pata, dos grupos, durante a fase I

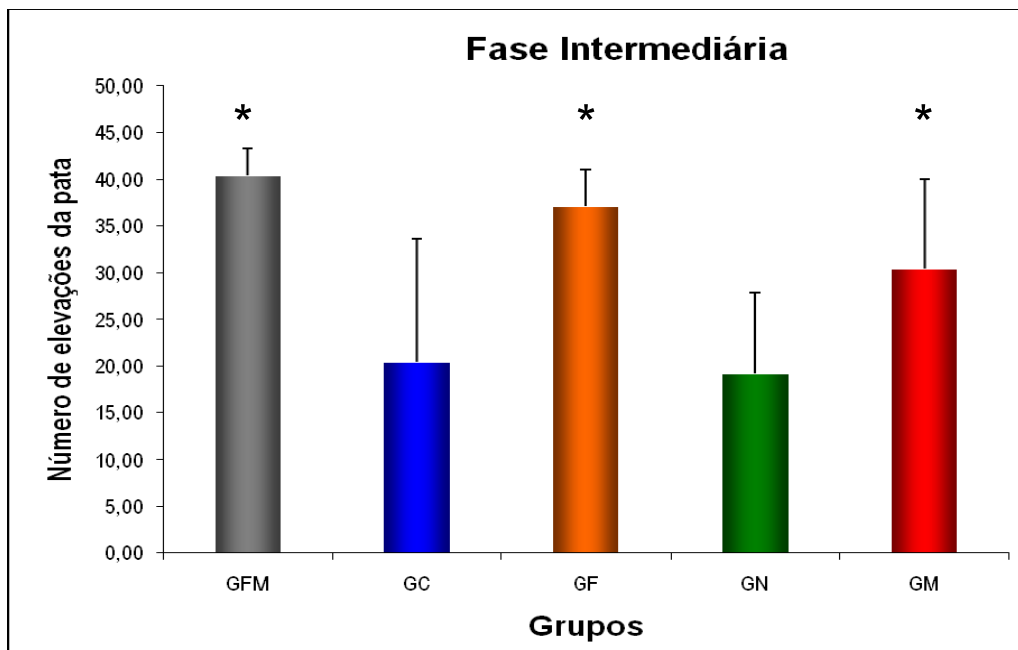


Figura 14. Médias e desvio padrão do número de elevações da pata, dos grupos, durante a fase intermediária

\* Diferença estatística significativa em comparação com o controle ( $p < 0,05$ )

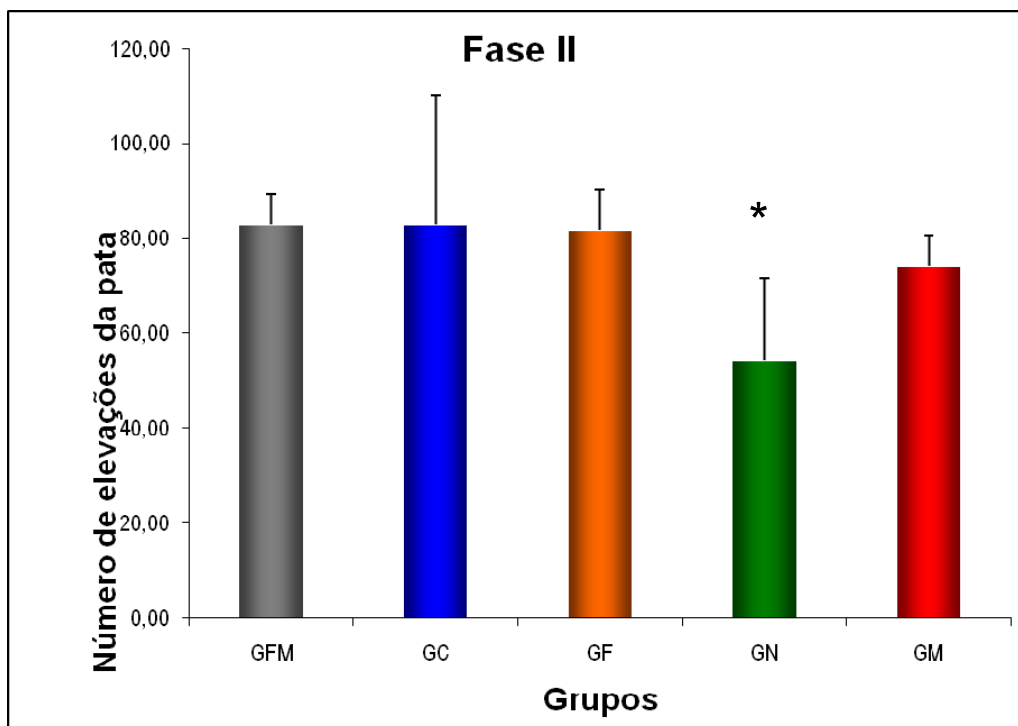


Figura 15. Médias e desvio padrão dos grupos durante a fase II

\* Diferença estatística significativa em comparação com o controle



Com objetivo de verificar possíveis diferenças entre as três fases de observação, quando comparadas concomitantemente, aplicou-se o Teste de Friedman (tabela 1, Apêndice E).

