

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Instituto De Ciências Biológicas  
Programa De Pós-Graduação Em Ciências Biológicas – Fisiologia E  
Farmacologia

Raquel Rodrigues Soares Santos

**Estudo sobre os mecanismos envolvidos na antinocicepção periférica  
induzida por tramadol em ratos**

Belo Horizonte

2021

Raquel Rodrigues Soares Santos

**Estudo sobre os mecanismos envolvidos na antinocicepção periférica  
induzida por tramadol em ratos**

**Versão final**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, com área de concentração em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte.

Belo Horizonte

2021

043 Santos, Raquel Rodrigues Soares.  
Estudo sobre os mecanismos envolvidos na antinocicepção periférica induzida por tramadol em ratos [manuscrito] / Raquel Rodrigues Soares Santos. - 2021.

136 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Tramadol. 2. Dor. 3. Hiperalgisia. 4. Opióides. 5. Serotonina. 6. Norepinefrina. I. Duarte, Igor Dimitri Gama. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Fisiologia e Farmacologia

#### ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado N° 535 DE RAQUEL RODRIGUES SOARES SANTOS

Às 14:00 horas do dia 14 do mês de janeiro de 2021, através da plataforma Google Meet: [meet.google.com/kgq-xqjn-wgg](https://meet.google.com/kgq-xqjn-wgg), realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Raquel Rodrigues Soares Santos**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Suzane Lillian Beyer**, Escola de Veterinária/Universidade Federal de Minas Gerais, e **Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**Estudo Sobre Os Mecanismos Envolvidos Na Antinocicepção Periférica Induzida Por Tramadol Em Ratos**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 14 de janeiro de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Igor Dimitri Gama Duarte**, Membro de comitê, em 14/01/2021, às 17:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira**, Professor do Magistério Superior, em 14/01/2021, às 17:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Suzane Lillian Beyer**, Coordenador(a) de curso, em 19/01/2021, às 20:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Quando as mentes das pessoas estiverem fechadas e a sabedoria trancada para fora, elas permanecem presas à doença. Ainda assim, seus sentimentos e desejos devem ser investigados e conhecidos, seus desejos e ideias deveriam ser seguidos; e então se torna aparente que aquelas que adquirem espírito e energia estão prósperas e florescendo, enquanto aquelas que perdem seu espírito e energia perecem.

- Huang Di Nei Jing

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, ao Universo, Ao Mestre Jesus, aos Orixás, aos bons espíritos que me guiam sempre por ter me trazido até aqui e por nunca terem me faltado.

Gratidão sempre!

Ao meu orientador professor Igor Dimitri por todos os ensinamentos, por todo o apoio quando mais precisei, por ter estado ao meu lado nessa caminhada, em todo esse tempo no laboratório, por toda essa partilha não apenas na Farmacologia, mas também na Veterinária. Um exemplo de conduta acadêmica e profissional, um exemplo de competência, didática e de pessoa. Muito obrigada!

Ao professor Thiago Romero pela convivência, pelas contribuições acadêmicas, pelo incentivo enquanto aluna e enquanto profissional.

À professora Andrea Perez pela convivência, pela contribuição acadêmica e pela amizade!

Aos professores do departamento de fisiologia e farmacologia pelo comprometimento e ensinamentos, em especial à professora Miriam, que sempre esteve ao lado dos alunos.

À minha mãe Consolação, que almeja me ver ocupando a cadeira de professora universitária!

Ao meu falecido pai, que de onde estiver está me guiando e me olhando e mesmo que eu não o esteja vendo, estou o sentindo.

Ao meu irmão Alex, meu grande herói. Aos meus sobrinhos Isabela e Lucca, que são a razão de eu querer ser mais forte e saudável.

Ao meu querido Igor, meu marido, meu companheiro, meu Yang, o que me completa, meu melhor amigo, o que nunca me faltou. Esse trabalho é dedicado especialmente a você!

Aos meus amigos de infância, Aline, Vitor, Naty, Ellen... Que sempre estiveram comigo e nunca se esquecem de mim. Minha vida sem vocês seria tão triste! Os que sabem exatamente o valor de uma dissertação de mestrado e como torcem por mim, sempre, sempre! Obrigada por tudo!

Aos meus grandes amigos do Laboratório de Dor e Analgesia, que levo cada um no fundo do meu coração, mas preciso citar Renata, que é minha irmã gêmea, mas que nasceu 6 anos antes e Amanda que insistiu em nascer antes também. Vocês são incríveis! O trabalho é muito mais gratificante com cada um de vocês ao meu lado! Flávia, Bárbara, Wallace, Daniel, Adriane, Dani, Douglas, Marla, Vanessa... Todos vocês que convivem comigo fazendo os meus dias mais felizes!

Aos técnicos bioteristas, Rinaldo, Wellington, Wilson, Hermes, Ricardo, Pedro, Frank por cuidar dos animais com tanto carinho e zelo. O trabalho de vocês é muito importante para todos nós!

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG por estarem ao lado da pesquisa e assim ser possível a realização desse trabalho.

Por fim, agradeço imensamente aos animais de experimentação que, sem escolha, foram utilizados nesse trabalho, mas que de onde estiverem recebam energias de gratidão e que São Francisco de Assis os proteja e que suas almas sejam acolhidas. Muito, muito obrigada e que um dia espero que me perdoem.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	VI
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	VIII
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	IX
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	XII
<b>RESUMO</b> .....	XIII
<b>ABSTRACT</b> .....	XVI
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	20
1.1 Estudo da dor .....	20
1.2 Via nociceptiva .....	24
1.3 Controle endógeno da dor.....	25
1.4 O tramadol.....	26
1.4.1 Enantiômeros e metabólitos .....	27
1.5 Tramadol e sua interação com sistemas analgésicos.....	30
1.5.1 Opioide.....	30
1.5.2 Monoaminas .....	31
1.5.3 Óxido Nítrico e Canais para potássio .....	33
1.5.4 Canabinoide.....	34
1.6 Uso de opioides e tramadol em Medicina Veterinária .....	35
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	39
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	40
3.1 Objetivo geral .....	40
3.2 Objetivos específicos .....	40
<b>4. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO</b> .....	42
<b>5. DROGAS E SOLVENTES</b> .....	42
5.1 Agente hiperalgésico.....	42



5.2 Substância antinociceptiva sob teste .....	43
5.3 Fármacos envolvidos na via opioidérgica .....	43
5.4 Fármacos envolvidos na via canabinoidérgica .....	43
5.5 Fármacos envolvidos na via L-arginina/NO/GMPc .....	44
5.6 Fármacos envolvidos com canais para k <sup>+</sup> .....	45
5.7 Fármacos envolvidos na via noradrenérgica .....	46
5.8 Fármacos envolvidos na via serotoninérgica .....	47
5.9 Fármacos envolvidos na via dopaminérgica .....	48
<b>6. ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS .....</b>	<b>49</b>
<b>7. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>50</b>
7.1 Teste Algesimétrico .....	50
7.2 Medida do limiar nociceptivo, hiperalgesia e antinocicepção .....	52
7.3 Exclusão do efeito sistêmico .....	53
7.4 Descrição dos experimentos .....	53
7.5 Análise estatística .....	54
<b>8 EFEITO ANTINOCICEPTIVO PERIFÉRICO DO TRAMADOL .....</b>	<b>56</b>
<b>9 EXCLUSÃO DO EFEITO SISTÊMICO .....</b>	<b>59</b>
<b>10 AVALIAÇÃO DO SISTEMA OPIOIDÉRGICO NA ANTINOCICEPÇÃO PERIFÉRICA INDUZIDA PELO TRAMADOL .....</b>	<b>61</b>
10.1 Efeito da naloxona sobre a antinocicepção periférica induzida pelo tramadol .....	61
<b>11 AVALIAÇÃO DO SISTEMA CANABINOIDÉRGICO NA ANTINOCICEPÇÃO PERIFÉRICA INDUZIDA PELO TRAMADOL .....</b>	<b>63</b>
11.1 Efeito dos antagonistas dos receptores CB <sub>1</sub> e CB <sub>2</sub> na antinocicepção periférica do tramadol .....	63
<b>12 PARTICIPAÇÃO DA VIA L-ARGININA/NO/GMPc NA ANTINOCICEPÇÃO PERIFÉRICA INDUZIDA PELO TRAMADOL .....</b>	<b>65</b>

12.1 Efeito da inibição das enzimas óxido nítrico sintases .....	65
12.2 Efeito da inibição da enzima guanilato ciclase solúvel (GC) .....	70
12.3 Efeito da inibição da enzima fosfodiesterase V e possível potencialização do efeito antinociceptivo.....	70
<b>13 ENVOLVIMENTO DOS CANAIS PARA POTÁSSIO NA ANTINOCICEPÇÃO PERIFÉRICA DO TRAMADOL.....</b>	<b>73</b>
13.1 Canais para potássio sensíveis ao ATP (K <sub>atp</sub> ).....	73
13.2 Canais para potássio dependentes de voltagem (K <sub>v</sub> ).....	73
13.3 Canais para potássio ativados por cálcio (K <sub>Ca</sub> ).....	73
<b>14 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA NORADRENÉRGICO NA ANTINOCICEPÇÃO PERIFÉRICA DO TRAMADOL.....</b>	<b>78</b>
14.1 Efeito do antagonista não seletivo dos receptores $\alpha_2$ -noradrenérgicos ioimbina sobre a antinocicepção periférica do tramadol .....	78
14.2 Efeito dos antagonistas seletivos dos receptores $\alpha_2$ -noradrenérgicos sobre a antinocicepção periférica do tramadol.....	78
<b>15 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO NA ANTINOCICEPÇÃO PERIFÉRICA DO TRAMADOL.....</b>	<b>84</b>
15.1 Efeito dos antagonistas dos receptores 5-HT <sub>1</sub> na antinocicepção induzida pelo tramadol	84
15.2 Efeito do antagonista dos receptores 5-HT <sub>2A</sub> na antinocicepção induzida pelo tramadol ..	84
15.3 Efeito do antagonista dos receptores 5-HT <sub>3</sub> na antinocicepção induzida pelo tramadol....	85
15.4 Efeito do antagonista dos receptores 5-HT <sub>7</sub> na antinocicepção induzida pelo tramadol....	85
<b>16 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO NA ANTINOCICEPÇÃO PERIFÉRICA DO TRAMADOL.....</b>	<b>91</b>
<b>17 DISCUSSÃO .....</b>	<b>96</b>
<b>18 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>118</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>136</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

**IASP** – Associação Internacional para o Estudo da Dor

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**SNP** – Sistema Nervoso Periférico

**DRG** – Gânglio da Raiz Dorsal

**CGRP** – Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina

**CDME** - Corno Dorsal da Medula Espinhal

**PAG** – Substância Cinzenta Periaquedutal

**5-HT** – Serotonina

**NA** – Noradrenalina

**LC** – Locus Coeruleus

**M1** – O-desmetiltramadol

**M2** – N-desmetiltramadol

**K<sub>i</sub>** – Constante de Afinidade

**NO** – Óxido Nítrico

**NOS** – Enzima Óxido Nítrico Sintase

**GC** – Guanilato Ciclase solúvel

**TEA** – Tetraetilamônio

**α<sub>2</sub>** – alfa-2-adrenérgico

**CB<sub>1</sub>** – Receptor Canabinoide 1

**CB<sub>2</sub>** – Receptor Canabinoide 2

**PGE<sub>2</sub>** – Prostaglandina E<sub>2</sub>

**i.pl.** – Intraplantar

**K<sub>ATP</sub>** – Canais para potássio ATP-sensíveis

**K<sub>v</sub>** – Canais para potássio voltagem dependentes

**K<sub>Ca</sub>** – Canais para potássio ativados por cálcio

**L-NOArg** - L<sup>G</sup>-Nitro-L-arginina

**L-NPA** – N<sup>w</sup>-propil-L-arginina

**L-NIO** – Dihidrocloridrato de N<sup>5</sup>-(1-iminoetil)-L-ornitina

**L-NIL** – Hidrocloridrato de N<sup>6</sup>-(1-iminoetil)-L-lisina

**ODQ** – 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalina-1-ona

**NOS<sub>n</sub>** – Enzima Óxido Nítrico Sintase Neuronal

**NOS<sub>e</sub>** – Enzima Óxido Nítrico Sintase Endotelial

**NOS<sub>i</sub>** – Enzima Óxido Nítrico Sintase Induzível

**E.P.M** – Erro Padrão da Média

**GMP<sub>c</sub>** – 3'5'-Guanosina Monofosfato Cíclico

**G<sub>s</sub>** – Proteína G do tipo s (excitatória)

**AMP<sub>c</sub>** – 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico

**PKA** – Fosfoquinase A

**PKC** – Fosfoquinase C

**PDE** – Fosfodiesterase

**MAPK** – Proteína quinase ativada por mitógeno

**NET** – Transportador de Noradrenalina

**SERT** – Transportador de Serotonina

**DAT** – Transportador de Dopamina

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Classificação dos tipos de dor .....	22
<b>Figura 2</b> – Tipos de fibras .....	25
<b>Figura 3</b> – Estruturas químicas do tramadol, morfina e codeína .....	31
<b>Figura 4</b> – Proposta de esquema de fármacos que interagem com o sistema opioide .....	43
<b>Figura 5</b> – Proposta de esquema de fármacos que interagem com o sistema canabinoide .....	44
<b>Figura 6</b> – Proposta de esquema de fármacos que interagem com o sistema nitrgico .....	45
<b>Figura 7</b> – Proposta de esquema de fármacos que interagem com os canais para potássio .....	46
<b>Figura 8</b> – Proposta de esquema de fármacos que interagem com o sistema noradrenrgico .....	47
<b>Figura 9</b> – Proposta de esquema de fármacos que interagem com o sistema serotoninrgico .....	48
<b>Figura 10</b> – Proposta de esquema de fármacos que interagem com o sistema dopaminrgico .....	49
<b>Figura 11</b> – Injeção intraplantar subcutânea em pata posterior de rato .....	49
<b>Figura 12</b> – Aparelho algosimétrico utilizado para medida do limiar nociceptivo em pata de ratos .....	51
<b>Figura 13</b> – Hipótese sobre o mecanismo de ação antinociceptivo periférico induzido pelo tramadol .....	115

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> – Efeito do tramadol sobre o limiar nociceptivo de ratos com hiperalgesia induzida por PGE <sub>2</sub> .....	57
<b>Gráfico 2</b> – Efeito do tramadol sobre o limiar nociceptivo de ratos com hiperalgesia induzida por PGE <sub>2</sub> na 3ª hora .....	58
<b>Gráfico 3</b> – Exclusão do efeito sistêmico do Tramadol nas doses 80 µg/pata e 100 µg/pata .....	60
<b>Gráfico 4</b> – Antagonismo do efeito antinociceptivo periférico do tramadol pela naloxona .....	62
<b>Gráfico 5</b> – Antagonismo do efeito antinociceptivo periférico do tramadol pelo AM251 ou AM630 .....	64
<b>Gráfico 6</b> – Reversão parcial do efeito antinociceptivo periférico do tramadol pela administração intraplantar de L-NOarg .....	66
<b>Gráfico 7</b> – Reversão parcial do efeito antinociceptivo periférico do tramadol pela administração intraplantar de L-NPA .....	67
<b>Gráfico 8</b> – Reversão do efeito antinociceptivo periférico do tramadol pela administração intraplantar de L-NIO .....	68
<b>Gráfico 9</b> – Efeito da injeção de L-NIL sobre a antinocicepção periférica do tramadol .....	69
<b>Gráfico 10</b> – Efeito da injeção de ODQ sobre a antinocicepção periférica do tramadol .....	71
<b>Gráfico 11</b> – Efeito da injeção de zaprinast sobre a antinocicepção periférica do tramadol .....	72

<b>Gráfico 12</b> – Efeito da injeção de glibenclamida sobre a antinocicepção periférica do tramadol .....	74
<b>Gráfico 13</b> – Efeito da injeção de tetraetilamônio sobre a antinocicepção periférica do tramadol .....	75
<b>Gráfico 14</b> – Efeito da injeção de paxilina sobre a antinocicepção periférica do tramadol .....	76
<b>Gráfico 15</b> – Efeito da injeção de dequalínio sobre a antinocicepção periférica do tramadol .....	77
<b>Gráfico 16</b> – Reversão parcial do efeito antinociceptivo periférico do tramadol pela administração intraplantar de ioimbina .....	79
<b>Gráfico 17</b> – Antagonismo do efeito antinociceptivo do tramadol pela administração de rauwolscina .....	80
<b>Gráfico 18</b> – Efeito da injeção de BR 44408 sobre a antinocicepção periférica do tramadol .....	81
<b>Gráfico 19</b> – Efeito da injeção de imiloxana sobre a antinocicepção periférica do tramadol .....	82
<b>Gráfico 20</b> – Efeito da injeção de RX 821002 sobre a antinocicepção periférica do tramadol .....	83
<b>Gráfico 21</b> – Antagonismo do efeito antinociceptivo do tramadol pela administração de isamoltano .....	86
<b>Gráfico 22</b> – Antagonismo do efeito antinociceptivo do tramadol pela administração de BRL 15572 .....	87
<b>Gráfico 23</b> – Efeito da injeção de cetanserina sobre a antinocicepção periférica do tramadol .....	88



<b>Gráfico 24</b> – Antagonismo do efeito antinociceptivo do tramadol pela administração de ondansetrona .....	89
<b>Gráfico 25</b> – Efeito da injeção de SB269970 sobre a antinocicepção periférica do tramadol .....	90
<b>Gráfico 26</b> – Efeito da injeção de remoxipride sobre a antinocicepção periférica do tramadol .....	92
<b>Gráfico 27</b> – Efeito da injeção de U 99194 sobre a antinocicepção periférica do tramadol .....	93
<b>Gráfico 28</b> – Efeito da injeção de L-745,870 sobre a antinocicepção periférica do tramadol .....	94

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Constantes de afinidade dos enantiômeros e metabólito M1 do tramadol em relação aos receptores opioides e monoaminas .....	29
--	----

## RESUMO

O tramadol é um analgésico sintético de ação central que se mostrou promissor, devido aos baixos efeitos colaterais no sistema respiratório, gastrointestinal e pouca capacidade de indução de tolerância e potencial aditivo, apesar dos principais efeitos adversos náusea e vômito. É uma droga que age em dor moderada a severa melhorando a modulação central da dor. O tramadol é inserido na classe dos “opioides atípicos”, já que tem mecanismos de ação opioide e não opioide, assim, os mecanismos de ação envolvem não apenas a ligação a receptores opioides, mas também a modulação da via descendente analgésica aminérgica central. As vias pelas quais o tramadol exerce a antinocicepção local ainda não estão bem elucidadas, de forma que o presente trabalho se dedicou a estudar os mecanismos pelos quais o tramadol poderia exercer a antinocicepção em modelo animal. Foram avaliados os sistemas opioidérgico, canabinoidérgico, nitrérgico, noradrenérgico, serotoninérgico e dopaminérgico, bem como a participação dos canais para potássio na antinocicepção periférica do tramadol frente a hiperalgesia induzida pela prostaglandina E<sub>2</sub>. Para a medida do limiar nociceptivo foi utilizado o método de retirada de pata de ratos submetida à compressão. A técnica se baseia no princípio de que a PGE<sub>2</sub> (2 µg) aumenta a sensibilidade ao estímulo doloroso e que esse aumento é susceptível de ser modificado por drogas ou procedimentos sob teste. Foi utilizada análise de variância *one-way ANOVA*, seguida de *post-hoc* de Bonferroni para múltiplas comparações como análise estatística. Para verificar a participação dos receptores opioides e canabinoides neste evento, utilizamos o antagonista opioide não seletivo naloxona (50 µg) e os antagonistas dos receptores canabinoides CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub>, AM251 (80 µg) e AM630 (100 µg),

respectivamente, que não foram capazes de reverter a antinocicepção do tramadol. Ao administrar o inibidor não seletivo das enzimas óxido nítrico sintase, L-NOArg (24 e 48 µg), a reversão da antinocicepção foi parcial, o que também ocorreu para os inibidores seletivos da NOSe, L-NIO (24, 48 µg) e NOSn, L-NPA (24,48 µg). O inibidor da NOSi L-NIL (24 µg) não conseguiu reverter a antinocicepção. O inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel ODQ reverteu a antinocicepção periférica do tramadol de maneira dose-dependente (25, 50 e 100 µg) e o zaprinast (50 µg) foi capaz de potencializar o efeito antinociceptivo do tramadol (60 µg). Ao avaliar a participação dos canais para potássio, apenas a glibenclamida foi capaz de bloquear a antinocicepção do tramadol, de maneira dose-dependente (20, 40 e 80 µg). Por outro lado, os demais bloqueadores de canais para potássio, tetraetilamônio (30 µg), que bloqueia canais voltagem-dependente, dequalínio (50 µg) e paxilina (20 µg), que bloqueiam canais ativados por cálcio de baixa e alta condutância, respectivamente, não conseguiram alterar a antinocicepção do tramadol. O antagonista não seletivo dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos ioimbina (20, 40 µg) reverteu parcialmente a analgesia do tramadol, enquanto o antagonista seletivo dos receptores  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos rauwolscina (10, 15, 20 µg) antagonizou totalmente a analgesia. Por outro lado, os antagonistas dos demais subtipos de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  e  $\alpha_{2D}$ , BRL44480, imiloxana e RX821002 (20 µg), respectivamente, não alteraram a antinocicepção. Quanto ao sistema serotoninérgico, os antagonistas dos receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> e 5-HT<sub>3</sub>, isamoltano, BRL 15572 e ondasetrona (100 ng, 1 e 10 µg), respectivamente, conseguiram bloquear a antinocicepção do tramadol, mas os antagonistas dos demais receptores avaliados, 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>7</sub>, cetanserina e SB269970 (10 µg), respectivamente, não foram capazes de

exercer o mesmo efeito. Quanto ao sistema dopaminérgico, nenhum receptor avaliado parece estar envolvido no efeito do tramadol. Os antagonistas dos receptores D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>, remoxipride (4, 20 µg), U99194 (32 µg) e L-745,870 (32 µg), respectivamente foram avaliados. Nossos dados sugerem, pela primeira vez, a ação antinociceptiva periférica induzida pelo tramadol quando administrado em modelo de hiperalgesia induzida por PGE<sub>2</sub>, e que este efeito deve envolver os receptores α<sub>2C</sub>-adrenérgicos os receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> e 5-HT<sub>3</sub>, além do sistema nitrérgico e canais para potássio ATP-sensíveis.

Palavras-chave: Tramadol, Hiperalgesia, serotonina, dor, opioides, noradrenalina

## ABSTRACT

Tramadol is a synthetic analgesic of central action that has shown promise, due to the low side effects on the respiratory, gastrointestinal system and little capacity to induce tolerance and additive potential, despite the main adverse effects nausea and vomiting. It is a drug that acts on moderate to severe pain by improving central pain modulation. Tramadol is inserted in the class of “atypical opioids”, since it has opioid and non-opioid mechanisms of action, thus, the mechanisms of action involve not only the binding to opioid receptors, but also the modulation of the central aminergic descending pathway. The pathways by which tramadol exerts local antinociception are still not well understood, so the present work was dedicated to studying the mechanisms by which tramadol could exert antinociception in an animal model. The opioidergic, cannabinoidergic, nitrenergic, noradrenergic, serotonergic and dopaminergic systems were evaluated, as well as the participation of potassium channels in the peripheral antinociception of tramadol against prostaglandin-induced hyperalgesia E2. To measure the nociceptive threshold, the method of removing rat paws subjected to compression was used. The technique is based on the principle that PGE<sub>2</sub> (2 µg) increases sensitivity to painful stimuli and that this increase is likely to be modified by drugs or procedures under test. One-way ANOVA analysis of variance was used, followed by Bonferroni's post-hoc for multiple comparisons as statistical analysis. To verify the participation of opioid and cannabinoid receptors in this event, we used the non-selective opioid antagonist naloxone (50 µg) and the cannabinoid receptor antagonists CB1 and CB2, AM251 (80 µg) and AM630 (100 µg), respectively, which were not able to reverse tramadol

antinociception. When administering the non-selective inhibitor of the nitric oxide synthase enzymes, L-NOArg (24 and 48  $\mu\text{g}$ ), the reversal of antinociception was partial, which also occurred for the selective NOSe inhibitors, L-NIO (24, 48  $\mu\text{g}$ ) and NOSn, L-NPA (24.48  $\mu\text{g}$ ). The NOSi L-NIL inhibitor (24  $\mu\text{g}$ ) was unable to reverse antinociception. The inhibitor of the enzyme soluble guanylate cyclase ODQ reversed the peripheral antinociception of tramadol in a dose-dependent manner (25, 50 and 100  $\mu\text{g}$ ) and zaprinast (50  $\mu\text{g}$ ) was able to potentiate the antinociceptive effect of tramadol (60  $\mu\text{g}$ ). When evaluating the participation of channels for potassium, only glibenclamide was able to block tramadol antinociception, in a dose-dependent manner (20, 40 and 80  $\mu\text{g}$ ). On the other hand, the other channel blockers for potassium, tetraethylammonium (30  $\mu\text{g}$ ), which blocks voltage-dependent channels, dequalinium (50  $\mu\text{g}$ ) and paxillin (20  $\mu\text{g}$ ), which block channels activated by low and high conductance calcium, respectively, failed to alter antinociception of tramadol. The non-selective  $\alpha_2$ -adrenergic yohimbine receptor antagonist (20, 40  $\mu\text{g}$ ) partially reversed tramadol analgesia, while the selective  $\alpha_{2C}$ -adrenergic receptor antagonist rauwolscine (10, 15, 20  $\mu\text{g}$ ) totally antagonized the analgesia. On the other hand, antagonists of the other  $\alpha_2$ -adrenergic receptor subtypes,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  and  $\alpha_{2D}$ , BRL44480, imiloxane and RX821002 (20  $\mu\text{g}$ ), respectively, did not alter antinociception. As for the serotonergic system, the 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists, isamoltane, BRL 15572 and ondasetron (100 ng, 1 and 10  $\mu\text{g}$ ), respectively, managed to block tramadol antinociception, but the antagonists of tramadol the other evaluated receptors, 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>7</sub>, ketanserin and SB269970 (10  $\mu\text{g}$ ), respectively, were not able to exert the same effect. As for the dopaminergic system, no evaluated receptor appears to be involved in the

effect of tramadol. D2, D3 and D4 receptor antagonists, remoxipride (4.20 µg), U99194 (32 µg) and L-745.870 (32 µg), respectively, were evaluated. Our data suggest, for the first time, the peripheral antinociceptive action induced by tramadol when administered in a model of PGE2-induced hyperalgesia, and that this effect should involve the  $\alpha_{2C}$ -adrenergic receptors, the 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> and 5-HT<sub>3</sub> serotonergic receptors, in addition to the nitrenergic system and ATP-sensitive potassium channels.

Keywords: Tramadol, Hiperalgesia, serotonin, pain, opioids, noradrenaline



---

## INTRODUÇÃO

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 ESTUDO DA DOR

O conceito de dor é um assunto que é debatido desde a antiguidade. No Oriente, a dor vem sendo tratada há mais de 3000 anos através da Medicina Tradicional Chinesa (MTC). No Ocidente, na antiguidade, os gregos, como Hipócrates e outros filósofos, deram vários significados para o termo “dor”, considerando o coração como o centro das sensações, emoções e toda a função mental (Chen, 2011). No entanto, foi apenas durante o Renascimento, precisamente no século XVII d.C., que René Descartes (1596-1650) descreveu a transmissão dolorosa como ascendente da periferia, passando pela medula espinhal em direção aos “ventrículos” do cérebro. Esse foi um dos primeiros cientistas a descrever o sistema somatossensorial em humanos. Segundo Descartes, a experiência dolorosa é a distinção que o cérebro faz entre o fenômeno neural e a transdução somatossensorial através de fibras nervosas (nocicepção) (Moayedi & Davis, 2013). A partir daí, várias teorias da dor foram descritas até chegar nas transmissões e sinalizações das vias como são aceitas hoje (Chen, 2011).

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), dor é definida como “experiência sensitiva e emocional desagradável, associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial” (DeSantana et al., 2020). Possui função protetora, que visa evitar o dano tecidual, apesar de causar reação considerada estressante ao indivíduo, afetando até mesmo a família do paciente, gerando custos e faltas ao trabalho (Anwar, 2016). Dois outros termos são importantes quando se considera o

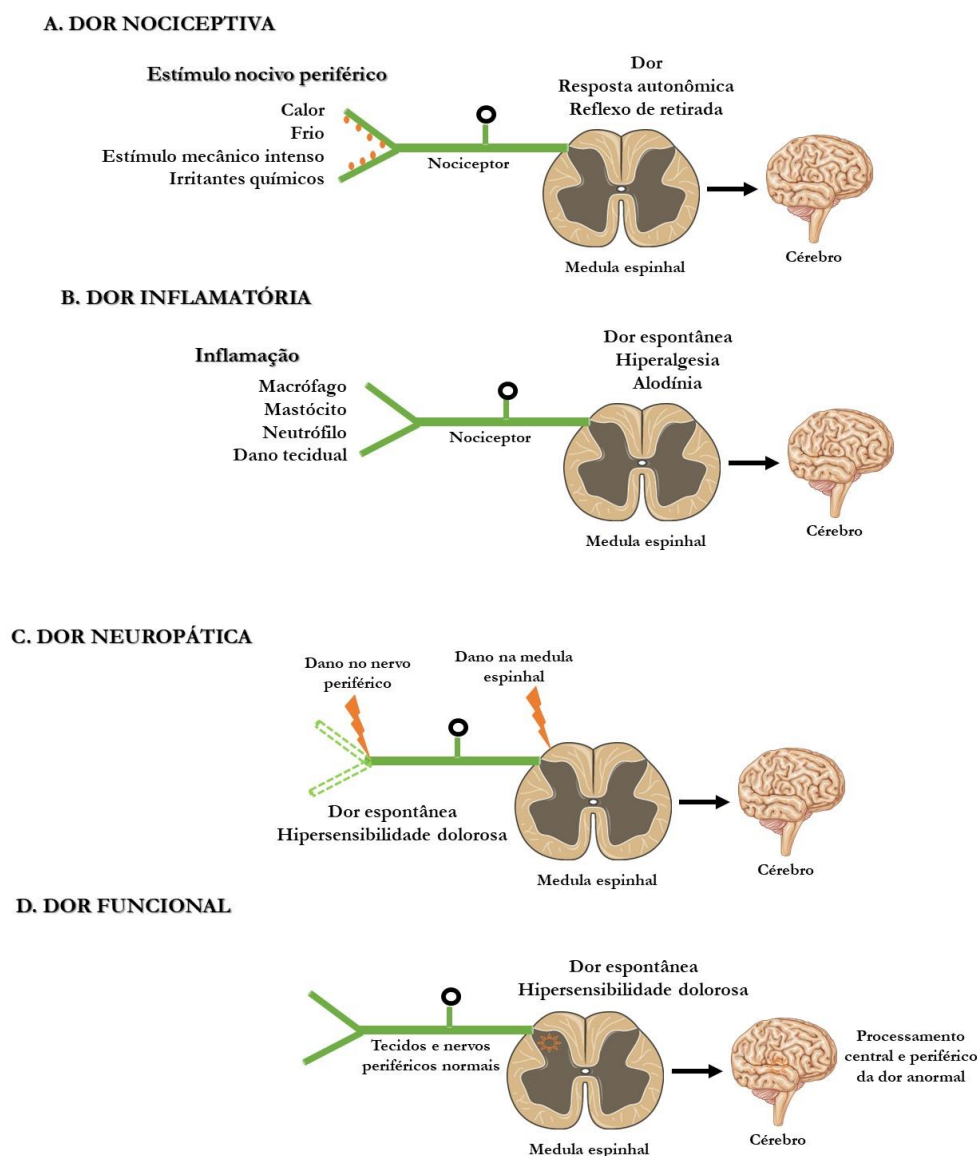
estudo da dor. São eles: (1) hiperalgesia, quando o estímulo nocivo causa reação dolorosa de forma mais intensa, ou, em outras palavras, quando o limiar algico do tecido está diminuído, sendo assim um aumento da sensibilidade dolorosa e (2) alodínia, quando um estímulo que normalmente não causaria dor passa a gerar esta sensação (Basbaum et al., 2009). Apesar de ser consenso de que há experiência emocional desagradável nos animais, esta não é fácil de ser mensurada. Portanto, em experimentação animal, utiliza-se o termo nocicepção para os estudos de dor, que é a decodificação do processamento do estímulo nocivo (Barrot, 2012; Bell, 2018).

A dor pode ter diversos tipos de classificação, como a aguda e crônica, conforme sua duração. A dor aguda é uma resposta fisiológica normal ao estímulo mecânico ou físico, com ativação de nociceptores no local da lesão, sendo de caráter protetivo, com objetivo de reduzir potencial dano tecidual (Anwar, 2016; Woolf, 2004), autolimitante, de curta duração (poucos dias ou semanas), com ativação da via simpática gerando aumento da frequência respiratória e cardíaca, aumento da pressão arterial sistêmica e midríase. (Anwar, 2016). A dor crônica é, diferentemente da dor aguda, uma doença propriamente dita e não um sintoma de uma patologia. É dor persistente, acima de 3 meses, segundo alguns autores, e que geralmente apresentam baixa resposta ao tratamento farmacológico (Anwar, 2016; Coda & Bonica, 2001). Gera baixa qualidade de vida ao paciente, reduzindo o bem-estar e culminando, por vezes, à perda da função do tecido. A área afetada tende a ficar hipersensível e hiper-responsiva a estímulos (Anwar, 2016).

