

Flora Lucena Santana

**INJEÇÃO INTRAESPINHAL DE TRAMADOL COMO OPÇÃO
NO CONTROLE DA ARTRITE: UM ESTUDO EM RATOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-
graduação em Farmacologia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Título de
Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Rogério
Tonussi

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santana, Flora Lucena
INJEÇÃO INTRAESPINAL DE TRAMADOL COMO OPÇÃO NO
CONTROLE DA ARTRITE: UM ESTUDO EM RATOS / Flora
Lucena Santana ; orientador, Carlos Rogério
Tonussi, 2017.
109 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

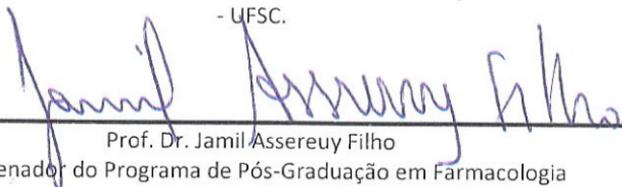
1. Farmacologia. 2. Nocicepção. 3. Reflexo da
Raiz Dorsal. 4. Artrite. 5. Injeção Intratecal. I.
Tonussi, Carlos Rogério. II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia. III. Título.

"Injeção intraespinhal de tramadol como opção no controle da artrite: um estudo em ratos"

Por

Flora Lucena Santana

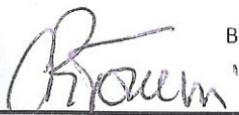
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (26/PPGFMC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.



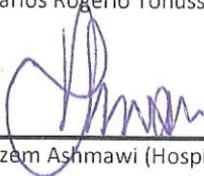
Prof. Dr. Jamil Assereuy Filho

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Banca examinadora:



Dr. Carlos Rogério Tonussi (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador



Dr. Hazam Ashmawi (Hospital das Clínicas/Universidade de São Paulo)



Dr. André Klein (Departamento de Farmacologia/Universidade Federal de Minas Gerais)



Dr. Fernando Spiller (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. Alfeu Zanotto Filho (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 07 de dezembro de 2017.

Este trabalho é dedicado à minha mãe,
meu padrasto, meu avô e minha avó,
que nada me deixaram faltar.

AGRADECIMENTOS

Para quem fez dois doutorados em cinco anos, tenho muitas pessoas a agradecer!

Inicialmente agradeço ao meu orientador, Carlos Rogério Tonussi, por ter aberto as portas do seu laboratório para mim, ainda no mestrado. Com ele tive as primeiras lições sobre ciência, e no decorrer do tempo ele me levou a (re)conhecer em mim as tantas capacidades que até então estavam adormecidas.

Ao Prof. Jamil, Profa. Thereza e outros professores do PPGF, sou grata por todos os desafios que me fizeram passar. A partir deles tive a oportunidade de honrar minha raiz nordestina ao reconhecer que sou Mandacaru, dando flores em plena seca.

Nesses quase sete anos de FMC muitos passaram na minha vida, cada um dando a sua contribuição para o meu crescimento, seja por uma atitude positiva ou por uma atitude negativa. Eu agradeço a todos, até os negativos, pois são os desafios e os “nãos” que edificam o ser.

Dos positivos, que graças a Deus foram mais prevalentes, agradeço meus colegas de laboratório. Alguns como Carol, Fran, Aline, Alessandra, Felipe e Marcele, passaram mais rápido, mas ainda assim deixaram a sua marca em mim. Outros como Taciane, Vanessa, Lucas, Elba e Maíra estão tatuados na minha pele e no meu coração. Foram meus colegas de laboratório e experimentos, meus amigos, meus confidentes, minha família. Vão estar comigo sempre, aonde quer que estejamos! À Elba e Maíra eu ainda agradeço a dedicação que tiveram comigo nessa reta final, sem vocês tudo teria sido muito mais difícil. À Débora gostaria de agradecer por ter me permitido continuar o seu trabalho, isto é, agradecer por ganhar um projeto!

Vagner e Patrícia entraram comigo no mestrado e no doutorado, e juntos fomos até o fim. Na nossa brutalidade mútua nos amamos, e que alegria a minha em tê-los! O departamento também me deu outros bons companheiros como Karol, Ruy, Jaque, Renata, Tuka, Kati, Sandro, dentre tantos outros. Muito obrigada pelo carinho e atenção de vocês. De fora da FMC, mas não menos importante, agradeço à amizade da Ana Paula e do Fernando. Fernando dividiu comigo seu tempo, seu conhecimento e sua amizade, de uma forma tão simples e natural que vai ser difícil preencher o espaço que ficou na despedida.

Ainda tenho muito a agradecer minhas companheiras de apartamento, cada uma em sua época, Clara, Taise e Paula, pela paciência comigo e a alegria que me proporcionaram enquanto estivemos juntas. A Leia, minha companheira de casa desde o final do

mestrado, eu agradeço por ter surgido em minha vida e se tornado a minha irmã. Já aprendemos a viver longe uma da outra há um tempo, devido às necessidades da vida, mas viver uma sem a outra não será mais possível.

Meus amores gringos que, seja pelas calorias advindas das comidas, seja pelo álcool degustado ou pela alegria de cada encontro, me deram energia para continuar. Ben, Yenny, Fabrizio, Andy e Vivi, muito obrigada!

Meus amigos de João Pessoa vibraram, choraram, gritaram e curtiram cada momento desse doutorado comigo. Mesmo longe eu sentia a presença e o carinho deles. Flávia, Camila, Leônidas, Layse, Anna Gabriela, Pedro, Wayana, Yuri e Gabriel, amo vocês!

Um agradecimento muito especial vai para Scheila, diamante raro da FMC! Também agradeço à Luciana, Andréa, Pedro e os meninos do biotério pelos cafés, conversas e disponibilidade em ajudar. No tópico de biotério, não posso deixar de agradecer a todos os animais utilizados neste trabalho e no anterior. A importância de vocês é incomparável. É de meu desejo que a ciência evolua para que a vida de vocês tenha ainda mais valor.

Meu último agradecimento vai para a minha família, especialmente meu avô, minha avó, minha mãe e meu padrasto. Com eles aprendi sobre cuidado, ética, amor, respeito, e eles fizeram tudo que podiam e não podiam para que eu tivesse uma boa educação e uma boa vida. Sou privilegiada por fazer parte dessa família, e tudo que sou e tenho é graças a eles. Muito obrigada!

“É preciso ter um caos dentro de si para dar à luz
uma estrela cintilante.”
(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

As doenças inflamatórias articulares crônicas são doenças progressivas e limitantes, onde a dor e o edema no local levam à incapacitação articular. Ainda existem grupos refratários aos tratamentos farmacológicos convencionais, e os efeitos colaterais gerados por eles causam desconforto e levam a descontinuidade do tratamento. Fármacos injetados pela via intratecal tem bons resultados como analgésicos, e o tramadol se apresenta como uma boa opção de tratamento por esta via, devido a sua baixa incidência de efeitos colaterais. Em ratos com articulação inflamada, tramadol pela via intratecal reduz não só a nocicepção como também o edema periférico, possivelmente pela inibição do reflexo da raiz dorsal. Neste trabalho foram utilizados ratos wistar machos com indução de artrite reativa a partir da injeção de carragenina/LPS na articulação fêmuro-tibial direita. Tramadol pela via intratecal (10µg/20µL) reduziu a incapacitação e o edema articular dos animais, assim como a imunomarcagem para a proteína c-fos nas lâminas I e II do corno dorsal da medula espinhal. Apesar de não alterar a migração celular, o tratamento diminuiu discretamente o imunocontéudo de TNF- α no líquido sinovial desses animais. O inibidor do canal NKCC₁, bumetanida (60µg/10µL), injetada antes do tramadol não interferiu no efeito do mesmo, enquanto que a depleção do terminal central de fibras primárias com a resiniferatoxina (7.6µg/10µL) aboliu totalmente o efeito antiedematogênico do tramadol. A administração prévia do antagonista μ -opioide, CTOP (15µg/10µL), não interferiu no efeito analgésico do tramadol, porém aboliu completamente o efeito antiedematogênico. A depleção de fibras serotoninérgicas descendentes pela neurotoxina 5,7-DHT (20µg/20µL) não interferiu de forma significativa no efeito do tramadol nem na incapacitação, nem no edema. Logo, podemos concluir que o tramadol injetado pela via intratecal gera analgesia provavelmente por uma junção do efeito opioide e de recaptação das monoaminas, enquanto que a diminuição do edema articular é gerada pela atividade μ -opioide, hiperpolarizando o terminal central das fibras aferentes primárias e impedindo a deflagração do reflexo da raiz dorsal. A injeção de tramadol pela via intratecal pode ser uma possibilidade para o tratamento de doenças articulares devido a sua eficácia e baixo índice de efeitos colaterais.

Palavras-chave: Injeção intratecal, tramadol, Reflexo da raiz dorsal.

ABSTRACT

The articular inflammatory chronic diseases are progressive and limiting disorders where pain and edema eventually leads to articular incapacitation. There are still some patients that are refractory to the conventional pharmacologic treatment, and their side effects causes discomfort and discontinuity of treatment. Drugs injected by intrathecal route have good analgesic results, and tramadol presents itself as a good option to be use intrathecally, due to it few side effects. Rats with inflamed joint treated with intrathecal tramadol showed not only analgesia, but reduction of articular edema as well, probably for inhibiting the dorsal root reflex. Here we used male wistar rats with reactive arthritis induction by carrageenan/LPS injection on the right hind knee joint. Tramadol injected intrathecally (10 μ g/20 μ L) was able to reduce both incapacitation and edema, as well as immunoreaction to c-fos protein on spinal cord dorsal horn's *laminae* I and II. Despite the treatment had no effect on cell migration, it discreetly reduced TNF- α levels on synovial fluid. Inhibition of the NKCC₁ channel with bumetanide (60 μ g/10 μ L), did not affect tramadol's response. On the other hand, depletion of central terminals of primary afferent fibers with resiniferatoxin (7.6 μ g/10 μ L) totally abolished tramadol's antiedematogenic effect. Administration of μ -opioid antagonist CTOP (15 μ g/10 μ L) previous to tramadol did not interfere on the analgesic effect of tramadol, but completely abolished the antiedematogenic effect. Serotonergic descending fibers depletion with 5,7-DHT (20 μ g/20 μ L) did not had any significant effect on tramadol's response. Ergo, we can conclude that intrathecal tramadol's analgesic effect is probably due to the opioid action together with the inhibition of monoamines reuptake, whereas the antiedematogenic effect is due to the μ -opioid activity, hyperpolarizing the central terminal of primary fibers and inhibiting the dorsal root reflex. Intrathecally injected tramadol, therefore, can be an alternative for the treatment of articular diseases due to its high efficacy and few side effects.