Como foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as três fases de observação, quando elas foram comparadas concomitantemente, para os cinco grupos, aplicou-se o Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon, com o intuito de identificar quais fases de observação diferenciavam-se entre si, em cada grupo estudado (tabela 1, Apêndice F).

Nos cinco grupos estudados, a fase intermediária diferenciava-se das outras duas, enquanto que, as fases I e II são estatisticamente semelhantes.

## **DISCUSSÃO**

## 5 DISCUSSÃO

O teste de formalina vem sendo cada vez mais utilizado como modelo de nocicepção em animais, pois produz respostas próximas das que ocorrem em seres humanos. O número de elevações da pata foi utilizado para a quantificação do comportamento doloroso induzido pela formalina por apresentar correlação importante com o teste da formalina clássico e com as alterações cardiovasculares em resposta à dor causada pela formalina na pata. Traz correlação confiável do comportamento doloroso em animais conscientes e não submetidos à restrição física e entre os vários comportamentos estereotipados no teste da formalina, a frequência de elevação da pata tem sido amplamente utilizada (Shibata et al., 1989; Wheeler-Aceto et al., 1991; Taylor et al., 1995; Doak e Sawinok, 1997; Parada et al., 2001; Ashmawi et al., 2003). Na literatura são encontradas várias doses de naloxona, fentolamina e metissergida utilizadas por via subaracnóidea, sendo as doses utilizadas nesse trabalho, similares as utilizadas por outros autores (Danzebrink e Gebhart, 1991; Liu et al., 1999, Obata et al., 2001).

O sistema, proposto como, inibitório descendente da dor consiste principalmente em quatro partes do SNC interligadas: a) sistemas corticais e diencefálicos; b) substância cinzenta periaquedutal (PAG) e periventricular ricas em encefalinas e receptores opióides; c) partes do bulbo rostroventral, especialmente o núcleo magno da rafe (NMR) e núcleos adjacentes que recebem impulsos excitatórios da PAG e que por sua vez enviam fibras serotoninérgicas e noradrenérgicas, via funículo dorsolateral, que se projetam para o corno dorsal da

medula e bulbo. As fibras do sistema inibitório descendente terminam principalmente nas lâminas I, II e V, onde inibem neurônios nociceptivos, incluindo interneurônios e tratos ascendentes que se projetam rostralmente incluindo o trato espinotalâmico, espinorreticular e espinomesencefálico. Outro importante grupo de fibras que tem sido incluído na formação do sistema endógeno de controle da dor são os neurônios noradrenérgicos originários no locus coeruleus e o sistema colinérgico central (Terman e Bonica, 2001; Vanegas e Shaible, 2004; Mason, 2005; D'Mello e Dickenson, 2008).

É notável que o número de neurotransmissores e de receptores inibitórios excede o de excitatórios no corno dorsal da medula espinhal e a transmissão das informações somatossensoriais do neurônio aferente primário para o neurônio secundário dependem de uma complexa interação entre a excitação e a inibição, que poderá ser mediada por vários neurotransmissores (Budai, 2000).

Franklin e Abbott (1993) verificaram que pentobarbital, diazepam e álcool inibiram a redução da nocicepção que ocorre na interfase do teste e afastaram a suposição do envolvimento de receptores GABA<sub>A</sub>. Por outro lado, em estudo eletrofisiológico, em ratos anestesiados com tiopental sódico e submetidos à secção medular, foi encontrado comportamento bifásico evidente, sugerindo que o controle da dor provocada pela formalina não é dependente de mecanismo gabaérgico e não requer neuroeixo intacto (Henry et al., 1999).

O envolvimento de opióides endógenos no sistema inibitório descendente foi estudado em modelo de inflamação por carragenina que mostrou aumento nos níveis de preproencefalina medular (Noguchi et al., 1992) entretanto, não foi encontrado aumento nos níveis de mRNA de preproencefalina medular após o uso

de formalina indicando especificidade de resposta para cada tipo de estímulo nóxico (Hunter et al., 1995).