Outra forma de classificar a dor é conforme sua natureza: nociceptiva, inflamatória, neuropática ou idiopática (**Figura 1**). A dor nociceptiva é

caracterizada como um estímulo rápido, com ativação de nociceptores na periferia. Ocorrem impulsos eletroquímicos que são decodificados e transmitidos da periferia à medula espinhal, a partir de abertura de canais para sódio e início de potencial de ação, processo chamado de transdução e transmissão, até o sistema nervoso central (SNC) supramedular, local em que ocorre a percepção da dor (Anwar, 2016; Scholz & Woolf, 2002). A dor nociceptiva pode ser somática ou visceral (Woolf et al., 1998). Somática, quando é localizada topograficamente em ossos, tecidos moles periféricos, articulações e músculos. Já a visceral, quando ocorre de forma difusa e referida, ou seja, a dor inicia-se em um local, mas é sentida em outra região do corpo, sendo acompanhada por reflexos motores e autonômicos, como náusea e vômito (Anwar, 2016). Há ainda a dor inflamatória, em que há redução do limiar nociceptivo. O processo inflamatório é importante para que a área seja “poupada” e protegida até que haja resolução (Woolf, 2004). A região inflamada é banhada por uma “sopa inflamatória” onde diversos autacoides podem ser identificados, como prostaglandinas, histamina, serotonina, bradicinina e citocinas. Esses mediadores modificam o limiar nociceptivo e sensibilizam e/ou ativam os nociceptores fazendo com que haja a hiperalgesia ou alodínia (Boddeke, 2001; Scholz & Woolf, 2002). Os anti-inflamatórios regulam esse fenômeno em momentos em que está exacerbado e extrapola o limiar fisiológico e necessário para o reparo da lesão (Woolf, 2004). A dor neuropática é devido a danos em estruturas neurais no sistema nervoso periférico (SNP) ou no SNC, gerando sensação de corte ou queimação. São exemplos a neuropatia diabética, neuralgias, radiculopatias e lesões da medula espinhal (Woolf, 2004). Uma dor idiopática ou funcional tem origem desconhecida, sendo psicogênica, miofascial ou somatização (Anwar, 2016).

Não há uma patologia neurológica evidente ou anomalia periférica. O sistema sensorial apresenta resposta ou função anormal acarretando exacerbação dos sintomas. O tratamento é bastante limitado e, muitas vezes, ineficaz. A fibromialgia, síndrome do intestino irritável, dor no peito não cardíaca e dor de cabeça tensional se enquadram nessa classificação (Woolf, 2004).

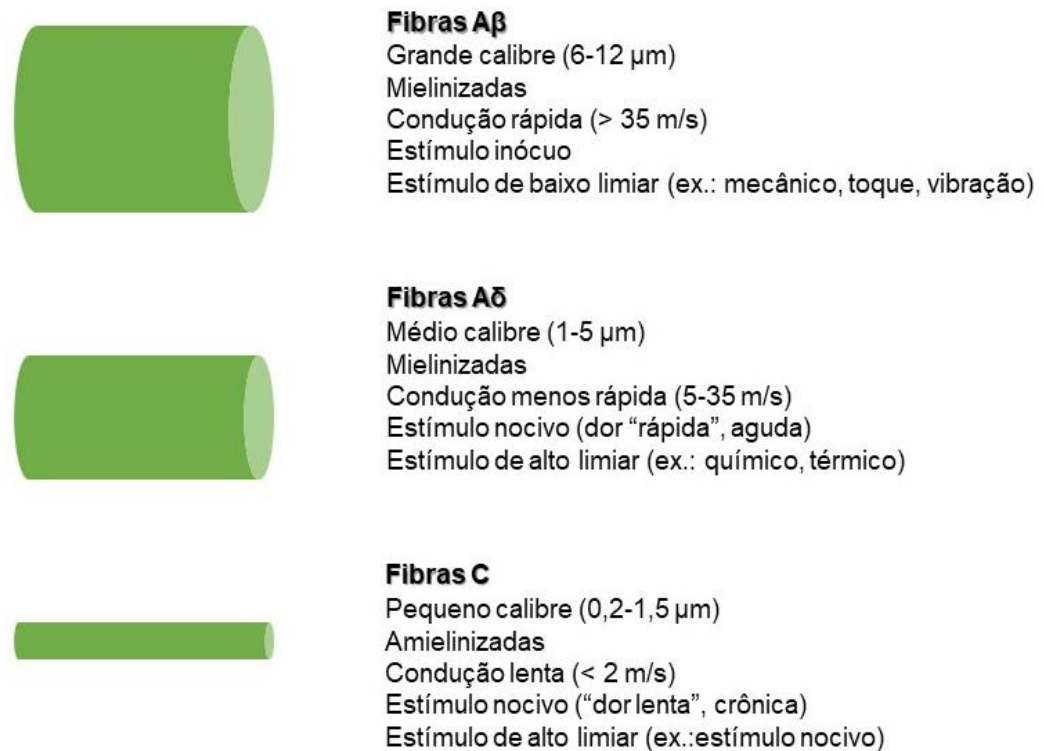


**Figura 1** – Classificação dos tipos de dor, conforme sua natureza

(Adaptado de Woolf, 2004).

## 1.2 VIA NOCICEPTIVA

A dor ocorre a partir de um estímulo térmico, mecânico ou químico na periferia (pele, músculos articulações e vísceras) com ativação de neurônios específicos que detectam estímulos potencialmente lesivos, chamados nociceptores (Basbaum & Jessell, 2000), cujos corpos neuronais estão localizados no gânglio da raiz dorsal (DRG) (Basbaum et al., 2009; Bell, 2018). Os nociceptores, neurônios aferentes primários (fibras A $\delta$  e C, **figura 2**) (Anwar, 2016; Bell, 2018), transformam esse estímulo em atividade elétrica, processo chamado de transdução (Anwar, 2016). Acontece, então, um disparo de potencial de ação, a partir de abertura de canais para sódio e despolarização da membrana (Gold, 2013), e esse estímulo elétrico é conduzido para a medula espinhal, precisamente para o corno dorsal da medula espinhal (CDME), onde há comunicação com os neurônios de segunda ordem, via neurotransmissores como glutamato, substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (Bell, 2018; Snider & McMahon, 1998; Todd, 2010). As fibras de segunda ordem cruzam a medula e ascendem pelo trato espinotalâmico e daí até o tálamo, de onde partem axônios dos neurônios de terceira ordem para regiões superiores do SNC (Anwar, 2016; Scholz & Woolf, 2002; Woolf, 2004). Por fim, acontece a percepção da dor no cérebro, na região do córtex somatossensorial e áreas associadas (Bell, 2018; Scholz & Woolf, 2002; Woolf, 2004).



**Figura 2** – Tipos de fibras nervosas periféricas (Anwar, 2016; Bell, 2018).

### 1.3 CONTROLE ENDÓGENO DA DOR

Melzack & Wall em 1965 postularam a “teoria do portão da dor” na qual um estímulo cutâneo não nociceptivo geraria impulsos nervosos transmitidos por fibras mielinizadas e que poderiam ativar interneurônios inibitórios, o que modularia negativamente a circuitaria para percepção e resposta à dor. Por outro lado, quando fibras nociceptivas menos mielinizadas são estimuladas, há inibição, através de ramificações colaterais, de interneurônios da substância gelatinosa e isso faz com que haja a chegada da informação nociceptiva no corno dorsal. O resultado é um balanço entre a informação nociceptiva e tátil ao nível da medula espinhal.

Além do sistema de controle segmentar descrito acima, a dor também é modulada de forma endógena através do sistema serotoninérgico, que se inicia na substância cinzenta periaquedutal (PAG) situada no mesencéfalo, descende até o núcleo magno da rafe no bulbo (Fields, 1978; Millan, 2002) e do sistema noradrenérgico, que se inicia no locus coeruleus (LC), localizado na ponte (Millan, 2002; Moore & Bloom, 1979). Esses sistemas acabam por causar a antinocicepção na medula espinhal. Além desses, outros sítios supraespinhais envolvidos nessa modulação que origina vias descendentes para o corno dorsal podem ser citados como o núcleo parabraquial, núcleo do trato solitário, hipotálamo, núcleo reticular paragigantocelular e núcleo reticular dorsal (Millan, 2002). As vias descendentes analgésicas foram primeiramente evidenciadas pelo trabalho de Reynolds (1969), no qual realizou-se estimulação elétrica na PAG em ratos e visualizou-se marcante antinocicepção com inibição da resposta reflexa a estímulos nocivos sem, no entanto, alterar a resposta a estímulos inócuos. Esse sistema supra medular projeta-se via funículo dorsolateral (Basbaum et al., 1976; Fields, 1988) chega ao corno dorsal e determina efeitos inibitórios sobre a transmissão nociceptiva (Fields, 1988).

Na literatura há descrição da participação de vários sistemas analgésicos endógenos, dentre eles o opioide, canabinoide, colinérgico e adrenérgico (Bell, 2018).

## 1.4 O TRAMADOL

O tramadol ((2-[(dimetilamino)metil]-1-(3-metoxifenil)ciclohexanol) é um analgésico sintético de ação central do tipo ciclohexanol desenvolvido na Alemanha em 1962 e atualmente é prescrito em mais de 100 países no mundo



(Bravo et al., 2017; Grond & Sablotzki, 2004; Miotto et al., 2017). Começou a ser comercializado em 1977 e mostrou-se promissor, devido aos baixos efeitos colaterais no sistema respiratório, gastrointestinal e pouca capacidade de indução de tolerância e potencial aditivo (Abel, 1995; Grond & Sablotzki, 2004). Os principais efeitos adversos são náusea e vômito (Abel, 1995; Bravo et al., 2017). Foi aprovado pela Food and Drug Administration (FDA-Estados Unidos) em 1995 como único opioide de prescrição não controlada disponível. No entanto, devido ao crescente índice de uso como droga de abuso e recreação, em 2014 passou a ser medicação de uso controlado (Bravo et al., 2017; Miotto et al., 2017). No Brasil, o tramadol é liberado para uso desde 1998 e é uma medicação de uso controlado pertencente à lista “A2”, podendo ser dispensado apenas com receita de controle especial em duas vias (BRASIL, 1999). É uma droga que age em dor moderada a severa de várias etiologias, como dor pós operatória, incluindo cirurgias obstétricas, isquemia do miocárdio, cólica renal, trauma agudo, câncer, osteoartrite, dor crônica e dor neuropática, além de fazer parte também de protocolos de anestesia multimodal (Bravo et al., 2017; Radbruch et al., 1996).

#### 1.4.1 ENANTIÔMEROS E METABÓLITOS

Do ponto de vista estrutural, o tramadol possui dois centros quirais, sendo, portanto, uma mistura racêmica dos estereoisômeros (+)-tramadol e (-)-tramadol, que atuam em sinergia para que ocorra a analgesia (Miotto et al., 2017).

O tramadol é inserido na classe dos “opioides atípicos”, já que tem mecanismos de ação opioide e não opioide (Bravo et al., 2017; Raffa et al., 1992). Assim, os mecanismos de ação envolvem não apenas a ligação a

receptores opioides, mas também a inibição da recaptação de serotonina e noradrenalina com conseqüente potencialização das vias descendentes analgésicas no SNC, mediadas pelo núcleo da rafe (Lee et al., 1993; Rojas-Corrales et al., 2000; Scott & Perry, 2000).

Após a administração do fármaco, a mistura racêmica segue mecanismos de ação particulares de cada um de seus enantiômeros, ainda que a analgesia se dê através da sinergia dos dois, além da ação dos metabólitos (García-Quetglas et al., 2007; Raffa et al., 1993). O (+)-tramadol está relacionado ao bloqueio da captação de 5-HT e aumento da disponibilidade desse neurotransmissor no núcleo da rafe dorsal. Sua afinidade pelo receptor  $\mu$ -opiode é baixa comparada a outros fármacos opioides, porém 60% mais alta que seu composto parental e 19 vezes maior que o enantiômero levógiro. Também apresenta afinidade superior à mistura, com valores até duas vezes superior (Grond and Sablotzki, 2004; Raffa et al., 1993). (-)-Tramadol é capaz de inibir a captação de NA em sinaptossomas de hipotálamo e comparativamente é cerca de duas vezes mais potente que o enantiômero dextrogiro e 10 vezes mais potente que a mistura (Driessen et al., 1993). A **tabela 1** descreve as constantes de afinidade dos enantiômeros e o metabólito M1 do tramadol.

**Tabela 1 – Constantes de afinidade expressas em  $\mu\text{M}$  dos enantiômeros e metabólito M1 do tramadol em relação aos receptores opioides e monoaminas.** Valores correspondentes a ensaios *in vitro* utilizando células humanas (Bravo et al., 2017; Gillen et al., 2000; Raffa et al., 1993).

	Receptores opioides			Monoaminas	
	$\mu$	$\delta$	$\kappa$	NA	5-HT
<b>Tramadol</b>	2,1	57,6	42,7	0,79	0,99
<b>(+)-Tramadol</b>	1,3	62,0	54,0	2,51	0,53
<b>(-)-Tramadol</b>	24,8	213,0	54,0	0,43	2,35
<b>O-desmetiltramadol (M1)</b>	0,0054	-	-	-	-
<b>Morfina</b>	0,00034	0,092	0,57	Inativo	Inativo

A afinidade e seletividade do tramadol depende do seu metabolismo hepático, no qual a mistura racêmica é convertida em O-desmetiltramadol (M1), principal metabólito ativo, e N-desmetiltramadol (M2) a partir da ação da enzima CYP2D6 durante a fase I de metabolização no fígado (Poulsen et al., 1996). O metabolismo, então, segue para a fase II, com formação dos metabólitos M3 (N,N-didesmetiltramadol), M4 (N,N,O-tridesmetiltramadol) e M5 (N,O-didesmetiltramadol), que são inativados pela adição de sulfato ou ácido glucurônico (Subrahmanyam et al., 2001). O metabólito M1 possui maior afinidade pelos receptores  $\mu$ -opioides comparado aos outros metabólitos e aos enantiômeros do tramadol sendo, portanto, o principal responsável pela analgesia opioide desse fármaco (Bravo et al., 2017; Gillen et al., 2000). Ide et al. (2006) mostraram que camundongos *knockout* para receptores  $\mu$ -opioides apresentam antinocicepção menos pronunciada no *tail-flick* e na placa quente quando comparados com camundongos selvagens e submetidos ao tratamento

tanto com tramadol, quanto com M1. Esse metabólito pode também estar envolvido na captação e aumento de NA e 5-HT (Driessen et al., 1993; Radbruch et al., 1996). Pessoas ou animais que não realizam bem a metabolização de fase I, ou seja, que possuem baixos níveis de CYP2D6 ou que estejam fazendo uso concomitante de fármacos que reduzem a ação dessa enzima, tendem a ter menores concentrações de M1 no plasma (García-Quetglas et al., 2007). Laugesen et al. (2005) avaliaram a interação do tramadol com a paroxetina, um antidepressivo capaz de inibir a ação da CYP2D6, e ela foi capaz de aumentar a concentração de (+)-tramadol e (-)-tramadol no plasma, além de reduzir a formação de M1, sugerindo redução da analgesia pelo mecanismo opioide. No entanto, a paroxetina não foi capaz de abolir totalmente a analgesia, sugerindo participação de outros mecanismos de ação que independem dessa enzima.

## 1.5 TRAMADOL E SUA INTERAÇÃO COM SISTEMAS ANALGÉSICOS

### 1.5.1 OPIOIDE

A estrutura química do tramadol está relacionada à codeína e morfina (**figura 3**), porém com substituição do grupo metil na metade fenólica, o que configura menor afinidade com receptor opioide (Dayer et al., 1994), com potência ser cerca de 6000 vezes inferior à morfina e 10 vezes inferior à codeína (Abel, 1995; Raffa et al., 1992).



**Figura 3** – Estruturas químicas do tramadol, morfina e codeína (Abel, 1995; Scott & Perry, 2000).

O tramadol apresenta constantes de dissociação ( $K_i$ ) entre 2,1 e 57,5  $\mu\text{mol/L}$  para os receptores opioides. A seletividade é maior pelos receptores do tipo  $\mu$ -opioide (Lee et al., 1993; Raffa et al., 1992).

### 1.5.2 MONOAMINAS

Como já citado, o tramadol age melhorando a modulação central da dor (Scott & Perry, 2000), atuando na liberação e recaptção dos neurotransmissores serotonina (5-HT) e noradrenalina (NA) (Lee et al., 1993; Sawynok, 1989) e agindo em neurônios de segunda ordem na medula espinhal (Lee et al., 1993; Scott & Perry, 2000). Desse modo, pode gerar síndrome serotoninérgica e reduzir o limiar convulsivo em pacientes com uso concomitante de fármacos que inibem a recaptção de 5-HT ou que tenham crises convulsivas (Miotto et al., 2017; Sansone & Sansone, 2009).

Estudos mostram que a naloxona reverte apenas parcialmente a antinocicepção em modelo de dor por compressão mecânica (Kayser et al., 1991), térmica (placa quente) e contorção abdominal (Raffa et al., 1992), sugerindo que não haja participação somente do mecanismo opioide na analgesia pelo tramadol. Além disso, antagonistas noradrenérgico e

serotoninérgico foram capazes de reverter a antinocicepção em modelos de dor térmica (tail-flick) e compressão de pata (Lee et al., 1993; Raffa et al., 1992).

O estudo do mecanismo de ação sobre as monoaminas é realizado tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Pesquisadores mostraram que em sinaptossomas de cérebro de ratos o tramadol inibiu a captação de 5-HT e NA (Hennies et al., 1982). Foi avaliado também o sistema dopaminérgico e o tramadol inibiu fracamente a captação de dopamina em sinaptossomas do núcleo caudado (Driessen et al., 1993). O tramadol também pode ser capaz de aumentar o efluxo de monoaminas no SNC contribuindo para a modulação descendente nociceptiva, sendo o enantiômero (+)-tramadol responsável pelo aumento do efluxo de 5-HT no núcleo dorsal da rafe em ratos (Bamigbade et al., 1997).

Existem evidências de inibição do transportador de NA, mas ainda são necessários mais estudos, uma que vez que os sítios de inibição do tramadol ainda não está bem esclarecido (Sagata et al., 2002). Faron-Górecka et al. (2004) sugeriram em seu trabalho o possível efeito de *down-regulation* do tramadol sobre os receptores inibitórios alfa-2-adrenérgicos ( $\alpha_2$ ), mas que também é alvo de uma teoria de mecanismo de ação que ainda merece maiores estudos.

Em modelos de nocicepção térmica e administração sistêmica de tramadol em camundongos, antagonistas serotoninérgicos foram capazes de interferir na antinocicepção do tramadol. SB269970, um antagonista dos receptores 5-HT<sub>7</sub>, reduziu a antinocicepção no *tail-flick*, assim como em modelo de dor incisional em pata associada à placa quente. Nesse último modelo, esse antagonista foi capaz de bloquear os efeitos do tramadol e de seu metabólito M1 (Yanarates et al., 2010). Rojas-Corrales et al. (2000) também utilizaram testes

de nocicepção térmica para avaliar os efeitos do tramadol sobre o sistema serotoninérgico e, ao injetar o agonista do receptor 5-HT<sub>1A</sub>, 8-OH-DPAT, ocorreu redução da latência de resposta sugerindo redução da antinocicepção do tramadol, enquanto que ao injetar pindolol, um antagonista 5-HT<sub>1A</sub> (e antagonista não seletivo dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos), houve um aumento da latência de resposta antinociceptiva do tramadol.

### 1.5.3 ÓXIDO NÍTRICO E CANAIS PARA POTÁSSIO

Outros mecanismos de ação também podem ser citados, como participação na via do óxido nítrico e abertura de canais para potássio (Bravo et al., 2017).

TSAI et al. (2006) estudaram uma linhagem celular que expressa RNAm de canais para potássio (K<sup>+</sup>) de retificação retardada (Brown & Higashida, 1988) e avaliaram o efeito do tramadol sobre os potenciais de membrana dessas células. Os resultados demonstraram que o tramadol é capaz de inibir as correntes de K<sup>+</sup> de retificação retardada reduzindo assim a excitabilidade neuronal e, de certo modo, reduzindo também a nocicepção.

Os canais para K<sup>+</sup> aumentam o fluxo desse íon pela membrana, controlando a atividade neuronal e a propagação do sinal, o que contribui para a modulação da dor (Yalcin & Aksu, 2005). Trabalhos com opioides fortes como a morfina mostraram que o bloqueio desses canais reduz o efeito antinociceptivo desses opioides (Ocaña et al., 1990). Ainda, ao injetar os bloqueadores 4-aminopiridina (4-AP) e tetraetilamônio (TEA) sistemicamente, pode-se verificar redução dos efeitos antinociceptivos do tramadol no teste da placa quente em camundongos (Yalcin & Aksu, 2005).

A via do óxido nítrico (NO) também pode participar do mecanismo de ação do tramadol. Inibidores da NO sintase (NOS) e da guanilato ciclase solúvel (GC) quando injetados sistemicamente são capazes de realizar antinocicepção independente de opioides e, ainda, há evidências de que o sistema NO-GMPc participem da transmissão nociceptiva supraespinhal (Yalcin & Aksu, 2005). Ao injetar precursor da NOS, L-arginina, há redução do efeito antinociceptivo do tramadol. Por outro lado, ao injetar N<sup>w</sup>-nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME), um bloqueador da NOS, o efeito analgésico do tramadol é potencializado, sugerindo que haja, de fato, participação da via do óxido nítrico no mecanismo de ação desse analgésico (Yalcin & Aksu, 2005).

#### 1.5.4 CANABINOIDE

É sabido que o sistema opioide está indiretamente ligado ao mecanismo de ação do tramadol uma vez que o metabólito M1 possui maior afinidade pelos receptores  $\mu$ -opioide, motivo pelo qual essa droga é inserida nessa classe de medicamentos. No entanto, estudos mostram que diversos outros sistemas estão envolvidos na analgesia pelo tramadol, droga essa considerada como indutora de analgesia multimodal.

A relação do sistema opioide e endocanabinoide vem sendo estudada em vários trabalhos e em diversas áreas (Pacheco et al., 2008, 2009). No entanto, poucos trabalhos são encontrados na literatura a respeito desse sistema relacionado ao mecanismo de ação do tramadol.

Alsalem et al. (2019) estudaram a interação do receptor canabinoide 1 (CB<sub>1</sub>) e o tramadol em modelo de inflamação intraplantar em ratos. Não ficando evidenciada nenhuma relação. Já Stachtari et al. (2014) avaliaram os receptores canabinoides 2 (CB<sub>2</sub>) e o tramadol. Esses receptores geralmente estão



envolvidos com o sistema imune e são expressos em baixos níveis no SNC, no entanto, em condições álgicas passam a ser hiper expressos nessa região. Desse modo, esses pesquisadores utilizaram o modelo de incisão plantar em ratos e nocicepção térmica para verificar a participação do sistema endocanabinoide na analgesia do tramadol. O antagonista CB<sub>2</sub> reverteu o efeito antinociceptivo obtido pela associação de tramadol com um agonista CB<sub>2</sub>. Isso sugere uma possível participação do sistema endocanabinoide na antinocicepção do tramadol.

## 1.6 USO DE OPIOIDES E TRAMADOL EM MEDICINA VETERINÁRIA

Em Medicina Veterinária os opioides são amplamente utilizados como principais fármacos para controle da dor moderada a severa, de origem aguda ou crônica (Epstein et al., 2015). A dor nos animais, apesar de difícil mensuração, compromete a qualidade de vida dos indivíduos, além de, muitas vezes, ser justificativa para abandono e até mesmo eutanásia, quando não é devidamente controlada e a causa tratada (Bell, 2018). Dentre os representantes do grupo pode-se citar os de uso praticamente exclusivo em ambiente hospitalar, como a morfina e fentanil, e os de prescrição, como codeína e tramadol. São considerados fármacos relativamente seguros, eficazes, com um bom custo-benefício e com bom potencial de reversibilidade dos efeitos adversos (Simon & Steagall, 2017).

Os opioides são comumente utilizados em protocolos de medicação pré-anestésica associados a outros fármacos para produzir neuroleptoanalgesia, gerando analgesia e sedação, um protocolo para anestesia multimodal. Além disso, também são utilizados em anestesia peridural, principalmente opioides

fortes, como a morfina (Kona-Boun et al., 2006; Muir et al., 2003; Simon & Steagall, 2017).

A utilização local de opioides também é utilizada, porém em menor escala, a mais comum por via intra-articular, após artroscopia, com injeção de morfina, por exemplo (Keates et al., 1999; Simon & Steagall, 2017). Isso se deve ao fato de que em tecidos inflamados os receptores opioides estão em maior quantidade, o que faz com que a ação local desses fármacos fique potencializada em lesões do tipo inflamatórias e sua ação é dose-dependente (Keates et al., 1999).

O metabolismo do tramadol em cães possui algumas peculiaridades que diferem de outras espécies, como os felinos e humanos. A concentração plasmática de M1 em cães é menor quando o tramadol é administrado por via oral, quando comparada com humanos, de forma que há uma maior requisição de doses ao longo do dia, sendo administrado geralmente três vezes ao dia para manter a concentração desse metabólito no plasma e, assim, a analgesia opioide. Ademais, a depuração sistêmica do tramadol parece ser mais rápida que em humanos, uma vez que em cães os opioides podem sofrer glucurinação extrahepática (Kukanich & Papich, 2004). Além disso, há uma fraca conversão da mistura racêmica em metabólitos, o que confere baixa analgesia opioide (Kukanich & Papich, 2004). Estudos em beagles sugerem que a razão M1:tramadol após administração oral é baixa e, por isso, outros metabólitos devem ser produzidos em maior quantidade quando comparados a M1 (Kukanich & Papich, 2004).

Já em gatos, é possível que o efeito opioide do tramadol seja devido a M1, cuja afinidade é maior por receptores opioides (Ide et al., 2006; Pypendop

et al., 2009). Quando o tramadol é administrado por via oral, ocorre a primeira passagem hepática formando o metabólito M1 via demetilação, um dos metabolismos de primeira fase. Nos felinos domésticos o clearance de M1 é menor que em cães, com meia vida maior. Isso significa que o fígado felino possui uma capacidade menor de biotransformar o tramadol, não na fase I, mas na fase II, uma vez que há deficiência na glucurinação. Desse modo, o metabólito M1, que, ao contrário de cães (Kukanich & Papich, 2004), é um dos mais importantes produzidos e permanece exercendo seu efeito. A razão M1:tramadol nessa espécie é próxima de 1 (Pypendop & Ilkiw, 2007). O efeito adverso mais comum é o padrão excitatório que o animal pode desenvolver (Steagall et al., 2008). Outros efeitos são mais observados em gatos, como depressão respiratória, sedação, midríase, constipação, vômito e síndrome serotoninérgica (Indrawirawan & McAlees, 2014; Simon & Steagall, 2017). Em gatos com osteoartrite, o uso crônico de tramadol melhora as condições físicas dos animais e pouca sensibilização central, apesar de causar excitação em alguns indivíduos (Monteiro et al., 2017).

---

## JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

## 2. JUSTIFICATIVA

A utilização do tramadol a nível local vem sendo estudada de forma débil, com poucos trabalhos na literatura a respeito. Geralmente a administração subcutânea ou intradérmica de opioides em humanos não é preconizada, de forma que parece não ser alvo de muitos estudos.

Em Medicina Veterinária a administração subcutânea de fármacos é largamente utilizada. Devido à dificuldade de contenção ou mesmo à complexidade de alguns procedimentos, faz-se necessário o uso de fármacos sedativos ou analgésicos mais potentes de forma injetável. Uma vez que já existe descrição na literatura de um possível efeito antinociceptivo local do tramadol, essa seria uma estratégia para reduzir os efeitos adversos de uma administração sistêmica do tramadol para pequenos procedimentos ou analgesia local de lesões ou tecidos inflamados. Além disso, por essa via não há metabolismo de primeira passagem, sendo útil em animais hepatopatas ou aqueles que estão sob uso de fármacos que reduzem a biodisponibilidade de enzimas CYP. No entanto, as vias antinociceptivas pelas quais o tramadol exerce a antinocicepção local ainda não estão bem elucidadas, de forma que o presente trabalho se dedicou a estudar por quais vias o tramadol poderia exercer a antinocicepção em modelo animal.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os mecanismos envolvidos na antinocicepção periférica induzida pelo tramadol em modelo de hiperalgesia mecânica em ratos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar o efeito antinociceptivo induzido por tramadol em modelo de hiperalgesia em pata induzida por prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>);
- Identificar a melhor dose de tramadol para administração intraplantar (i.pl.);
- Avaliar o possível efeito sistêmico do tramadol para a dose definida como periférica para os demais experimentos;
- Estudar os seguintes sistemas possivelmente envolvidos na antinocicepção periférica do tramadol:
  - opioide
  - canabinoide
  - NO e do segundo mensageiro GMPc
  - canais para K<sup>+</sup>: ATP-sensíveis (K<sub>ATP</sub>), voltagem dependentes (K<sub>v</sub>) e ativados por cálcio (K<sub>Ca</sub>)
  - sistemas monoaminérgicos: noradrenérgico, serotoninérgico e dopaminérgico

---

## MATERIAIS E MÉTODOS

## 4. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos, peso médio  $170 \pm 30$  g, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-ICB/UFMG). Para o experimento, os animais foram mantidos, nos dois dias anteriores e no próprio dia do experimento, em caixas de plástico com cama de maravalha, sob condições controladas de temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas, com luz iniciando às 07:00 h) para ambientalização. Tinham livre acesso à ração e água. Todos os experimentos foram realizados entre 07:00 h e 17:00 h, na fase clara. Os animais foram ambientalizados ao aparelho algosimétrico no dia anterior aos testes. Após os procedimentos experimentais esses animais foram eutanasiados com solução de cetamina (300 mg/Kg) e xilazina (15 mg/Kg), por via intraperitoneal. Este projeto teve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA UFMG) sob protocolo nº 138/2019 (**anexo I**).

## 5. DROGAS E SOLVENTES

### 5.1 AGENTE HIPERALGÉSICO

- $\text{PGE}_2$  (Sigma, EUA) mantida em freezer, dissolvida em etanol. Imediatamente antes das injeções, foi diluída em solução salina (NaCl 0,9%), obtendo-se concentração final de 2% em salina.

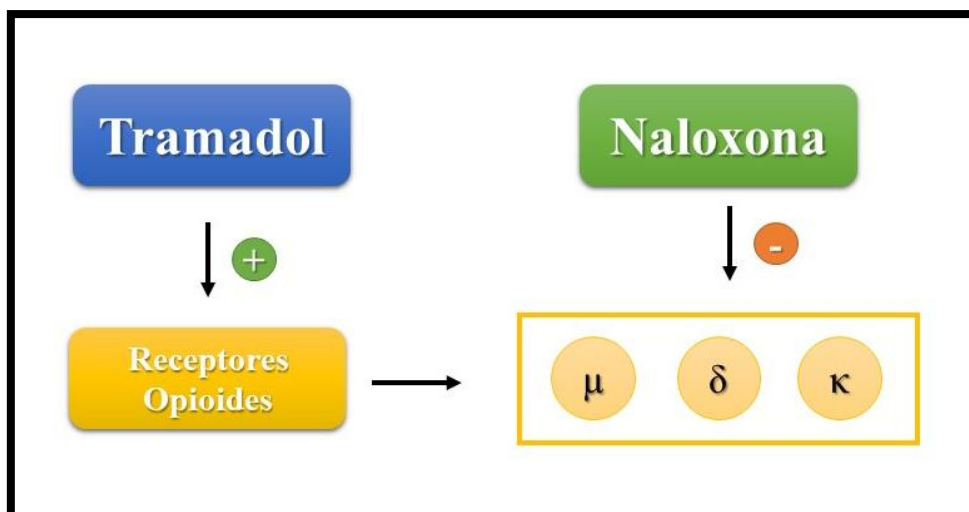


## 5.2 SUBSTÂNCIA ANTINOCICEPTIVA SOB TESTE

- Tramadol (Cloridato, Teuto, Brasil), mantido em freezer e diluído em solução salina imediatamente antes das injeções.

## 5.3 FÁRMACOS ENVOLVIDOS NA VIA OPIOIDÉRGICA

- Naloxona (Sigma, EUA), antagonista não seletivo dos receptores  $\mu$ -opioides, dissolvida em solução salina.

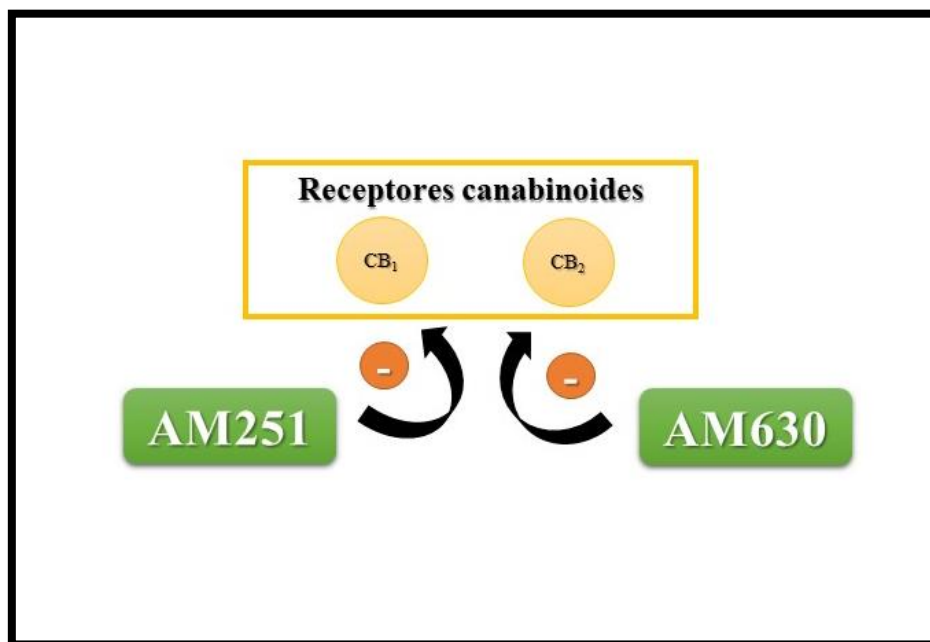


**Figura 4** – Proposta de esquema de fármacos que interagem com o sistema opioidérgico e suas ações

## 5.4 FÁRMACOS ENVOLVIDOS NA VIA CANABINOIDÉRGICA

- AM251 [1-(2,4-diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N-(1-piperidil)pirazol-3-carboxamida] (Sigma, EUA), antagonista  $CB_1$ , dissolvido em DMSO 10% em salina.