Key words: Intrathecal injection. tramadol. Dorsal root reflex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Imagem ilustrativa da transmissão nociceptiva.....	33
Figura 1.2: Representação esquemática do mecanismo da PAD, da Inibição Pré-Sináptica e do Reflexo da Raiz Dorsal.....	38
Figura 1.3: Estrutura química do tramadol e seu metabólito O-DES.....	42
Figura 1.4: Resumo dos possíveis mecanismos de ação do tramadol e seu metabólito.....	46
Figura 3.1: Imagem ilustrativa do procedimento de injeção intra-articular.....	51
Figura 3.2: Imagem ilustrativa do sistema do Teste de Incapacitação Articular.....	52
Figura 3.3: Imagem ilustrativa da medida do diâmetro articular..	53
Figura 3.4: Imagem ilustrativa da injeção intratecal.....	54
Figura 4.1: Protocolo Experimental 1..	58
Figura 4.2: Efeito da injeção de tramadol em diferentes vias de administração sobre a incapacitação articular e o diâmetro articular.....	59
Figura 4.3: Quantificação de TNF-α no líquido sinovial.	59
Figura 4.4: Protocolo Experimental 2..	60
Figura 4.5: Imagens representativas da região de avaliação da imunomarcção para proteína c-Fos.....	61
Figura 4.6: Efeito da injeção intratecal de tramadol sobre a expressão de proteína c-Fos.....	62
Figura 4.7: Protocolo Experimental 3.	63
Figura 4.8: Efeito da administração prévia de bumetanida na ação do tramadol sobre o TEP e o DA.	64
Figura 4.9: Protocolo Experimental 4.	65
Figura 4.10: Efeito da administração prévia de RTX na ação do tramadol sobre o TEP e o DA.....	66
Figura 4.11: Protocolo Experimental 5..	67
Figura 4.12: Efeito da administração do CTOP na ação do tramadol sobre o TEP e o DA.	67
Figura 4.13: Protocolo Experimental 6.	68
Figura 4.14: Efeito da administração de 5,7-DHT na ação do tramadol sobre o TEP e o DA.....	69
Figura A1.1: Efeito da administração intratecal do Tramadol na migração celular.....	107
Figura A2.1: Fotomicrografia da cartilagem articular e da membrana sinovial da articulação do joelho dos animais Naive... 	108

Figura A2.2: Fotomicrografia da cartilagem articular e da membrana sinovial da articulação do joelho dos animais com ReA tratados com Salina..... 108
Figura A2.3: Fotomicrografia da cartilagem articular e da membrana sinovial da articulação do joelho dos animais com ReA tratados com Tramadol. 109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5,7-DHT - 5,7-dihidroxitriptamina
ACh - Acetilcolina
CGRP - Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX - ciclooxigenase
DMARD - *Disease modifying antirheumatic drugs*
DRG - *Dorsal root ganglia*
GMPC - *Cyclic guanosine monophosphate*
IHQ - Imunohistoquímica
IL - Interleucina
LPS - Lipopolissacarídeo
MAO - Monoamina oxidase
NET - *Norepinephrine transporter*
NK - Neurocinina
NKCC - Co-transportador de sódio, potássio e cloreto
NMR - Núcleo mago da Rafe
OMS - Organização mundial de Saúde
PGE₂ - Prostaglandina E₂
ReA - Artrite reativa
RRD - Reflexo da raiz dorsal
RVM - *Rostroventral medulla*
SERT- *Serotonin transporter*
SNC - Sistema nervoso central
SP - Substância P
TNF α - *Tumor necrosis factor α*
TRPV – Receptor do tipo Vaniloide

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	Doenças Articulares	27
1.1.1	O Desafio no Tratamento das Doenças Articulares	28
1.2	Neurobiologia da nocicepção.....	30
1.2.1	O Componente Inflamatório	34
1.3	O Reflexo da Raiz Dorsal	35
1.4	Aplicação de drogas pela via intratecal.....	39
1.5	Tramadol.....	41
2	OBJETIVOS.....	49
2.1	Objetivo geral	49
2.2	Objetivos específicos	49
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	50
3.1	Animais	50
3.2	Modelo de dor inflamatória induzida por Carragenina/LPS – Artrite Reativa.....	50
3.3	Teste Algesimétrico – Medida da Incapacitação Articular.....	51
3.4	Diâmetro Articular	53
3.5	Injeção Intratecal	53
3.6	Imunohistoquímica	54
3.7	Coleta do Líquido Sinovial	56
3.8	Western Blotting	56
3.9	Análise Estatística	57
4	RESULTADOS.....	58
4.1	Confirmação do efeito analgésico e anti-edematogênico do Tramadol injetado pela via intratecal	58
4.2	Avaliação da expressão de proteína c-Fos no corno dorsal espinhal após tratamento com tramadol	60
4.3	Efeito da inibição do co-transportador NKCC1 na ação do Tramadol.....	62

4.4	Efeito da dessensibilização das fibras aferentes primárias na ação do Tramadol	64
4.5	Efeito do antagonista seletivo de receptores μ-opioides na ação do tramadol.....	66
4.6	Efeito da ablação das fibras descendentes serotoninérgicas na ação do tramadol.....	68
5	DISCUSSÃO	71
6	CONCLUSÃO.....	81
	REFERÊNCIAS.....	83
	ANEXO A	107
1.	Contagem total e diferencial de células no líquido sinovial de animais com artrite reativa induzida por carragenina/LPS e tratados com tramadol.....	107
2.	Avaliação das alterações morfológicas na articulação de animais com artrite reativa induzida por carragenina/LPS e tratados com tramadol.....	108

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Articulares

O comprometimento do sistema musculoesquelético, seja em qualquer estrutura (músculo, osso, cartilagem e/ou estruturas periarticulares), é característica comum de um grande número de doenças progressivas e associadas à sensação dolorosa. Segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 150 condições patológicas se encontram neste grupo de doenças musculoesqueléticas, dentre elas a osteoartrite, artrite reumatoide, espondiloartropatias, miastenia *gravis* e fibromialgia, atingindo no geral de 3-8% da população mundial. A prevalência pode ser de 0,5%, como no caso das espondiloartropatias e de até 30%, como na osteoartrite, porém, mesmo nas quais a prevalência é relativamente baixa, o impacto social e econômico dessas doenças é muito importante (HELMICK et al., 2008; WOOLF; PFLEGER, 2003).

Nos casos de afecções articulares, a dor, a rigidez articular e a formação de edema são as principais causas de incapacitação física, o que leva ao afastamento de atividades corriqueiras como o trabalho e a vida social (LEE; WEINBLATT, 2001). Ao diminuir a atividade e movimento do membro afetado, a qualidade de vida do paciente é bastante reduzida, resultando na característica de morbidade comum a este grupo. Além disso, os gastos diretos (consulta médica, tratamento farmacológico e exames) e indiretos (falta de produtividade e uso de previdência) são muito altos, gerando um impacto na economia (BANSBACK et al., 2009; MICHAUD et al., 2003; WHITE et al., 2008).

As doenças musculoesqueléticas são a causa mais comum de dor na clínica médica (FELSON, 2005; WOOLF; PFLEGER, 2003), porém para a grande maioria das afecções articulares, por exemplo, a fisiopatologia ainda não é completamente descrita, e a falta de conhecimento sobre a origem das doenças ainda dificulta o uso de tratamento mais eficaz. Devido a isso, atualmente o tratamento é paliativo e se baseia na redução ou prevenção da inflamação e danos causados por ela, como danos nas estruturas articulares, e diminuição da dor e do edema, com o objetivo de limitar ou impedir a incapacidade física (GUIDELLI et al., 2015; MOTA et al., 2011).

1.1.1 O Desafio no Tratamento das Doenças Articulares

De uma forma geral, o tratamento das doenças articulares é paliativo e com foco no controle da dor, principal sintoma destas afecções, e da inflamação. Mais recentemente, drogas que possuem capacidade de impedir também o dano estrutural ósseo-cartilaginoso gerado pela cronicidade da doença estão disponíveis. Diversas diretrizes já foram feitas e são utilizadas para a escolha do melhor tratamento possível, levando em conta o estado do paciente, estágio da doença, evolução do quadro, qualidade de vida e efeitos colaterais (SAAG et al., 2008; SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010; SMOLEN et al., 2010). A farmacoterapia comumente empregada se baseia em anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e anti-inflamatórios esteroidais (corticoides), drogas modificadoras da doença (DMARDs) e agentes biológicos (BRUYÈRE et al., 2016; GUIDELLI et al., 2015).

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), assim como os corticoides, sempre foram medicamentos de primeira escolha em quadros de dor articular crônica ou estágios iniciais de artrite (DONAHUE et al., 2012). São bastante eficazes no controle da dor e da inflamação, apesar de não proteger contra os danos nas estruturas articulares em quadros mais avançados de artrite, tendo sua eficácia limitada. Além disso, os efeitos colaterais que acompanham o uso crônico de ambas as classes se tornam, com o tempo, quase tão prejudiciais quanto à própria doença. Dentre os diversos efeitos colaterais que os corticóides apresentam, podem ser destacados o aumento na incidência de osteoporose nos pacientes artríticos, a atividade imunossupressora, a retenção de líquido e a insuficiência supra-renal (DONAHUE et al., 2012; SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010).

Os AINEs atuam inibindo as enzimas COX 1 e 2, impedindo a formação de prostanóides, especialmente a PGE₂, envolvida com o processamento de dor e a resposta inflamatória (VANE, 1971; VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998). Danos intestinais como ulceração, danos renais e disfunção plaquetárias são comuns quando há uso continuado de AINEs que inibem a COX 1, pois os prostanóides com atividade protetora também tem a sua concentração reduzida durante o tratamento, sendo indicado que seu uso seja feito em conjunto com drogas que inibam as bombas de prótons, para proteção gastrointerstinal, e por um curto espaço de tempo (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010). A COX-

2 é uma enzima que tem sua produção e atividade aumentada em um processo inflamatório, e sua inibição de forma seletiva pelos AINEs conhecidos como coxibes não tem os efeitos indesejáveis gastrointestinais especialmente, porém seu uso prolongado afeta diretamente a agregação plaquetária e aumenta o risco de infarto do miocárdio nos pacientes (BOERS, 2001; WEIR et al., 2003). Juntando os efeitos colaterais proeminentes e a baixa eficácia no controle da progressão da doença, a continuidade do tratamento com corticoides ou AINEs é limitada.