No presente estudo, não encontramos aumento no número de elevações da pata na fase intermediária após o uso de naloxona intratecal, dando subsídios a não participação de vias opioidérgicas descendentes inibitórias na analgesia temporária que ocorre na fase intermediária do teste da formalina, em conformidade ao estudo que não mostrou aumento da preproencefalina medular após uso de formalina na pata (Hunter et al., 1995). Por outro lado, encontramos aumento no número de elevações da pata durante a fase intermediária nos grupos fentolamina, metisergida e fentolamina associada à metisergida, indicando o envolvimento de vias serotoninérgicas e noradrenérgicas no sistema inibitório descendente da dor.

Esperávamos encontrar um efeito aditivo ou potencializador sobre o número de elevações da pata com a utilização da associação dos antagonistas serotoninérgico e noradrenérgico, entretanto, não observamos um aumento maior no número de elevações da pata do que quando os antagonistas foram utilizados isoladamente. O uso de doses logaritmicamente menores poderia evidenciar melhor esse efeito dos antagonistas serotoninérgico e noradrenérgico, fentolamina e metisergida, bem como da sua associação na inibição da atividade inibitória descendente serotoninérgica e noradrenérgica, pois os dados desta pesquisa permitem inferir que apesar de terem sido usadas doses já avaliadas por outros autores (Mason, 2005; Danzebrink e Gebhart, 1991; Obata et al., 2000), as mesmas podem ter sido elevadas para permitir elucidar aspectos controversos da atividade inibitória descendente serotoninérgica e noradrenérgica.

Em conformidade aos resultados obtidos neste estudo, o envolvimento da serotonina (5-HT) na modulação descendente da dor, reduzindo a analgesia após estimulação central, foi demonstrado pela inibição de sua síntese por p-chlorophenylalanina, da lesão eletrolítica do núcleo magno da rafe e do emprego de 5,6 dihydroxytryptamina, uma neurotoxina serotoninérgica (Basbaum, 1981). O papel inibitório de vias serotoninérgicas e noradrenérgicas também foi evidenciado no modelo de retirada da cauda, onde metissergida, fentolamina e ioimbina induziram a um aumento da corrente elétrica de estimulação do núcleo reticular lateral para ativação do sistema descendente inibitório (Gebhart e Ossipov, 1986).

No presente estudo, a metissergida, um antagonista não seletivo dos receptores de 5-HT, e a fentolamina, um antagonista adrenoceptor não seletivo se mostraram eficazes em inibir o efeito modulador espinal da dor, sugerindo efeito noradrenérgico e serotoninérgico inibitório da transmissão nociceptiva espinal, sem haver efeito somatório ou potencializador quando utilizados em conjunto. Entretanto, estes efeitos não foram observados com a naloxona, e assim um efeito opióide modulador espinal, na interfase do teste não ficou estabelecido.

Durante a fase II do teste da formalina, a naloxona causou redução da resposta nociceptiva à formalina, contrastando com os estudos de Ossipov et al. (1996) que utilizaram naloxona por via intraperitoneal na dose de  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$ , mas em conformidade com os estudos de Vaccarino, et al. (1988) que encontrou que a naloxona, por via sistêmica, na dose de  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  potencializou a analgesia induzida pela morfina e em baixas doses ( $0,1$  a  $0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) atenuou a analgesia produzida pela morfina. Bianchi e Panerai (1992) demonstraram resposta analgésica da naloxona na dose de  $30 \text{ mg.kg}^{-1}$ , no teste da placa quente, efeito

este bloqueado pelo antagonista do receptor  $\kappa$ -opiáceo, MR 1452 e modulado pelo agonista do receptor  $\kappa$ -opiáceo U 50-488, sugerindo envolvimento dos receptores  $\kappa$ -opiáceos na analgesia induzida pela naloxona. Estes achados confirmam o nosso achado, no qual a naloxona foi injetada no espaço subaracnóideo, próximo à medula espinhal, local onde há o predomínio dos receptores  $\kappa$ -opiáceos.

Os resultados obtidos corroboram a hipótese de que a naloxona exerça atividade sobre os receptores  $\kappa$ -opiáceos e à possibilidade de utilização de agonistas serotoninérgicos, noradrenérgicos e da naloxona para abordagem da dor.

## **CONCLUSÕES**



## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram inferir que:

1) A fentolamina e a metissergida modificaram a fase intermediária do teste da formalina modificado, sugerindo modulação noradrenérgica e serotoninérgica inibitória da transmissão nociceptiva espinhal, sem haver efeito somatório ou potencializador quando utilizadas em conjunto.

2) A naloxona não interferiu na fase intermediária do teste de formalina modificado, sugerindo não haver efeito opióide sobre a modulação espinhal.

3) A naloxona reduziu a resposta nociceptiva da fase II fase do teste de formalina modificado, sugerindo haver efeito opióide sobre a modulação espinhal.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott FV, Franklin KBJ, Westbrook RF. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain**. 1995;60:91-102.