- AM630 {[6-iodo-2-metil-1-(2-4-morfolinil)etil]-1H-indol-3-il(4-motoxifenil-metanona)} (Sigma, EUA), antagonista seletivo CB<sub>2</sub>, dissolvido em DMSO 10% em salina.

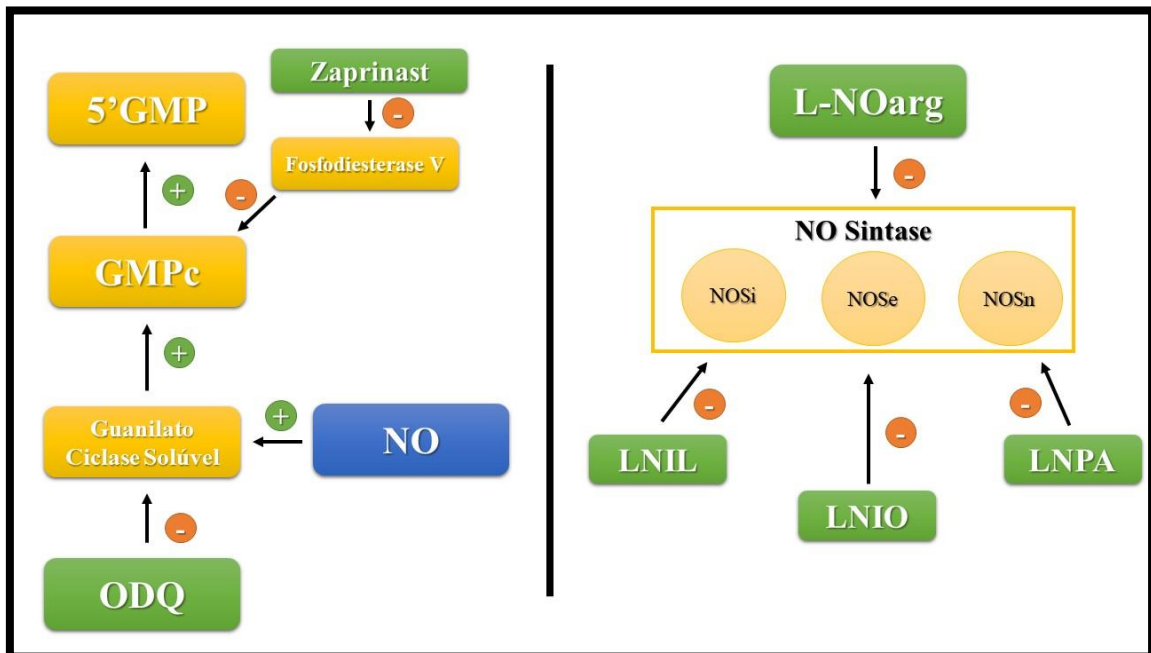


**Figura 5** – Esquema de fármacos que interagem com o sistema canabinoide e suas ações

## 5.5 FÁRMACOS ENVOLVIDOS NA VIA L-ARGININA/NO/GMPC

- L-NOarg (L<sup>G</sup>-Nitro-L-arginina) (RBI, EUA), inibidor não seletivo das enzimas NOS, dissolvido em salina.
- L-NPA (N<sup>w</sup>-propil-L-arginina) (Tocris, EUA), inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase neuronal (NOS<sub>n</sub>), dissolvido em salina.
- L-NIO (dihidrocloridrato de N<sup>5</sup>-(1-iminoetil)-L-ornitina) (Tocris, EUA), inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase endotelial (NOS<sub>e</sub>)

- L-NIL (hidrocloridrato de N<sup>6</sup>-(1-iminoetil)-L-lisina) (Tocris, EUA), inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase induzível (NOSi), dissolvido em salina.
- ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalina-1-ona) (Tocris, EUA), inibidor seletivo da enzima GC, dissolvido em DMSO 10% em salina.
- Zaprinast (Cayman Chemical, EUA), inibidor da fosfodiesterase de GMPc, dissolvido em DMSO 10%.

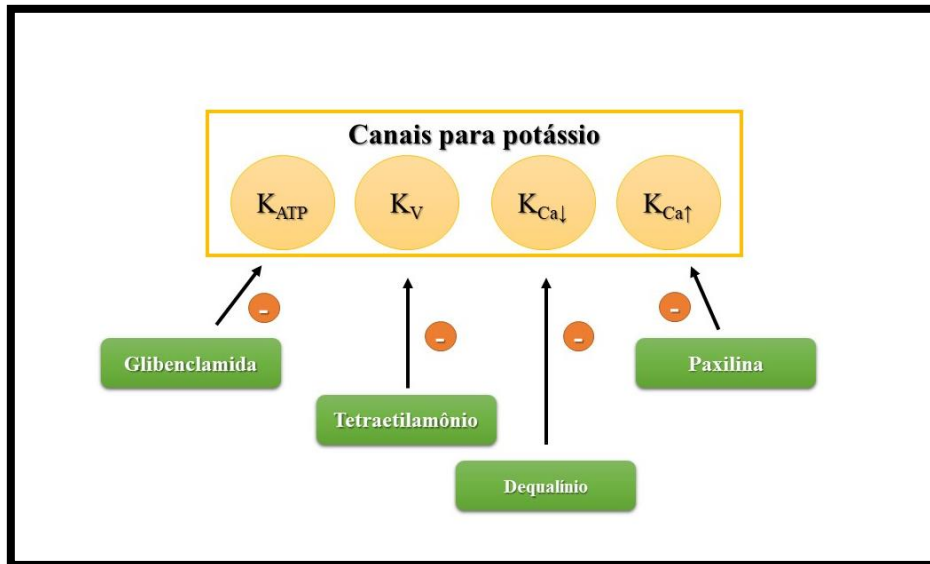


**Figura 6** – Esquema de fármacos que interagem com o sistema nitrérgico e suas ações

## 5.6 FÁRMACOS ENVOLVIDOS COM CANAIS PARA K<sup>+</sup>

- Glibenclamida (Sigma, EUA), bloqueador seletivo dos K<sub>ATP</sub>, dissolvida em Tween20 1% em salina.
- TEA (Sigma, EUA), bloqueador seletivo dos K<sub>v</sub>, dissolvido em salina.

- Cloreto de dequalínio (Sigma, EUA), bloqueador seletivo dos  $K_{Ca}$  de baixa condutância, dissolvido em salina.
- Paxilina (Sigma, EUA), bloqueador seletivo dos  $K_{Ca}$  de alta condutância, dissolvido em salina.

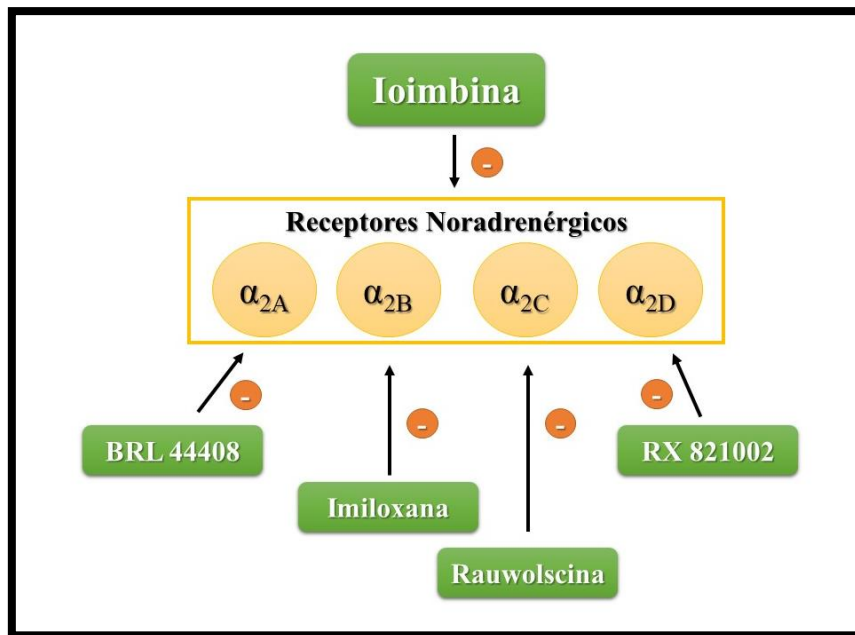


**Figura 7** – Esquema de fármacos que interagem com os canais para potássio e suas ações

## 5.7 FÁRMACOS ENVOLVIDOS NA VIA NORADRENÉRGICA

- Ioimbina (Sigma, EUA), antagonista não seletivo de  $\alpha_2$ , dissolvida em salina.
- BRL 44480 (Tocris, EUA), antagonista seletivo dos receptores  $\alpha_{2A}$ -adrenérgicos, dissolvido em salina.
- Imiloxana (Tocris, EUA), antagonista seletivos dos receptores  $\alpha_{2B}$ -adrenérgicos, dissolvida em salina.
- Rauwolscina (Tocris, EUA), antagonista seletivos dos receptores  $\alpha_{2C}$ -adrenérgicos, dissolvida em salina.

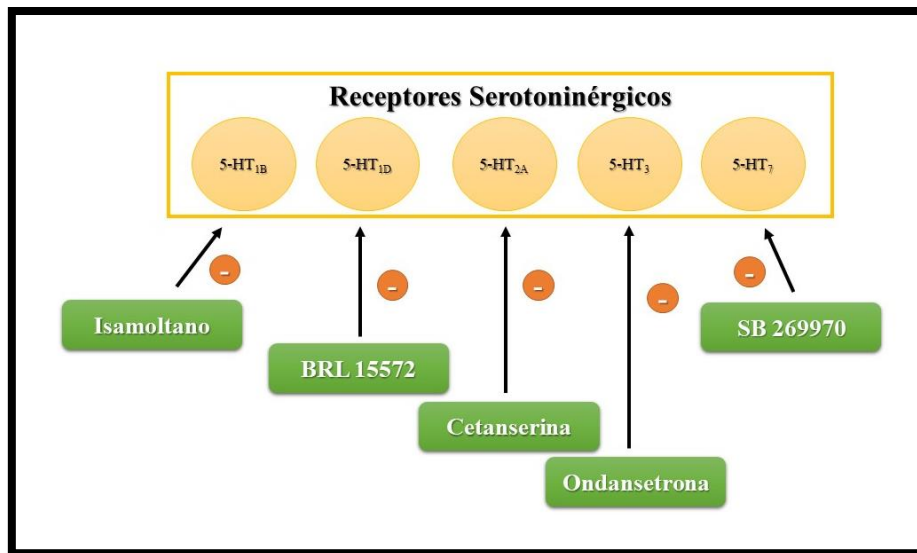
- RX 821002 (Tocris, EUA), antagonista dos receptores  $\alpha_{2D}$ -adrenérgicos, dissolvido em salina.



**Figura 8** – Esquema de fármacos que interagem com o sistema noradrenérgico e suas ações

## 5.8 FÁRMACOS ENVOLVIDOS NA VIA SEROTONINÉRGICA

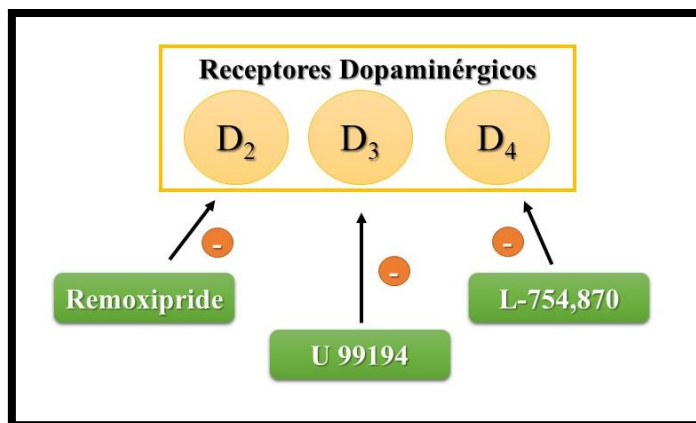
- Isamoltano (Tocris, EUA), antagonista seletivo dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1B</sub>, dissolvido em salina.
- BRL 15572 (Sigma, EUA), antagonista seletivo dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1D</sub>, dissolvido em salina.
- Cetanserina (Biotrend, Suíça), antagonista seletivo dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A</sub>, dissolvido em salina.
- Ondansetrona (Cristália, Brasil), antagonista seletivo dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub>, dissolvido em salina.
- SB 269970 (Sigma, EUA), antagonista seletivo dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>7</sub>, dissolvido em salina.



**Figura 9** – Esquema de fármacos que interagem com o sistema serotoninérgico e suas ações

## 5.9 FÁRMACOS ENVOLVIDOS NA VIA DOPAMINÉRGICA

- Remoxipride (Tocris, EUA), antagonista seletivo dos receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>, dissolvido em salina.
- U99194 (Tocris, EUA), antagonista seletivo dos receptores dopaminérgicos D<sub>3</sub>, dissolvido em salina.
- L-754,870 (Tocris, EUA), antagonista seletivo dos receptores dopaminérgicos D<sub>4</sub>, dissolvido em salina.



**Figura 10** – Esquema de fármacos que interagem com o sistema dopaminérgico e suas ações

## 6. ADMINISTRAÇÃO DE FÁRMACOS

As soluções preparadas foram administradas por via subcutânea na superfície plantar da pata posterior do rato (via intraplantar), num volume de 50  $\mu$ L/pata para todas os fármacos, exceto PGE<sub>2</sub>, cujo volume foi de 100  $\mu$ L/pata (**Figura 11**).

Foi utilizada a pata direita, exceto para o teste de exclusão do efeito sistêmico, no qual foram utilizadas ambas as patas posteriores para injeção de PGE<sub>2</sub>.



**Figura 11** – Administração intraplantar subcutânea em pata posterior de rato

## 7. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 7.1 TESTE ALGESIMÉTRICO

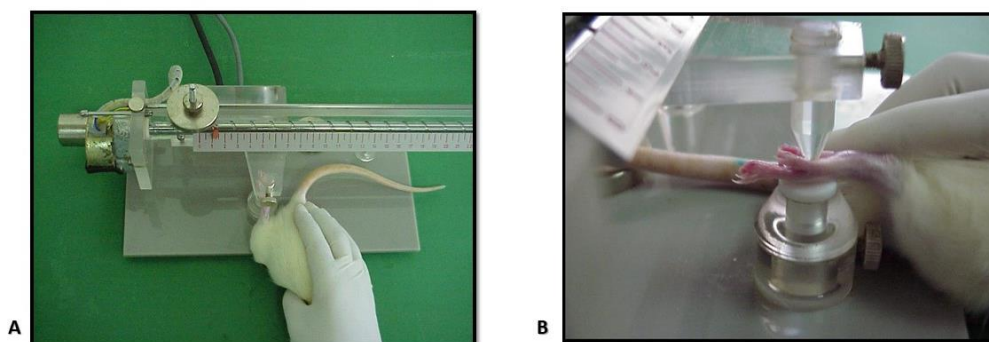
Para a medida do limiar nociceptivo foi utilizado o método de retirada de pata do rato submetida à compressão, descrito originalmente por Randall & Selitto (1957). Esses autores desenvolveram uma técnica para medir a atividade antinociceptiva, baseada no princípio de que a inflamação aumenta a sensibilidade ao estímulo doloroso (hiperalgesia) e que a sensibilidade aumentada é susceptível de ser modificada por drogas ou procedimentos sob teste.

O aparelho utilizado foi o aparelho algesimétrico da Ugo Basile (Itália) (**Figura 12a**).

No teste, o animal foi cuidadosamente mantido em posição horizontal sobre a bancada, por uma das mãos do experimentador, enquanto a pata sob teste foi colocada, por sua superfície plantar, entre as duas superfícies, constituída por uma parte plana, sobre a qual se apoia a pata do animal, e outra cônica, com uma área de 1,75 mm<sup>2</sup> na extremidade, por meio da qual é aplicada uma pressão na superfície plantar do rato (**figura 12b**). A intensidade da pressão aumenta a uma taxa constante de 32 g/s. O aparelho começa a deslocar o peso à medida que o pedal é acionado pelo pé do experimentador. Ao observar a resposta nociceptiva do animal (reflexo de retirada da pata), o experimentador solta o pedal, interrompendo assim o aumento da pressão imposta à pata. O valor do limiar nociceptivo fica indicado na escala do aparelho, expresso em gramas, através de uma marcação acoplada ao peso. O valor do limiar nociceptivo é aquele indicado na régua multiplicado por 20, já que cada centímetro equivale a 20 g.



Antes de serem realizados os testes, o experimentador passa por um treinamento para detectar o momento em que o animal percebe o estímulo como sendo doloroso e desenvolve a reação reflexa de retirada de pata. Esse treinamento é importante para que não ocorra avaliação incorreta do valor de limiar nociceptivo e o experimentador não confunda a reação aversiva à situação com a resposta nociceptiva do animal. Além disso, durante o treinamento o experimentador aprende a forma correta de contenção manual do animal e a maneira de colocação da pata no aparelho. O animal também é submetido ao aparelho algésimétrico no dia que antecede o teste. Essa ambientalização consiste em submeter o animal à mesma situação que será vivenciada no dia do experimento, com o objetivo de observar a resposta nociceptiva do animal sem que ele manifeste uma reação de fuga quando sua pata é submetida ao aparelho.



**Figura 12 – A)** Aparelho algésimétrico utilizado para medida do limiar nociceptivo em pata de ratos. **B)** Superfície cônica por meio da qual é aplicada pressão na pata de rato.

## 7.2 MEDIDA DO LIMIAR NOCICEPTIVO, HIPERALGESIA E ANTINOCICEPÇÃO

O limiar nociceptivo é a pressão exercida pelo aparelho na qual o animal retira a pata (reflexo nociceptivo).

Antes de ser realizada qualquer administração de fármacos é feita a medida basal do limiar nociceptivo, ou seja, aquele limiar em que não há qualquer substância agindo no tecido do animal, ou o momento zero. Essa medida é feita três vezes, aguardando-se um tempo de 10 segundos entre cada medida e o valor final é a média entre elas.

Para avaliação do tempo de ação do tramadol, foi feito um acompanhamento temporal dos valores de limiar nociceptivo, desde a terceira hora, pico de ação da PGE<sub>2</sub> até a sexta hora, quando não há mais ação do agente hiperalgésico.

Considerando a hiperalgesia como redução do limiar nociceptivo, os demais experimentos tiveram seus resultados expressos em função da diferença ( $\Delta$ ) do limiar basal e aquele medido na 3<sup>a</sup> hora, quando ocorre pico de ação da PGE<sub>2</sub>. Caso antes ou durante a hiperalgesia for administrado algum fármaco e este tiver uma ação antinociceptiva, haverá uma redução da hiperalgesia com consequente redução do  $\Delta$ . Do contrário, caso algum fármaco injetado tenha ação de interrupção de antinocicepção do tramadol, haverá restauração da hiperalgesia e, da mesma forma, aumento dos valores de  $\Delta$  próximos àqueles obtidos quando se administra somente o agente hiperalgésico.

### 7.3 EXCLUSÃO DO EFEITO SISTÊMICO

Para excluir um possível efeito sistêmico, foi injetada PGE<sub>2</sub> em ambas as superfícies plantares. O tramadol foi injetado na superfície plantar da pata direita dos animais do grupo teste na maior dose selecionada e solução salina nos animais do grupo controle. A medida do limiar nociceptivo foi feita nas duas patas.

### 7.4 DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS

As doses e os tempos de injeções das drogas foram baseados em experimentos preliminares (pilotos) e dados da literatura e estão representados na parte superior de todos os gráficos.

A substância nociceptiva sob teste, tramadol, ou o seu veículo foram injetados cinco minutos antes da terceira hora após a injeção da PGE<sub>2</sub>, momento de hiperalgesia máxima provocada por ela.

A naloxona, os agentes do sistema nitrérgico, exceto ODQ e zaprinast, TEA e os antagonistas noradrenérgicos seletivos foram injetados 30 minutos antes do tramadol.

Os antagonistas dos receptores canabinoides e o ODQ foram injetados 10 minutos antes do tramadol.

O zaprinast foi injetado 60 minutos antes da administração do tramadol.

Os bloqueadores de canais para potássio, exceto TEA, foram injetados 5 minutos antes da injeção de tramadol.

A ioimbina foi injetada 40 minutos antes da administração de tramadol.

Os antagonistas serotoninérgicos e dopaminérgicos, exceto remoxipride, foram injetados 15 minutos antes do tramadol.

O Remoxipride foi administrado 25 minutos antes da administração de tramadol.

## 7.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado cálculo do  $n$  amostral de acordo com a fórmula descrita abaixo e encontrado valor de  $n=4,71$ . Assim, para todos os grupos experimentais foram utilizados 5 animais.

$$n = \frac{2 \cdot \sigma^2 \cdot (Z_{\beta} + Z_{\alpha})^2}{E^2}$$

Sendo:

$n$  = número amostral

$\sigma$  = desvio padrão

$Z_{\beta}$  = poder de teste de 80%

$Z_{\alpha}$  = nível de significância alfa = 0,05

$E$  = erro absoluto

$n$  = número amostral

$\sigma$  = 13,6277g

$Z_{\beta}$  = 0,84

$Z_{\alpha}$  = 1,64

$E$  = 22g

Os dados obtidos foram apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M) da intensidade de hiperalgesia e analisados utilizando análise de variância *one-way ANOVA*, seguida de *post-hoc* de Bonferroni para múltiplas comparações. Foram considerados estatisticamente significativos valores menores que 5% ( $p < 0,05$ ). Utilizou-se o programa GraphPad Prism 5.

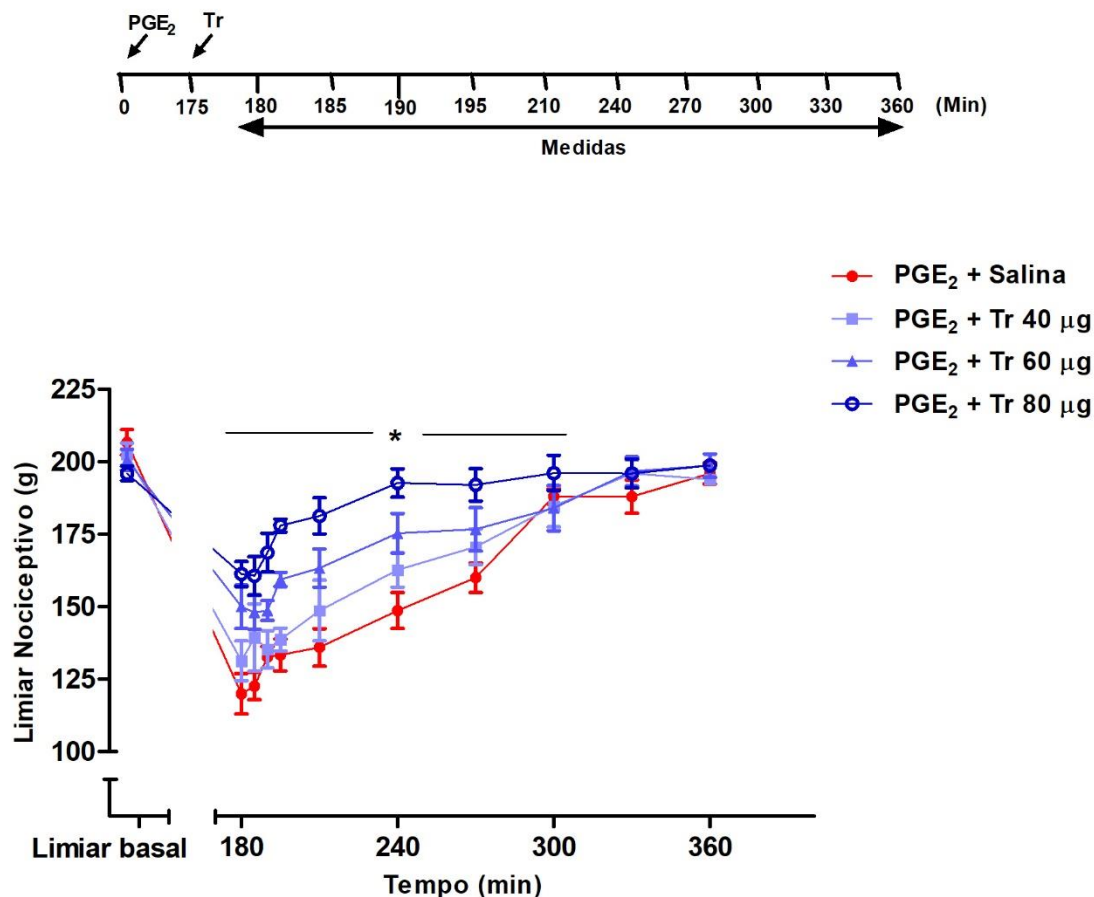
---

## RESULTADOS

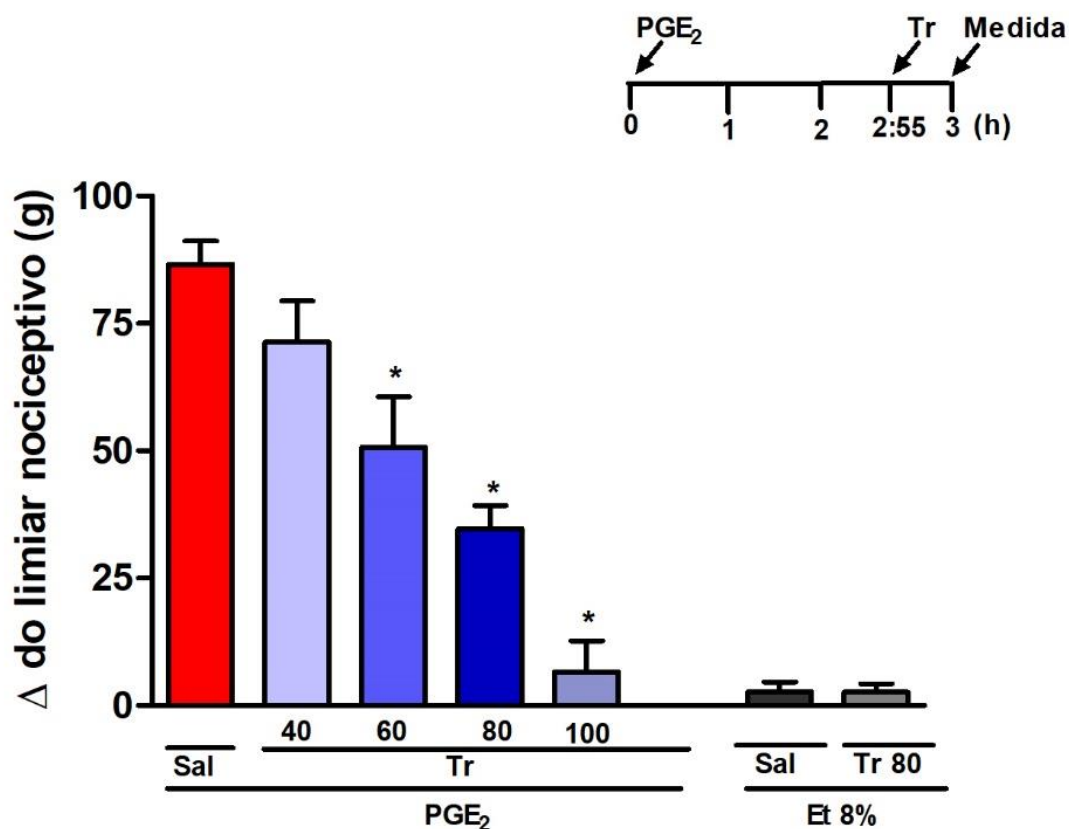
## 8 EFEITO ANTINOCICEPTIVO PERIFÉRICO DO TRAMADOL

Para verificar a melhor dose e o tempo de resposta do tramadol, foi feita uma curva tempo-resposta do tramadol em função da ação de PGE<sub>2</sub> (2 µg/pata) (**Gráfico 1**). Observa-se que o pico de antinocicepção ocorre com 5 minutos da administração, com diminuição gradativa do efeito até seu término, ocorrido com 2 horas, para a maior dose de 80 µg.

Quando os dados foram apresentados com o  $\Delta$  do limiar nociceptivo (**gráfico 2**), ressalta-se que as doses de 80 e 100 µg produziram melhor antinocicepção, revertendo completamente a hiperalgesia. Nesse gráfico é possível observar que o tramadol não causou efeito nociceptivo na ausência de PGE<sub>2</sub>.



**Gráfico 1 – Efeito do tramadol sobre o limiar nociceptivo de ratos com hiperalgesia induzida por PGE<sub>2</sub>.** Tramadol (µg/pata) foi administrado na pata posterior direita 5 minutos antes da 3ª hora após a injeção local de PGE<sub>2</sub> (pico de ação do agente hiperalgésico). A medida do limiar nociceptivo foi realizada de acordo com o descrito em Materiais e Métodos. Cada linha representa a medida e E.P.M referentes ao n=5 animais. \* indica diferença estatística significativa em relação à administração de PGE<sub>2</sub> 2 µg + Salina como controle (P<00,5, ANOVA + *post-hoc* Bonferroni).



**Gráfico 2 – Efeito do tramadol sobre a hiperalgisia induzida por PGE<sub>2</sub> na 3ª hora.** Tramadol (Tr, µg/pata) ou solução salina (Sal, NaCl 0,9%) foram administrados na pata posterior direita 5 minutos antes da 3ª da injeção local de PGE<sub>2</sub> (pico de ação do agente hiperalgésico). A medida do limiar nociceptivo foi realizada de acordo com o descrito em Materiais e Métodos. Cada barra representa a medida e E.P.M referentes ao n=5 animais. \* indica diferença estatística significativa em relação à administração de PGE<sub>2</sub> 2 µg + Salina como controle (P<00,5, ANOVA + *post-hoc* Bonferroni).

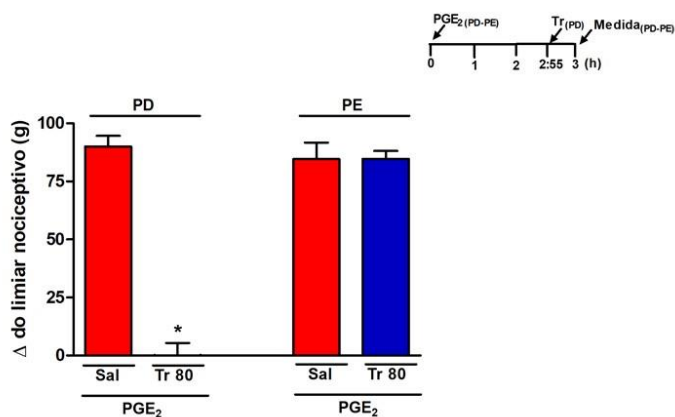


## 9 EXCLUSÃO DO EFEITO SISTÊMICO

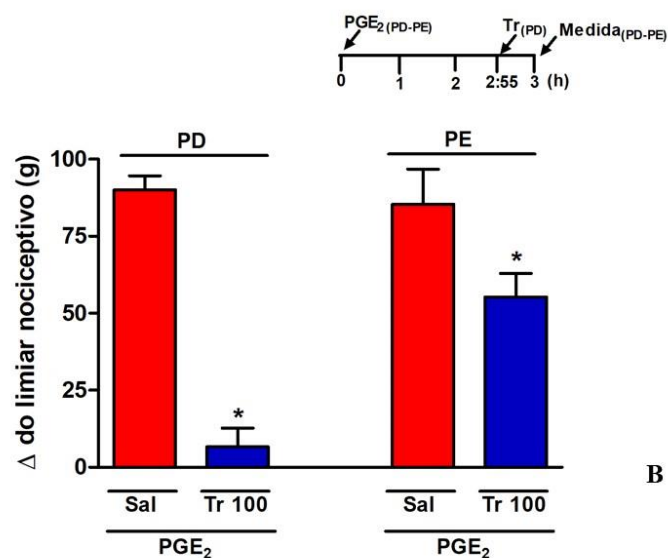
Para avaliar se a dose escolhida para os experimentos não teria efeito sistêmico, foi injetado PGE<sub>2</sub> em ambas as patas e o agente antinociceptivo apenas na pata direita. As duas patas tiveram o limiar nociceptivo aferido no aparelho algosimétrico.

As doses utilizadas foram 80 µg/pata e 100 µg/pata, já que foram capazes de reverter completamente a hiperalgesia induzida pela PGE<sub>2</sub>.

A dose de 100 µg provocou antinocicepção parcial na pata contralateral, enquanto a dose de 80 µg teve seu efeito restrito à pata direita, sugerindo efeito periférico nessa dose (**gráfico 3**). Assim, ela foi escolhida para os demais experimentos realizados.