As drogas modificadoras do curso da doença (DMARDs) são imunomoduladores que, apesar de não terem seus mecanismos de ação totalmente elucidados, são capazes de melhorar os sintomas e também retardar a progressão da doença, sendo apresentado como alternativa aos AINEs e corticoides (MOTA; LAURINDO; SANTOS NETO, 2010). Essa classe ainda pode ser dividida em agentes sintéticos e biológicos. Os sintéticos mais comuns são o metotrexato, sulfassalazina, leflunomide e hidrocloroquina. Todos eles com boa resposta no controle da progressão da doença, sendo o metotrexato o atual medicamento de escolha para o tratamento das artrites. Os efeitos colaterais dos DMARDs sintéticos compreendem distúrbios bucais e gastrointestinais, disfunção pulmonar, toxicidade ocular, cirrose hepática e anormalidade hematológicas, e seu uso em conjunto com AINEs potencializa boa parte desses efeitos (ALCORN; SAUNDERS; MADHOK, 2009; SALLIOT; VAN DER HEIJDE, 2009).

São exemplos de DMARDs biológicos o etanercept, abatacept, infliximabe, adalimumabe e anaquinra, que são anticorpos monoclonais ou inibidores de atividade direta de citocinas importantes no quadro artrítico, como $IL-1\beta$ e $TNF-\alpha$ (CHOY; PANAYI, 2001; MAINI; TAYLOR, 2000; SURESH, 2010). Os agentes biológicos são altamente eficazes, especialmente em quadros mais avançados de inflamação articular ou em pacientes não-responsivos aos DMARDs sintéticos, porém com eficácia moderada em estágios iniciais da doença (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010). A maior preocupação quanto ao uso dos agentes biológicos é o risco de infecção que o paciente é exposto, devido à diminuição da atividade do sistema imune. Infecções cruzadas com *Mycobacterium tuberculosis* e hepatites B e C, especialmente, são fatores de risco no uso crônico destas medicações (DIXON et al., 2010; LEOMBRUNO; EINARSON; KEYSTONE, 2009; SCHOELS et al., 2010).

A variabilidade dentre os indivíduos com artrite pode fazer com que alguns pacientes não respondam adequadamente à terapia empregada em seu caso, obrigando que seja adotada uma politerapia, podendo ser utilizado DMARDs com AINEs, DMARDs sintéticos e biológicos, ou até uma tripla terapia com três DMARDs sintéticos diferentes (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010). Ainda há opções de injeções intra-articulares de corticoides ou ácido hialurônico, por exemplo, ou até cirurgia em alguns casos. A escolha da terapia ideal acaba sendo individualizada para cada paciente e não é possível prever qual estratégia de combinação teria o melhor resultado (DONAHUE et al., 2012). Todos os efeitos colaterais advindos do uso crônico das classes citadas, as politerapias e intervenções clínicas, e a inconsistência no tratamento, especialmente em casos avançados, são desafios constantes na escolha da melhor forma de tratamento para pacientes artríticos. A origem do sinal de dor em paciente artríticos pode ser inflamatória ou não-inflamatória, mas no geral a transmissão nociceptiva é semelhante, e a busca por novas drogas ou vias de administração que diminuam essa transmissão e a atividade inflamatória articular é contínua.

1.2 Neurobiologia da nociceção

O caminho comum de uma transmissão nociceptiva se inicia na periferia com a ativação de nociceptores, segue pelas fibras sensitivas de forma ortodrômica passando pelo gânglio da raiz dorsal e alcançando o corno dorsal da medula espinhal, onde faz conexão com neurônios de segunda ordem que ascendem o sinal até o sistema nervoso central supraespinhal, onde o sinal nociceptivo será processado e reconhecido como dor (Fig. 1.1). Todo esse caminho pode ser dividido em três partes: o mecanismo periférico, o mecanismo medular e o mecanismo supraespinhal. No mecanismo periférico se destacam as fibras sensitivas, que podem reconhecer estímulos de diferentes naturezas (químico, térmico e mecânico) e intensidades (inócuo ou nocivo), devido à suas características estruturais (GIORDANO, 2005; JULIUS; BASBAUM, 2001; MILLAN, 1999).

As fibras A β são fibras de grande calibre e densa bainha de mielina, o que permite que a sua velocidade de condução do potencial de ação seja bastante rápida, e por isso ela responde de uma forma mais específica a estímulos mecânicos de baixo limiar e inócuos, como o tato.

A fibra A δ , assim como a anterior também apresenta um revestimento de mielina, porém numa densidade menor, e seu calibre é mais baixo, de forma que a velocidade de condução deste tipo de fibra é intermediária, e ela passa a responder a estímulos de maior limiar e nociceptivo (mecânico e térmico). Já as fibras C não tem bainha de mielina e seu calibre é pequeno, fazendo com que a sua velocidade de condução seja baixa, e assim somente estímulos de alto limiar são conduzidos por esta fibra. Ela responde tanto a estímulos térmicos, químicos e mecânicos, como também a alguns estímulos inócuos em certas condições (CERVERO; LAIRD, 1996).

As fibras sensitivas A δ e C também podem ser chamadas de nociceptores, pois reconhecem estímulos nocivos e transmitem a informação nociceptiva de forma organizada até o seu terminal central no corno dorsal da medula espinhal, passando pelo gânglio da raiz dorsal, onde se encontram os corpos celulares desses neurônios (D'MELLO; DICKENSON, 2008). Aqui se inicia o mecanismo medular. No corno dorsal, os nociceptores alcançam as lâminas I, II e V, onde fazem sinapse com neurônios de segunda ordem (neurônios ascendentes). As sinapses são predominantemente excitatórias, onde o aferente primário libera vesículas de Substância P, CGRP (Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina) e glutamato para ativar o neurônio de segunda ordem (BASBAUM et al., 2009; YOSHIMURA; JESSELL, 1990). Uma variedade de interneurônios, tanto inibitórios quanto excitatórios, também está presente nessas lâminas de forma a manter um controle da transmissão nociceptiva medular (BASBAUM; WOOLF, 1999; MILLAN, 2002).

A ativação dos neurônios de segunda ordem permite que o sinal nociceptivo ascenda para o SNC supraespinhal a partir de tratos ou vias, cada um com funções diferentes no processamento da informação de dor. Por exemplo, as fibras do trato espino-talâmico lateral alcançam estruturas responsáveis pelo componente sensorio-discriminativo da dor, isto é, por esta via pode-se reconhecer a localização, o tipo e a duração da dor, enquanto que o trato espino-talâmico medial alcança estruturas límbicas e permite realizar uma discriminação afetivo-emocional da dor, e o trato espino-parabraquial termina em estruturas que controlam atividades homeostáticas e respostas autonômicas (KUNER, 2010; PRICE, 2002; TRACEY; MANTYH, 2007). É no mecanismo supraespinhal, logo que alcança o SNC, que o sinal nociceptivo iniciado na periferia é processado e reconhecido como dor, e qualquer função

anormal ou alterada durante este caminho pode exacerbar uma sensação dolorosa.

Existem ainda fibras que saem de núcleos do SNC e alcançam a medula, liberando neurotransmissores no local, podendo gerar uma resultante inibitória ou facilitatória da dor (HEINRICHER et al., 2009; VANEGAS; SCHAIBLE, 2004). Ambas as vias enviam projeções neuronais serotoninérgicas e noradrenérgicas, especialmente, e no caso da via facilitatória, há uma exacerbação do sinal nociceptivo. Porém o que faz com que haja prevalência da atividade da via descendente facilitatória sobre a via inibitória ainda é motivo de muitas perguntas (MILLAN, 2002; VANEGAS; SCHAIBLE, 2004). As vias descendentes inibitórias da dor, além de neurônios monoaminérgicos, contam ainda com algumas projeções de neurônios opioidérgicos (RUDA; BENNETT; DUBNER, 1986), que produzem e liberam opioides endógenos, gerando o seu caráter inibitório. Essas vias descendentes podem inibir a continuidade de um *input* nociceptivo diretamente nas fibras primárias ou secundárias, assim como inibir interneurônios excitatórios ou estimular interneurônios inibitórios, tudo dependendo do neurotransmissor e do receptor em questão (MILLAN, 2002).

A Substância Cinzenta Periaquedutal (do inglês *periaqueductal grey*; PAG) é uma estrutura mesencefálica com importante atividade no controle da dor (GEBHART; JONES, 1988; JONES; GEBHART, 1988). Ela recebe projeções de estruturas como hipotálamo, tálamo e amígdala, todos ativados pelas vias ascendentes, indicando um processo nociceptivo na periferia. A partir da PAG saem fibras descendentes partindo para a medula, como forma de controle endógeno da dor, e em seu caminho essas fibras alcançam núcleos como o *Locus coeruleus* e núcleos da Rafe (RVM, NMR), centros de origem das projeções noradrenérgica e serotoninérgica, respectivamente. As fibras descendentes, ao alcançarem o corno dorsal da medula espinhal, liberam seus neurotransmissores como serotonina, noradrenalina, dopamina e opioides endógenos, diminuindo a neurotransmissão medular e gerando analgesia (BASBAUM; FIELDS, 1978; FIELDS; BASBAUM, 1978; MILLAN, 2002).

1.2.1 O Componente Inflamatório

A inflamação tem um papel muito importante na transmissão nociceptiva. No caso de uma inflamação articular, por exemplo, inicialmente há ativação de células do sistema imune inato, como macrófagos (MCINNES; SCHETT, 2011) produzindo citocinas, prostanoídes e metaloproteinases, seguida de ativação e polarização de células T residentes no líquido sinovial (SMOLEN; STEINER, 2003), que potencializa a produção de citocinas e estimula a atividade de outras células inflamatórias (FIRESTEIN, 2003).

O TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8 e IL-17 são todas citocinas conhecidas por participarem da indução e da manutenção de um processo artrítico (AREND; DAYER, 1995; MIOSSEC; KORN; KUCHROO, 2009) e podem ativar diretamente os nociceptores, ou estimular a produção e liberação de outros mediadores inflamatórios, como a PGE₂ (KRUSTEV; RIOUX; MCDUGALL, 2015; LOTZ; CARSON; VAUGHAN, 1987; STEINMAN, 2004). Nas articulações, além das fibras sensitivas, ainda existe a influência de fibras simpáticas, formando o Sistema Nervoso Periférico local, que se comunica entre si e também com o sistema imune (HILDEBRAND et al., 1991; NANCE; SANDERS, 2007; ORDOVAS-MONTANES et al., 2015; SATO; SCHAIBLE, 1987; SCHAIBLE; STRAUB, 2014).

A liberação de citocinas pelo sistema imune e a ativação dos respectivos receptores nas fibras sensitivas inicia uma resposta de defesa e a fibra sensitiva peptidérgica libera alguns peptídeos com função vasoativa, como a Substância P e o CGRP, na camada íntima da membrana sinovial provocando vasodilatação, extravasamento plasmático e recrutamento de células imunes, intensificando o processo inflamatório já iniciado (DE FELIPE et al., 1998; HOOD et al., 2000; IWASAKI; INOUE; HUKUDA, 1995; SMITH et al., 1993). A SP tem ação mais duradoura do que o CGRP, promovendo um extravasamento plasmático mais pronunciado, além de ser o componente com função quimiotática, interagindo diretamente com células imunes a partir de seu receptor NK₁, estimulando liberação de histamina, TNF- α e IL-6 de macrófagos e monócitos (BIRKLEIN; SCHMELZ, 2008), aumentando a sensibilização dos nociceptores e fortalecendo a sinalização de dor em um processo inflamatório.

Por ser iniciada a partir de atividade neuronal e dependente da integridade das fibras neuronais primárias, essa inflamação é conhecida como inflamação neurogênica, e tem a capacidade de perpetuar um quadro inflamatório (LIN; ZOU; WILLIS, 2000; SLUKA et al., 1995; WILLIS, 1999). Além disso, ainda há a atividade simpática, que pode ser tanto anti-inflamatória quanto pró-inflamatória dependendo das circunstâncias (PONGRATZ; STRAUB, 2013, 2014; STRAUB et al., 2010). Todas essas substâncias e a característica pró-inflamatória final gerada por elas causa uma hiperalgesia inflamatória devido à sensibilização periférica.

A neuroplasticidade gerada neste processo faz com que o nociceptor passe a responder a partir de então a estímulos mais fracos ou anteriormente inócuos, processo conhecido como alodinia, ou responde de forma exacerbada a um estímulo dnoso, o que caracteriza a hiperalgesia (CERVERO; LAIRD; GARCIA-NICAS, 2003). A hiperalgesia inflamatória gerada por esse excesso de mediadores tem uma característica aguda em certos quadros, e é passível de tratamento. Porém, quando há persistência no quadro da patologia com inflamação neurogênica potencializada e hiperalgesia inflamatória cronicada, o excesso de sinal nociceptivo que alcança a medula causa uma neuroplasticidade no corno dorsal, isto é, uma sensibilização central, amplificando a resposta nociceptiva e induzindo alterações neuronais em longo prazo pela atividade das citocinas e SP agora no corno dorsal (DE FELIPE et al., 1998; SOMMER; SCHMIDT; GEORGE, 1998). Com a atividade neuronal periférica aumentada gerando a inflamação neurogênica e a neurotransmissão no corno dorsal alterada, o papel da medula e das fibras primárias não só na dor, mas também na inflamação, fica evidenciado (XANTHOS; SANDKÜHLER, 2014).

1.3 O Reflexo da Raiz Dorsal

Como já descrito anteriormente, a ativação dos nociceptores na periferia gera um potencial de ação que leva o sinal até o corno dorsal da medula espinhal e, através de sinapses excitatórias com neurônios de segunda ordem, o sinal ascende até o SNC supraespinhal (BASBAUM et al., 2009; JULIUS; BASBAUM, 2001). Porém, em algumas situações, como uma inflamação persistente, há uma modulação da neurotransmissão no curso dorsal e a fibra aferente primária passa a responder também de forma antidrômica, isto é, do corno dorsal para a periferia (BARRON; MATTHEWS, 1938a; ECCLES; SCHMIDT;

WILLIS, 1962; KELLY; DUNHAM; DONALDSON, 2007; WILLIS, 1999). Esse processo é conhecido como o Reflexo da Raiz Dorsal (RRD) (BARRON; MATTHEWS, 1938b).

A deflagração do RRD é complexa e dependente de uma despolarização do terminal central da fibra aferente primária conhecida como PAD (do inglês *Primary Afferent Depolarization*), que, apesar de ser uma despolarização, tem caráter inibitório. Isso é possível devido à alta concentração de íons cloreto dentro dos neurônios do corno dorsal, gerada e mantida por co-transportadores do tipo NKCC₁ que carregam um íon sódio, um íon potássio e dois íons cloretos para dentro da célula (ALVAREZ et al., 2001; BLAESSE et al., 2009). A chegada de um potencial de ação da periferia no corno dorsal libera glutamato e SP, principalmente, fazendo com que os neurônios de segunda ordem se ativem, mas também ativando interneurônios inibitórios gabaérgicos presentes no corno dorsal. A ativação desses interneurônios libera GABA e este se liga ao seu receptor GABA_A presente no terminal central da fibra aferente. Devido ao gradiente de cloreto estar mais alto na célula do que fora dela, a ligação do GABA ao seu receptor provoca um efluxo de cloreto, e desta forma gera uma despolarização fraca (PAD), limitada somente a esta membrana. Quando acontece essa despolarização, os canais de cálcio e sódio ficam em seu estado inativado, e assim os próximos potenciais de ação que vem da periferia tem uma amplitude menor, sendo incapazes de liberar as vesículas com os neurotransmissores excitatórios (CERVERO; LAIRD; GARCIA-NICAS, 2003; KUDO et al., 1975; WILLIS, 1999).

Essa condição caracteriza uma inibição pré-sináptica, e serve como um filtro de sinais fracos que vem da periferia, permitindo somente a passagem de sinais mais intensos. Em estados patológicos como quadros de inflamação articular (LEVINE; MOSKOWITZ; BASBAUM, 1985; LIN; ZOU; WILLIS, 2000; REES et al., 1995; SLUKA; LAWAND; WESTLUND, 1994), ocorre a sensibilização periférica descrita anteriormente, provocando uma intensificação da transmissão nociceptiva e levando à sensibilização central, caracterizada por, dentre outros fatores, aumento da excitabilidade no corno dorsal e o aumento da expressão do NKCC₁ (GALAN; CERVERO, 2005; MORALES-AZA et al., 2004; WEI et al., 2010). Com isso, a intensidade da PAD aumenta, e ela passa de um caráter inibitório para um caráter excitatório, alcançando todo o comprimento da fibra, que passa a ter atividade antidrômica (Fig. 1.2) (WILLIS, 1999). A

deflagração do RRD estimula a liberação das substâncias vasoativas pelas fibras sensitivas, aumentando a quantidade de SP, CGRP e PGE₂ na cavidade sinovial, gerando todos os eventos descritos previamente e perpetuando a inflamação local (AVERBECK; REEH; MICHAELIS, 2001; CAROLAN; CASALE, 1993; CHOPRA et al., 2000; HOOD et al., 2000; SMITH et al., 1993).

Estudos mostraram que o bloqueio farmacológico do NKCC₁, que é expresso quase que exclusivamente no SNC (BALLANYI; GRAFE, 1985; HARA et al., 1992; MISGELD et al., 1986), reduz a inflamação periférica e também a nocicepção em modelos animais, possivelmente por inibir a deflagração do RRD (BRESSAN; PERES; TONUSSI, 2012; FOLETTTO, 2015; GRANADOS-SOTO; ARGÜELLES, 2005). Além disso, a denervação de fibras sensitivas peptidérgicas provoca a diminuição da concentração de SP, diminuição do edema e também da hiperalgesia em modelo experimental de artrite (CRUWYS, 1995). Assim, fica claro a complexidade e a importância da medula, assim como das fibras peptidérgicas, na neurotransmissão nociceptiva e na inflamação neurogênica, nos permitindo inferir que a modulação dessa neurotransmissão pode interferir não somente na resposta de dor, mas também em um processo inflamatório periférico.

Diversos trabalhos já mostraram que a injeção de drogas diretamente no canal medular através de injeção intratecal é capaz de reduzir parâmetros de avaliação de dor e inflamação periférica em animais com indução de artrite (BRESSAN; PERES; TONUSSI, 2012; BROCK; TONUSSI, 2008; DAHER; DE MELO; TONUSSI, 2005; DAHER; TONUSSI, 2003; FOLETTTO; MARTINS; TONUSSI, 2013; NORÕES, 2015; STEIN et al., 2016). Desta forma, a administração de drogas pela via intratecal surge como uma alternativa no tratamento das doenças articulares, diminuindo os efeitos indesejáveis dos tratamentos sistêmicos e mantendo boas respostas no controle da dor e da inflamação.

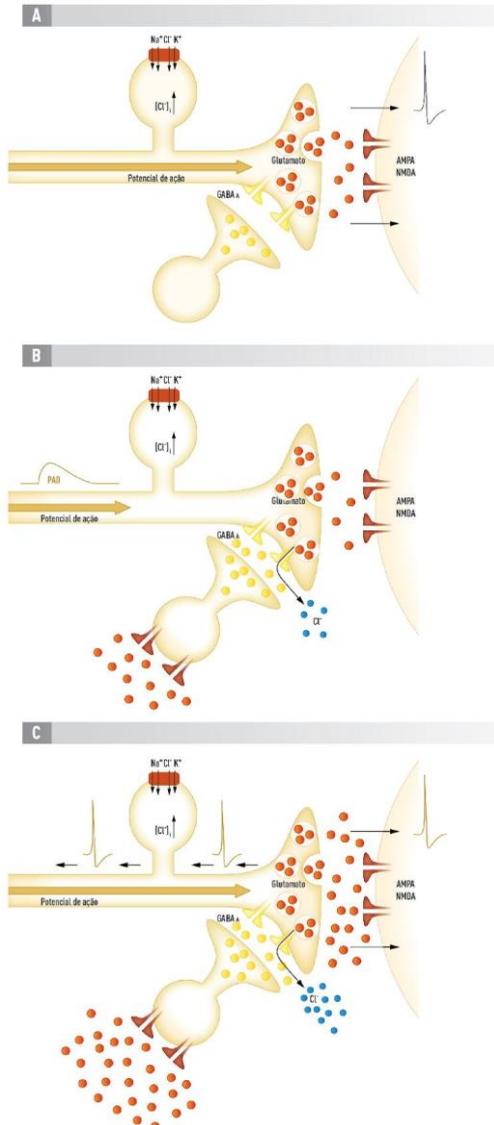


Figura 1.2: Representação esquemática do mecanismo da PAD, da Inibição Pré-Sináptica e do Reflexo da Raiz Dorsal. (A) Os potenciais de ação são transmitidos ao longo da fibra aferente. (B) A partir de uma despolarização de interneurônios GABAérgicos de sinapse axo-axônica com aferentes primários ocorre a liberação de GABA, que ao se ligar aos receptores GABA_A permite a abertura do canal iônico acoplado ao seu receptor e ocorre o efluxo de Cl^- da

célula devido ao acúmulo de Cl^- no meio interno, causado pelo cotransportador NKCC1, e assim uma despolarização de baixa intensidade ocorre (PAD). Por conseguinte, um impulso aferente ortodrômico ao ascender irá encontrar o terminal em despolarização abaixo do limiar, inviabilizando a transmissão nociceptiva para a fibra pós-sináptica, ou seja, ocorre uma inibição pré-sináptica. (C) Em condições específicas, a PAD é intensificada a ponto de propagar potenciais de ação de forma bidirecional (FOLETTTO, 2015).