Ashmawi HA, Chambergo FS, Palmeira CCA, Posso IP. The effects of pirilamine and cimetidine and nociceptive flinching behavior in rats. **Anesth Analg**. 2003;97:541-46.

Basbaum, AI. Descending control of pain transmission: possible serotonergic-enkephalinergic interactions. **Adv Exp Med Biol**. 1981;133:177-89.

Bianchi A, Panerai AE. Naloxone-induced analgesia: involvement of  $\kappa$ -opiate receptors. **Pharm Biochem Behav**. 1993;46:145-48.

Budai D. Neurotransmitters and receptors in the dorsal horn of the spinal cord. **Acta Biol Szeged**. 2000;44:21-38.

Buritova J, Honoré P, Chapman V, Besson. Concurrent reduction of inflammation and spinal Fos-like neurons by systemic diclofenac in the rat. **Neuroscience**. 1995;188:175-78.

Byers M, Bonica JJ. Peripheral pain mechanisms and nociceptor plasticity in: **Bonica's – Management of Pain**. 3<sup>th</sup> Ed., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 2001;26-72.

Calejesan AA, Chang HC, Zhuo M. Spinal serotonergic receptors mediate of a nociceptive reflex by subcutaneous formalin injection into hindpaw in rats. **Brain Res**. 1998;798:46-54.

Carvalho WA, Lemônica L. Mecanismos centrais de transmissão e de modulação da dor. Atualização terapêutica. **Rev Bras Anesthesiol**. 1998;48:221-41.

Chapman V, Buritova J, Honoré P, Besson JM. 7-Nitroindazole, a selective inhibitor of neuronal nitric oxide synthetase, reduces formalin evoked c-fos expression in dorsal horn neurons of the rat spinal cord. **Brain Res**. 1995;697:258-61.

Coderre TJ, Melzack R. The contribution of excitatory aminoacid to central sensibilization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. **J Neurosci**. 1992;12:3665-70.

Danzebrink RM, Gebhart GF. Evidence that spinal 5-HT1, 5-HT2 and 5-HT3 receptor subtypes modulate responses to noxious colorectal distension in the rat. **Brain Res**. 1991;538:64-75.

D'Armour FE, Smith D. A method for determining loss of pain sensation. **J Pharmacol Exp Ther.** 1941;72:74-9.

D'Mello R, Dickenson AH. Spinal cord mechanisms of pain. **Br J Anaesth.** 2008;101:8-16.

Doak GJ, Sawynok J. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. **Neuroscience.** 1997;3:939-49.

Dubner R. Methods of assessing pain in animals, in: Wall PD, Melzack R. **Textbook of Pain.** London, Churchill-Livingstone. 1995;293-302.

Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: A quantitative study of analgesic effects of morphine, meperidina, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain.** 1977;4:161-74.

Franklin KBJ, Abbott FV. Pentobarbital, diazepam and ethanol abolish the interphase diminution of pain in the formalin test: evidence for pain modulation by GABA<sub>A</sub> receptors. **Pharmacol Biochem Behav.** 1993;46:661-6.

Gebhart GF, Ossipov MH. Characterization of inhibition of the spinal nociceptive Tail-Flick Reflex in the rat from the medullary lateral reticular nucleus. **Neuroscience.** 1986;6:701-13.

Granados-Soto V, Rufino MO, Lopes LDG, Ferreira SH. Evidence for the involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. **Eur J Pharmacol.** 1997;340:177-80.

Henry JL, Yashpal K, Pitcher GM, Coderre TJ. Physiological evidence that the “interfase” in the formalin test is due to active inhibition. **Pain.** 1999;82:57-63.

Honoré P, Buritova J, Besson JM. Intraplantar morphine depresses spinal c-fos expression induced by carragenin inflammation but not by noxious heat. **Br J Pharmacol.** 1996;118:671-80.

Hunter JC, Woodburn VL, Durieux C, Petterson EKE, Poat JÁ, Hughes J. C-fos antisense oligodeoxynucleotide increases formalin induced nociception and regulates preprodynorphin expression. **Neuroscience.** 1995;65:485-92.

Iadarola MJ, Brady LS, Draisci G, Dubner R. Enhancement of dynorphin gene expression in spinal cord following experimental inflammation: stimulus specificity, behavioral parameters and opioid receptor binding. **Pain.** 1988a;35:313-26.

Iadarola MJ, Douglass J, Civelli O, Naranjo JR. Differential effects activation of spinal cord dynorphin and enkephalin neurons during hyperalgesia: evidence using cDNA hybridization. **Brain Res.** 1988b;455:205-12.

Johnson KW, Nelson DL, Dieckman DK, Wainscott DB, Lucaites VL, Audia JE, Owton WM, Phebus LA. Neurogenic dural protein extravasation induced by meta-chlorophenylpiperazine (C-CPP) involves nitric oxide and 5-HT<sub>2B</sub> receptor activation. **Cephalalgia**. 2003;23:117-23.