A



B

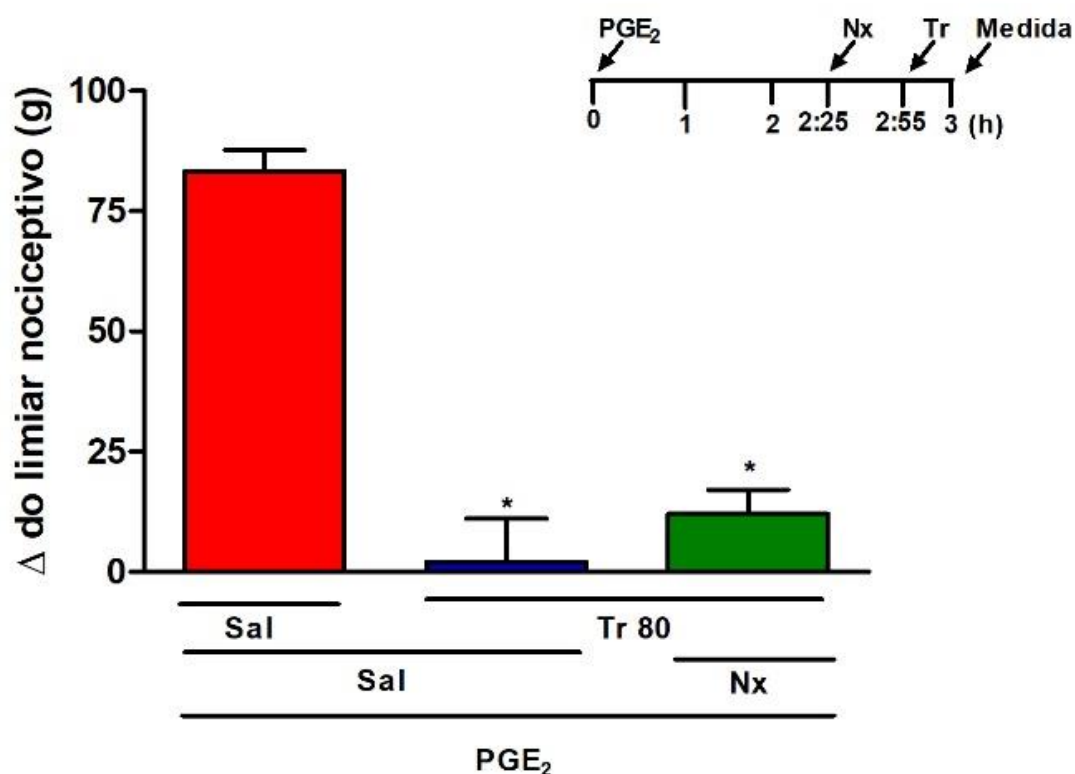
**Gráfico 3 - Exclusão do efeito sistêmico do Tramadol nas doses (A) 80 µg/pata e (B) 100 µg/pata.** PGE<sub>2</sub> foi injetada na pata posterior direita (PD) e na esquerda (PE) e o tramadol (Tr) foi injetado na pata posterior direita. Tramadol foi injetado 5 minutos antes da 3ª hora após administração da PGE<sub>2</sub>. Cada barra representa o E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo (gramas, g). n = 5 animais. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (PGE<sub>2</sub> + Salina, PD e PE). (P<0,05, ANOVA + *Post-hoc* Bonferroni).

## 10 AVALIAÇÃO DO SISTEMA OPIOIDÉRGICO NA ANTINOCICEPÇÃO PERIFÉRICA INDUZIDA PELO TRAMADOL

### 10.1 EFEITO DA NALOXONA SOBRE A ANTINOCICEPÇÃO

#### PERIFÉRICA INDUZIDA PELO TRAMADOL

Para verificar a possível participação de receptores opioides na antinocicepção periférica induzida pelo tramadol (80 µg/pata), foi administrada naloxona i.pl na pata direita dos ratos na dose de 50 µg/pata. Não houve reversão da antinocicepção induzida pelo tramadol (**Gráfico 4**).



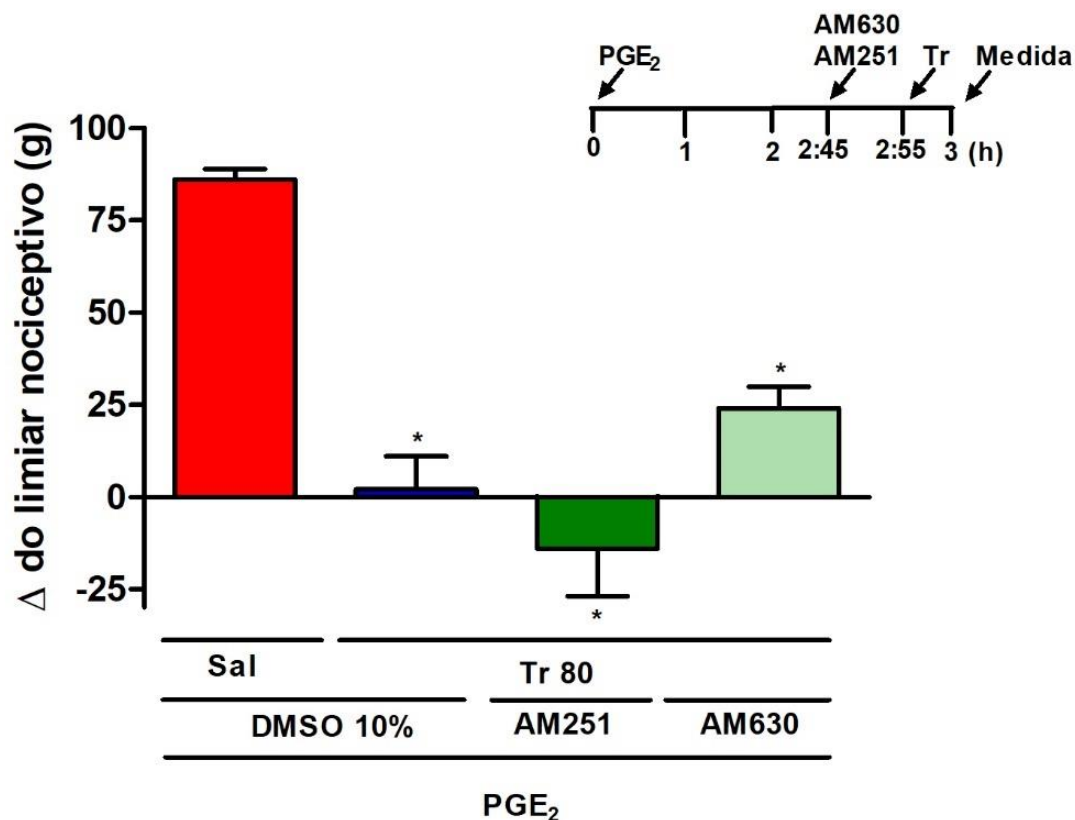
**Gráfico 4 – Efeito da naloxona (Nx, 50µg/pata) sobre a antinociceção periférica induzida pelo tramadol (Tr, 80µg/pata).** A naloxona, tramadol e salina (sal, NaCl 0,9%) foram administrados i.pl na pata direita dos animais de acordo com os tempos indicados no diagrama na parte superior direita do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo (gramas, g). n=5 animais. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (PGE<sub>2</sub> + Sal + Sal). P<0,05 (ANOVA + *post-hoc* de Bonferroni).

## 11 AVALIAÇÃO DO SISTEMA CANABINOIDÉRGICO NA ANTINOCICEPÇÃO PERIFÉRICA INDUZIDA PELO TRAMADOL

### 11.1 EFEITO DOS ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES CB<sub>1</sub> E CB<sub>2</sub> NA ANTINOCICEPÇÃO PERIFÉRICA DO TRAMADOL

Para verificar se há participação dos receptores CB<sub>1</sub> na antinocicepção periférica do tramadol (80 µg/pata), foi administrado o antagonista seletivo AM251, i.pl na pata direita dos ratos na dose de 80 µg/pata. Não houve reversão da antinocicepção periférica induzida pelo tramadol.

Da mesma forma, para avaliar a possível participação dos receptores CB<sub>2</sub> na antinocicepção periférica da droga em estudo, injetou-se o antagonista seletivo AM630 (100 µg/pata) i.pl na pata direita. Não houve antagonismo da antinocicepção (**Gráfico 5**).



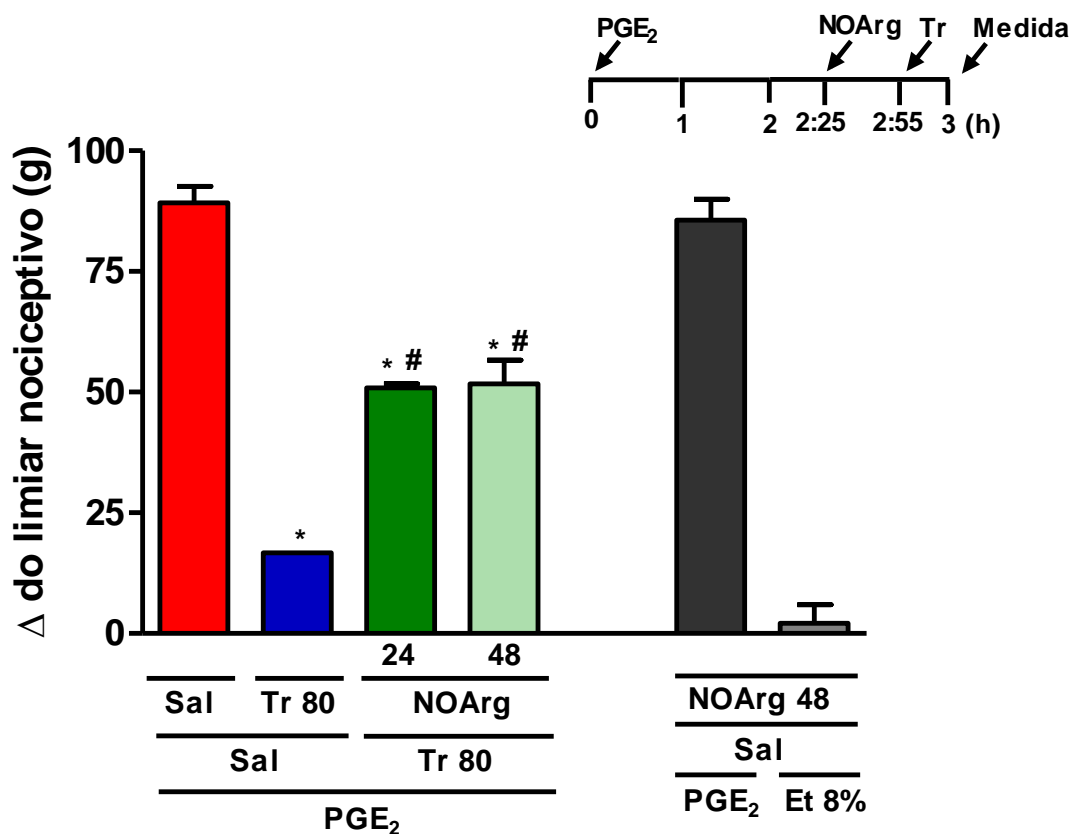
**Gráfico 5 – Efeito dos antagonistas AM251 (80 µg/pata) ou AM630 (100 µg/pata) sobre a antinociceção periférica induzida pelo tramadol (Tr, 80µg/pata).** O AM251, AM630, seus veículos, dimetilsulfóxido 10% (DMSO, 10%) e o tramadol foram administrados i.pl na pata direita dos animais de acordo com os tempos indicados no diagrama na parte superior direita do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo (gramas, g). n=5 animais. \* indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (PGE<sub>2</sub> + DMSO 10% + Sal). P<0,05 (ANOVA + *post-hoc* de Bonferroni).

## 12 PARTICIPAÇÃO DA VIA L-ARGININA/NO/GMP<sub>c</sub> NA ANTINOCICEPÇÃO PERIFÉRICA INDUZIDA PELO TRAMADOL

### 12.1 EFEITO DA INIBIÇÃO DAS ENZIMAS ÓXIDO NÍTRICO

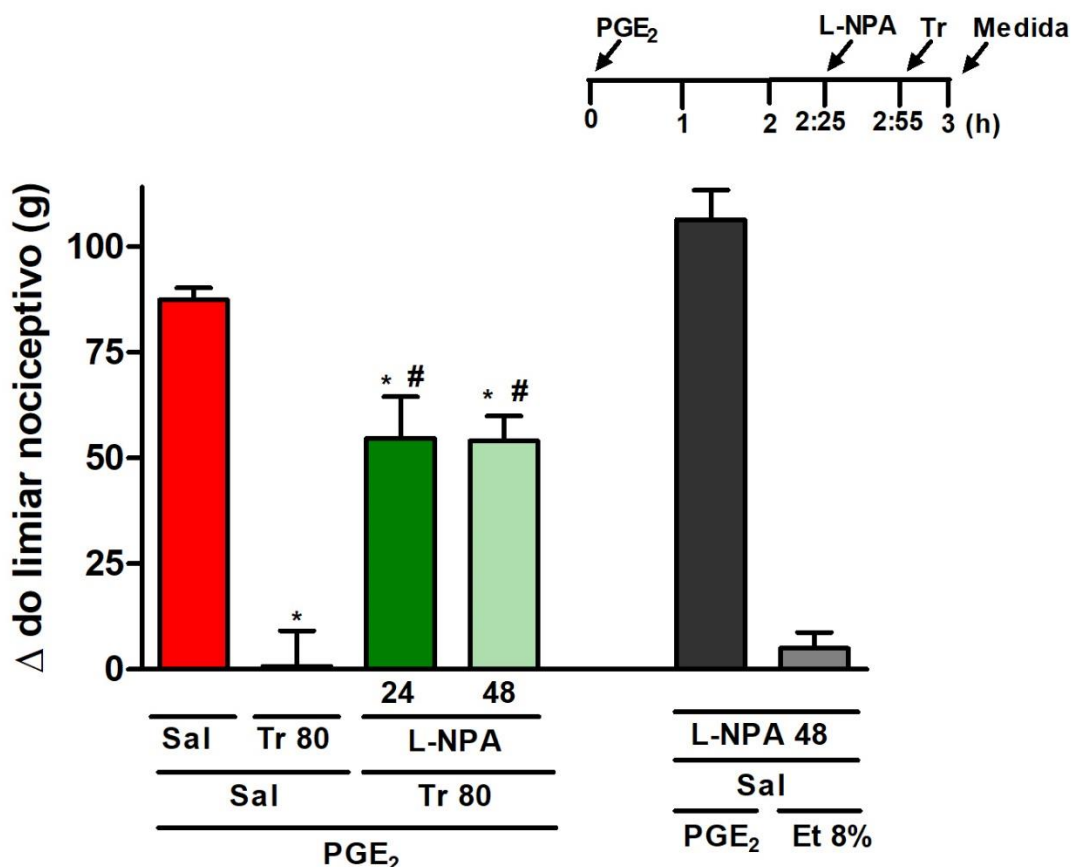
#### SINTASES

O **gráfico 6** mostra que o L-NOarg (24, 48 µg/pata), inibidor não seletivo das enzimas NOS, reverteu parcialmente a antinocicepção periférica induzida pelo tramadol (80 µg/pata). Ao avaliar seletivamente as enzimas, NOS<sub>n</sub>, NOS<sub>e</sub> e NOS<sub>i</sub>, que possivelmente teriam participação na antinocicepção, o L-NPA (24, 48 µg/pata) (**Gráfico 7**) foi capaz de reverter parcialmente a antinocicepção periférica do tramadol e o L-NIO (24, 48 µg/pata) (**Gráfico 8**) conseguiu reverter totalmente a antinocicepção na maior dose. Por outro lado, o L-NIL (24 µg/pata) (**Gráfico 9**) não foi capaz de reverter a antinocicepção periférica do tramadol. Observa-se que nenhum inibidor utilizado foi capaz de causar hiperalgesia ou antinocicepção quando administrado sozinho, conforme registrado nos experimentos à direita de cada gráfico.

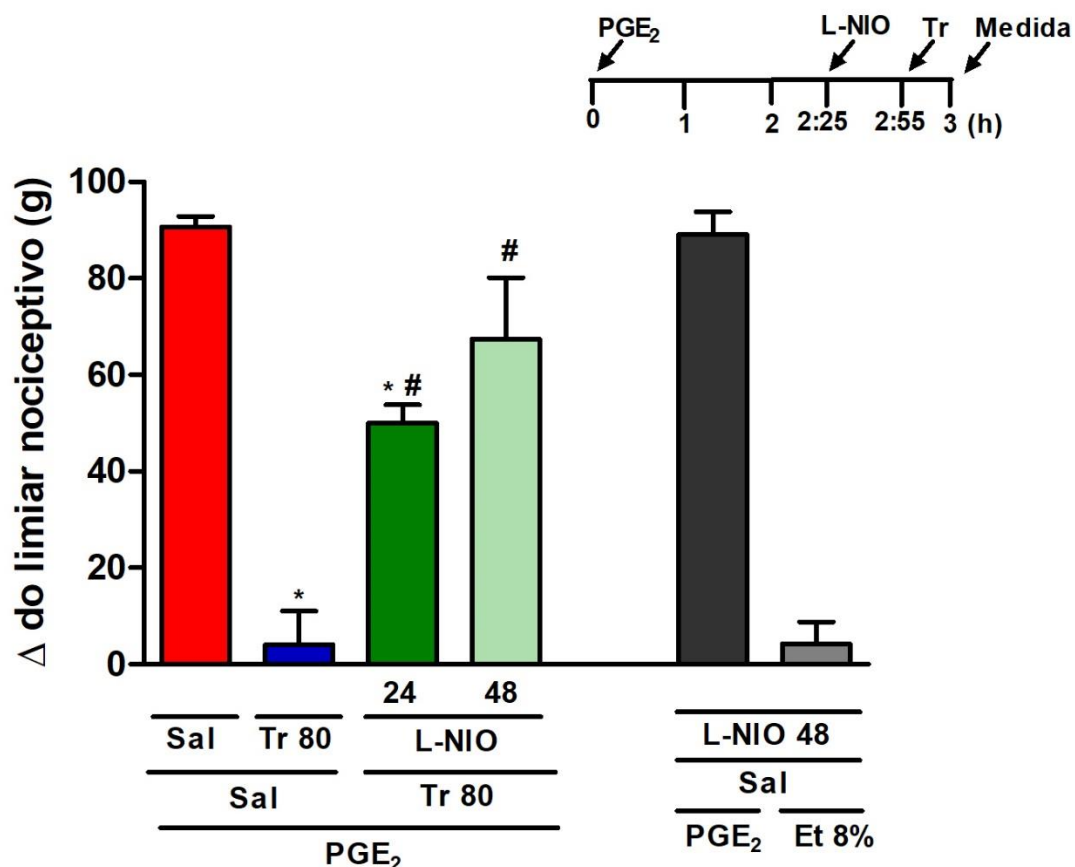


**Gráfico 6 – Reversão parcial do efeito antinociceptivo periférico do tramadol (Tr, 80 µg/pata) pela administração intraplantar de L-NOarg (NOarg, 24,48 µg/pata).** As drogas foram administradas nos tempos indicados no diagrama descrito na parte superior direito do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. n=5. \* indica diferença estatística em relação ao grupo controle hiperálgico (PGE<sub>2</sub> + Sal + Sal). # indica diferença estatística em relação ao grupo controle antinocicepção (PGE<sub>2</sub> + Sal + Tr). P<0,05, ANOVA + *post-hoc* Bonferroni.

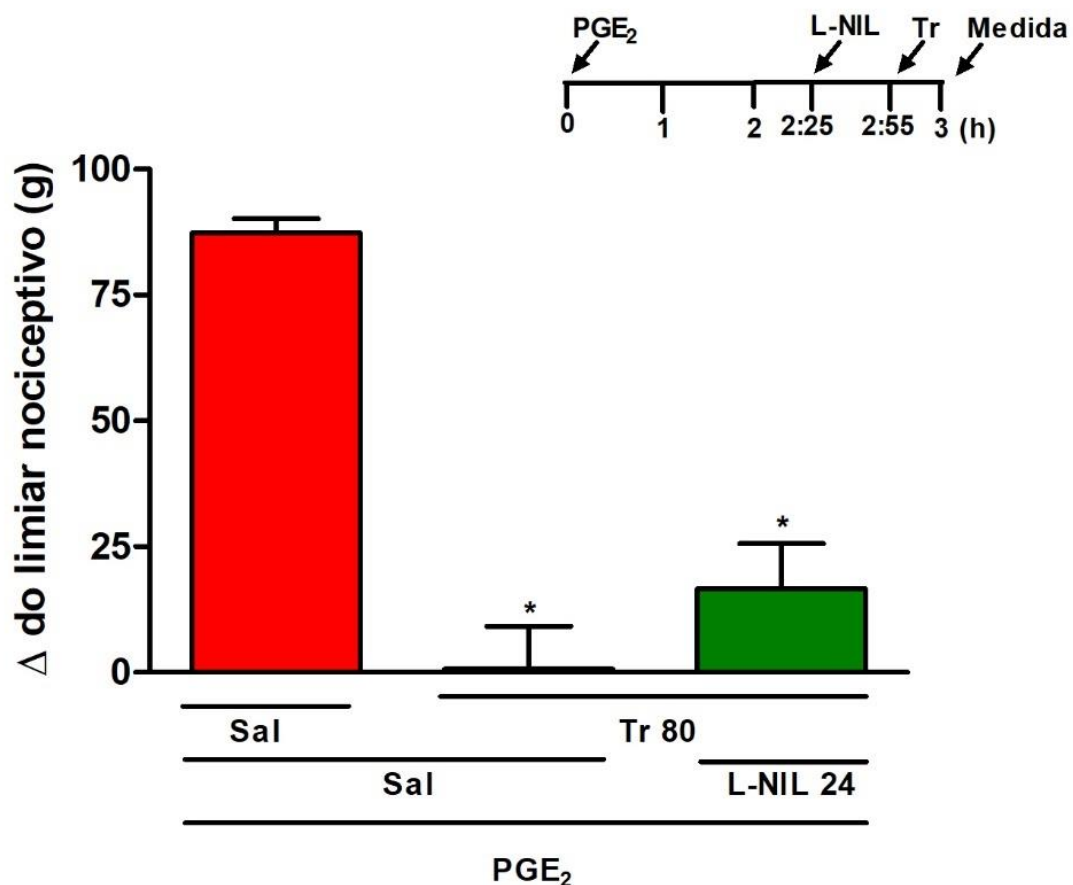




**Gráfico 7 – Reversão parcial do efeito antinociceptivo periférico do tramadol (Tr, 80 µg/pata) pela administração intraplantar de L-NPA (L-NPA, 24,48 µg/pata).** As drogas foram administradas nos tempos indicados no diagrama descrito na parte superior direito do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. n=5. \* indica diferença estatística em relação ao grupo controle hiperálgico (PGE<sub>2</sub> + Sal + Sal). # indica diferença estatística em relação ao grupo controle antinocicepção (PGE<sub>2</sub> + Sal + Tr). P<0,05, ANOVA + *post-hoc* Bonferroni.



**Gráfico 8 – Reversão do efeito antinociceptivo periférico do tramadol (Tr, 80 µg/pata) pela administração intraplantar de L-NIO (L-NIO, 24,48 µg/pata).** As drogas foram administradas nos tempos indicados no diagrama descrito na parte superior direito do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. n=5. \* indica diferença estatística em relação ao grupo controle hiperalgésico (PGE<sub>2</sub> + Sal + Sal). # indica diferença estatística em relação ao grupo controle antinociceção (PGE<sub>2</sub> + Sal + Tr). P<0,05, ANOVA + *post-hoc* Bonferroni.



**Gráfico 9 – Efeito da injeção de L-NIL (48 µg/pata) sobre a antinociceção periférica do tramadol (Tr, 80 µg/pata).** As drogas foram administradas nos tempos indicados no diagrama descrito na parte superior direito do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. n=5. \* indica diferença estatística em relação ao grupo controle hiperalgésico (PGE<sub>2</sub> + Sal + Sal). P<0,05, ANOVA + *post-hoc* Bonferroni.

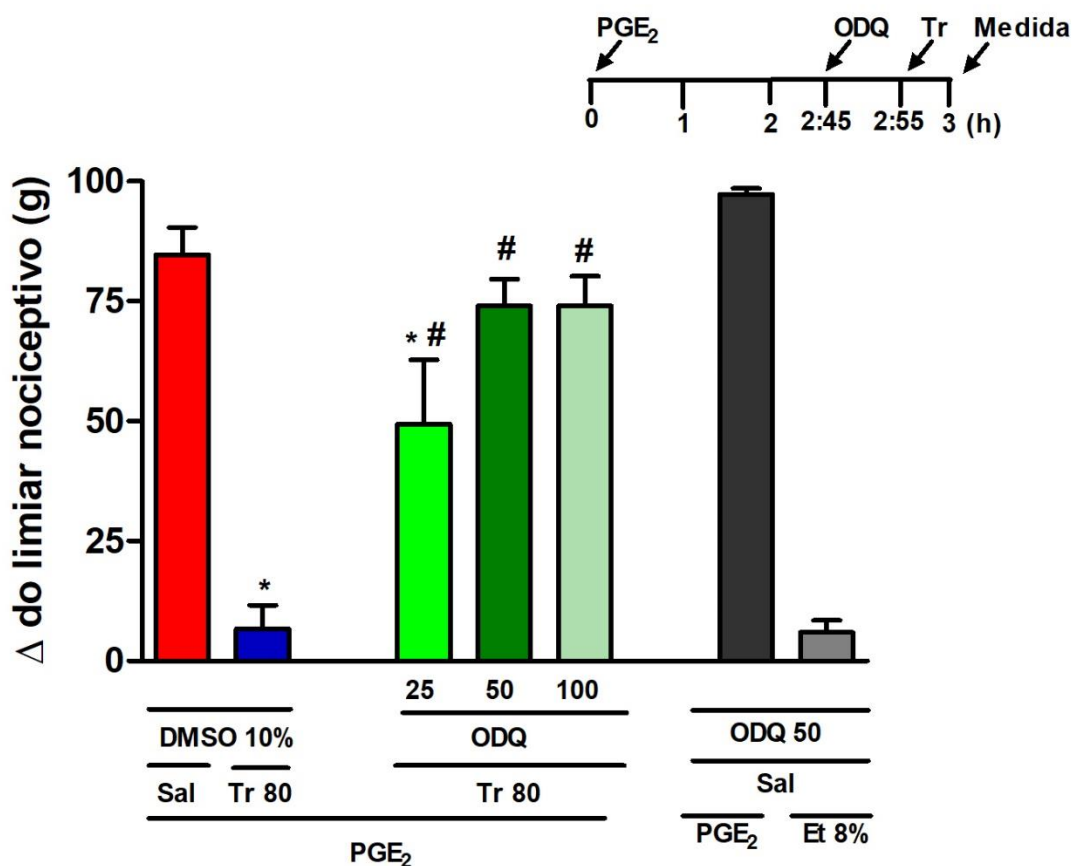
## 12.2 EFEITO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL (GC)

O **gráfico 10** mostra que ao injetar um inibidor da enzima GC, ODQ (25, 50, 100 µg/pata) ocorre reversão da antinocicepção periférica do tramadol (80 µg/pata) de maneira dose-dependente.

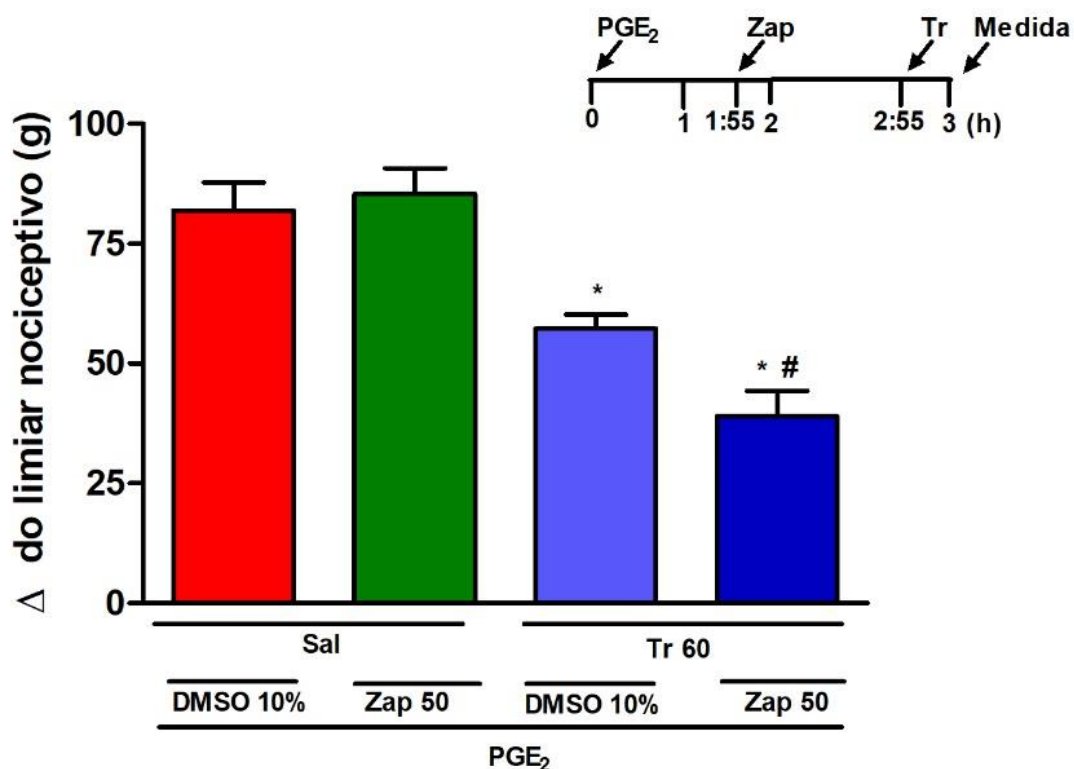
## 12.3 EFEITO DA INIBIÇÃO DA ENZIMA FOSFODIESTERASE V E POSSÍVEL POTENCIALIZAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO

Para verificar a consequência da não degradação intracelular de GMPc, utilizou-se zaprinast (50 µg/pata) administrado i.pl., um inibidor da enzima fosfodiesterase V, que degrada o GMPc. Para esse teste, foi utilizada uma dose de tramadol submáxima (60 µg/pata), para que se pudesse avaliar uma possível potencialização do efeito antinociceptivo devido à inibição da enzima fosfodiesterase V.

O **gráfico 11** mostra que, embora o zaprinast não induza efeito *per se*, induziu potencialização do efeito antinociceptivo periférico do tramadol.



**Gráfico 10 – Efeito da injeção de ODQ (25, 50, 100 µg/pata) sobre a antinocicepção periférica do tramadol (Tr, 80 µg/pata).** As drogas foram administradas nos tempos indicados no diagrama na parte superior direito do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. n=5. \* indica diferença estatística em relação ao grupo controle hiperalgésico (PGE<sub>2</sub> + DMSO 10% + Sal). # indica diferença estatística em relação ao grupo controle antinocicepção (PGE<sub>2</sub> + DMSO 10% + Tr). P<0,05, ANOVA + *post-hoc* Bonferroni.



**Gráfico 11 – Efeito da injeção de zaprinast (Zap, 50 µg/pata) sobre a antinocicepção periférica do tramadol (Tr, 60 µg/pata).** As drogas foram administradas nos tempos indicados no diagrama descrito na parte superior direito do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. n=5. \* indica diferença estatística em relação ao grupo controle hiperalgésico (PGE<sub>2</sub> + DMSO 10% + Sal). # indica diferença estatística em relação ao grupo controle analgésico (PGE<sub>2</sub> + DMSO 10% + Tr 60). P<0,05, ANOVA + *post-hoc* Bonferroni.

## 13 ENVOLVIMENTO DOS CANAIS PARA POTÁSSIO NA ANTINOCICEPÇÃO PERIFÉRICA DO TRAMADOL

### 13.1 CANAIS PARA POTÁSSIO SENSÍVEIS AO ATP ( $K_{ATP}$ )

Para avaliar a participação dos canais para potássio sensíveis ao ATP na antinocicepção periférica do tramadol (80  $\mu\text{g/pata}$ ), foi administrada glibenclamida (20, 40, 80  $\mu\text{g/pata}$ ), bloqueador seletivo de  $K_{ATP}$ .

A glibenclamida foi capaz de reverter a antinocicepção induzida pelo tramadol, mesmo na menor dose avaliada (**gráfico 12**).

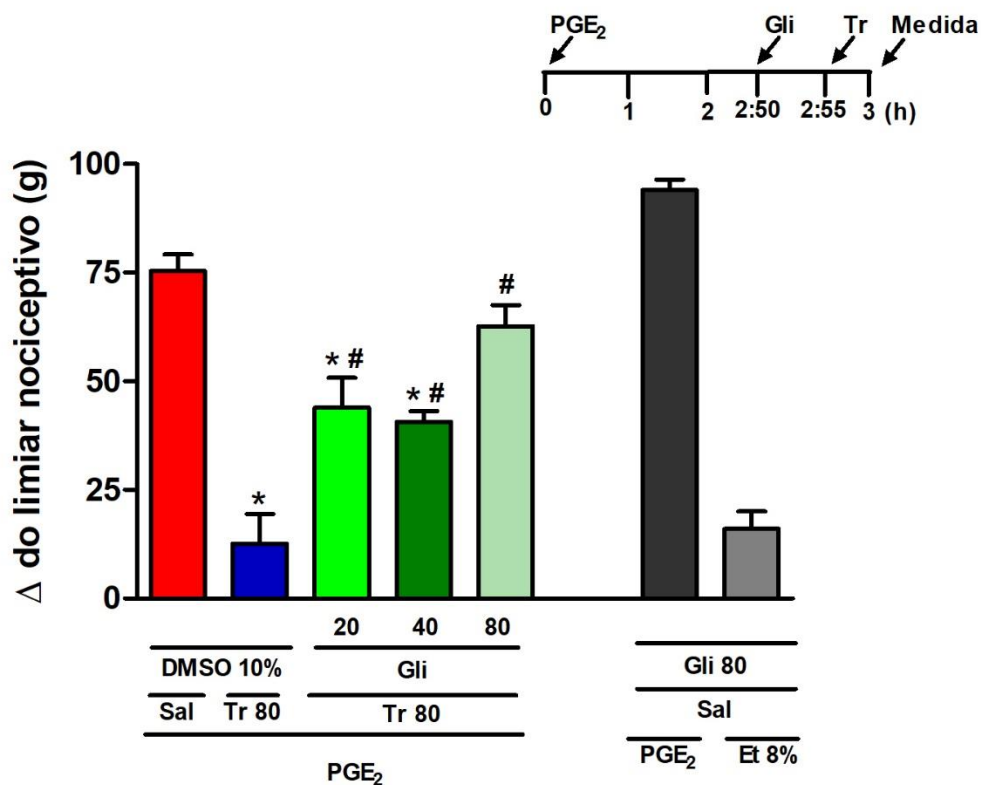
### 13.2 CANAIS PARA POTÁSSIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM ( $K_v$ )

Buscando verificar se haveria participação de  $K_v$  no efeito antinociceptivo da droga em estudo, foi administrado por i.pl. TEA (30  $\mu\text{g/pata}$ ), bloqueador seletivo desse tipo de canal.