1.4 Aplicação de drogas pela via intratecal

Os tratamentos farmacológicos feitos pela via oral são amplamente utilizados devido à facilidade na administração, permitindo que o próprio paciente faça uso do medicamento sem nenhum auxílio profissional necessário. Porém, assim como outras formas farmacêuticas que levam a efeitos sistêmicos, a dose necessária para tratamento é normalmente alta e acompanha diversos efeitos indesejáveis. No caso de quadros artríticos, os efeitos adversos do uso crônico de todas as classes descritas anteriormente levam a um aumento no prejuízo da qualidade de vida já ocasionada pela doença, desistência e abandono do tratamento e, em alguns casos, até o óbito (FERREIRA; ROMANEK; POSSO, 2014; MCKEENA et al., 2001; RAFFEINER et al., 2009). Neste contexto, a administração de drogas analgésicas pela via intratecal, alcançando diretamente o canal medular, se apresenta como uma boa alternativa.

A administração de drogas no canal raquidiano foi feita pela primeira vez em cães por Corning, em 1885, levando a fraqueza dos membros e diminuição na sensibilidade, levantando o interesse sobre a via e sua utilidade no processo analgésico (WALLACE; YAKSH, 2000). A primeira administração em humanos como tratamento da dor foi feita por De Pasquies e Leri, em 1910, utilizando cocaína, mesma droga utilizada anteriormente por Corning (NELSON; LANDAU, 2001). Com o decorrer do tempo outras drogas foram utilizadas pela via intratecal, como anestésicos locais e corticosteroides (LARA JÚNIOR, 2006; NELSON; LANDAU, 2001; WALLACE; YAKSH, 2000), e atualmente a classe mais utilizada como analgésico pela via intratecal são os opioides (SMYTH et al., 2015). Sendo menor a quantidade de droga necessária para a analgesia, devido à administração direta no sítio de ação desejável, há uma redução dos efeitos adversos pela baixa distribuição à circulação sistêmica. Além disso, ocorre uma maior

eficácia de tratamento, pois a droga alcança os receptores e canais iônicos do corno dorsal diretamente, e, por fim, há uma maior duração do efeito, importantes benefícios para pacientes com dor crônica (CHANEY, 1995; DOUGHERTY; STAAT, 1999; HAYEK et al., 2011; POPE et al., 2016; VALLE; TEXEIRA; CAVALTANTE, 2001).

Os sistemas de liberação intratecal de fármacos (*IDDS*, do inglês *intrathecal drug delivery systems*) permite que seja feita uma farmacoterapia eficaz para pacientes com dor crônica que não respondem ou são refratários aos tratamentos farmacológicos convencionais. A implementação das bombas de infusão que liberam o fármaco de forma contínua no canal medular é atualmente o maior desafio do uso clínico desta técnica, pois pode apresentar mau funcionamento do implante, ou infecção no local, se fazendo necessário uma triagem na seleção dos pacientes, avaliando o custo benefício deste tratamento para o paciente (BOLASH; MEKHAIL, 2014; DEER et al., 2017; HAYEK; HANES, 2014; VER DONCK et al., 2014). Desde a década de 80 os cateteres e implantes adaptados para administração crônica de drogas pela via intratecal vem sendo aprimorados, e diversos estudos utilizando injeção intratecal de opioides em pacientes com dor crônica já apresentaram alta eficácia no controle da dor.

A administração intratecal de morfina, fentanil, meperidina e buprenorfina no tratamento de pacientes com dor crônica já foram avaliadas por períodos de avaliação de 5, 14, 21 e até 41 meses, e foi possível observar a redução da dor das mais diversas origens nestes pacientes, apresentando baixa incidência de efeitos colaterais e pouca ou nenhuma reação adversa ao implante (ANGEL; GOULD; CAREY, 1998; BRAZENOR, 1987; FOLLETT et al., 1992; HASSENBUSCH et al., 1995; KRAMES; LANNING, 1993; PENN; PAICE, 1987), demonstrando ser essa uma via segura para tratamentos crônicos. Em alguns casos inclusive houve melhora nas respostas de questionários relativos à qualidade de vida dos pacientes (PIMENTA et al., 1998; WINKELMÜLLER; WINKELMÜLLER, 1996).

Apesar disso, o uso de tratamentos com opioides para pacientes com inflamação articular crônica atualmente é limitado à via oral e somente em casos avançados, devido seus importantes efeitos no SNC (CURTIS et al., 2017; WHITTLE; RICHARDS; BUCHBINDER, 2013). Dentre os opioides com uso permitido pela via intratecal se destaca o tramadol, que tem bons efeitos clínicos por esta via

(ALHASHEMI; KAKI, 2003; DEMIRARAN; KOCAMAN; AKMAN, 2005; SUBEDI et al., 2013), além de apresentar baixos efeitos adversos quando comparado à morfina, mesmo pela via oral, sendo inclusive recomendado como tratamento para casos de Osteoartrite grave (PELLETIER et al., 2016). Logo, a associação entre um opioide fraco com baixos níveis de efeitos colaterais, e uma via de administração direta e mais segura, pode se tornar atrativa para pacientes com inflamação articular crônica.

1.5 Tramadol

O tramadol é um analgésico opioide fraco amplamente utilizado em quadros de dor moderada a leve, de caráter agudo ou crônico, como pós-operatórios, dor neuropática e câncer, com eficácia significativa (KIMURA; OBATA; SAITO, 2012; SCHUG, 2007; WHO, 2015). Nas afecções musculoesqueléticas, seu efeito analgésico já foi descrito para quadros de osteoartrite, espondilite anquilosante e artrite reumatoide (BRUYÈRE et al., 2016; CHANG et al., 2013; SCHUG, 2007; SUBEDI et al., 2013). Apesar de ser classificado como opioide, seu mecanismo de ação não é restrito a esse sistema, tendo uma característica de analgésico multimodal, justificando a ausência de efeitos colaterais tipo-opioide no SNC (BARTH et al., 1987; DHASMANA et al., 1989; HENNIES; FRIEDERICH; SCHNEIDER, 1988; KAYSER; BESSON; GUILBAUD, 1992; RAFFA, 1996).

Pela via oral, sua absorção é rápida e quase completa ($\approx 90\%$), com biodisponibilidade média de 70%. O tramadol é uma mistura racêmica dos enantiômeros (\pm) tramadol, e ao alcançar o fígado sofre metabolismo de Fase I do tipo *N* ou *O*-desmetilação, gerando metabólitos de M1 a M5, também de forma racêmica, isto é, de (\pm)-M1 a (\pm)-M5 (LINTZ et al., 1981, 1986). Os metabólitos M1 e M5 podem ainda sofrer reações de Fase II (glucuronidação e sulfatação), e ambos são metabólitos ativos, onde o M1, aqui chamado de O-DES, tem atividade comparável ou até maior que a do tramadol em alguns casos (GILLEN et al., 2000; HENNIES; FRIEDERICH; SCHNEIDER, 1988; KOGA et al., 2005; LINTZ et al., 1981; MINAMI et al., 2015). A meia vida do tramadol racêmico é de aproximadamente 6 h, enquanto que seu metabólito O-DES tem meia vida de 8 h. Sua estrutura química está representada na figura 1.3.

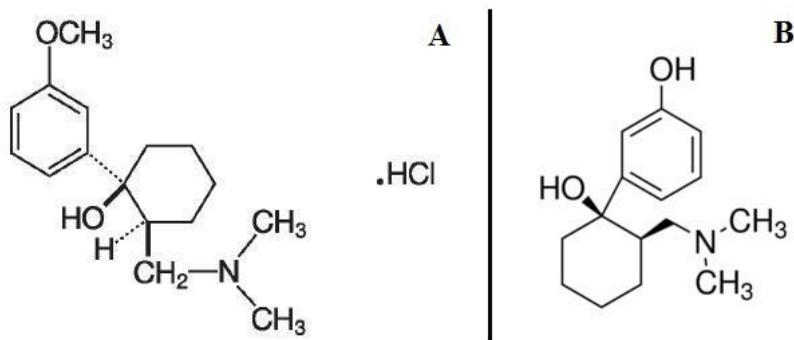


Figura 1.3: Estrutura química do tramadol e seu metabólito O-DES. (A) Fórmula estrutural do tramadol com nome químico: (±)-trans-2-[(dimetilamino)metil]-1-(3-metoxifenil) ciclohexanol hidrocloreto. (B) Fórmula estrutural do metabólito O-DES com nome químico: (±)-mono-*O*-desmetiltramadol. Imagens retiradas de:

<https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/archives/image.cfm?archivid=62806&type=img&name=tramadol-structure1.jpg>
http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure3/125/mfcd01311883.eps/_jcr_content/renditions/mfcd01311883-medium.png

O tramadol se liga a receptores μ -opioides ativando-os e gerando uma hiperpolarização na célula, porém a sua afinidade a esses receptores é cerca de 6000 vezes menor que a morfina, e seu metabólito O-DES tem afinidade ainda maior que o próprio tramadol (FRINK et al., 1996; GILLEN et al., 2000; HENNIES; FRIEDERICHS; SCHNEIDER, 1988; RAFFA et al., 1993). Além disso, quando utilizado um ligante mais específico para os receptores μ -opioides, a seletividade do tramadol pelo sítio de ligação nestes receptores diminui (RAFFA et al., 1992). A baixa afinidade pelo receptor μ -opioides e o fato de seu efeito analgésico ser inibido somente de forma parcial pela naloxona (DESMEULES et al., 1996; KAYSER; BESSON; GUILBAUD, 1991; RAFFA et al., 1993) indicam que a atividade analgésica do tramadol não é somente via sistema opioide.