Liu RJ, Zhang RX, Qiao JT, Dafny Nachum. Interrelations of opióides with monoaminas in descending inhibition of nociceptive transmission at the spinal level: an immunocytochemical study. **Brain Res**. 1999;830:183-90.

Mason P. Deconstructing endogenous pain modulation. **J Neurophysiol**. 2005;94:1659-63.

Mc Pherson GA. Currente trends in the study of potassium Channel openers. **Gen Pharmacol**. 1993;24:275-81.

Merskey H. (Chairman). Pain therms: a list with definition and note on usage. Recommended by the IASP subcommittee on taxonomy. **Pain**. 1979;6:249-52.

Milne B, Jhamandas K. Naloxone: new therapeutic roles. **Can Anaesth Soc J**. 1984;31:272-8.

Mochizucki D. Serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors in animal models of pain. **Hum Psychopharmacol Clin Exp**. 2004;19:S15-19.

Noguchi K, Kowalski K, Traub R, Solodkin A, Iadarola M, Ruda MA. Dynorphin expression and Fos-like immunoreactivity following inflammation induced hyperalgesia are co-localized in spinal cord neurons. **Mol Brain Res**. 1991;10:227-33.

Obata H, Saito S, Sasaki M, Ishizaki K, Fumio G. Antiallodynic effect of intrathecaly administered 5-HT<sub>2</sub> agonists in rats with nerve ligation. **Pain**. 2001;90:173-79.

Oliveira AR, Barros HMT. Ultrasonic rat vocalizations during the formalin test: A measure of the affective dimension of pain? **Anesth Analg**. 2006;102:832-39.

Ossipov MH, Kovelowski CJ, Wheeler-Aceto H, Cowan A, Hunter JC, Lai J, Malan TP, Porreca F. Opioid antagonists and antisera to endogenous opioids increase the nociceptive response to formalin: demonstration of an opioid kappa and delta inhibitory tone. **J Pharm Exp Ther**. 1996;277:784-8.

Parada CA, Tambeli CH, Cunha FQ, Ferreira SH. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**. 2001;102:937-44.

Przewlocka B, Lason W, Przewlocka R. Time dependent changes in the activity of opioid systems in the spinal cord of mono arthritic rats – a release and in situ hybridization study. **Neuroscience**. 1992;46:209-12.



Rang H, Urban L. New molecules in analgesia. **Br J Anaesth**. 1995;75:145-56.

Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic bifasic pain response. **Pain**. 1989;38:347-52.

Subhani M, Sridhar S, DeCristofaro JD. Phentolamine use in neonate for the prevention of dermal necrosis caused by dopamine: case report. **J Perinatol**. 2001;21:324-6.

Sousa A, Franco PAB, Ashmawi HA, Posso IP. Efeito analgésico local do tramadol em modelo de dor provocada por formalina em ratos. **Rev Bras Anesthesiol**. 2008;58:375-9.

Taylor BK, Peterson MA, Basbaum AI. Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. **J Neuroscience**. 1995;15:7575-84.

Terman GW, Bonica JJ. Spinal mechanisms and their modulation in: **Bonica's – Management of Pain**. 3<sup>th</sup> Ed., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 2001;73-152.

Tjolsen A, Berge OG, Hunskar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**. 1992;51:5-17.

Vaccarino AL, Tasker RAR, Melzack R. Analgesia produced by normal doses of opioid antagonists alone and in combination with morphine. **Pain**. 1989;36:103-9.

Vanegas H, Schaible HG. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Res Rev**. 2004;46:295-309.

Walker KMJ, Poulos CX, Cappel H. Chronic selective blockade of  $\mu$  opioid receptors produces analgesia and augmentation of the effects of a  $\kappa$  agonist. **Brain Res**. 1991;538:181-6.

Watkins LR, Mayer DJ. Organization of endogenous opiate and non opiate pain control system. **Science**. 1982;246:1185-92.

Wheeler-Aceto H, Porreca F, Cowan A. The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. **Pain**. 1990;40:229-38.

Yaksh T, Rudy TA. Chronic catheterization of spinal subarachnoid space. **Physiol Behav**. 1976;192:1031-36.

**ANEXOS**

## 8 ANEXOS

### 8.1 Anexo A

Ofício do Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade de Taubaté nº 002 de 06 de agosto de 2004.