Não houve reversão da antinocicepção induzida pelo tramadol (80  $\mu\text{g/pata}$ ) (**gráfico 13**).

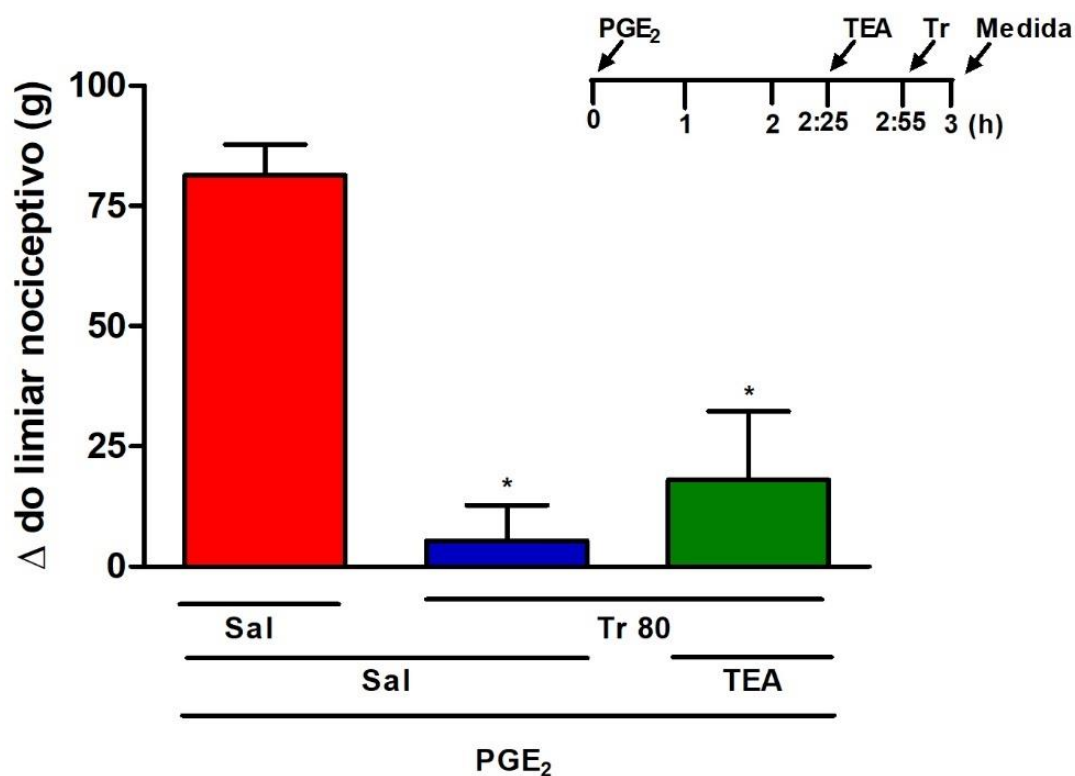
### 13.3 CANAIS PARA POTÁSSIO ATIVADOS POR CÁLCIO ( $K_{Ca}$ )

Para verificar se a antinocicepção periférica do tramadol (80  $\mu\text{g/pata}$ ) envolveria canais para potássio dependentes de cálcio, foram administrados i.pl. paxilina (20  $\mu\text{g/pata}$ ), bloqueador de  $K_{Ca}$  de alta condutância e dequalínio (50  $\mu\text{g/pata}$ ), bloqueador de  $K_{Ca}$  de baixa condutância. Ambos não foram capazes de reverter a antinocicepção induzida pelo tramadol (**gráfico 14 e gráfico 15**).

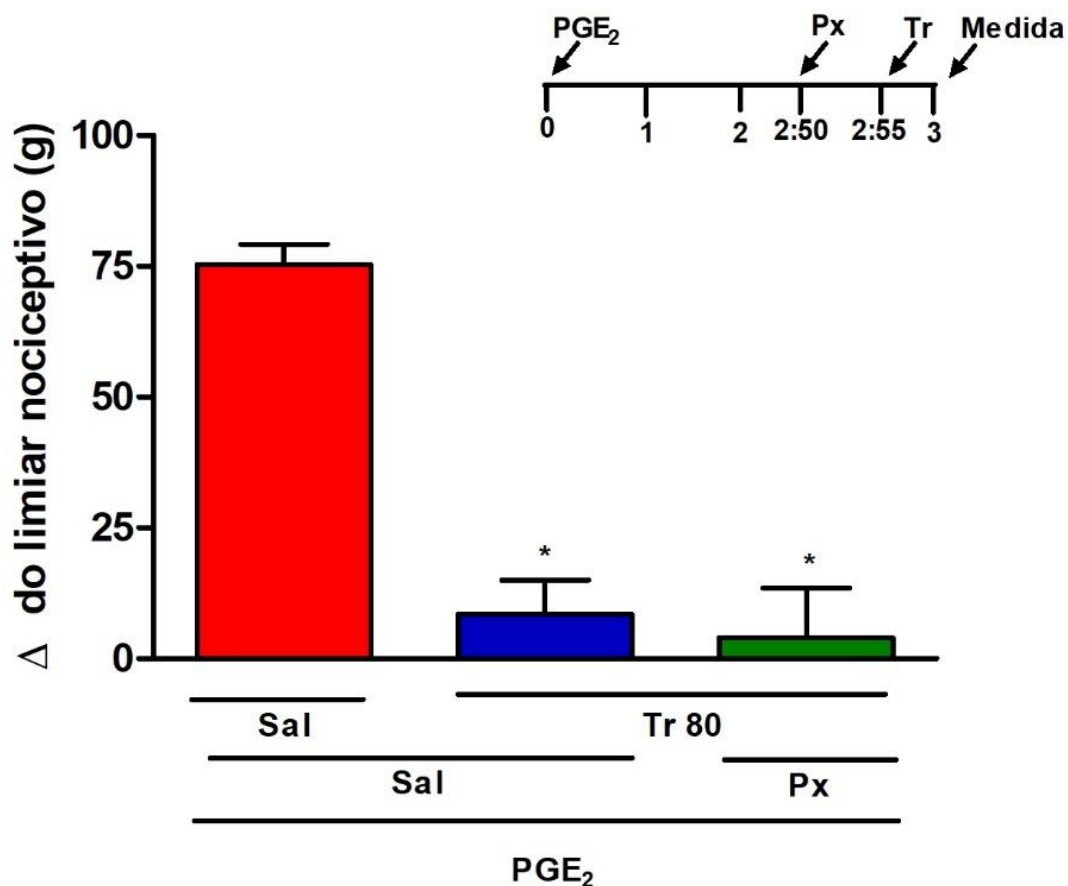


**Gráfico 12 – Efeito da injeção de glibenclamida (Gli, 20, 40, 80 µg/pata) sobre a antinociceção periférica do tramadol (Tr, 80 µg/pata).** As drogas foram administradas nos tempos indicados no diagrama descrito no canto superior direito do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. n=5. \* indica diferença estatística em relação ao grupo controle hiperálgico (PGE<sub>2</sub> + DMSO 10% + Sal). # indica diferença estatística em relação ao grupo controle antinociceção (PGE<sub>2</sub> + DMSO 10% + Tr). P<0,05, ANOVA + *post-hoc* Bonferroni.





**Gráfico 13 – Efeito da injeção de TEA (30 µg/pata) sobre a antinociceção periférica do tramadol (Tr, 80 µg/pata).** As drogas foram administradas nos tempos indicados no diagrama descrito na parte superior direito do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. n=5. \* indica diferença estatística em relação ao grupo controle hiperálgico (PGE<sub>2</sub> + Sal + Sal). P<0,05, ANOVA + *post-hoc* Bonferroni.



**Gráfico 14 – Efeito da injeção de paxilina (Px, 20 µg/pata) sobre a antinocicepção periférica do tramadol (Tr, 80 µg/pata).** As drogas foram administradas nos tempos indicados no diagrama descrito na parte superior direito do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. n=5. \* indica diferença estatística em relação ao grupo controle hiperalgésico (PGE<sub>2</sub> + Sal + Sal). P<0,05, ANOVA + *post-hoc* Bonferroni.

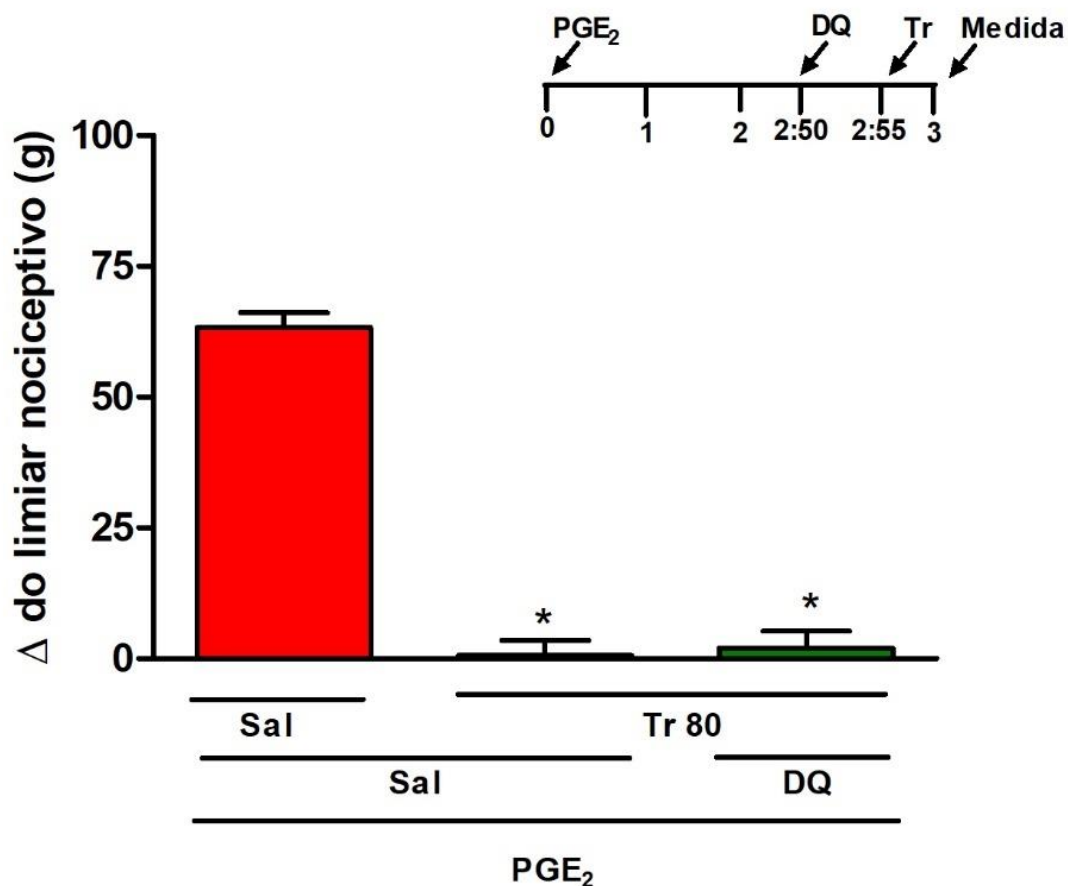


Gráfico 15 – Efeito da injeção de dequalínio (DQ, 50 µg/pata) sobre a antinocicepção periférica do tramadol (Tr, 80 µg/pata). As drogas foram administradas nos tempos indicados no diagrama descrito na parte superior direito do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. n=5. \* indica diferença estatística em relação ao grupo controle hiperálgico (PGE<sub>2</sub> + Sal + Sal). P<0,05, ANOVA + *post-hoc* Bonferroni.

## 14 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA NORADRENÉRGICO NA ANTINOCICEPÇÃO PERIFÉRICA DO TRAMADOL

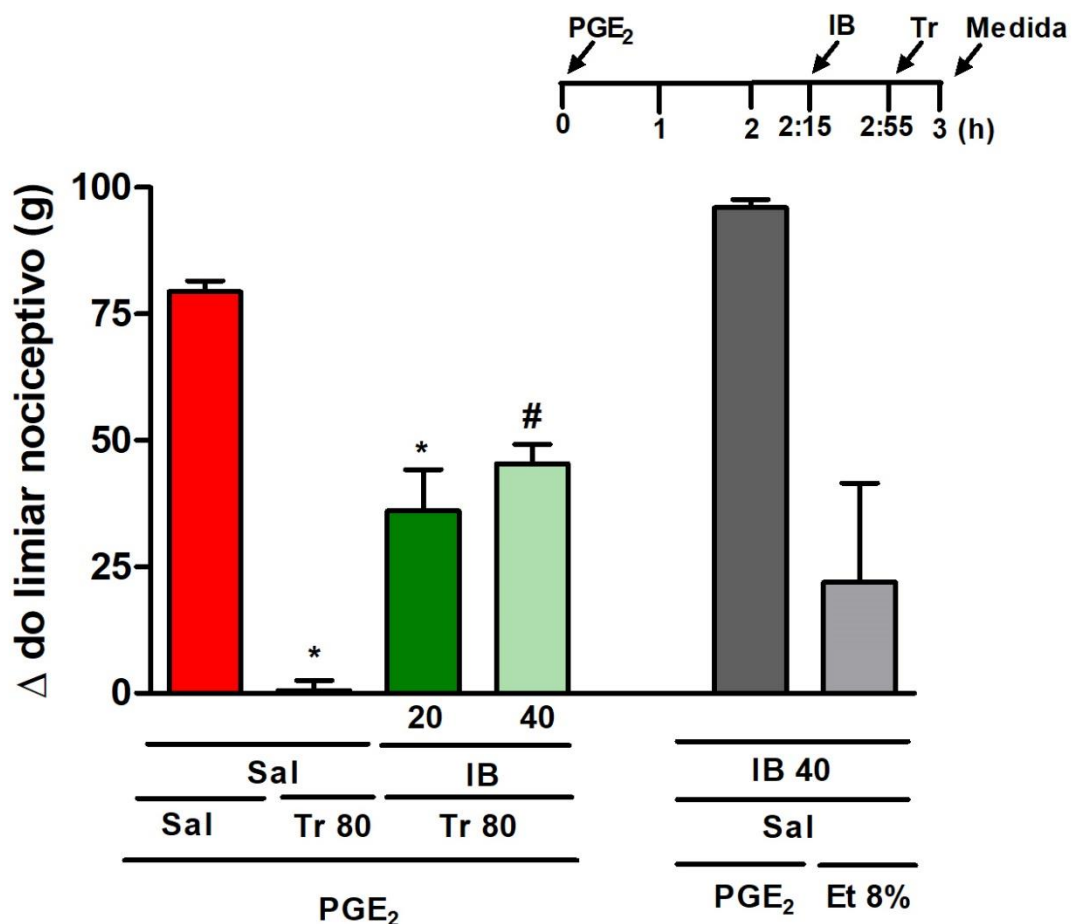
### 14.1 EFEITO DO ANTAGONISTA NÃO SELETIVO DOS RECEPTORES $\alpha_2$ -NORADRENÉRGICOS IOIMBINA SOBRE A ANTINOCICEPÇÃO PERIFÉRICA DO TRAMADOL

Ao administrar por via intraplantar o antagonista não seletivo noradrenérgico ioimbina, houve reversão parcial (20  $\mu\text{g/pata}$ ) do efeito antinociceptivo da droga em estudo (80  $\mu\text{g/pata}$ ), e a reversão total ocorre ao administrar uma dose mais alta (40  $\mu\text{g/pata}$ ) do antagonista (**gráfico 16**).

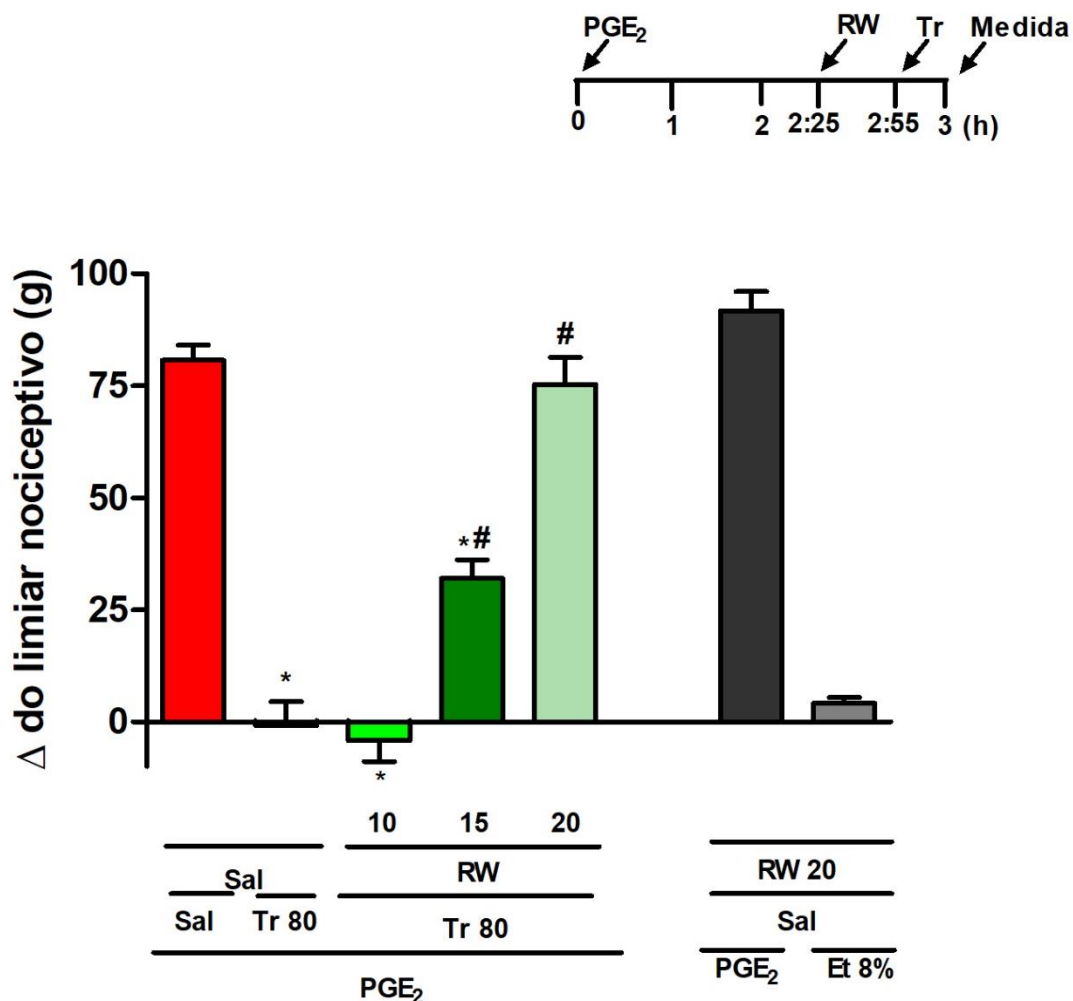
### 14.2 EFEITO DOS ANTAGONISTAS SELETIVOS DOS RECEPTORES $\alpha_2$ -NORADRENÉRGICOS SOBRE A ANTINOCICEPÇÃO PERIFÉRICA DO TRAMADOL

Para verificar quais os subtipos de receptores noradrenérgicos  $\alpha_2$  participam da antinocicepção periférica do tramadol (80  $\mu\text{g/pata}$ ), foram administrados por via i.pl. os antagonistas seletivos dos receptores  $\alpha_{2C}$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  e  $\alpha_{2D}$  noradrenérgicos a rauwolscina, BRL 44480, imiloxona e RX 821002, respectivamente.

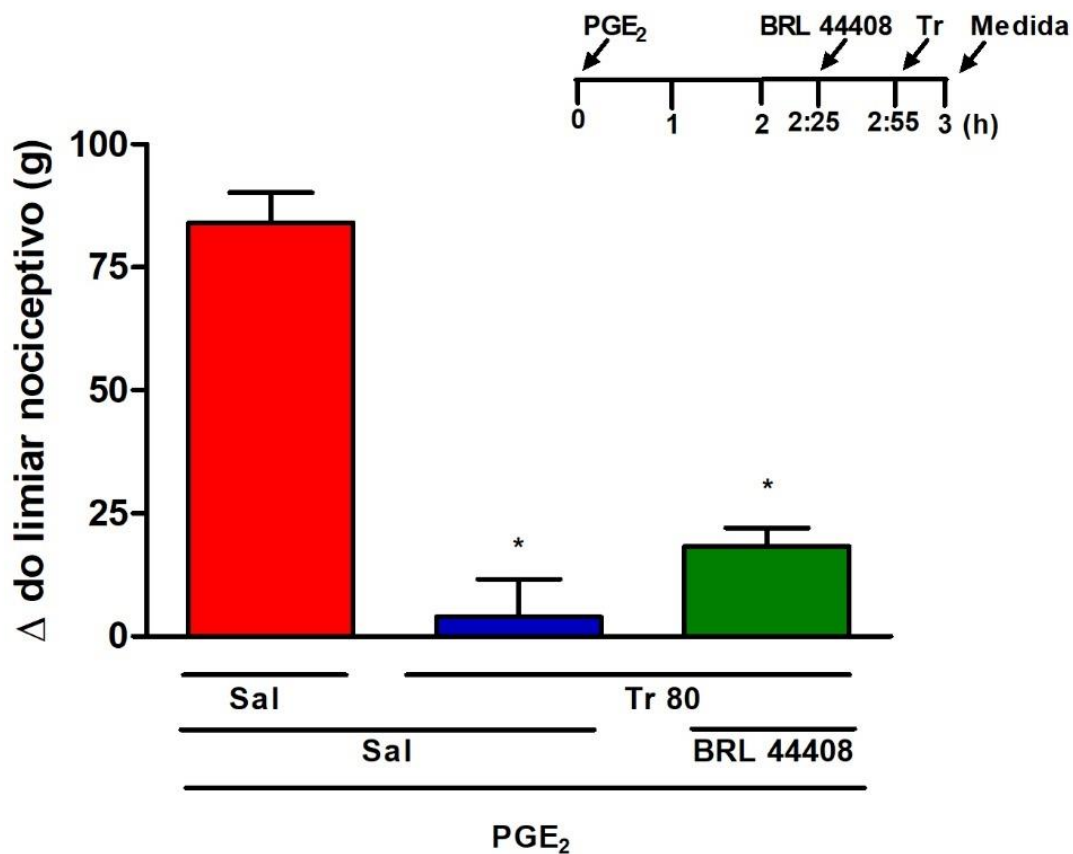
Apenas a rauwolscina (10,15,20  $\mu\text{g/pata}$ ) foi capaz de reverter a antinocicepção periférica do tramadol de maneira dose-dependente (**gráfico 17**), mas não os demais antagonistas, 20  $\mu\text{g/pata}$  (**gráficos 18, 19 e 20**).



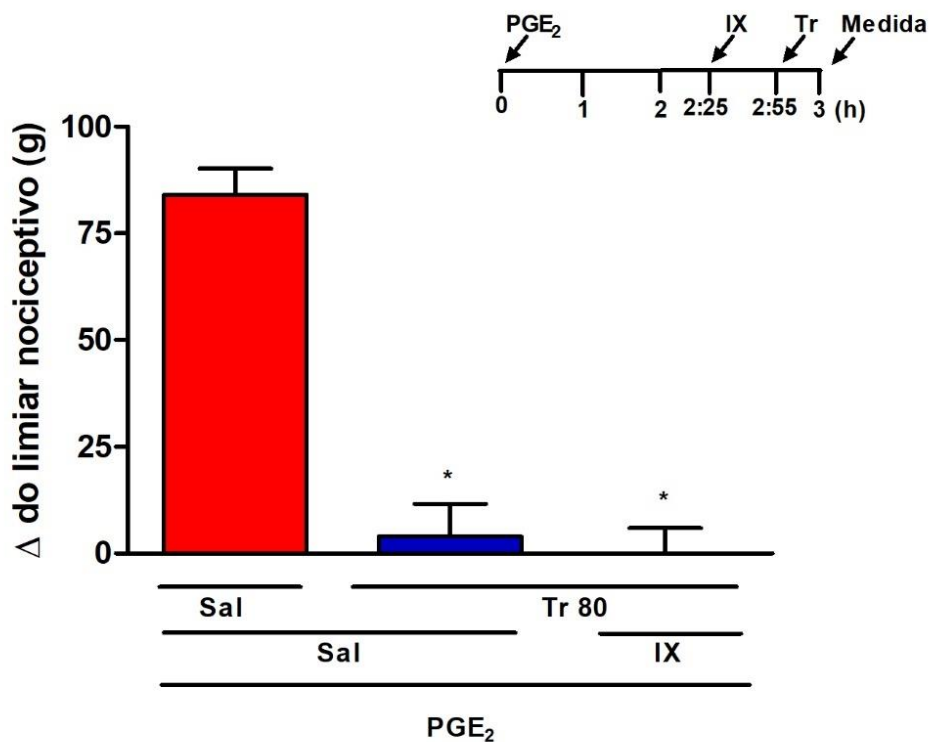
**Gráfico 16 – Reversão do efeito antinociceptivo periférico do tramadol (Tr, 80 μg/pata) pela administração intraplantar de ioimbina (IB, 20,40 μg/pata).** As drogas foram administradas nos tempos indicados no diagrama descrito na parte superior direita do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. n=5. \* indica diferença estatística em relação ao grupo controle hiperalgésico (PGE<sub>2</sub> + Sal + Sal). # indica diferença estatística em relação ao grupo controle antinociceção (PGE<sub>2</sub> + Sal + Tr). P<0,05, ANOVA + *post-hoc* Bonferroni.



**Gráfico 17 – Antagonismo do efeito antinociceptivo do tramadol (80 µg/pata) pela administração de rauwolscina (RW, 10,15,20 µg/pata).** As drogas foram administradas nos tempos indicados no diagrama descrito na parte superior direita do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. n=5. \* indica diferença estatística em relação ao grupo controle hiperalgésico (PGE<sub>2</sub> + Sal + Sal). # indica diferença estatística em relação ao grupo controle antinocicepção (PGE<sub>2</sub> + Sal + Tr). P<0,05, ANOVA + *post-hoc* Bonferroni.

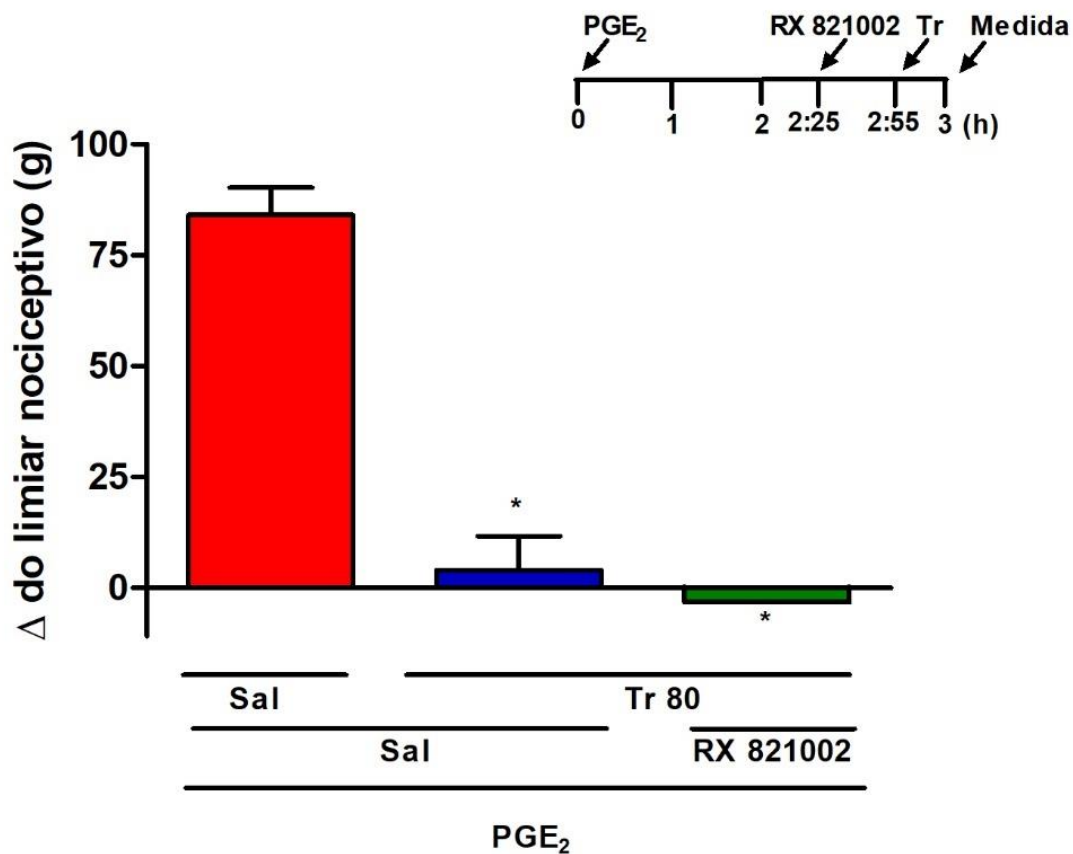


**Gráfico 18 – Efeito da injeção de BR 44408 (20 µg/pata) sobre a antinociceção periférica do tramadol (Tr, 80 µg/pata).** As drogas foram administradas nos tempos indicados no diagrama descrito na parte superior direito do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. \* indica diferença estatística em relação ao grupo controle hiperálgico (PGE<sub>2</sub> + Sal + Sal). P<0,05, ANOVA + *post-hoc* Bonferroni.



**Gráfico 19 – Efeito da injeção de Imiloxana (IX, 20 µg/pata) sobre a antinociceção periférica do tramadol (Tr, 80 µg/pata).** As drogas foram administradas nos tempos indicados no diagrama descrito na parte superior direita do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. \* indica diferença estatística em relação ao grupo controle hiperálgico (PGE<sub>2</sub> + Sal + Sal). P<0,05, ANOVA + *post-hoc* Bonferroni.





**Gráfico 20 – Efeito da injeção de RX 821002 (20 µg/pata) sobre a antinociceção periférica do tramadol (Tr, 80 µg/pata).** As drogas foram administradas nos tempos indicados no diagrama descrito na parte superior direito do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. \* indica diferença estatística em relação ao grupo controle hiperálgico (PGE<sub>2</sub> + Sal + Sal). P<0,05, ANOVA + *post-hoc* Bonferroni.

## 15 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA SEROTONINÉRGICO NA ANTINOCICEPÇÃO PERIFÉRICA DO TRAMADOL

### 15.1 EFEITO DOS ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES 5-HT<sub>1</sub> NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO TRAMADOL

Para avaliar a participação dos receptores 5-HT<sub>1</sub> na antinocicepção periférica do tramadol, foram injetados, por via intraplantar, os antagonistas seletivos isamoltano e BRL 15572 (0,1, 1, 10 µg/pata), dos receptores 5-HT<sub>1B</sub> e 5-HT<sub>1D</sub>, respectivamente.

Ambas as drogas produziram uma reversão total da antinocicepção periférica do tramadol (80 µg/pata), de maneira dose-dependente (**gráficos 21 e 22**).

### 15.2 EFEITO DO ANTAGONISTA DOS RECEPTORES 5-HT<sub>2A</sub> NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO TRAMADOL

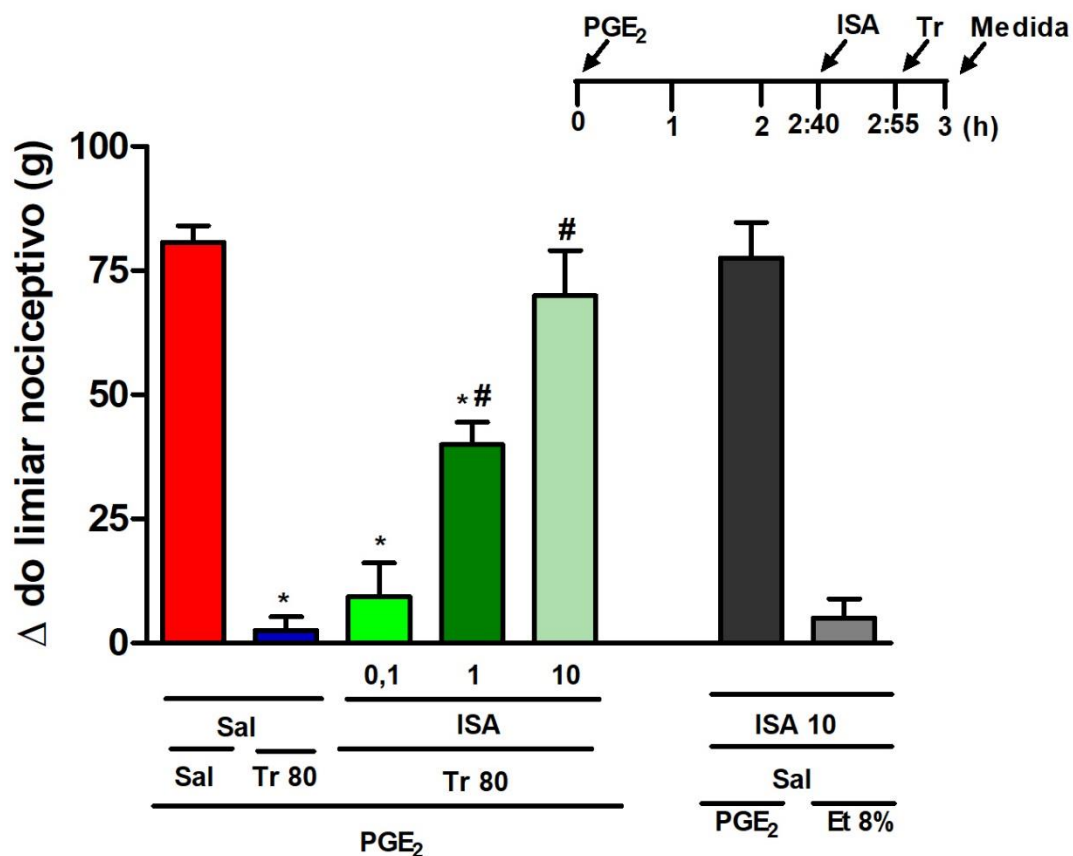
O **gráfico 23** mostra que a administração i.pl. de cetanserina (10 µg/pata), antagonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>2A</sub>, não foi capaz de reverter a antinocicepção periférica do tramadol (80 µg/pata).