A característica de analgésico multimodal vem da sua capacidade de interferir nos mais diversos sistemas fisiológicos. Em revisão feita no ano de 2015, foi listada uma variedade de trabalhos científicos envolvendo o tramadol e seu metabólito O-DES, e sua atividade em

receptores acoplados à proteína G (GPCR's) e canais iônicos (MINAMI; OGATA; UEZONO, 2015). Por exemplo, ao inibir receptor de adenosina do tipo 1, tanto periférico quanto medular, há uma redução do efeito analgésico do tramadol em camundongos (SAWYNOK; REID; LIU, 2013). Em oócitos tratados com o metabólito O-DES, há inibição da corrente gerada por receptores para SP (MINAMI et al., 2011).

Além disso, foi observada a inibição dos canais receptores de NMDA (HARA; MINAMI; SATA, 2005), apesar de não ter sido observada nenhuma influência na atividade dos receptores para endotelina do tipo A (ANDURKAR; GENDLER; GULATI, 2012), dos canais de sódio e cálcio dependentes de voltagem (SHIRAISHI et al., 2002), nem dos canais do tipo GABA_A e glicina (HARA; MINAMI; SATA, 2005), justificando a baixa atividade hipnótica deste medicamento (LEE; MCTAVISH; SORKIN, 1993). Mais recentemente foi demonstrada a atividade do tramadol e do seu metabólito O-DES em canais medulares do tipo TRPA1, porém nenhuma atividade em TRPV1 (MIYANO et al., 2015), o que vai contra aos achados de Marincsák e colaboradores, que descreveram atividade agonística do tramadol nos canais TRPV1 (MARINCŠÁK et al., 2008), tornando inconclusiva a atividade do tramadol nestes canais.

Ao se avaliar a atividade do tramadol no sistema de transmissão da acetilcolina (receptores muscarínicos e nicotínicos), foi observado que apesar de não haver afinidade nem do tramadol e nem de seu metabólito O-DES pelos receptores muscarínicos do tipo 1 (M₁) (FRINK et al., 1996), o tramadol foi capaz de reduzir correntes geradas pela ACh em oócitos, assim como o acúmulo de GMP_C em células de adrenal bovina (SHIRAISHI et al., 2001). Efeitos semelhantes foram observados por Shiga e colaboradores em 2002, desta vez avaliando a atividade do receptor M₃ (SHIGA et al., 2002). O metabólito O-DES, por sua vez, só teve essa influência inibitória nos receptores M₁, e não no M₃ (NAKAMURA et al., 2005). Quanto aos receptores nicotínicos foi observada a inibição dos canais do tipo $\alpha 7$ -nicotínicos em oócitos (SHIRAISHI et al., 2002).

Quanto ao sistema noradrenérgico já foi observada que a ativação de receptores α_2 -adrenérgicos é capaz de potencializar o efeito analgésico do tramadol (ANDURKAR; GENDLER; GULATI, 2012; ÖZDOĞAN; LÄHDESMÄKI; SCHEININ, 2006), e que a inibição deste mesmo receptor reduz a capacidade analgésica do tramadol

(DESMEULES et al., 1996; DHASMANA et al., 1989; KAYSER; BESSON; GUILBAUD, 1992), apesar de não ter uma ligação direta do tramadol com o receptor α_2 -adrenérgico (LI et al., 2012). A mesma falta de afinidade direta pelo receptor se observa no sistema de transmissão serotoninérgico (FRINK et al., 1996), pelo menos para os subtipos de receptores serotoninérgicos 5-HT₁₋₃. Porém, a inibição de receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₂ diminui a capacidade analgésica do tramadol em modelo de formalina em camundongos (OLIVA et al., 2002), assim como a corrente gerada por este mesmo receptor em oócitos (HORISHITA et al., 2006; OGATA et al., 2004a). Metisergida e ketanserina, ambos antagonistas serotoninérgicos, também foram capazes de inibir a atividade analgésica do tramadol em modelos animais (DHASMANA et al., 1989; YANARATES et al., 2010).

Hennies e colaboradores, em 1982, observaram que a inibição da enzima de degradação das monoaminas (MAO) provocava um aumento da sua potência em até 2x. Ainda foi observada neste trabalho a capacidade do tramadol em inibir a recaptação de monoaminas em níveis comparáveis com os inibidores de recaptação já conhecidos (HENNIES et al., 1982), apresentando um mecanismo de ação diferente para o tramadol. A partir deste momento, muitos trabalhos relacionando o efeito do tramadol com a atividade das monoaminas, e implicando a sua capacidade de inibir a recaptação das mesmas, surgiram na literatura.

A inibição da recaptação de noradrenalina foi comprovada *in-vitro* e em fatias de córtex e no *Locus coeruleos*, núcleo de origem dos neurônios noradrenérgicos (DRIESSEN; REIMANN, 1989a; DRIESSEN; REIMANN; GIERTZ, 1993; FRANCESCHINI; LIPARTITI; GIUSTI, 1999; HALFPENNY et al., 1999), assim como a inibição da recaptação de serotonina também em tecido de córtex e do Núcleo Dorsal da Rafe, ponto de origem dos neurônios serotoninérgicos (BAMIGBADE et al., 1997; DRIESSEN; REIMANN, 1992). Para o transportador de serotonina (SERT) e o transportador de noradrenalina (NET) foi comprovada a afinidade tanto do tramadol quanto de seu metabólito M1 (FRINK et al., 1996). Desta forma, o tramadol aumenta a concentração das monoaminas na fenda sináptica e estas podem se ligar aos seus receptores potencializando o efeito analgésico opioide (MATTIA et al., 1993; MINAMI; OGATA; UEZONO, 2015; RAFFA et al., 1992).

A capacidade de se ligar em mais de um receptor e afetar mais de um sistema indica uma variedade de produtos ativos. Como já descrito anteriormente, o tramadol é uma mistura racêmica, que na sua biotransformação produz metabólitos também racêmicos (LINTZ et al., 1981). Isto é, o (+)-tramadol gera os metabólitos (+)-O-DES a (+)-M5, enquanto que o (-)-tramadol gera os metabólitos (-)-O-DES a (-)-M5, e cada produto exibe uma afinidade diferente por um tipo de receptor ou sistema. Por exemplo, o enantiômero (+)-tramadol parece ter um efeito maior nos SERTs, enquanto que o (-)-tramadol tem maior afinidade pelos NETs, sendo a mistura racêmica do tramadol mais seletiva para esses sistemas do que a mistura racêmica do seu metabólito O-DES (DRIESSEN; REIMANN, 1992; FRINK et al., 1996; RAFFA et al., 1993). Em contrapartida, o metabólito O-DES tem mais afinidade pelos receptores μ -opioides que o tramadol, sendo o (+)-O-DES o mais potente de todos (FRINK et al., 1996; GILLEN et al., 2000; HENNIES; FRIEDERICHES; SCHNEIDER, 1988; RAFFA et al., 1993).

Apesar de atuar em tantos sistemas e ter mais de um componente com atividade biológica, o tramadol é uma droga relativamente segura. Em um relatório feito pelo *Expert Committee on Drug Dependence* (ECDD), órgão vinculado à Organização Mundial da Saúde, em 2015, ficou claro que revisões periódicas quanto ao uso do tramadol são feitas devido ao aumento das prescrições para uso tanto dentro quanto fora de estabelecimentos de saúde, mas que este é sempre considerado como seguro. Os baixos índices de abuso, dependência e crises de retirada foram suficientes para fazer com que a vigilância quanto ao seu uso não fosse rígida (WHO, 2015). Diferente de outros opioides utilizados na clínica, a dependência não é comum em pacientes que fazem uso do tramadol. Os poucos casos de dependência descritos foram classificados como “dependência marginal” e observados em pacientes que utilizaram tramadol pela via oral (o mesmo não acontece pela via parenteral) por um período de 2-24 meses (BARTH et al., 1987). Além disso, outros casos foram registrados ao se usar doses supra-terapêuticas ou em pacientes que já tinham histórico de adicção (CAMÍ; LAMAS; FARRÉ, 1994; CICERO et al., 1999; PRESTON; JASINSKI; TESTA, 1991).

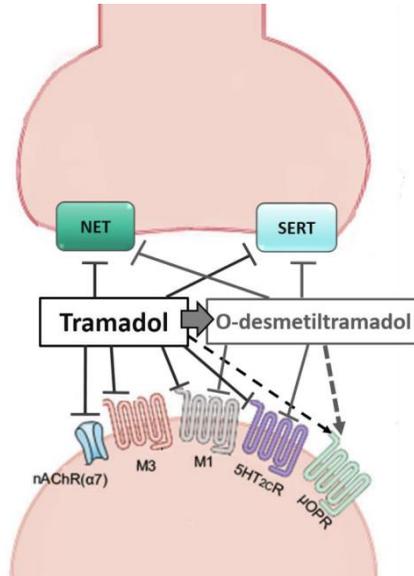


Figura 1.4: Resumo dos possíveis mecanismos de ação do tramadol e seu metabólito. Setas indicam ativação e barras indicam inibição do tramadol sobre os receptores acoplados à proteína G, transportadores de aminas e canais iônicos. SERT: transportador de 5HT, NET: transportador de norepinefrina, nAChR($\alpha 7$): receptor nicotínico da acetilcolina $\alpha 7$, M1/M3: receptores muscarínicos tipo 1 e 3, 5HT $2c$ R: receptor 5HT $2c$, μ OPR: receptor μ opioide. (CALLADO, 2017).