	<b>UNIVERSIDADE TAUBATÉ</b>
	Autarquia Municipal de Regime Especial Reconhecida pelo Dec. Fed. Nº 78.924/76 Recredenciada pela Portaria CEE/GP nº 30/03
	<b>COMITÊ DE ÉTICA PARA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL</b> Avenida Tiradentes, 500 - centro - CEP 12030-180 - Taubaté - SP - Brasil Tel. (12) 229-7909

**DECLARAÇÃO**

Registro CEEA/UNITAU nº 002/2004 (esse nº de registro deverá ser citado pelo pesquisador nas correspondências referentes a este projeto).

Projeto de Pesquisa: *Efeitos dos antagonistas de opióides de serotonina e de noradrenalina (naloxona, metisergida e fentolamina) sobre o teste de formalina modificado, em ratos.*

Pesquisador(a) Responsável: Oscar César Pires

Apresentar relatório final ao término da pesquisa: 2005

O Comitê de Ética para Experimentação Animal, em reunião de 30/07/2004 e no uso das competências definidas na Deliberação CONSEP Nº 362/2003, considerou o Projeto acima **aprovado**.

Taubaté, 06 de agosto de 2004

  
Prof. Dr. Claudemir de Carvalho  
Coordenador do Comitê de Ética para Experimentação Animal  
Universidade de Taubaté





2º Tabelião de Notas e de Protesto de Letras e Títulos de Taubaté - SP  
Pça. Mons. Silva Barros, 41 - Centro - Taubaté - Cep 12030-070 - Taubaté - SP  
Tabelião: Lilla Campos

-----> AUTENTICACAO <----->  
Autentico o anverso da presente copia reprografica extraída das notas, a qual confere com o original, do que dou fe.  
Taubaté, 10 de agosto de 2004  
VALERIA CARINI S GONCALVES SILVA-ESCREVENTE  
Custas por Verba R\$ \*\*\*\*1,20  
VALIDA SOMENTE PARA UM DOCUMENTO E COM O SELO DE AUTENTICIDADE

## 8.2 Anexo B

Ofício da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da CAPPesq – Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade de Taubaté nº 002 de 06 de agosto de 2004.



AO

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 02.02.05 tomou conhecimento da execução do Protocolo de Pesquisa nº **040/05** - intitulado "Efeitos dos antagonistas de opióide (Naloxona), Serotonina (Metisergida) e Noradrenalina (Fentolamina) por via intratecal sobre o teste de formalina modificado em ratos".

No que tange a sua parte empírica, será desenvolvido na Universidade Taubaté, tendo seu Comitê de Ética para Experimentação Animal aprovado o protocolo em 30.07.04.

Pesquisadores Responsáveis: Prof. Dr. Irimar de Paula Posso

Prof. Dr. Hazem Adel Ashmawi

Pesquisador(a) Executante: Dr. Oscar César Pires

CAPPesq, 10 de Fevereiro de 2005.

  
PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO  
Presidente da Comissão Ética para Análise  
de Projetos de Pesquisa

## **APÊNDICES**

## 9 APÊNDICES

### 9.1 Apêndice A

Formulário para registro dos dados durante o experimento.

**Grupo: .....**; **N° .....** ; **Data: ...../.....** ; **Idade: ..... dias**; **Peso: ....g.**

	HORA INÍCIO	TEMPO (minutos)	N° de ELEVAÇÕES da PATA
Adaptação:		15	
Anestesia		03	
Injeção intratecal		01	
Despertar		26	
Injeção de formalina			
Observação		05	
Observação		10	
Observação		15	
Observação		20	
Observação		25	
Observação		30	
Observação		35	
Observação		40	
Observação		45	
Observação		50	
Observação		55	
Observação		60	

Observações:.....  
.....

## 9.2 Apêndice B

Tabela 1. Medidas descritivas do número de elevações da pata, ao longo do tempo, dos animais do grupo controle com solução salina (GC).

ANIMAL	TEMPO (minutos)											
	05	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
01	62	08	01	22	104	123	104	103	103	120	157	132
02	68	45	05	25	56	47	79	83	106	110	82	80
03	109	42	36	66	120	60	69	132	132	160	112	131
04	87	39	04	03	09	12	29	46	66	78	49	66
05	68	19	03	11	22	28	43	73	83	68	71	85
06	60	18	17	20	33	59	107	94	60	106	124	114
07	90	22	05	20	24	43	39	94	102	111	112	94
<b>MÉDIAS</b>	<b>77,7</b>	<b>27,6</b>	<b>10,1</b>	<b>23,9</b>	<b>52,6</b>	<b>53,1</b>	<b>67,1</b>	<b>89,3</b>	<b>93,1</b>	<b>107,6</b>	<b>101,0</b>	<b>100,3</b>

Tabela 2. Medidas descritivas do número de elevações da pata, ao longo do tempo, dos animais do grupo fentolamina (GF).