### 15.3 EFEITO DO ANTAGONISTA DOS RECEPTORES 5-HT<sub>3</sub> NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO TRAMADOL

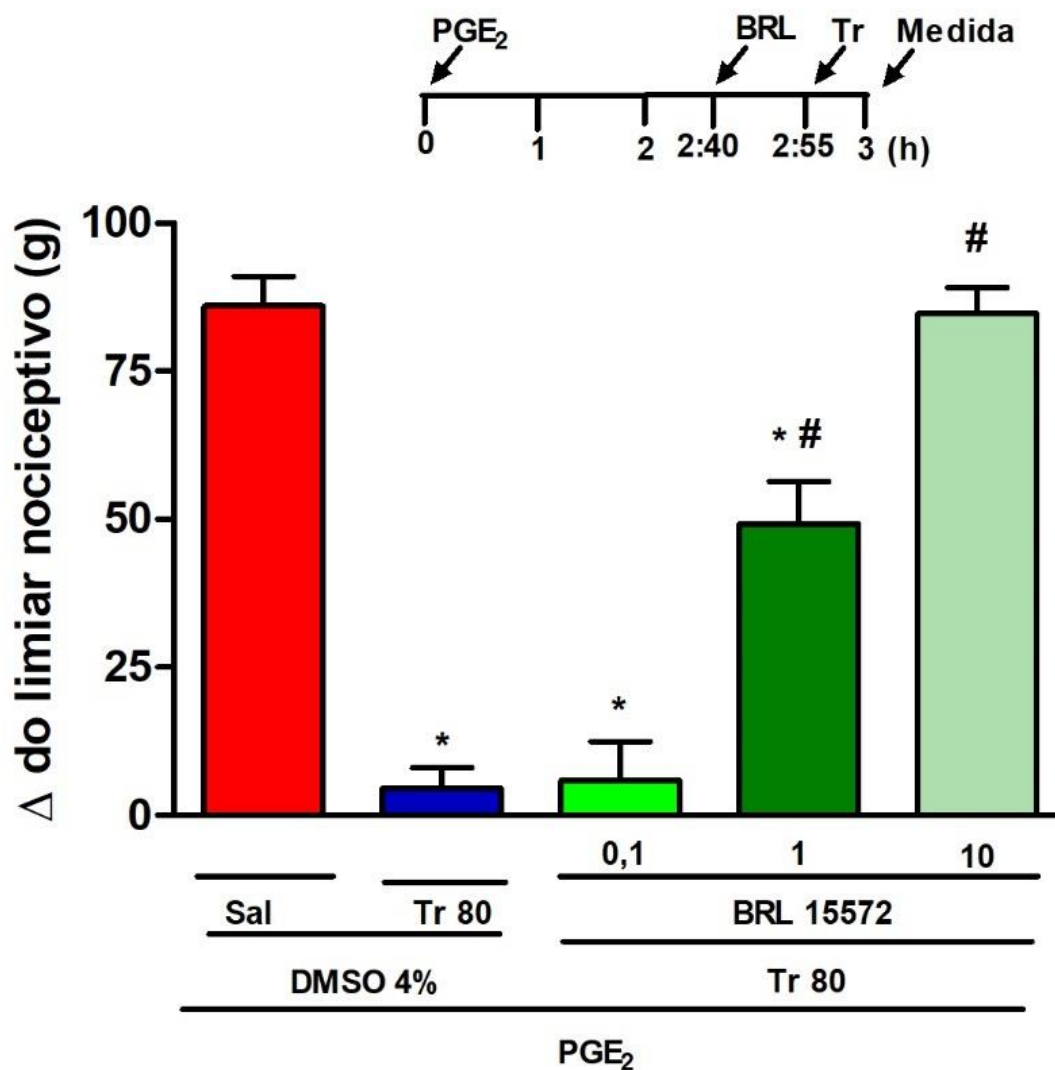
O **gráfico 24** mostra que a administração i.pl. de ondansetrona (0,1, 1, 10 µg/pata), antagonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>3</sub>, foi capaz de reverter a antinocicepção periférica do tramadol (80 µg/pata) de maneira dose-dependente.

### 15.4 EFEITO DO ANTAGONISTA DOS RECEPTORES 5-HT<sub>7</sub> NA ANTINOCICEPÇÃO INDUZIDA PELO TRAMADOL

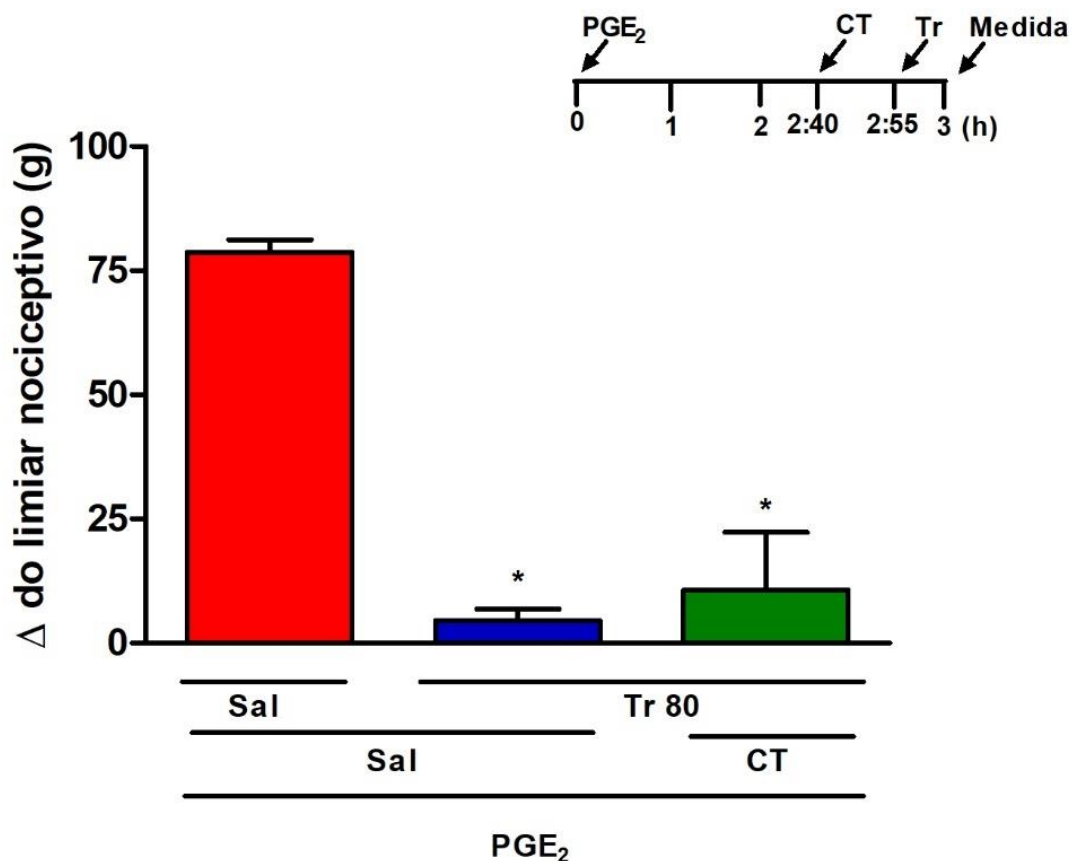
O **gráfico 25** mostra que a administração i.pl. de SB269970 (10µg/pata), antagonista seletivo dos receptores 5-HT<sub>7</sub>, não foi capaz de reverter a antinocicepção periférica do tramadol (80 µg/pata).



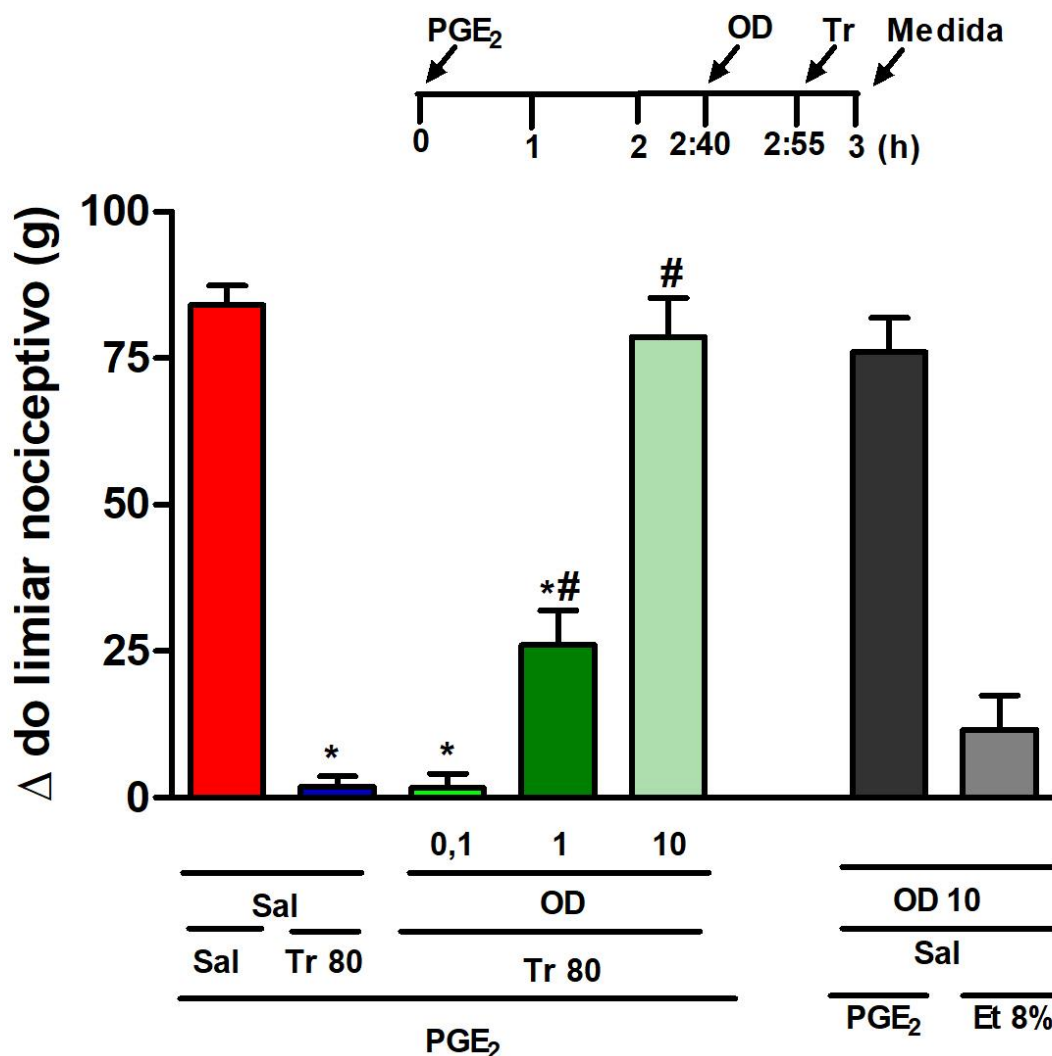
**Gráfico 21 – Antagonismo do efeito antinociceptivo do tramadol (Tr, 80 µg/pata) pela administração de isamoltano (ISA, 0,1,1,10 µg/pata).** As drogas foram administradas nos tempos indicados no diagrama descrito na parte superior direita do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. n=5. \* indica diferença estatística em relação ao grupo controle hiperalgésico (PGE<sub>2</sub> + Sal + Sal). # indica diferença estatística em relação ao grupo controle antinocicepção (PGE<sub>2</sub> + Sal + Tr). P<0,05, ANOVA + *post-hoc* Bonferroni.



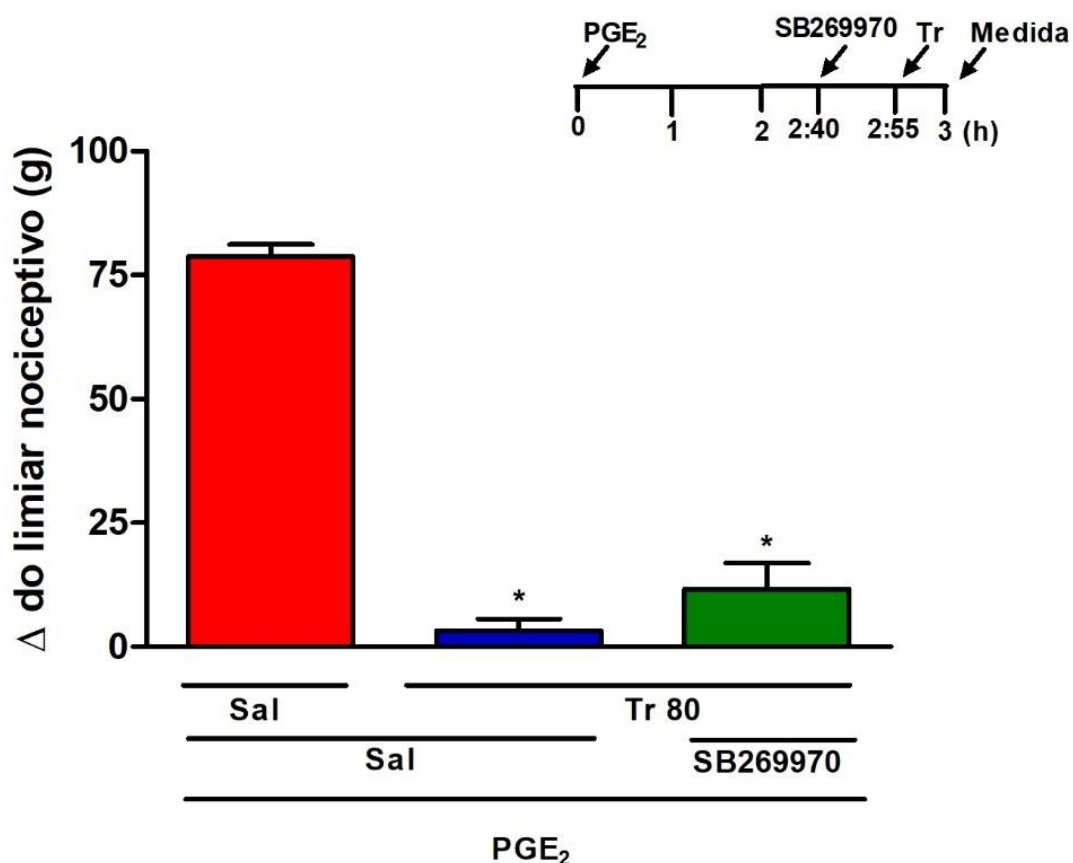
**Gráfico 22 – Antagonismo do efeito antinociceptivo do tramadol (Tr, 80 µg/pata) pela administração de BRL 15572 (0,1,1,10 µg/pata).** As drogas foram administradas nos tempos indicados no diagrama descrito na parte superior direita do gráfico. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. n=5. \* indica diferença estatística em relação ao grupo controle hiperálgico (PGE<sub>2</sub> + DMSO 4% + Sal). # indica diferença estatística em relação ao grupo controle antinocicepção (PGE<sub>2</sub> + DMSO 4% + Tr). P<0,05, ANOVA + *post-hoc* Bonferroni.



**Gráfico 23 – Efeito da injeção de cetanserina (CT, 10  $\mu\text{g/pata}$ ) sobre a antinocicepção periférica do tramadol (Tr, 80  $\mu\text{g/pata}$ ).** As drogas foram administradas nos tempos indicados no diagrama descrito na parte superior direita do gráfico. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. \* indica diferença estatística em relação ao grupo controle hiperalgésico ( $\text{PGE}_2 + \text{Sal} + \text{Sal}$ ).  $P < 0,05$ , ANOVA + *post-hoc* Bonferroni.



**Gráfico 24 – Antagonismo do efeito antinociceptivo do tramadol (Tr, 80 µg/pata) pela administração de ondansetrona (OD, 0,1, 1, 10 µg/pata).** As drogas foram administradas nos tempos indicados no diagrama descrito na parte superior direita do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. n=5. \* indica diferença estatística em relação ao grupo controle hiperálgico (PGE<sub>2</sub> + DMSO 4% + Sal). # indica diferença estatística em relação ao grupo controle antinociceção (PGE<sub>2</sub> + DMSO 4% + Tr). P<0,05, ANOVA + *post-hoc* Bonferroni.



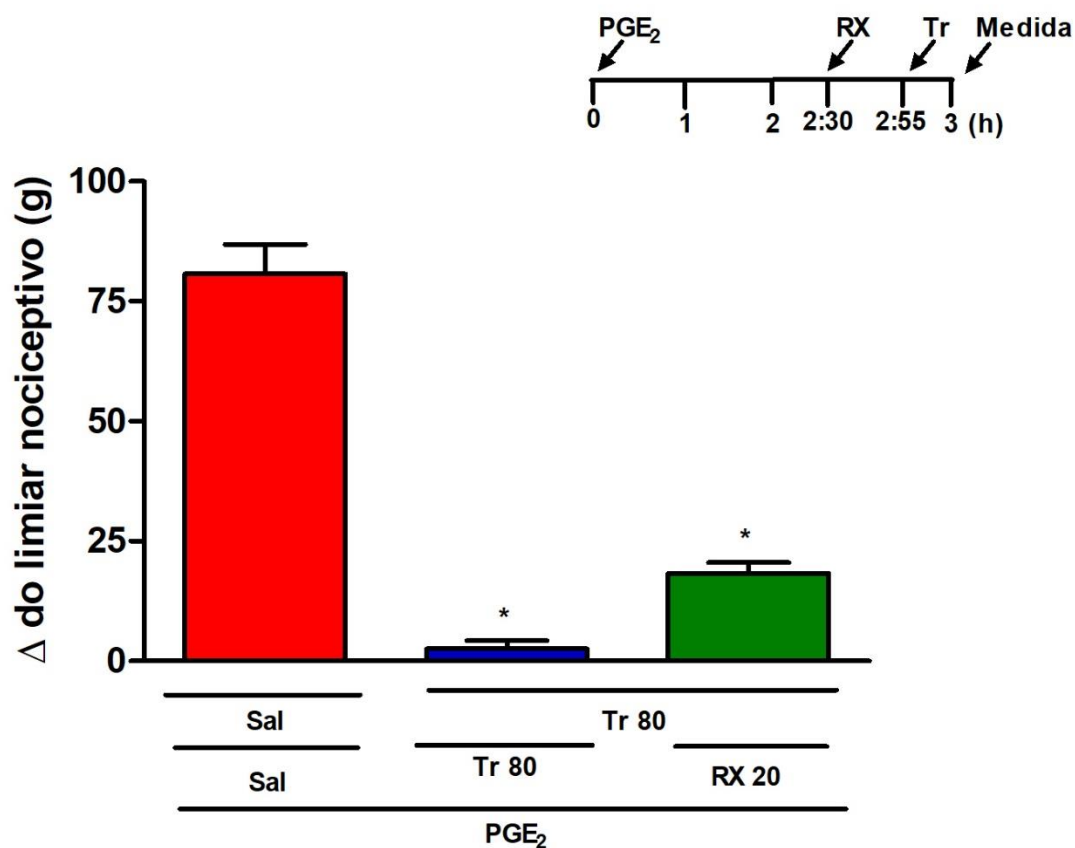
**Gráfico 25 – Efeito da injeção de SB269970 (10 µg/pata) sobre a antinocicepção periférica do tramadol (Tr, 80 µg/pata).** As drogas foram administradas nos tempos indicados no diagrama descrito na parte superior direita do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. \* indica diferença estatística em relação ao grupo controle hiperálgico (PGE<sub>2</sub> + Sal + Sal). P<0,05, ANOVA + *post-hoc* Bonferroni.



## 16 PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO NA ANTINOCICEPÇÃO PERIFÉRICA DO TRAMADOL

Com o intuito de estudar a participação dos receptores dopaminérgicos na antinocicepção periférica do tramadol, foram injetados, por via i.pl., os antagonistas seletivos dos receptores D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub> remoxipride (20 µg/pata) (**gráfico 26**), U99194 (32 µg/pata) (**gráfico 27**) e L-745,870 (32 µg/pata) (**gráfico 28**), respectivamente.

Não houve reversão do efeito antinociceptivo do tramadol (80 µg/pata) em nenhum teste realizado com esses antagonistas.



**Gráfico 26 – Efeito da injeção de remoxipride (RX, 4,20 µg/pata) sobre a antinociceção periférica do tramadol (Tr, 80 µg/pata).** As drogas foram administradas nos tempos indicados no diagrama descrito no canto superior direito do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. n=5. \* indica diferença estatística em relação ao grupo controle hiperálgico (PGE<sub>2</sub> + Sal + Sal). P<0,05, ANOVA + *post-hoc* Bonferroni.

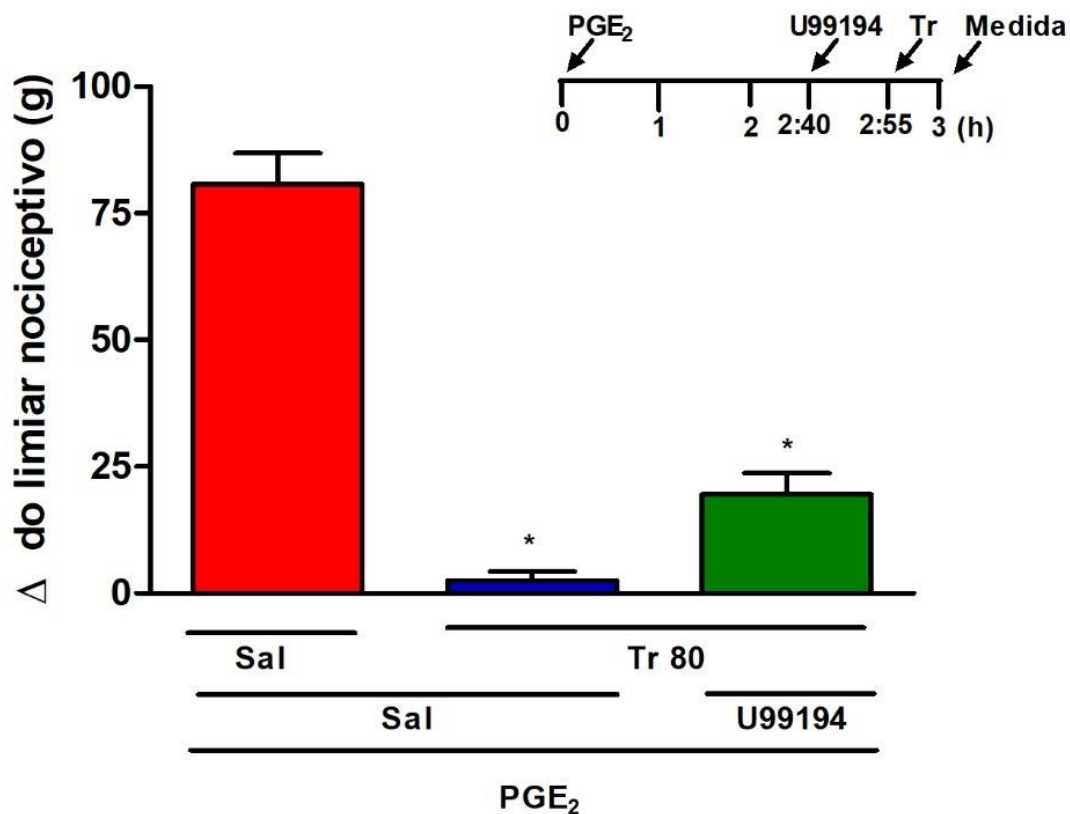
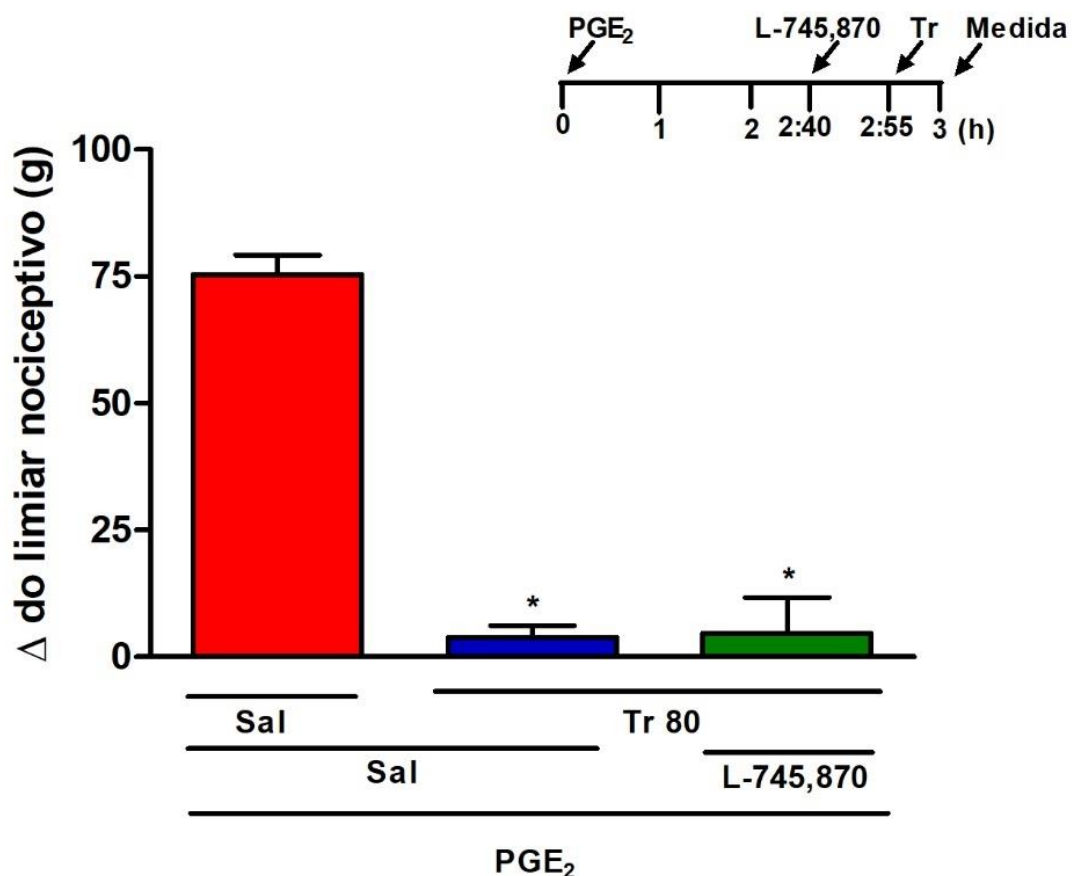


Gráfico 27 - Efeito da injeção de U99194 (32 µg/pata) sobre a antinocicepção periférica do tramadol (Tr, 80 µg/pata). As drogas foram administradas nos tempos indicados no diagrama descrito na parte superior direita do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. n=5. \* indica diferença estatística em relação ao grupo controle hiperalgésico (PGE<sub>2</sub> + Sal + Sal). P<0,05, ANOVA + *post-hoc* Bonferroni.



**Gráfico 28** – Efeito da injeção de L-745,870 (32 µg/pata) sobre a antinociceção periférica do tramadol (Tr, 80 µg/pata). As drogas foram administradas nos tempos indicados no diagrama descrito na parte superior direita do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. n=5. \* indica diferença estatística em relação ao grupo controle hiperalgésico (PGE<sub>2</sub> + Sal + Sal). P<0,05, ANOVA + *post-hoc* Bonferroni.

---

## DISCUSSÃO

---

## 17 DISCUSSÃO

Até o presente momento, os estudos em torno do tramadol permanecem, em maior parte, na esfera do mecanismo sistêmico de ação. Pouco ainda se sabe a respeito das vias pelas quais ocorre a antinocicepção periférica do tramadol.

Em medicina veterinária, o tramadol é o analgésico opioide que mais se prescreve para dores moderadas a severas no Brasil e Estados Unidos (Kogan et al., 2019; Lorena et al., 2014, 2013). Uma vez que os efeitos adversos, pelo menos em algumas espécies, são pouco evidenciados, restringindo-se à redução da motilidade intestinal e frequência respiratória, êmese e excitação, principalmente em gatos, esse fármaco parece ser uma opção segura para tratamento de diversas patologias dolorosas (Lorena et al., 2014; Mastrocinque & Fantoni, 2003).

Em animais foi avaliado o efeito local do tramadol em modelo de incisão plantar. A nocicepção periférica em modelo incisional e hiperalgesia mecânica foi descrita por Sousa & Ashmawi (2014), no qual a naloxona não foi capaz de reverter a antinocicepção. Oliveira Junior & Ashmawi (2015) avaliaram o efeito desse opioide frente hiperalgesia mecânica utilizando Von Frey em ratos e, além de verificarem o efeito antinociceptivo do tramadol, reforçaram o mecanismo de ação via opioide, uma vez que a injeção de naloxona reverteu o efeito do analgésico. Os dados não corroboram o outro trabalho. Isso sugere que ainda são necessários maiores estudos a respeito das vias antinociceptivas periféricas do tramadol.

No presente trabalho, avaliamos o efeito antinociceptivo local desse fármaco frente à hiperalgesia causada pela injeção de PGE<sub>2</sub>.

---

Em nossos experimentos, utilizamos a PGE<sub>2</sub> como agente hiperalgésico, já que não causa necessariamente dor, mas aumenta a sensibilidade a estímulos químicos e mecânicos (Ferreira, 1972; Horton, 1963). A hiperalgesia induzida pela administração de PGE<sub>2</sub> tem como mecanismo a ativação de receptores acoplados à proteína G do tipo excitatória (G<sub>s</sub>), o que faz com haja ativação da enzima adenilato ciclase e ativação do segundo mensageiro AMP<sub>c</sub>, que ativa a proteína quinase A (PKA) culminando no efeito biológico, a sensibilização de neurônios sensitivos primários (Aley & Levine, 1999; Cunha et al., 2010; Ferreira & Nakamura, 1979; Kassuya et al., 2007; Kawabata, 2011; Sachs et al., 2009; Taiwo & Levine, 1991). Essa participação da PKA na via hiperalgésica da PGE<sub>2</sub> é evidenciada a partir da administração de inibidor da PKA, que reverte a hiperalgesia (Kassuya et al., 2007). A fosfoquinase C (PKC) também pode participar da sensibilização periférica da PGE<sub>2</sub>, uma vez que a injeção de inibidor de PKC reverte esse efeito (Kassuya et al., 2007; Kawabata, 2011). Vale salientar que o uso da PGE<sub>2</sub> possui vantagem sobre outros agentes hiperalgésicos, como a carragenina, por abolir a possibilidade de o efeito periférico do fármaco em estudo ser ação sobre mediadores inflamatórios no local, seja bloqueando a liberação ou reduzindo seu efeito (Vinegar et al., 1987). A dose de prostaglandina administrada, 2 µg/pata, nos animais está em consonância com aquela já utilizada em estudos prévios realizados no laboratório, que demonstram que ela produz intensidade máxima de hiperalgesia (Alves et al., 2013; Pacheco et al., 2008, 2009; Romero et al., 2018; Romero & Duarte, 2013).

Em nossos experimentos, a injeção de tramadol em várias doses foi necessária para que houvesse segurança de qual a melhor dose para causar

---

analgésia sem alcançar o efeito sistêmico. A estratégia de exclusão do efeito sistêmico foi necessária por esse motivo. Ao injetar o agente hiperalgésico em ambas as patas posteriores e tramadol nas doses de 80 µg ou 100 µg/pata e medir o limiar nociceptivo, é possível perceber se a droga conseguiu extrapolar o compartimento local e alcançar o sistema gerando antinocicepção na pata contralateral. Como apenas a dose de 100 µg gerou antinocicepção na pata esquerda, optou-se pela dose de 80 µg para os experimentos que se seguiram. Na literatura, as doses utilizadas para avaliação de efeito local divergem muito, variando entre 500 µg (Mert et al., 2007) e 5 mg/pata (Oliveira Junior & Ashmawi, 2015; Sousa & Ashmawi, 2014b). No entanto, em nosso estudo, para o modelo sugerido, a dose de 80 µg foi a mais adequada.

Examinamos a hipótese da participação de várias vias antinociceptivas do tramadol, além da via clássica opioide e das vias monoaminérgicas, na periferia. Surpreendentemente, o tramadol parece não se ligar aos receptores opioides localmente, uma vez que o efeito antinociceptivo não foi revertido pela naloxona. Isso se contrapõe a vários trabalhos que se propuseram a esclarecer a participação local dos receptores opioides na periferia. Oliveira Junior & Ashmawi (2015) avaliaram o efeito do tramadol localmente em modelo de incisão plantar e houve ligação a receptores opioides, como relatado anteriormente nesse trabalho. No entanto, colaboradores do mesmo grupo sugeriram que, ao contrário, não há participação dos receptores opioides na antinocicepção do tramadol para esse modelo (Sousa & Ashmawi, 2014b). Desse modo, é notável que ainda existam controvérsias a respeito da participação não apenas dos receptores opioides, mas também de outras vias antinociceptivas na antinocicepção pelo fármaco em estudo.