Outra característica comum dos opióides é a tolerância, o que também parece não acontecer com o tramadol (MALONNE et al., 2005; MATTIA et al., 1993). Em testes pré-clínicos utilizando modelo de hiperalgesia induzida por CFA (*Complete Freund Adjuvant*), foi observado que a administração repetida de tramadol não causou tolerância nos animais tratados, diferente de outros opióides testados, e que o efeito analgésico do tramadol se mantém mesmo em ratos já tolerantes à morfina (KAYSER; BESSON; GUILBAUD, 1991). Em contrapartida, foi observado que a efetividade de uma dose fixa de tramadol diminuía com o tempo. Duas semanas após a constrição do nervo ciático os animais foram tratados com tramadol, tendo um índice analgésico de 93%, e em quatro semanas após a constrição do nervo, a mesma dose só reduziu a dor em 39%. Essa condição não pode ser considerada uma tolerância à droga, pois o tratamento não foi contínuo

durante as quatro semanas. Desta forma, acredita-se que ocorre uma mudança no mecanismo de ação do tramadol durante a progressão da neuropatia, já que a naloxona inibiu o efeito do tramadol nos dois pontos de tratamento, porém a ioimbina (antagonista α_2 -adrenérgico) só inibe nas etapas posteriores (HAMA; SAGEN, 2007; MORENO-ROCHA et al., 2016).

Os efeitos colaterais mais comuns relatados após o uso do tramadol são náusea, vômitos, tontura, cansaço, sudorese e boca seca, sendo o mais comum deles, a náusea, que ocorre em somente em 6% dos pacientes (COSSMANN et al., 1997; GROND; SABLITZKI, 2004), e esta é mais comum durante os testes clínicos do que no uso diário (COSSMANN et al., 1997). Outros efeitos colaterais comuns aos opioides como os que ocorrem em sistema cardiovascular, a constipação e a depressão respiratória não são observados, ou aparecem de forma discreta, em pacientes que fazem uso do tramadol (CEPEDA et al., 2006; GROND; SABLITZKI, 2004; SCOTT; PERRY, 2000; WHO, 2015). O tramadol apresenta um melhor custo-benefício para pacientes com osteoartrite quando comparado com inibidores de COX-2 e AINEs com inibidor de bomba de prótons, porém é mais prescrito e indicado somente se houver comorbidades (CURTIS et al., 2017; KATZ et al., 2016; SCHUG, 2007; SMITH et al., 2016, 2017) por não haver informações suficientes sobre seu uso crônico em quadros de inflamação articular.

Em animais, já foi observada a sinergia entre o tramadol e diversas outras substâncias utilizadas no tratamento de dor neuropática, como gabapentina, venlafaxina e minociclina (CORONA-RAMOS et al., 2016; GUNELI et al., 2007; MEI et al., 2013; UYAR et al., 2003; ZHANG et al., 2013), assim como sua atividade analgésica em modelos de fibromialgia (KANEKO et al., 2014). Quanto às afecções articulares, já foi observada a resposta analgésica do tramadol em modelos de inflamação articular induzida por ácido úrico (MORENO-ROCHA et al., 2016), em gatos com osteoartrite natural por idade (MONTEIRO et al., 2017). Mais recentemente, nosso grupo de pesquisa apresentou resultados de analgesia com a administração oral e intratecal de tramadol em modelos de osteoartrite e artrite reativa em ratos, observando que, apenas quando injetado pela via intratecal, o tramadol era capaz de inibir também o edema articular em ambos os modelos, utilizando uma dose muito menor que a dose recomendada na clínica

(CALLADO, 2017). Esse efeito antiedematogênico do tramadol não é comum na clínica e por isso pouco descrito ou estudado.

Desta forma, o tramadol injetado pela via intratecal torna-se uma ferramenta farmacológica para o tratamento de doenças inflamatórias articulares crônicas, pois é capaz de unir uma resposta analgésica com poucos efeitos colaterais e uma via de administração que possibilita não somente a injeção da droga diretamente no centro do controle da dor, mas também a redução do edema articular periférico. O efeito antiedematogênico do tramadol está ainda por ser elucidado, mas tendo em vista a atividade do corno dorsal da medula espinhal e a influência do RRD na inflamação periférica, originou-se a hipótese de que o tramadol diminui a neurotransmissão no corno dorsal da medula espinhal, inibindo o processamento nociceptivo e a deflagração do RRD, assim diminuindo dor e edema periféricos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar o mecanismo antiedematogênico do tramadol injetado pela via intratecal.

2.2 Objetivos específicos

- Evidenciar a capacidade inibitória neuronal de uma baixa dose de tramadol injetada pela via intratecal;
- Investigar a participação do co-transportador NKCC₁ e das fibras aferentes primárias nos efeitos analgésicos e antiedematogênicos do tramadol injetado pela via intratecal;
- Observar o envolvimento dos receptores μ -opioides e dos receptores de monoaminas nos efeitos analgésicos e antiedematogênicos do tramadol injetado pela via intratecal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, com peso entre 300 - 370 gramas fornecidos pelo Biotério do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (CCB, UFSC). Os animais foram agrupados em caixas contendo 5 animais e mantidos sob temperatura controlada ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro (12 horas de claro e 12 horas de escuro) e livre acesso à água e à ração. Os experimentos foram realizados entre 8:00 e 18:00 horas, após ambientação prévia dos animais por pelo menos 1 hora na sala onde o experimento foi realizado. Os experimentos foram conduzidos seguindo os preceitos éticos definidos pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP, 1983) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC (PP 3007-16).

3.2 Modelo de dor inflamatória induzida por Carragenina/LPS – Artrite Reativa

O modelo de artrite reativa experimental (ReA) tem como objetivo induzir uma reação inflamatória na articulação semelhante ao que ocorre na ReA em humanos (BRESSAN; CUNHA; TONUSSI, 2006; BRESSAN; MITKOVSKI; TONUSSI, 2010). A ReA manifesta-se como sequela de uma infecção originada no trato gastrointestinal ou urogenital da qual, embora definida como uma inflamação articular estéril, pode-se encontrar componentes bacterianos remanescentes, como o LPS, nos tecidos articulares de pacientes, sendo este um importante fator não só da indução mas também da manutenção do quadro inflamatório articular (GRAMFORS et al., 1990; HANNU, 2011; SIEPER; BRAUN; KINGSLEY, 2000). De forma concomitante, é descrito que trauma prévio na articulação é fator de predisposição para alguns pacientes que posteriormente desenvolvem ReA (ALCALAY et al., 1989). Logo, uma injeção de carragenina, um mucopolissacarídeo extraído da alga marinha *Chondrus crispus*, que ao ser injetada na articulação induz sensibilização articular (SANTER; SRIRATANA; LOWTHER, 1983), serve como um trauma prévio, e quando seguida de uma reexposição da mesma articulação à uma solução contendo LPS gera um importante quadro inflamatório na articulação exposta

(BRESSAN; CUNHA; TONUSSI, 2006), prolongando a dor inflamatória.

Para tanto, primeiramente foi injetada na articulação fêmuro-tibial direita dos animais a carragenina, diluída em solução salina 0.9% (300 $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ /articulação) e fervida por alguns segundos para facilitar a diluição. Após 72 h, os animais receberam o LPS (*Escherichia coli*) na mesma articulação, também diluído em salina 0.9% (30 $\text{ng}/50 \mu\text{l}$ /articulação). Os animais foram contidos com um pano e a articulação tricotomizada antes da aplicação intra-articular.

A injeção intra-articular foi feita com os animais cuidadosamente imobilizados com uma flanela, mantendo o terço inferior do abdômen exposto, facilitando a manipulação dos membros posteriores. Em decúbito dorsal e com o membro posterior direito flexionado, foi feita a tricotomia da articulação fêmuro-tibial, permitindo a visualização do tendão infrapatelar. Uma agulha de 29 gauge e 8 mm de comprimento foi inserida de forma perpendicular ao tendão em cerca de 1/3 do seu comprimento até alcançar a cavidade sinovial e assim a droga pode ser injetada.

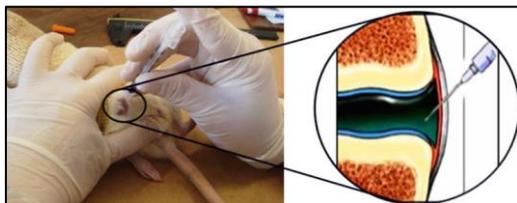


Figura 3.1: Imagem ilustrativa do procedimento de injeção intra-articular. Em destaque está o local onde se insere a agulha. (Stein, 2012).

3.3 Teste Algesimétrico – Medida da Incapacitação Articular

A avaliação da nocicepção articular foi feita de forma indireta pela avaliação da incapacitação articular. Tonussi e Ferreira, em 1992, desenvolveram o Teste de Incapacitação Articular, que permite avaliar o estado funcional da articulação fêmuro-tibial de ratos. O teste consiste de um aparelho com um cilindro rotatório (Fig. 3.2A) revestido com uma malha trançada em aço inox, sapatilhas metálicas e um

microcomputador. A utilização de um sistema computacional para registro retira o viés do experimentador neste teste, já que independe do mesmo.

É acoplada a cada uma das patas traseiras dos animais uma sapatilha metálica (Fig. 3.2B). A sapatilha da pata direita, a qual a articulação do joelho recebeu a substância algésica, acompanha um fio condutor que envia o seu sinal a um computador. O animal é então estimulado a deambular no cilindro em rotação constante (3 r.p.m.) utilizando as sapatilhas durante um tempo total de 60 s, durante o qual o computador registra o toque da sapatilha na malha metálica. Ao final da deambulação, o programa *RatLimb* apresenta o tempo total que o animal ficou sem encostar a pata, isto é, o Tempo de Elevação de Pata (TEP; s). O TEP constitui uma medida de incapacitação articular, logo, quanto maior o TEP, maior a incapacitação articular, caracterizando um comportamento nociceptivo (TONUSSI; FERREIRA, 1992).

Os animais são ensinados a deambular no cilindro voltados para frente, e treinados no sistema antes das injeções intra-articulares para que se acostumem com as sapatilhas. No terceiro dia após a carragenina, antes de qualquer manipulação farmacológica, é registrado o TEP basal dos animais, que varia entre 13-18s neste protocolo de indução. As medidas do TEP neste trabalho foram feitas na terceira, quarta e quinta hora (3 h, 4 h, 5 h) após a injeção intra-articular de LPS, e apresentadas graficamente como a média do somatório das três horas medidas.