ANIMAL	TEMPO (minutos)											
	05	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
01	60	33	23	46	45	67	51	93	88	105	83	60
02	33	22	23	48	78	87	106	99	80	82	95	102
03	75	48	31	34	37	85	86	82	83	100	111	101
04	99	32	28	53	54	82	98	73	102	90	104	86
05	68	30	33	47	46	64	68	42	76	79	110	113
06	87	48	22	56	60	79	97	96	108	112	98	73
07	71	30	26	68	71	73	78	82	74	73	78	34
<b>MÉDIA</b>	<b>70,4</b>	<b>34,7</b>	<b>26,6</b>	<b>50,3</b>	<b>55,9</b>	<b>76,7</b>	<b>83,4</b>	<b>81,0</b>	<b>87,3</b>	<b>91,6</b>	<b>97,0</b>	<b>81,3</b>

Tabela 3. Medidas descritivas para o número de elevações da pata, ao longo do tempo, dos animais do grupo naloxona (GN).

ANIMAL	TEMPO (minutos)											
	05	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
01	37	19	08	08	13	26	42	71	95	105	140	77
02	92	50	07	06	18	44	81	108	74	69	79	89
03	117	25	26	15	07	28	33	35	35	52	60	40
04	72	15	17	31	34	28	29	41	56	85	81	74
05	90	53	12	06	04	15	16	12	15	49	37	58
06	76	06	03	04	31	40	72	51	45	63	77	79
07	104	47	19	27	40	33	51	56	76	99	78	89
<b>MÉDIA</b>	<b>84,0</b>	<b>30,7</b>	<b>13,1</b>	<b>13,9</b>	<b>21,0</b>	<b>30,6</b>	<b>46,3</b>	<b>53,4</b>	<b>56,6</b>	<b>74,6</b>	<b>78,9</b>	<b>72,3</b>



Tabela 4. Medidas descritivas para o número de elevações da pata, ao longo do tempo, dos animais do grupo metissergida (GM).

ANIMAL	TEMPO (minutos)											
	05	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
<b>01</b>	63	22	16	21	37	67	76	89	88	87	78	68
<b>02</b>	59	50	28	26	48	79	79	83	76	74	73	75
<b>03</b>	76	26	39	67	93	69	72	95	95	87	77	80
<b>04</b>	42	31	44	49	57	76	73	70	74	75	70	56
<b>05</b>	84	25	28	25	52	22	77	82	93	82	53	84
<b>06</b>	86	27	27	24	75	45	82	89	93	87	94	90
<b>07</b>	62	24	25	18	41	36	72	69	80	81	85	94
<b>MÉDIA</b>	<b>67,4</b>	<b>29,3</b>	<b>29,6</b>	<b>32,9</b>	<b>57,6</b>	<b>56,3</b>	<b>75,9</b>	<b>82,4</b>	<b>85,6</b>	<b>81,9</b>	<b>75,7</b>	<b>78,1</b>

Tabela 5. Medidas descritivas para o número de elevações da pata, ao longo do tempo, dos animais do grupo fentolamina associada à metissergida (GFM).

ANIMAL	TEMPO (minutos)											
	05	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
<b>01</b>	99	37	35	49	57	59	69	94	101	100	94	87
<b>02</b>	75	38	37	39	44	88	83	87	85	110	95	95
<b>03</b>	76	37	39	43	77	95	108	86	102	90	82	97
<b>04</b>	99	35	38	51	58	87	99	75	90	91	87	92
<b>05</b>	68	30	35	45	46	66	73	45	71	84	104	103
<b>06</b>	87	48	31	59	65	79	99	97	92	98	80	75
<b>07</b>	71	29	27	67	75	79	78	70	79	79	85	62
<b>MÉDIA</b>	<b>82,1</b>	<b>36,3</b>	<b>34,6</b>	<b>50,4</b>	<b>60,3</b>	<b>79,0</b>	<b>87,0</b>	<b>79,1</b>	<b>88,6</b>	<b>93,1</b>	<b>89,6</b>	<b>87,3</b>

## 9.2 Apêndice C

Tabela 1. Aplicação do Teste de Kruskal-Wallis, com o intuito de verificarmos possíveis diferenças entre os cinco grupos, quando comparados concomitantemente a variável idade.

Grupo	N	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Significância (p)
GC	7	154,57	5,88	150,00	165,00	0,996
GF	7	156,57	9,50	143,00	171,00	
GN	7	155,71	9,81	144,00	166,00	
GM	7	154,29	8,94	144,00	166,00	
GFM	7	154,57	5,97	149,00	165,00	
Total	35	155,14	7,76	143,00	171,00	

Tabela 2. Aplicação do Teste de Kruskal-Wallis, com o intuito de verificarmos possíveis diferenças entre os cinco grupos, quando comparados concomitantemente a variável peso.

Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Significância (p)
GC	7	256,57	11,12	244,00	278,00	0,974
GF	7	258,14	16,15	238,00	287,00	
GN	7	257,14	16,16	237,00	284,00	
GM	7	256,43	16,54	238,00	280,00	
GFM	7	258,29	18,96	237,00	295,00	
Total	35	257,31	15,04	237,00	295,00	

Tabela 3. Aplicação do Teste de Kruskal-Wallis, para verificar possíveis diferenças entre os cinco grupos, quando comparados concomitantemente a variável número de elevações da pata durante a fase I.

Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Significância (p)
GC	7	77,71	18,10	60,00	109,00	0,275
GF	7	70,43	20,93	33,00	99,00	
GN	7	84,00	25,84	37,00	117,00	
GM	7	67,43	15,60	42,00	86,00	
GFM	7	82,14	12,94	68,00	99,00	
Total	35	76,34	19,19	33,00	117,00	

Tabela 4. Aplicação do Teste de Kruskal-Wallis, para verificar possíveis diferenças entre os cinco grupos, quando comparados concomitantemente a variável número de elevações da pata durante a fase Intermediária.

<b>Grupo</b>	<b>n</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Significância (p)</b>
GC	7	20,52	13,07	10,33	48,00	<b>0,002</b>
GF	7	37,19	3,86	31,00	42,00	
GN	7	19,24	8,67	4,33	31,00	
GM	7	30,57	9,50	19,67	44,00	
GFM	7	40,43	2,97	36,67	46,00	
Total	35	29,59	11,78	4,33	48,00	

Tabela 5. Aplicação do Teste de Kruskal-Wallis, para verificar possíveis diferenças entre os cinco grupos, quando comparados concomitantemente a variável número de elevações da pata durante a fase II.

<b>Grupo</b>	<b>n</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Significância (p)</b>
GC	7	83,02	26,93	44,38	118,25	<b>0,003</b>
GF	7	81,77	8,51	70,38	91,13	
GN	7	54,20	17,36	25,75	71,13	
GM	7	74,18	6,21	68,13	83,50	
GFM	7	83,00	6,24	74,00	92,13	
Total	35	75,23	18,24	25,75	118,25	

### 9.3 Apêndice D

Tabela 1. Aplicação do Teste de Mann-Whitney, para verificar quais grupos diferenciam-se entre si, durante a fase intermediária.

VARIÁVEL	PAR DE GRUPOS									
	GC x GF	GC x GN	GC x GM	GC x GFM	GF x GN	GF x GM	GF x GFM	GN x GM	GN x GFM	GM x GFM
<b>Fase Int.</b>	0,025	0,654	0,047	0,025	0,002	0,200	0,178	0,047	0,002	0,096

Tabela 2. Aplicação do Teste de Mann-Whitney, para verificar quais grupos diferenciam-se entre si, durante a fase II.

VARIÁVEL	PAR DE GRUPOS									
	GC x GF	GC x GN	GC x GM	GC x GFM	GF x GN	GF x GM	GF x GFM	GN x GM	GN x GFM	GM x GFM
<b>Fase II</b>	0,949	0,035	0,406	0,949	0,003	0,035	0,949	0,018	0,002	0,013

## 9.4 Apêndice E

Tabela 1. Aplicação do *Teste de Friedman*, para verificar diferenças entre as fases de observação, em cada grupo.

Grupo	Variáveis	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Significância (p)
GC	Fase I	7	77,71	18,10	60,00	109,00	0,005
	Fase Int	7	20,52	13,07	10,33	48,00	
	Fase II	7	83,02	26,93	44,38	118,25	
GF	Fase I	7	70,43	20,93	33,00	99,00	0,004
	Fase Int	7	37,19	3,86	31,00	42,00	
	Fase II	7	81,77	8,51	70,38	91,13	
GN	Fase I	7	84,00	25,84	37,00	117,00	0,002
	Fase Int	7	19,24	8,67	4,33	31,00	
	Fase II	7	54,20	17,36	25,75	71,13	
GM	Fase I	7	67,43	15,60	42,00	86,00	0,004
	Fase Int	7	30,57	9,50	19,67	44,00	
	Fase II	7	74,18	6,21	68,13	83,50	
GFM	Fase I	7	82,14	12,94	68,00	99,00	0,005
	Fase Int	7	40,43	2,97	36,67	46,00	
	Fase II	7	83,00	6,24	74,00	92,13	

## 9.5 Apêndice F

Tabela 1. Aplicação do Teste dos Postos Sinalizados de Wilcoxon, para identificar quais fases diferenciam-se, em cada grupo.

Par de Fases	GC	GF	GN	GM	GFM
Fase int – Fase I	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018
Fase I – Fase II	0,735	0,176	0,091	0,237	0,866
Fase 2 – Fase int	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018