---

O tramadol é um fármaco incluído na classe dos “opioides atípicos”, por ter mecanismo de ação opioide e não opioide. O sistema opioidérgico e seus efeitos, vêm sendo extensivamente estudados nos últimos anos. Os efeitos opioides ocorrem devido a ligação aos receptores  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ -opioide, todos acoplados à proteína  $G_i$ , com inibição da adenilato ciclase e redução da liberação do segundo mensageiro AMPc e, conseqüentemente, redução de PKA. Isso faz com que haja abertura de canais para cálcio tipo T, que atenuam a excitabilidade neuronal, reduzindo a hiperalgesia mecânica (Cunha et al., 2010; Kawabata, 2011).

Em nossos experimentos a naloxona não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo do tramadol, corroborando com os dados encontrados por Sousa & Ashmawi (2014). A naloxona é um antagonista não seletivo dos receptores opioides, de forma que sua ação esperada fosse reverter o efeito do tramadol. Ela também não teve efeito analgésico ou hiperalgésico quando injetada sozinha.

Os trabalhos envolvendo o mecanismo opioidérgico do tramadol, em sua maioria, utilizam modelos de administração sistêmica desse fármaco (Bravo et al., 2017; Mastrocinque & Fantoni, 2003; Radbruch et al., 1996). Esses dados sugerem a necessidade do metabolismo hepático, com geração de M1 e sua ligação aos receptores opioides (Frankus et al., 1978; Friderichs & Becker, 1991; García-Quetglas et al., 2007; Lee et al., 1993). Como abordado anteriormente, a enzima hepática CYP2D6 parece ter maior importância para que ocorra o efeito  $\mu$ -opioide, já que há produção do metabólito M1 (García-Quetglas et al., 2007; Gillen et al., 2000; Jimenez et al., 2018; Miotto et al., 2017; Raffa et al., 1992). Dessa forma, como em nosso trabalho optamos pela administração intraplantar,

---

não há, portanto, passagem hepática e formação de M1. Desse modo, sugere-se que o efeito opioide tenha sido abolido em nosso modelo por esse motivo. No entanto, mais estudos são necessários para que essa hipótese seja esclarecida.

Estudos com morfina sugerem que esse fármaco seja capaz de ativar, periféricamente, receptores  $\mu$  através da interação com proteína  $G_i$ , que inibe a ativação de adenilato ciclase (Levine & Taiwo, 1989) e consequente redução na produção de AMPc, inibindo o processo doloroso (Cunha et al., 2010; Endres-Becker et al., 2007; Ferreira & Nakamura, 1979; Vetter et al., 2006).

Tendo em vista que recentemente a literatura tem mostrado estreita relação dos sistemas opioide e canabinoide, nós investigamos a participação dos receptores canabinoides  $CB_1$  e  $CB_2$  na antinocicepção periférica pelo tramadol. Nossos resultados sugerem que, assim como o sistema opioide, o sistema canabinoide não tem envolvimento no efeito analgésico do tramadol, uma vez que os antagonistas dos receptores  $CB_1$  e  $CB_2$ , AM251 e AM630, respectivamente, não conseguiram reverter a antinocicepção causada pelo fármaco em estudo.

Pacheco et al. (2008, 2009) descrevem que a ativação de receptores  $\mu$ -opioides liberaria canabinoides endógenos, o que contribuiria para o efeito antinociceptivo dos opioides. Uma vez que o tramadol não foi capaz de ativar os receptores opioides, sugerimos que não seja possível, portanto, a liberação de endocanabinoides por essa via.

Na literatura os trabalhos envolvendo o sistema canabinoide e o tramadol são escassos. Alsalem et al. (2019) estudaram a interação do receptor  $CB_1$  e o tramadol em modelo de inflamação intraplantar utilizando adjuvante de Freund para induzir a resposta inflamatória. O tramadol foi administrado sistemicamente

---

e os pesquisadores não evidenciaram a participação dos receptores CB<sub>1</sub>. Já Stachtari et al. (2014) estudaram a possível participação do receptor CB<sub>2</sub> em modelo de incisão plantar em ratos e administração sistêmica de tramadol. A coadministração de tramadol e agonista CB<sub>2</sub> gerou antinocicepção equivalente à do tramadol sozinho em modelo de dor pós-operatória.

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem estudado extensivamente a ação antinociceptiva periférica de fármacos e a via NO/GMPc/KATP. Trabalhos sugerem participação de NO no mecanismo de ação de fármacos analgésicos (Ferreira, Duarte & Lorenzetti, 1991; Soares & Duarte, 2001; Romero *et al.*, 2012; Alves *et al.*, 2013), o que sugere que o sistema nitrérgico exerce efeito importante na antinocicepção periférica.

Cunha et al. (2010) sugeriu que a subunidade βγ da proteína G<sub>i</sub>, quando ativada pela ligação da morfina aos receptores μ-opioides, ativa a via PI3K/AKT, o que ativa a NOS, ativando por sua vez a cascata NO/GMPc/KATP, como consequência a analgesia.

Apesar de o tramadol não ter tido efeito sobre os receptores opioides ou canabinoides, no presente estudo, sabe-se que esses fármacos induzem antinocicepção periférica a partir da capacidade também de ativar a via L-arginina/NO/GMPc (Ferreira, Duarte & Lorenzetti, 1991). Cunha et al. (2010) mostrou que há participação da NOSn no mecanismo analgésico da morfina e que, na ausência dessa enzima, esse fármaco não foi capaz de reverter a hiperalgesia gerada pela PGE<sub>2</sub>, o que sugere papel importante da rota do NO na ação de opioides. Desse modo, o próximo passo do trabalho foi avaliar a participação da via L-arginina/NO/GMPc na analgesia pelo tramadol.

---

Os experimentos realizados tiveram como resultado a reversão parcial da antinocicepção do tramadol frente à hiperalgisia provocada pela PGE<sub>2</sub> pelo inibidor não seletivo das enzimas NOS L-NOArg, nas doses de 24 e 48 µg. Apesar da dose máxima preconizada na literatura ser 24 µg, decidimos por dobrar a dose para verificar se a inibição do L-NOArg é realmente parcial e não devida a alguma particularidade do tramadol ou alteração individual dos animais em experimentação. Esse resultado mostra que há síntese de NO e participação dessa via no efeito antinociceptivo periférico do analgésico em estudo. Isirdia-espinoza et al. (2014) utilizaram N<sup>w</sup>-nitro-arginina-metil-ester (L-NAME), um outro inibidor não seletivo da NOS, para avaliar a participação dessas enzimas na ação periférica da associação do tramadol com o dexcetoprofeno em camundongos no teste da formalina e os resultados encontrados pelo grupo foram semelhantes ao do presente estudo.

O L-NOarg é análogo competitivo com L-arginina pelo sítio de ligação das enzimas NOS, que ao se ligar bloqueia a via de síntese de NO (Moore et al., 1990). O NO é uma molécula altamente instável, que uma vez sintetizada, difunde-se facilmente pelos tecidos (Kelm, 1999).

Inibidores não seletivos da NOS são capazes de inibir a ação das enzimas NOS<sub>n</sub>, NOS<sub>i</sub> e NOS<sub>e</sub>. O NO é formado a partir da catalização pela NOS de L-citrulina após oxidação de L-arginina (Moncada, 1991; Romero et al., 2012). As três isoformas da enzima óxido nítrico sintase podem ser do tipo constitutivas dependentes de cálcio (NOS<sub>n</sub> e NOS<sub>e</sub>), ou induzível (NOS<sub>i</sub>) (Alderton et al., 2001). De acordo com nossos resultados, ao injetar inibidores seletivos de cada uma das isoformas, notamos que houve reversão total da antinocicepção ao inibir a NOS<sub>e</sub>, seguida de reversão parcial ao inibir NOS<sub>n</sub> e não houve reversão

---

da analgesia ao utilizar bloqueador de iNOS. Isso sugere que haja participação da enzima NOSe e, em parte, NOSn para síntese de NO e produção de antinocicepção pelo tramadol. Ferreira et al. (1991) evidenciaram a participação de NOSe na antinocicepção periférica de opioides, ao administrar o bloqueador L-NIO e ter como resultado a reversão da antinocicepção da morfina.

Uma vez que inibidores de PI3K e inibidores de AKT revertem o efeito antinociceptivo da morfina (Cunha et al., 2010), hipotetizamos que, já que a via de sinalização nitrérgica dos dois fármacos é semelhante, a antinocicepção do tramadol pode também respeitar a via PI3K/AKT/NOS/NO, ainda que, no caso da morfina, a principal enzima que participa da via seja NOSn e, neste trabalho, a NOSe também tenha participação na antinocicepção. São necessários mais estudos para corroborar essa hipótese.

O NO produzido é, por sua vez, diretamente responsável pelo acúmulo do segundo mensageiro GMPc por estimular a ação da enzima guanilato ciclase solúvel, que então ativa quinases gerando assim o efeito biológico, que em nosso estudo seria a antinocicepção periférica (Moncada, 1991; Murphy & Brayden, 1995; Romero et al., 2012). Visto isso, foi administrado o inibidor da GC ODQ como pré-tratamento ao tramadol e como resultado obteve-se reversão total da antinocicepção periférica mesmo em dose intermediária da droga inibidora. Isso sugere papel importante da enzima guanilato ciclase solúvel e produção de GMPc na antinocicepção periférica do tramadol, tendo como uma das principais vias antinociceptivas a L-arginina/NO/GMPc, nesse modelo. Ferreira et al. (1991) utilizaram azul de metileno para inibir a enzima GC e reduzir a produção de GMPc, atenuando a antinocicepção causada pela morfina. O uso do azul de metileno para avaliar a antinocicepção periférica também pôde verificar a

---

participação dessa rota na ação de outros fármacos, como a dipirona, mirceno (Duarte et al., 1992) e o próprio tramadol em associação com outros fármacos analgésicos (Isiordia-espinoza et al., 2014).

O segundo mensageiro GMPc uma vez formado, tem sua permanência limitada pelas enzimas fosfodiesterases (PDE), que realizam a hidrólise desse mensageiro controlando a duração do sinal (Alves et al., 2013; Juilfs et al., 1999; Mullershausen et al., 2001; Rybalkin et al., 2002). Inibidores das enzimas PDE, como o zaprinast, são capazes de bloquear a degradação de GMPc, potencializando assim o efeito da droga sob teste, evidenciando que o GMPc é um passo na redução da hiperalgesia da PGE<sub>2</sub> pelo NO (Duarte et al., 1992; Romero et al., 2012). Em nosso estudo, utilizamos o zaprinast como pré-tratamento ao tramadol. Nesse caso especificamente, para avaliar se haveria uma possível potencialização do efeito analgésico do tramadol, a dose injetada na pata posterior direita foi de 60 µg, ao invés de 80 µg. Desse modo, foi possível observar a potencialização do efeito do tramadol. Assim, ao inibir a PDE pode-se sugerir que haja, de fato, participação do segundo mensageiro GMPc na via antinociceptiva do tramadol. Vários trabalhos também utilizaram inibidores da PDE para verificar a participação de GMPc nas vias antinociceptivas, como o MY5445, que potencializou o efeito periférico da dipirona, mirceno e morfina quando injetados na pata de ratos como pré-tratamento (Duarte et al., 1992; Ferreira et al., 1991).

O acúmulo de GMPc ativa proteínas quinases, que fosforilam e conseqüentemente ativam diferentes tipos de canais para potássio (Murphy & Brayden, 1995). A abertura desses canais faz com que haja aumento da condutância desse íon, gerando uma hiperpolarização da membrana (Murphy &

---

Brayden, 1995; Thornbury et al., 1991). O efeito biológico esperado, nesse estudo, seria o controle da atividade neuronal e a não propagação do sinal, com redução do efeito hiperalgésico produzido pela administração de PGE<sub>2</sub>. São descritos na literatura quatro tipos de canais para potássio de importância na antinocicepção periférica. São eles os sensíveis ao ATP (K<sub>ATP</sub>), os dependentes de voltagem (K<sub>v</sub>), os ativados por cálcio de alta condutância (K<sub>Ca↑</sub>) e os ativados por cálcio de baixa condutância (K<sub>Ca↓</sub>) (Rodrigues & Duarte, 2000). Nossos resultados mostram que quando há bloqueio de canais para potássio sensíveis ao ATP, pela injeção de glibenclamida, há reversão do efeito antinociceptivo do tramadol de maneira dose-dependente. Vale ressaltar que a glibenclamida não altera o limiar nociceptivo quando injetada sozinha. Por outro lado, a injeção de bloqueadores de K<sub>v</sub> (tetraetilamônio – TEA), K<sub>Ca↑</sub> (paxilina) e K<sub>Ca↓</sub> (dequalínio) não alteraram a analgesia pelo tramadol, sugerindo a não participação desses canais nesse processo.

Vários trabalhos avaliaram o efeito de canais iônicos na antinocicepção do tramadol, a nível periférico e sistêmico. Mert et al. (2006) sugerem que o tramadol seja capaz de bloquear potenciais de ação em estudos de eletrofisiologia de injúria nervosa. Quando TEA ou 4-aminopiridina (4-AP), outro bloqueador de K<sub>v</sub>, são injetados na região de nervos periféricos lesados, esses canais se fecham e não há o efluxo de potássio. O resultado é a reconstrução da condução nervosa. Yalcin & Aksu (2005) verificaram que ao se bloquear canais para potássio voltagem dependentes há redução na analgesia pelo tramadol, quando administrado de forma sistêmica. Essa teoria se contrapõe aos encontrados no presente trabalho, uma vez que não há evidências da participação desses canais na analgesia pelo tramadol em nosso modelo. Já

---

Rodrigues & Duarte (2000) sugerem que os bloqueadores de  $K_{ATP}$  sejam capazes de antagonizar efeitos dos opioides. Levando-se em consideração a classe do tramadol, espera-se que a glibenclamida tenha o mesmo efeito. Da mesma forma, esses autores também verificaram que os bloqueadores de  $K_v$  não alteram o efeito da morfina, corroborando com nossos resultados. A glibenclamida também é capaz de bloquear a antinocicepção periférica induzida pelo NO, sugerindo a relação entre a produção de NO e os canais para potássio dependentes de ATP, a via L-arginina/NO/GMPc/ $K_{ATP}$  (Soares & Duarte, 2001). *In vitro*, essa droga é capaz de modificar canais de retificação tardia, reduzindo, portanto, a excitabilidade neuronal (Tsai et al., 2006).

No presente estudo, foi administrado como pré-tratamento a ioimbina, um antagonista não seletivo dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, e como resultado obtivemos um bloqueio parcial da atividade antinociceptiva periférica do tramadol. No entanto, em contraponto ao encontrado em nossos experimentos, Andurkar et al. (2012) sugeriram que a ioimbina não seja capaz de bloquear a antinocicepção do tramadol em modelo de nocicepção térmica. As diferenças em relação a este trabalho podem envolver a dose dos fármacos, via de administração e/ou modelo nociceptivo utilizado.

O tramadol é uma mistura racêmica de dois enantiômeros, (+)-tramadol e (-)-tramadol. A mistura é capaz de aumentar os níveis extracelulares de monoaminas, entre elas a NA. Os efeitos da mistura racêmica não são meramente aditivos, parecem atuar de maneira sinérgica, cada fração potencializando a outra (Hopwood et al., 2001). Além disso, o enantiômero levogiro, (-)-tramadol, teria maior seletividade pela inibição da recaptação de NA (Hopwood et al., 2001) e esses efeitos seriam modulados pelo metabólito M1,



---

com maior afinidade por receptores  $\mu$ -opioide. (Bloms-Funke et al., 2011). Ainda, a fração levogira parece aumentar o efluxo de NA, comparada às outras frações, além de prolongar a captação desse neurotransmissor no LC (Halfpenny et al., 1999). Visto isso, a antinocicepção do tramadol através da via opioide-monoaminérgica parece ser estereoseletiva (Sevcik et al., 1993). De acordo com nossos resultados, o bloqueio da antinocicepção periférica foi total com a injeção de ioimbina. Como a nível periférico não há metabolismo hepático, não há formação de metabólitos e, portanto, não há potencialização do efeito antinociceptivo noradrenérgico por ativação dos receptores opioides. Estudos *in vitro* sugerem que o enantiômero (-)-tramadol tenha maior seletividade por receptores  $\alpha_2$ , uma vez que a redução disparos de potenciais de ação e hiperpolarização são inibidos pela adição de rauwolscina ao meio. Ele também seria capaz de aumentar a concentração de NA ao redor dos receptores adrenérgicos. Além disso o (+)-tramadol não foi capaz de reduzir os disparos em presença desse antagonista  $\alpha_{2C}$  seletivo (Sevcik et al., 1993).

Em teste de formalina e administração intraperitoneal de tramadol, os níveis de NA estão aumentados na pata inflamada, provavelmente por bloqueio da recaptção desse neurotransmissor nas terminações nervosas periféricas (Mobasher et al., 2014). A nível periférico e espinhal, em modelo de inflamação causada por carragenina, antagonistas não seletivos  $\alpha_2$  conseguem bloquear o efeito de opioides fortes, como a morfina. (Browning et al., 1982; Hylden and Wilcox, 1983). Isso ocorreria por ativação da via descendente como mecanismo analgésico de opioides (Hylden et al., 1991). O tramadol como um opioide atípico provavelmente utilizaria também essa rota analgésica. Durante o processo inflamatório, os níveis de NA estão elevados na medula. Assim, o bloqueio da

---

ação de opioides por antagonistas  $\alpha_2$  em tecidos inflamados ou sensibilizados por autacóides na periferia evidencia a participação de NA espinhal na analgesia (Hylden et al., 1991). Em modelo de artrite em ratos seguido por nocicepção mecânica por compressão de pata, o tramadol injetado por via intravenosa foi antagonizado pela ioimbina de forma significativa (Kayser et al., 1992).

Para avaliar a possível participação dos diferentes receptores do tipo  $\alpha_2$ , utilizamos antagonistas seletivos como pré-tratamento. O antagonista seletivo do receptor  $\alpha_{2C}$ , rauwolscina, foi capaz de bloquear o efeito analgésico do tramadol de maneira dose-dependente. Por outro lado, os antagonistas dos receptores  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$  e  $\alpha_{2D}$  não bloquearam a antinocicepção. Apesar de não evidenciarem efeito na antinocicepção, há estudos demonstrando a presença de RNAm para estes receptores no gânglio da raiz dorsal. O receptor  $\alpha_{2C}$  parece ter maior concentração de RNAm, enquanto  $\alpha_{2A}$  praticamente não há detecção dessa proteína.  $\alpha_{2B}$  também pode ter RNAm expresso no DRG. Os estudos não avaliaram a presença de RNAm de  $\alpha_{2D}$  (Gold et al., 1997). Animais *knockout* para o receptor  $\alpha_{2A}$  mostraram maior sensibilidade aos efeitos antinociceptivos do tramadol em modelo de nocicepção térmica. Assim, antagonistas  $\alpha_{2A}$  melhorariam a antinocicepção do tramadol e a perda da função de  $\alpha_{2A}$  implicaria na analgesia opioide por mecanismos indiretos (Özdoğan et al., 2006). No entanto, periféricamente, não foi observado esse efeito em nosso trabalho.

O estímulo de adrenorreceptores pelo tramadol, principalmente o enantiômero levogiro (Sevcik et al., 1993), aumentaria a condutância de  $K^+$ , gerando hiperpolarização de membrana e inibição do processo nociceptivo (Jordan & Devi, 1999; Özdoğan et al., 2006). Uma vez que, de acordo com nossos resultados, os canais para potássio ATP-dependentes possuem

---

participação na analgesia do tramadol e que os receptores  $\alpha_2$  foram bloqueados, essa teoria corrobora nossos resultados. Os mecanismos analgésicos via  $\alpha_2$  são semelhantes nos níveis espinal e supra espinal (Miranda et al., 2001; Özdoğan et al., 2006). Em nosso estudo, a ioimbina bloqueou totalmente a antinocicepção, assim como a rauwolscina. Desse modo, sugere-se que o tramadol seja capaz de liberar NA endógena, que se liga aos receptores  $\alpha_{2C}$ , interrompendo a transmissão dolorosa em tecidos periféricos.

Na periferia, o gânglio da raiz dorsal expressa RNAm para diversos subtipos de receptores serotoninérgicos, principalmente em condições de inflamação periférica. Os receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>3</sub> têm seu RNAm aumentado em condições de inflamação imediata. Já os receptores 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> e 5-HT<sub>7</sub> o RNAm é expresso mais tardiamente na inflamação. 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1F</sub> e 5-HT<sub>5A</sub> não é percebido qualquer alteração na expressão do RNAm (Liu et al., 2005). Estudos prévios realizados em nosso laboratório mostraram que os receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>3</sub> participam da antinocicepção periférica da serotonina em baixas doses de forma dose-dependente, uma vez que os antagonistas desses receptores são capazes de reverter o efeito antihiperálgico desse neurotransmissor (Diniz et al., 2015). Da mesma forma, em nosso trabalho, o antagonista do receptor 5-HT<sub>1B</sub> e 5-HT<sub>3</sub>, isamoltano e ondasetrona respectivamente, mas não a cetanserina, antagonista do receptor 5-HT<sub>2A</sub>, aboliram o efeito antinociceptivo do tramadol de maneira dose-dependente, sugerindo a participação desses receptores na analgesia do tramadol. Além disso, o BRL 15572, antagonista do receptor 5-HT<sub>1D</sub>, também foi capaz de bloquear o efeito do tramadol, de forma dose-dependente. Esse resultado não era esperado, uma vez que Diniz et al. (2018; 2015) não

---

encontraram esse resultado em seus trabalhos, mas sim o contrário, a não participação desse receptor na analgesia da serotonina em baixas doses a nível periférico. Vale ressaltar que os antagonistas utilizados em nossos experimentos não mostraram qualquer efeito analgésico ou hiperalgésico quando injetados sozinhos.

Pode-se sugerir que haja relação dos opioides com ativação do sistema serotoninérgico descendente para modulação da dor. Estudos envolvendo paroxetina, um inibidor seletivo da recaptção de serotonina (ISRS), e morfina mostraram que a antinocicepção em teste de contorção abdominal provocada pela paroxetina foi abolida pela injeção de naloxona, mostrando a participação do sistema opioide na antinocicepção desse antidepressivo (Kesim et al., 2005). Nosso grupo de pesquisa mostrou que opioides endógenos estariam envolvidos na antinocicepção periférica induzida pela serotonina (Diniz et al., 2018).

O receptor 5-HT<sub>1B</sub>, assim como o receptor 5-HT<sub>1D</sub>, é acoplado à proteína G<sub>i</sub>, de forma que é capaz de reduzir a produção de AMPc e estimular a liberação de cálcio intracelular. São receptores estruturalmente semelhantes, sendo o receptor 5-HT<sub>1B</sub> mais encontrado em roedores e 5-HT<sub>1D</sub> em não roedores (Hannon & Hoyer, 2008). No teste da formalina, esses receptores mostraram participação na antinocicepção periférica (Granados-Soto et al., 2010) e animais *knockout* para receptores 5-HT<sub>1B</sub> tiveram respostas aumentadas para nocicepção térmica e inflamatória no teste da formalina (Kayser et al., 2007).

Sabe-se que o aumento da concentração de 5-HT plasmática, sem alcançar níveis tóxicos, gera analgesia. O estímulo dos receptores 5-HT<sub>3</sub> pode ser obtido com injeção de quipazina. Isso faz com que haja potencialização da analgesia no pós operatório imediato (Zemlan et al., 1980). Os receptores 5-HT<sub>3</sub>

---

estão localizados nas fibras sensoriais periféricas promovendo rápida despolarização. São canais iônicos controlados por ligantes cuja abertura permite influxo de sódio e cálcio e efluxo de potássio (Hannon & Hoyer, 2008). No entanto, a administração subcutânea de agonista ou antagonista 5-HT<sub>3</sub> não foi capaz de produzir qualquer efeito sobre a hiperalgisia produzida pela serotonina (Tokunaga et al., 1998). Por outro lado, o uso concomitante de ondasetrona, um bloqueador dos receptores 5-HT<sub>3</sub>, com tramadol reduz o potencial analgésico (Arcioni et al., 2002; De Witte et al., 2001) e reduz também a antinocicepção da paroxetina em modelo de contorção abdominal (Kesim et al., 2005). De fato, em nossos experimentos essa droga reduziu a antinocicepção periférica do tramadol de maneira dose-dependente, sugerindo um papel importante desse receptor na analgesia do tramadol.

Os receptores 5-HT<sub>2A</sub> são acoplados à proteína G<sub>q</sub>, ativando a via IP<sub>3</sub>/PKC/Ca<sup>2+</sup> (Hannon & Hoyer, 2008; Rocha-González et al., 2005). A administração de agonista 5-HT<sub>2A</sub> gera hiperalgisia térmica, enquanto que o seu antagonista é capaz de reverter a dor produzida pela administração de 5-HT (Tokunaga et al., 1998). O RNAm para 5-HT<sub>2A</sub> está aumentado em ratos com inflamação periférica e antagonistas seletivos para esse receptor quando administrados de forma sistêmica são capazes de antagonizar parcialmente a analgesia do tramadol (Xie et al., 2008). São receptores geralmente associados aos eventos antidepressivos, portanto com papel importante no mecanismo analgésico da serotonina. No entanto, em nossos experimentos não foi observado reversão da analgesia do tramadol pelo antagonista cetanserina. Outros trabalhos corroboram esses resultados. A analgesia periférica da paroxetina também não foi bloqueada pela injeção de cetanserina nos

---

experimentos de Kesim et al. (2005), sugerindo uma semelhança farmacológica entre o tramadol e esse antidepressivo. Em trabalhos com venlafaxina, foi observado que o tramadol também não teve ligação com o receptor 5-HT<sub>2A</sub>, assim como a própria venlafaxina. (Rickli et al., 2018). Mais estudos são necessários para elucidar essa rota analgésica periférica. É importante notar que o enantiômero dextrogiro aumenta efluxo de 5-HT no núcleo da rafe dorsal (Bamigbade et al., 1997; Halfpenny et al., 1999).

O receptor 5-HT<sub>7</sub> é o único receptor avaliado nos experimentos acoplado à proteína G<sub>s</sub>, ou seja, que ativa a AC e aumentando os níveis de AMPc. Conseqüentemente, aumenta a excitabilidade neuronal (Cardenas et al., 1999; Hannon & Hoyer, 2008; Rocha-González et al., 2005). O RNAm desses receptores é detectado em neurônios sensoriais de ratos e humanos (Pierce et al., 1996; Rocha-González et al., 2005). De fato, no teste da formalina, o receptor 5-HT<sub>7</sub> possui ação pronociceptiva e o agonista 5-HT<sub>7</sub> produziu dor na fase 2 do teste e foi revertido pelo seu antagonista (Rocha-González et al., 2005). Em nossos experimentos, no entanto, o receptor 5-HT<sub>7</sub> parece não ter qualquer envolvimento na analgesia periférica pelo tramadol, uma vez que o antagonista SB269970 não foi capaz de reverter a analgesia produzida pelo opioide. O papel dos receptores serotoninérgicos no mecanismo de ação desse opioide atípico ainda requer maiores estudos.

O sistema dopaminérgico tem sido avaliado também no estudo da dor periférica. Em relação ao tramadol, poucos estudos tem sido feitos para elucidar a participação desses receptores na antinocicepção desse opioide.

Em nosso trabalho, avaliamos a ação dos antagonistas dos receptores D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub> e nenhum deles conseguiu bloquear a antinocicepção periférica do

---

tramadol. Estudos envolvendo estresse oxidativo produzido pelo tramadol e consequente redução do limiar convulsivo mostraram que agonistas dos receptores D<sub>2</sub> conseguem reduzir ainda mais o limiar convulsivo, enquanto antagonistas desses receptores produzem efeito contrário, aumentam o limiar, sugerindo bloqueio parcial da ação do tramadol e que essa ação seja, pelo menos em parte, através da via dopaminérgica (Bameri et al., 2018). O receptor D<sub>2</sub> pode ser encontrado no SNC e na periferia, possuindo alta densidade no corno dorsal da medula (van Dijken et al., 1996). Participa de mecanismos excitatórios e, quando estimulado por tramadol intravenoso, é capaz de abolir hiper-reatividade do músculo detrusor da bexiga reduzindo incontinência urinária gerada por injeção sistêmica de apomorfina em ratos (Pehrson & Andersson, 2003). Na medula espinhal, as áreas de liberação de encefalinas que modulam tônus vesical são as mesmas onde se encontram receptores D<sub>2</sub> (van Dijken et al., 1996). O tramadol seria, portanto, sistemicamente, capaz de estimular a via dopaminérgica, principalmente seu enantiômero (+)-tramadol, que aumenta a rotatividade de dopamina no striatum (Frink et al., 1996; Pehrson & Andersson, 2003).

A antinocicepção produzida pela morfina injetada de forma sistêmica foi atenuada pela administração de agonista dos receptores D<sub>3</sub> 7-OH-DPAT. Isso sugere a relação entre opioides e a via dopaminérgica (Cook et al., 1999). Em nosso trabalho, periféricamente, o antagonista U 99194 não conseguiu bloquear a antinocicepção do tramadol, não deixando claro se esses receptores possuem papel na analgesia do tramadol em nosso modelo.

Em relação aos transportadores dopaminérgicos (DAT), em sinaptossomas de córtex de ratos o tramadol apresentou baixa interferência

---

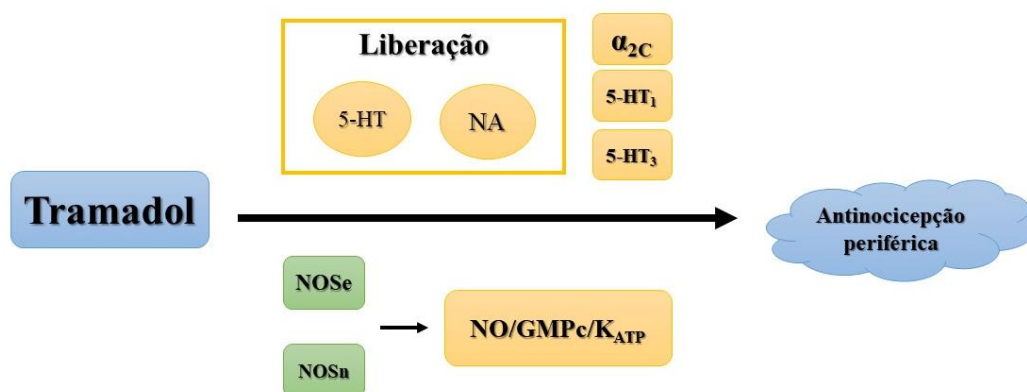
sobre os transportadores (Driessen et al., 1993). Por outro lado, ensaios de binding mostraram que o metabólito M1 foi capaz de se ligar ao DAT, assim como a mistura racêmica ( $\pm$ )-tramadol (Olson et al., 2019).

Em conclusão, nossos dados sugerem, pela primeira vez, a ação periférica induzida pelo tramadol quando administrado em modelo de hiperalgesia induzida por PGE<sub>2</sub>, e que há interação com os receptores  $\alpha_2C$ -adrenérgicos e com os receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> e 5-HT<sub>3</sub>, além do sistema nitrérgico e canais para potássio ATP-sensíveis. A hipótese é que o tramadol aja através da ativação dos receptores serotoninérgicos e transdução inibitória através da proteína G<sub>i</sub>, com inibição da enzima AC e PKA e conseqüente redução nos níveis de Ca<sup>2+</sup> intracelular. O tramadol interage também com receptores noradrenérgicos inibitórios que induz a antinocicepção pelo mesmo processo. Ainda, ocorre hiperpolarização de membrana via L-arginina/NO/GMPc/KATP gerando o efeito antinociceptivo (**Figura 13**).

O presente estudo mostrou-se importante não apenas para contribuir para o entendimento dos mecanismos de ação do tramadol, mas também para elucidar as possíveis aplicações do fármaco em medicina veterinária e humana a nível local.

Ressaltamos a necessidade de investigações futuras e esse trabalho abre portas para novas perspectivas como dosagem de nitrito para quantificação de níveis de NO utilizando técnica de Griess (Bryan and Grisham, 2007), quantificação de receptores na superfície plantar de ratos utilizando western blot e experimentos farmacológicos em modelo de hiperalgesia por PGE<sub>2</sub> utilizando os enantiômeros (+)-tramadol, (-)-tramadol e o metabólito M1.





**Figura 13 – Hipótese sobre o mecanismo de ação antinociceptivo periférico induzido pelo tramadol.** O tramadol pode obedecer às seguintes vias analgésicas: inibição da enzima adenilato ciclase através da ativação de

---

receptores acoplados à proteína  $G_i$  ( $\alpha_{2C}$ , 5-HT<sub>1B</sub> e 5-HT<sub>1D</sub>) e dos receptores ionotrópicos 5-HT<sub>3</sub>, com abertura de canais para sódio e cálcio, gerando hiperpolarização da membrana e antinocicepção; participação na via L-arginina/NO/GMPc, com produção de NO, principalmente através das enzimas NOSe e NOSn, e o segundo mensageiro GMPc, ativando  $K_{ATP}$ .

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 18 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel, S.R., 1995. Tramadol: An alternative Analgesic to Traditional Opioids and NSAIDs. *J. Pharm. Care Pain Symptom Control* 3, 5–29.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G., 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J* 357, 593–615.
- Aley, K.O., Levine, J.D., 1999. Role of Protein Kinase A in the Maintenance of Inflammatory Pain. *J. Neurosci.* 19, 2181 LP – 2186. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-06-02181.1999>
- Alsalem, M., Altarifi, A., Haddad, M., Aldossary, S.A., Kalbouneh, H., Aldaoud, N., Saleh, T., El-salem, K., 2019. Antinociceptive and Abuse Potential Effects of Cannabinoid/Opioid Combinations in a Chronic Pain Model in Rats. *Brain Sci.* 9, 1–13.
- Alves, D.P., Motta, P.G., Romero, T.R.L., Klein, A., Duarte, I.D.G., 2013. NO / cGMP production is important for the endogenous peripheral control of hyperalgesia during inflammation. *Nitric Oxide* 28, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2012.09.001>
- Andurkar, S. V, Gendler, L., Gulati, A., 2012. Tramadol antinociception is potentiated by clonidine through  $\alpha_2$  -adrenergic and I2 -imidazoline but not by endothelin ETA receptors in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 683, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.03.016>
- Anwar, K., 2016. Pathophysiology of pain. *Disease-a-Month* 62, 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2016.05.015>
- Arcioni, R., Rocca, M., Romano, S., Romano, R., Pietropaoli, P., Gasparetto, A., 2002. Ondansetron Inhibits the Analgesic Effects of Tramadol: A Possible 5-HT 3 Spinal Receptor Involvement in Acute Pain in Humans. *Anesth Analg* 94, 1553–7.
- Bameri, B., Shaki, F., Ahangar, N., Ataee, R., Samadi, M., Mohammadi, H., 2018. Evidence for the Involvement of the Dopaminergic System in Seizure and

- Oxidative Damage Induced by Tramadol. *Int. J. Toxicol.* 37, 164–170.  
<https://doi.org/10.1177/1091581817753607>
- Bamigbade, T.A., Davidson, C., Langford, R.M., Stamford, J.A., 1997. 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.* 79, 352–356.
- Barrot, M., 2012. Review tests and models of nociception and pain in rodents. *NSC* 211, 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.041>
- Basbaum, A., Jessell, T., 2000. The Perception of Pain, in: Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T. (Eds.), *Principles of Neuroscience*. Appleton and Lange, Nova York, pp. 472–491.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., Julius, D., 2009. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* 139, 267–284.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>. Cellular
- Basbaum, A.I., Clanton, C.H., Fields, H.L., 1976. Opiate and stimulus-produced analgesia: Functional anatomy of a medullospinal pathway. *Proc. Nati. Acad. Sci.* 73, 4685–4688.
- Bell, A., 2018. The neurobiology of acute pain. *Vet. J.* 237, 55–62.  
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.05.004>
- Bloms-Funke, P., Dremencov, E., Cremers, T.I.F.H., Tzschentke, T.M., 2011. Tramadol increases extracellular levels of serotonin and noradrenaline as measured by in vivo microdialysis in the ventral hippocampus of freely-moving rats. *Neurosci. Lett.* 490, 191–195.  
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.12.049>
- Boddeke, E.W., 2001. Involvement of chemokines in pain. *Eur. J. Pharmacol.* 429, 115–119.
- BRASIL, 1999. PORTARIA Nº 344, DE 12 DE MAIO DE 1998. Aprova o Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. *Diário Of. da União*.

- Bravo, L., Mico, J.A., Berrocoso, E., 2017. Discovery and development of tramadol for the treatment of pain. *Expert Opin. Drug Discov.* 12, 1281–1291. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1377697>
- Brown, D.A., Higashida, H., 1988. Membrane current responses of NG108-15 mouse neuroblastoma x rat glioma hybrid cells to bradykinin. *J. Physiol.* 397, 167–184. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp016994>
- Browning, S., Lawrence, D., Livingston, A., Morris, B., 1982. Interactions of drugs active at opiate receptors and drugs active at  $\alpha_2$ -receptors on various test systems. *Br. J. Pharmac.* 77, 487–491.
- Bryan, N.S., Grisham, M.B., 2007. Methods to Detect Nitric Oxide and its Metabolites in Biological Samples. *Free Radic Biol Med* 43, 645–657.
- Cardenas, C.G., Mar, L.P. Del, Vysokanov, A. V, Arnold, P.B., Cardenas, L.M., Surmeier, D.J., Scroggs, R.S., 1999. Serotonergic modulation of hyperpolarization-activated current in acutely isolated rat dorsal root ganglion neurons. *J. Physiol.* 518, 507–523.
- Chen, J., 2011. History of pain theories. *Neurosci. Bull.* 27, 343–350. <https://doi.org/10.1007/s12264-011-0139-0>
- Coda, B., Bonica, J., 2001. General considerations of acute pain., in: Loeser, J.D., Coda, B., Bonica, J. (Eds.), *Bonica's Management of Pain*. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 22–40.
- Cook, C.D., Rodefer, J.S., Picker, M.J., 1999. Selective attenuation of the antinociceptive effects of  $\mu$  opioids by the putative dopamine D3 agonist 7-OH-DPAT. *Psychopharmacology (Berl)*. 144, 239–247.
- Cunha, T.M., Roman-campos, D., Lotufo, C.M., Duarte, H.L., Souza, G.R., Verri, W.A., Funez, M.I., Ferreira, S.H., 2010. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3K  $\gamma$  / AKT / nNOS / NO / K ATP signaling pathway. *PNAS* 107, 4442–4447. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914733107>
- Dayer, P., Collar, L., Desmeules, J., 1994. The Pharmacology of Tramadol. *Drugs* 47, 3–7.

- De Witte, J.L., Schoenmaekers, B., Sessler, D.I., Deloof, T., 2001. The Analgesic Efficacy of Tramadol is Impaired by Concurrent Administration of Ondansetron. *Anesth Analg* 92, 1319–1321.
- DeSantana, J.M., Perissinotti, D.M.N., Oliveira Junior, J.O. de, Correia, L.M.F., Oliveira, C.M. de, Fonseca, P.R.B. da, 2020. Tradução para a língua portuguesa da definição revisada de dor pela Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor. *Pain* 1–8.
- Diniz, D.A., Petrocchi, J.A., Navarro, L.C., Souza, T.C., Castor, M.G.M. e., Duarte, I.D.G., Romero, T.R.L., 2018. Serotonin induces peripheral antinociception via the opioidergic system. *Biomed. Pharmacother.* 97, 1434–1437. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.048>
- Diniz, D.A., Petrocchi, J.A., Navarro, L.C., Souza, T.C., Castor, M.G.M., Perez, A.C., Duarte, I.D.G., Romero, T.R.L., 2015. Serotonin induces peripheral mechanical antihyperalgesic effects in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 767, 94–97. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.10.012>
- Driessen, B., Reimann, W., Giertz, H., 1993. Effects of the central analgesic tramadol on the uptake and release of noradrenaline and dopamine in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 108, 806–811. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1993.tb12882.x>
- Duarte, I.D., dos Santos, I.R., Lorenzetti, B.B., Ferreira, S.H., 1992. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 217, 225–227.
- Endres-Becker, J., Heppenstall, P.A., Mousa, S.A., Labuz, D., Oksche, A., Schäfer, M., Stein, C., Zöllner, C., 2007.  $\mu$ -Opioid receptor activation modulates transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) currents in sensory neurons in a model of inflammatory pain. *Mol. Pharmacol.* 71, 12–18.
- Epstein, M., Rodan, I., Griffenhagen, G., Kadrlík, J., Petty, M., Robertson, S., Simpson, W., 2015. 2015 AAHA/AAFP Pain Management Guidelines for Dogs and Cats. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 51, 67–84.

<https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-7331>

- Faron-Górecka, A., Kusmider, M., Inan, S.Y., Siwanowicz, J., Dziedzicka-Wasylewska, M., 2004. Effects of tramadol on alfa-2-adrenergic receptors in the rat brain. *Brain Res.* 1016, 263–267. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.05.026>
- Ferreira, S., 1972. Prostaglandins, Aspirin-like Drugs and Analgesia. *Nat. New Biol.* 240, 200–203.
- Ferreira, S.H., Duarte, I.D.G., Lorenzetti, B.B., 1991. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. *Eur. J. Pharmacol.* 201, 121–122.
- Ferreira, S.H., Nakamura, M., 1979. II - Prostaglandin hyperalgesia: the peripheral analgesic activity of morphine, enkephalins and opioid antagonist. *Prostaglandins* 18, 191–200.
- Fields, H.L., 1988. Sources of variability in the sensation of pain. *Pain* 33, 195–200.
- Fields, H.L., 1978. Brainstem control of spinal pain-transmission neurons. *Ann Rev Physiol* 40, 217–48.
- Frankus, E., Friderichs, E., Kim, S.M., Osterloh, G., 1978. On separation of isomeres, structural elucidation and pharmacological characterization of 1-(m-methoxyphenyl)-2-(dimethylaminomethyl)-cyclohexan-1-ol (author's transl). *Arzneimittelforschung.* 28, 114–121.
- Friderichs, E., Becker, R., 1991. Correlation of tramadol and M1 serum levels with antinociceptive activity in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 343, R9.
- Frink, M.C., Hennies, H.H., Englberger, W., Haurand, M., Willfert, B., 1996. Influence of tramadol on neurotransmitter systems of the rat brain. *Arzneimittelforschung.* 46, 1029–1036.
- García-Quetglas, E., Azanza, J.R., Sádaba, B., Muñoz, M.J., Gil, I., Campanero, M.A., 2007. Pharmacokinetics of tramadol enantiomers and their respective



- phase I metabolites in relation to CYP2D6 phenotype. *Pharmacol. Res.* 55, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2006.11.003>
- Gillen, C., Haurand, M., Kobelt, D.J., Wnendt, S., 2000. Affinity, potency and efficacy of tramadol and its metabolites at the cloned human  $\mu$ -opioid receptor. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 362, 116–121. <https://doi.org/10.1007/s002100000266>
- Gold, M., 2013. Molecular biology of sensory transduction, in: McMahon, Koltzenburg, Tracey, Turk (Eds.), *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. Elsevier, pp. 31–47.
- Gold, M.S., Dastmalchi, S., Levine, J.D., 1997.  $\alpha_2$ -Adrenergic receptor subtypes in rat dorsal root and superior cervical ganglion neurons. *Pain* 69, 179–190.
- Granados-Soto, V., Argüelles, C., Rocha-González, H., Godínez-Chaparro, B., Flores-Murrieta, F., Villalón, C., 2010. The role of peripheral 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub> and 5-HT<sub>1F</sub> serotonergic receptors in the reduction of nociception in rats. *Neuroscience* 165, 561–568. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.10.020>
- Grond, S., Sablotzki, A., 2004. Clinical Pharmacology of Tramadol. *Clin. Pharmacokinet.* 43, 879–923.
- Halfpenny, D.M., Callado, L.F., Hopwood, S.E., Bamigbade, T.A., Langford, R.M., Stamford, J.A., 1999. Effects of tramadol stereoisomers on norepinephrine efflux and uptake in the rat locus coeruleus measured by real time voltammetry 83, 909–915. <https://doi.org/10.1093/bja/83.6.909>
- Hannon, J., Hoyer, D., 2008. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav. Brain Res.* 195, 198–213. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.03.020>
- Hennies, H.-H., Friderichs, E., Wilsmann, K., Flohé, L., 1982. Effect of the opioid analgesic tramadol on inactivation of norepinephrine and serotonin. *Biochem. Pharmacol.* 31, 1654–1655.
- Hopwood, S.E., Owesson, C.A., Callado, L.F., McLaughlin, D.P., Stamford, J.A., 2001. Effects of chronic tramadol on pre- and post-synaptic measures of

- monoamine function. *J. Psychopharmacol.* 15, 147–153.  
<https://doi.org/10.1177/026988110101500301>
- Horton, E.W., 1963. Action of Prostaglandin E1 on Tissues which respond to Bradykinin. *Nature* 200, 892–893. <https://doi.org/10.1038/200892b0>
- Hylden, J., Wilcox, G., 1983. Pharmacological characterization of substance P-induced nociception in mice: modulation by opioid and noradrenergic agonists at the spinal level. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 226, 398–404.
- Hylden, J.L., Thomas, D.A., Iadarola, M.J., Nahin, R.L., Dubner, R., 1991. Spinal opioid analgesic effects are enhanced in a model of unilateral inflammation/hyperalgesia: possible involvement of noradrenergic mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* 194, 135–143.
- Ide, S., Minami, M., Ishihara, K., Uhl, G.R., Sora, I., Ikeda, K., 2006. Mu opioid receptor-dependent and independent components in effects of tramadol. *Neuropharmacology* 51, 651–658.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.05.008>
- Indrawirawan, Y., McAlees, T., 2014. Tramadol toxicity in a cat: case report and literature review of serotonin syndrome. *J. Feline Med. Surg.* 16, 572–578.  
<https://doi.org/10.1177/1098612X14539088>
- Isiordia-espinoza, M.A., Pozos-guillén, A., Pérez-urizar, J., Chavarría-bolaños, D., 2014. Involvement of Nitric Oxide and ATP-Sensitive Potassium Channels in the Peripheral Antinociceptive Action of a Tramadol – Dexketoprofen Combination in the Formalin Test. *Drug Dev Res* 75, 449–454. <https://doi.org/10.1002/ddr.21180>
- Jimenez, T.E.P., Mealey, K.L., Schnider, D., Grubb, T.L., Greene, S.A., Court, M.H., 2018. Identification of canine cytochrome P-450s (CYPs) metabolizing the tramadol (+)- M1 and (+)- M2 metabolites to the tramadol (+)- M5 metabolite in dog liver microsomes. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 41, 815–824.  
<https://doi.org/10.1111/jvp.12706>
- Jordan, B.A., Devi, L.A., 1999. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399, 697–700.

<https://doi.org/10.1038/21441>

Juilfs, D.M., Soderling, S., Burns, F., Beavo, J.A., 1999. Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs), in: *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Volume 135. Springer, pp. 67–104.

Kassuya, C.A.L., Ferreira, J., Claudino, R.F., Calixto, J.B., 2007. Intraplantar PGE 2 causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. *Br. J. Pharmacol.* 150, 727–737. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707149>

Kawabata, A., 2011. Prostaglandin E2 and Pain—An Update. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 1170–1173.

Kayser, V., Besson, J., Guilbaud, G., 1991. Effects of the analgesic agent tramadol in normal and a the effects of different opioids, including tolerance and cross-tolerance to morphine. *Eur. J. Pharmacol.* 195, 37–45.

Kayser, V., Besson, J.M., Guilbaud, G., 1992. Evidence for a noradrenergic component in the antinociceptive effect of the analgesic agent tramadol in an animal model of clinical pain, the arthritic rat. *Eur. J. Pharmacol.* 224, 83–88. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(92\)94822-D](https://doi.org/10.1016/0014-2999(92)94822-D)

Kayser, V., Elfihri, I., Aubel, B., Melfort, M., Julius, D., Gingrich, J.A., Hamon, M., Bourgoin, S., 2007. Mechanical, thermal and formalin-induced nociception is differentially altered in 5-HT1A<sup>-/-</sup>, 5-HT1B<sup>-/-</sup>, 5-HT2A<sup>-/-</sup>, 5-HT3A<sup>-/-</sup> and 5-HTT<sup>-/-</sup> knock-out male mice. *Pain* 130, 235–248. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.11.015>

Keates, H.L., Cramond, T., Smith, M.T., 1999. Intraarticular and Periarticular Opioid Binding in Inflamed Tissue in Experimental Canine Arthritis. *Anesth Analg* 89, 409–415.

Kelm, M., 1999. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim. Biophys. Acta* 1411, 273–289.

Kesim, M., Duman, E.N., Kadioglu, M., Yaris, E., Kalyoncu, N.I., Erciyas, N.,

2005. The Different Roles of 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>3</sub> Receptors on Antinociceptive Effect of Paroxetine in Chemical Stimuli in Mice. *J Pharmacol Sci* 97, 61–66.
- Kogan, L., Hellyer, P., Rishniw, M., Schoenfeld-tacher, R., 2019. The US Opioid Epidemic and Its Impact on US General Practice Veterinarians. *Front. Vet. Sci.* 6, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00222>
- Kona-Boun, J.-J., Cuveliez, S., Troncy, E., 2006. Evaluation of epidural administration of morphine or morphine and bupivacaine for postoperative analgesia after premedication with an opioid analgesic and orthopedic surgery in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 229, 1103–1112.
- Kukanich, B., Papich, M.G., 2004. Pharmacokinetics of tramadol and the metabolite O -desmethyltramadol in dogs. *J. vet. Pharmacol. Ther.* 27, 239–246.
- Laugesen, S., Enggaard, T.P., Pedersen, R.S., Sindrup, S.H., Broesen, K., 2005. Paroxetine, a cytochrome P450 2D6 inhibitor, diminishes the stereoselective O-demethylation and reduces the hypoalgesic effect of tramadol. *Clin Pharmacol Ther* 77, 312–323. <https://doi.org/10.1016/j.clpt.2004.11.002>
- Lee, C.R., Mctavish, D., Sorkin, E.M., 1993. Tramadol: A Preliminary Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Potential in Acute and Chronic Pain States. *Drugs* 46, 313–340.
- Levine, J.D., Taiwo, Y.O., 1989. Involvement of the mu-opiate receptor in peripheral analgesia. *Neuroscience* 32, 571–575.
- Liu, X., Wu, S., Wang, Y., Wang, W., Zhou, L., Li, Y., 2005. Changes of 5-HT receptor subtype mRNAs in rat dorsal root ganglion by bee venom-induced inflammatory pain. *Neurosci. Lett.* 375, 42–46. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.10.064>
- Lorena, E.R.S., Luna, S.P.L., Lascelles, B.D.X., Corrente, J.E., 2014. Current attitudes regarding the use of perioperative analgesics in dogs and cats by Brazilian veterinarians. *Vet. Anaesth. Analg.* 41, 82–89. <https://doi.org/10.1111/vaa.12104>

- Lorena, S.E., Luna, S.P., Lascelles, B.D.X., Corrente, J.E., 2013. Attitude of Brazilian veterinarians in the recognition and treatment of pain in horses and cattle. *Vet. Anaesth. Analg.* 1–9. <https://doi.org/10.1111/vaa.12025>
- Mastrocinque, S., Fantoni, D.T., 2003. A comparison of preoperative tramadol and morphine for the control of early postoperative pain in canine ovariohysterectomy. *Vet. Anaesth. Analg.* 30, 220–228.
- Melzack, R., Wall, P.D., 1965. Pain Mechanisms: A New Theory. *Science* (80- ). 150, 971–979.
- Mert, T., Gunes, Y., Gunay, I., 2007. Role of 4-aminopyridine-sensitive potassium channels in peripheral antinociception. *Eur. J. Pharmacol.* 572, 138–141. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.06.026>
- Mert, T., Gunes, Y., Ozcengiz, D., Gunay, I., Polat, S., 2006. Comparative effects of lidocaine and tramadol on injured peripheral nerves. *Eur. J. Pharmacol.* 543, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.06.008>
- Millan, M.J., 2002. Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* 66, 355–474.
- Miotto, K., Cho, A.K., Khalil, M.A., Blanco, K., Sasaki, J.D., Rawson, R., 2017. Trends in Tramadol: Pharmacology, Metabolism, and Misuse. *Anesth Analg* 124, 44–51. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000001683>
- Miranda, H.F., Sierralta, F., Pinardi, G., 2001. An Isobolographic Analysis of the Adrenergic Modulation of Diclofenac Antinociception. *Anesth. Analg.* 93.
- Moayed, M., Davis, K.D., 2013. Theories of pain : from specificity to gate control. *J. Neurophysiol.* 109, 5–12. <https://doi.org/10.1152/jn.00457.2012>
- Mobasher, M.A., Sajedianfard, J., Jamshidzadeh, A., Naghdi, N., Namvaran, M.M., 2014. The effects of tramadol on norepinephrine and MHPG releasing in locus coeruleus in formalin test in rats: a brain stereotaxic study. *Iran J Basic Med Sci.* 17, 419–425.
- Moncada, S., 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol rev* 43, 109–142.

- Monteiro, B.P., Klinck, M.P., Moreau, M., Guillot, M., Paulo, V., Steagall, M., Pelletier, J.-P., Martel-Pelletier, J., Gauvin, D., Del Castillo, J.R.E., Troncy, E., 2017. Analgesic efficacy of tramadol in cats with naturally occurring osteoarthritis. *PLoS One* 12, 1–13.
- Moore, P.K., Al-Swayeh, O.A., Chong, N.W.S., Evans, R.A., Gibson, A., 1990. L-NG-nitro arginine (L-NOARG), a novel, L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilatation in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 99, 408–412.
- Moore, R., Bloom, F., 1979. Central catecholamine neuron systems: anatomy of the norepinephrine. *Ann Rev Physiol* 2, 113–68.
- Muir, W.W., Wiese, A.J., March, P.A., 2003. Effects of morphine, lidocaine, ketamine, and morphine-lidocaine-ketamine drug combination on minimum alveolar concentration in dogs anesthetized with isoflurane. *Am. J. Vet. Res.* 64, 1155–1160.
- Mullershausen, F., Russwurm, M., Thompson, W.J., Liu, L., Koesling, D., Friebe, A., 2001. Rapid nitric oxide-induced desensitization of the cGMP response is caused by increased activity of phosphodiesterase type 5 paralleled by phosphorylation of the enzyme. *J. Cell Biol.* 155, 271–278.
- Murphy, M.E., Brayden, J.E., 1995. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. *J. Physiol.* 486, 47–58.
- Ocaña, M., Pozo, E. Del, Barrios, M., Robles, L.I., Baeyens, J.M., 1990. An ATP-dependent potassium channel blocker antagonizes morphine analgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 186, 377–378.
- Oliveira Junior, J.O. de, Ashmawi, H.A., 2015. Efeito analgésico periférico do tramadol em modelo de dor pós-operatória em ratos. Tese(doutorado)--Faculdade Med. da Univ. São Paulo. Programa Anestesiol. São Paulo.
- Olson, K.M., Duron, D.I., Womer, D., Fell, R., Streicher, J.M., 2019. Comprehensive molecular pharmacology screening reveals potential new receptor interactions for clinically relevant opioids. *PLoS One* 14, 1–18.

- Özdoğan, K.Ü., Lähdesmäki, J., Scheinin, M., 2006. The analgesic efficacy of partial opioid agonists is increased in mice with targeted inactivation of the  $\alpha 2A$ -adrenoceptor gene. *Eur. J. Pharmacol.* 529, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.10.029>
- Pacheco, D.F., Klein, A., Perez, A.D.C., Pacheco, F., Francischi, J.N. De, Duarte, I., 2008. The mu-opioid receptor agonist morphine, but not agonists at delta- or kappa-opioid receptors, induces peripheral antinociception mediated by cannabinoid receptors. *Br. J. Pharmacol.* 154, 1143–1149. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.175>
- Pacheco, F., Klein, A., Perez, A.C., Mara, C., Francischi, J.N. De, Maria, G., Reis, L., Duarte, I.D.G., 2009. Central antinociception induced by mu-opioid receptor agonist morphine, but not d- or k-, is mediated by cannabinoid CB1 receptor. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 158, 225–231. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00310.x>
- Pehrson, R., Andersson, K., 2003. Tramadol inhibits rat detrusor overactivity caused by dopamine receptor stimulation. *J. Urol.* 170, 272–275. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000062528.54550.65>
- Pierce, P.A., Xie, G.-X., Levine, J.D., Peroutka, S.J., 1996. 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: a polymerase chain reaction study. *Neuroscience* 70, 553–559.
- Poulsen, L., Arendt-Nielsen, L., Brøsen, K., Sindrup, S.H., 1996. The hypoalgesic effect of tramadol in relation to CYP2D6\*. *Clin. Pharmacol. Ther.* 60, 636–644. [https://doi.org/10.1016/S0009-9236\(96\)90211-8](https://doi.org/10.1016/S0009-9236(96)90211-8)
- Pypendop, B.H., Ilkiw, J.E., 2007. Pharmacokinetics of tramadol, and its metabolite O-desmethyl-tramadol, in cats. *J. vet. Pharmacol. Ther.* 31, 52–59. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2007.00921.x> Pharmacokinetics
- Pypendop, B.H., Siao, K.T., Ilkiw, J.E., 2009. Effects of tramadol hydrochloride on the thermal threshold in cats. *Am J Vet Res* 70, 1465–1470.
- Radbruch, L., Grond, S., Lehmann, K.A., 1996. A Risk-Benefit Assessment of

- Tramadol in the Management of Pain. *Drug Saf.* 15, 8–29.
- Raffa, R.B., Friderichs, E., Reimann, W., Shank, R.P., Codd, E.E., Vaught, J.L., 1992. Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an “atypical” opioid analgesic. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 260, 275–285.
- Raffa, R.B., Friderichs, E., Reimann, W., Shank, R.P., Codd, E.E., Vaught, J.L., Jacoby, H.I., Selve, N., 1993. Complementary and synergistic antinociceptive interaction between the enantiomers of tramadol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267, 331–340.
- Randall, L.O., Selitto, J.J., 1957. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn. Thérapie* 111, 409–419.
- Reynolds, D. V., 1969. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science* (80- ). 164, 444–445.
- Rickli, A., Liakoni, E., Hoener, M.C., Liechti, M.E., 2018. Opioid-induced inhibition of the human 5-HT and noradrenaline transporters in vitro: link to clinical reports of serotonin syndrome. *Br. J. Pharmacol.* 175, 532–543. <https://doi.org/10.1111/bph.14105>
- Rocha-González, I.H., Meneses, A., Carlton, S.M., Granados-soto, V., 2005. Pronociceptive role of peripheral and spinal 5-HT<sub>7</sub> receptors in the formalin test. *Pain* 117, 182–192. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.06.011>
- Rodrigues, A., Duarte, I., 2000. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Br. J. Pharmacol.* 129, 110–114.
- Rojas-Corrales, M.O., Ortega-Alvaro, A., Gibert-Rahola, J., Roca-Vinardell, A., Micó, J.A., 2000. Pindolol, a beta-adrenoceptor blocker/5-hydroxytryptamine<sub>1A/1B</sub> antagonist, enhances the analgesic effect of tramadol. *Pain* 88, 119–124.
- Romero, T.R.L., Duarte, I.D.G., 2013. Involvement of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the peripheral antinociceptive effect induced by ketamine. *Vet. Anaesth.*



- Analg. 40, 419–424. <https://doi.org/10.1111/vaa.12024>
- Romero, T.R.L., Galdino, G.S., Silva, G.C., Resende, L.C., Perez, C., Cortes, S.F., Duarte, I.D.G., 2012. Involvement of the L-Arginine / Nitric Oxide / Cyclic Guanosine Monophosphate Pathway In Peripheral Antinociception Induced by N-Palmitoyl-Ethanolamine in Rats. *J. of Neuroscience Res.* <https://doi.org/10.1002/jnr.22797>
- Romero, T.R.L., Soares Santos, R.R., Castor, M.G.M. e., Petrocchi, J.A., Guzzo, L.S., Klein, A., Duarte, I.D.G., 2018. Noradrenaline induces peripheral antinociception by endogenous opioid release. *Pharmacol. Reports* 70, 784–788. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.02.020>
- Rybalkin, S.D., Rybalkina, I.G., Feil, R., Hofmann, F., Beavo, J.A., 2002. Regulation of cGMP-specific Phosphodiesterase ( PDE5 ) Phosphorylation in Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* 277, 3310–3317. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106562200>
- Sachs, D., Villarreal, C.F., Cunha, F.Q., Parada, C.A., Ferreira, S.H., 2009. The role of PKA and PKC $\epsilon$  pathways in prostaglandin E<sub>2</sub>-mediated hypernociception. *Br. J. Pharmacol.* 156, 826–834. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2008.00093.x>
- Sagata, K., Minami, K., Yanagihara, N., Shiraishi, M., Toyohira, Y., Ueno, S., Shigematsu, A., 2002. Tramadol Inhibits Norepinephrine Transporter Function at Desipramine-Binding Sites in Cultured Bovine Adrenal Medullary Cells. *Anesth Analg* 94, 901–906.
- Sansone, R.A., Sansone, L.A., 2009. Tramadol Seizures, Serotonin Syndrome, and Coadministered Antidepressants. *Psychiatry (Edgmont)* 6, 17–21.
- Sawynok, J., 1989. The role of ascending and descending noradrenergic and serotonergic pathways in opioid and non-opioid antinociception as revealed by lesion studies. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67, 975–988.
- Scholz, J., Woolf, C.J., 2002. Can we conquer pain? *Nat. Neurosci. Suppl.* 5, 1062–1067. <https://doi.org/10.1038/nn942>

- Scott, L.J., Perry, C.M., 2000. Tramadol: A Review of its Use in Perioperative Pain. *Drugs* 60, 139–176.
- Sevcik, J., Nieber, K., Driessen, B., Illes, P., 1993. Effects of the central analgesic tramadol and its main metabolite , 0-desmethyltramadol , on rat locus coeruleus neurones. *Br. J. Pharmacol.* 110, 169–176.
- Simon, B.T., Steagall, P. V, 2017. The present and future of opioid analgesics in small animal practice. *J. vet. Pharmacol. Ther.* 40, 315–326. <https://doi.org/10.1111/jvp.12377>
- Snider, W.D., McMahon, S.B., 1998. Tackling Pain at the Source: New Ideas about Nociceptors. *Neuron* 20, 629–632.
- Soares, A.C., Duarte, I., 2001. Dibutyryl-cyclic GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in the rat PGE<sub>2</sub>-induced hyperalgesic paw. *Br. J. Pharmacol.* 134, 127–131.
- Sousa, A.M., Ashmawi, H.A., 2014. Local analgesic effect of tramadol is not mediated by opioid receptors in early postoperative pain in rats. *Rev Bras Anesthesiol.* xx. <https://doi.org/10.1016/j.bjane.2014.06.006>
- Stachtari, C.C., Thomareis, O.N., Tsaousi, G.G., Karakoulas, K.A., Chatzimanoli, F.I., Chatzopoulos, S.A., Vasilakos, D.G., 2014. Interaction of a Cannabinoid-2 Agonist With Tramadol on Nociceptive Thresholds and Immune Responses in a Rat Model of Incisional Pain. *Am. J. Ther.* 000, 1–9.
- Steagall, P.V., Taylor, P.M., Brondani, J.T., Luna, S.P., Dixon, M.J., 2008. Antinociceptive effects of tramadol and acepromazine in cats. *J. Feline Med. Surg.* 10, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2007.06.009>
- Subrahmanyam, V., Renwick, A.B., Walters, D.G., Young, P.J., Price, R.J., Tonelli, A.P., Lake, B.G., 2001. Identification of cytochrome P-450 isoforms responsible for cis-tramadol metabolism in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* 29, 1146–1155.
- Taiwo, Y.O., Levine, J.D., 1991. Further confirmation of the role of adenyl cyclase

- and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. *Neuroscience* 44, 131–135. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(91\)90255-m](https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90255-m)
- Thornbury, K., Ward, S., Dalziel, H., Carl, A., Westfall, D., KM, S., 1991. Nitric oxide and nitrosocysteine noncholinergic hyperpolarization mimic nonadrenergic, in canine proximal colon. *Gastrointest. Liver Physiology* 261, G553–G557.
- Todd, A.J., 2010. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 823–836. <https://doi.org/10.1038/nrn2947>
- Tokunaga, A., Saika, M., Senba, E., 1998. 5-HT 2A receptor subtype is involved in the thermal hyperalgesic mechanism of serotonin in the periphery. *Pain* 76, 349–355.
- Tsai, T., Tsai, Y., Wu, S., Liu, Y., 2006. Tramadol-induced blockade of delayed rectifier potassium current in NG108-15 neuronal cells. *Eur. J. Pain* 10, 597–601. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2005.09.001>
- van Dijken, H., Dijk, J., Voorn, P., Holstege, J.C., 1996. Localization of dopamine D2 receptor in rat spinal cord identified with immunocytochemistry and in situ hybridization. *Eur. J. Neurosci.* 8, 621–628.
- Vetter, I., Wyse, B.D., Monteith, G.R., Roberts-Thomson, S.J., Cabot, P.J., 2006. The  $\mu$  opioid agonist morphine modulates potentiation of capsaicin-evoked TRPV1 responses through a cyclic AMP-dependent protein kinase A pathway. *Mol. Pain* 2, 1744–8069.
- Vinegar, R., Truax, J.F., Selph, J., Jonhston, P., Venable, A., McKenzie, K., 1987. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. *Fed Proc* 46, 118–126.
- Woller, S.A., Eddinger, K.A., Corr, M., Yaksh, T.L., Jolla, L., Jolla, L., 2019. An Overview of Pathways Encoding Nociception. *Clin Exp Rheumatol* 35, 40–46.
- Woolf, C.J., Bennett, G.J., Doherty, M., Dubner, R., Kidd, B., Koltzenburg, M., Lipton, R., Loeser, J.D., Payne, R., Torebjork, E., 1998. Towards a

- mechanism-based classification of pain? *Pain* 77, 227–229.
- Woolf, M.C.J., 2004. Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. *Ann Intern Med.* 140, 441–451.
- Xie, H., Dong, Z.Q., Ma, F., Bauer, W.R., Wang, X., Wu, G.C., 2008. Involvement of serotonin 2A receptors in the analgesic effect of tramadol in mono-arthritic rats. *Brain Res.* 1210, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.02.049>
- Yalcin, I., Aksu, F., 2005. Involvement of potassium channels and nitric oxide in tramadol antinociception. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 80, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.10.020>
- Yanarates, O., Dogrul, A., Yildirim, V., Sahin, A., Aypar, U., Seyrek, M., Kozak, O., Kurt, E., 2010. Spinal 5-HT<sub>7</sub> Receptors Play an Important Role in the Antinociceptive and Antihyperalgesic Effects of Tramadol and Its Metabolite, O-Desmethyltramadol, via Activation of Descending Serotonergic Pathways. *Anesthesiology* 112, 696–710.
- Zemlan, F.P., Corrigan, S.A., Pfaff, D.W., Zemlan, F., 1980. Noradrenergic and serotonergic mediation of spinal analgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 61.

---

## ANEXOS

# ANEXO I



**UFMG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 138/2019

Título do projeto: Estudo sobre os mecanismos envolvidos na antinocicepção periférica induzida por tramadol em ratos

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Igor Dimitri Gama Duarte

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Farmacologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 05/08/2019. Validade: 05/08/2019 à 04/08/2024  
Belo Horizonte, 05/08/2019.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@pppq.ufmg.br](mailto:cetea@pppq.ufmg.br)