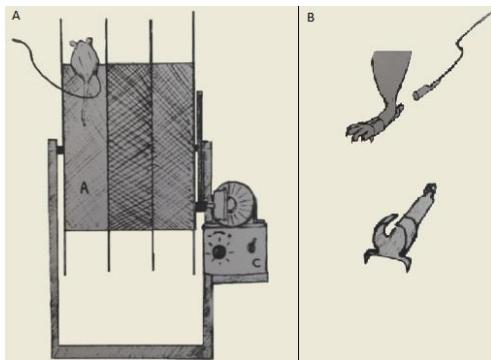


Figura 3.2: Imagem ilustrativa do sistema do Teste de Incapacitação Articular. (A) Representa o aparelho utilizado para a deambulação dos animais e (B) as sapatilhas e fio condutor.

3.4 Diâmetro Articular

O edema articular induzido pela carragenina/LPS foi quantificado através da medida do diâmetro da articulação fêmuro-tibial (eixo médio-lateral), com auxílio de um paquímetro (Fig. 3.3). As medidas do diâmetro articular (DA) foram realizadas imediatamente após cada registro de TEP, e para cada registro eram feitas três medições do DA e considerada como resultado a maior. Os valores do DA foram expressos como a diferença entre o diâmetro articular mensurado antes da injeção intra-articular de LPS (DA basal) e as três medidas subsequentes (DA das horas 3, 4 e 5 após o LPS). O DA está expresso graficamente como a média do somatório das três diferenças obtidas.



Figura 3.3: Imagem ilustrativa da medida do diâmetro articular. A foto mostra a região de medida do diâmetro articular e o paquímetro utilizado. (Stein, 2012).

3.5 Injeção Intratecal

A injeção de fármacos pela via intratecal foi realizada segundo o método descrito por Mestre e colaboradores (1994). Neste procedimento, os animais foram previamente anestesiados com isoflurano (2% em oxigênio hospitalar) e posicionados em decúbito esternal com os membros pélvicos e a cauda estendidos e então realizada a tricotomia da região dorsal lombar (Fig. 3.4A). Cuidadosamente, foi inserida uma agulha 29 gauge, de 12,7 mm de comprimento (Seringa BD Ultra Fine) perpendicularmente entre as vértebras L5 e L6 até a visualização de um leve bater de cauda, denominado *flick*, indicando que a agulha entrou no espaço subaracnóideo e alcançou o canal vertebral corretamente (MESTRE et al., 1994)(Fig. 3.4B).

Neste trabalho foram administradas de forma intratecal as seguintes drogas: **Tramadol** (10 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$) e **CTOP** (15 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$), diluídos em solução salina 0.9%; **Bumetanida** (60 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$), diluída em solução com bicarbonato de sódio 1.29% com $\text{pH} \sim 7.4$ e mantida em aquecimento leve para impedir a formação de cristais; **Resiniferatoxina** (3.8 $\mu\text{g}/\text{Kg}/10\mu\text{L}$), diluída em PBS + Tween 7%; e **5,7-dihidroxitriptamina** (20 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$), diluída em solução com ácido ascórbico 0.2%; ou seus respectivos veículos, de acordo com o protocolo específico de cada tratamento.

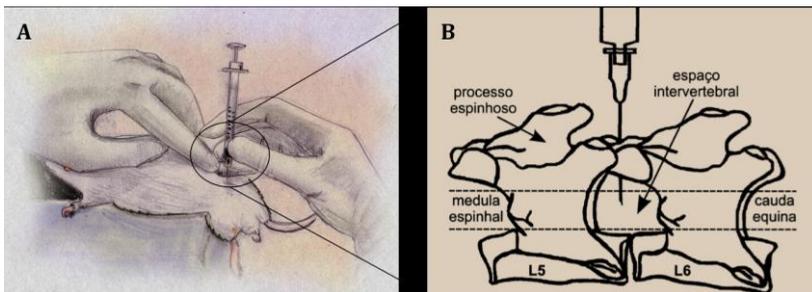


Figura 3.4: Imagem ilustrativa da injeção intratecal. Em (A) vemos a posição do animal adotada para facilitar a injeção, e em (B) uma representação anatômica do local de alcance da seringa e onde a droga é injetada. (FOLETTTO, 2015).

3.6 Imunohistoquímica

Para a avaliação da atividade neuronal no corno dorsal da medula espinhal, alguns animais foram submetidos ao protocolo de imunohistoquímica para marcação de proteína c-Fos, indicativa de atividade neuronal. Para tal, 3h após a injeção intra-articular do LPS, os animais foram anestesiados com Xilazina e Cetamina (5mg/kg e 90mg/kg; 1.5 ml/kg) e perfundidos com 9.25% de sacarose seguida de 4% de paraformaldeído, ambos em solução com PB 0.2M. Após a perfusão, foram retiradas as porções da região lombar da medula espinhal, mantidas em PFA 4% por 24 hs e sacarose 30% até o processo de congelamento rápido com nitrogênio líquido, e mantidas em -80°C até o seu uso. As fatias das medulas no tamanho de 50 μm foram feitas com auxílio de um Criostato Leica CM1850 (Leica Microsystems Inc.; Buffalo Grove, IL, EUA), cedido pelo Laboratório Multiusuário de

Estudos em Biologia (LAMEB), da UFSC, e coletadas de forma seriada em compartimentos contendo solução anti-congelante (Propilenoglicol e sacarose 30% em PB 0.2M), de forma a gerar uma crioproteção até o momento de utilização das amostras.

A IHQ seguiu o método *Free-floating*, onde as fatias são alocadas em poços contendo cestas de contenção e todas as lavagens e incubações ocorrem dentro desses poços (MELLEU; LINO-DE-OLIVEIRA; MARINO-NETO, 2017). Inicialmente, e após cada incubação, as amostras foram lavadas com tampão PBST (PBS + Triton-X 0.3%; 3x/5 min). A primeira incubação foi feita com metanol + H₂O₂ por 30 min, para bloqueio da peroxidase endógena. Após a lavagem com tampão, as amostras foram incubadas com PBST contendo BSA 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 60 min, seguida de mais uma lavagem com PBST e então incubadas com o anticorpo primário anti-Fos (SC-52, rabbit IgG, Santa Cruz, em PBST 1:2000) *overnight* na temperatura de 4°C.

Em seguida, as secções foram novamente lavadas e incubadas com o anticorpo secundário biotilado anti-rabbit (1:1000, em PBST) por 90 min, e ao fim da lavagem foi feita a última incubação com o complexo enzimático de avidina biotilada (Vectastain Elite ABC Kit, VectorLabs, em PBST 1:500) por 2h. Para melhor visualizar a reação, as secções foram expostas, por 5 min, a uma solução de 0.05% de DAB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA; PBST + 0.03% H₂O₂). As amostras foram lavadas em água destilada e colocadas em lâminas gelatinizadas por 48h em temperatura ambiente, seguido de processo de desidratação gradual em álcoois (70%, 90% e absoluto) e xilol (três vezes) e cobertas com lamínulas em meio de montagem com DPX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Para análise do número de células c-Fos positivas, as lâminas foram levadas ao microscópio e duas secções aleatórias foram escolhidas para as fotomicrografias da região das lâminas I e II do corno dorsal da medula espinhal e posterior contagem do número de células pela área selecionada (cél x A). As lâminas I e II do corno dorsal lombar foram escolhidas como área de análise por serem pontos de entrada das fibras nociceptivas na medula, e importantes para a continuidade da transmissão nociceptiva (CERVERO; IGGO, 1980; FURUE; KATAFUCHI; YOSHIMURA, 2004). A área selecionada foi analisada pelo software ImageJ (RASBAND, 1997) após serem convertidas ao

formato binário com um limiar de 0.35 relativo ao nível de sinal do preto e do branco, afim de excluir núcleos menos nítidos. A contagem de núcleos c-Fos positivos foi feita de forma manual dentro da área selecionada com o auxílio do ImageJ.

3.7 Coleta do Líquido Sinovial

Ao fim da quinta hora, após a avaliação do TEP e do DA, os animais foram eutanasiados por overdose de Xilazina e Cetamina (5mg/kg e 90mg/kg; 3ml/kg) seguido de deslocamento cervical, e tiveram sua articulação direita aberta, de forma a expor a cavidade sinovial e permitir a coleta do lavado articular. A cavidade sinovial foi então lavada repetidamente até se utilizar todo o volume de 100 μ L/cavidade de EDTA 4% e Solução Inibidora de Protease 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Um volume de 5 μ L de líquido sinovial puro foi separado em lâminas de esfregaço para contagem diferencial de leucócitos, 20 μ L do lavado foi separado para contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer, e o restante foi mantido a -80°C e analisado o seu conteúdo por *Western Blotting*.

3.8 Western Blotting

A técnica de *Western Blotting* foi utilizada para analisar a presença da citocina TNF- α no imunoc conteúdo do líquido sinovial. Previamente foi utilizado 2 μ L de cada amostra de líquido sinovial para a dosagem de proteína pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), e em seguida foi adicionado a mesma quantidade de tampão de amostra no restante de cada tubo (glicerol 20%, mercaptoetanol 14,4mM, azul de bromofenol 0.1%, Tris-HCl 0.2M e SDS 10%; 1:200). As amostras foram fervidas à 95°C por 8 min e mantidas a -80°C até o momento da utilização.

Inicialmente as proteínas de cada amostra são separadas por um processo de eletroforese. Para isso se utilizou um gel de separação (acrilamida 8%, bis-acrilamida 0,2%, Tris 375 mM, SDS 0,1%, TEMED 0,06% e persulfato de amônia 0,04%) e um gel de entrada (acrilamida 4%, bis-acrilamida 0,09%, Tris 125 mM, SDS 0,1%, TEMED 0,08% e persulfato de amônia 0,03%). Foram aplicadas nos poços formados entre os géis o padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™ Standards, Kaleidoscope™, BioRad, CA, EUA) e as amostras em volume suficiente para alcançar 50 μ g de proteína por mL de amostra. A

eletroforese foi feita a 90 V, durante aproximadamente 2 h, banhada em tampão de corrida. Em seguida realizou-se a transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose a 100 V, por 1 h, a 4°C, banhado em tampão de transferência.

As membranas foram coradas com vermelho de *Ponceau* 0.2% para visualização das bandas de proteína e então lavadas 3 vezes durante 10 min com TBS-T (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄ 20 mM, Tween-20 0,05%) para retirar o corante. Em seguida a membrana foi bloqueada com TBS-T com leite em pó desnatado 5% por 1 h a temperatura ambiente e imediatamente depois incubadas com o anticorpo primário anti-TNF (SC-52746, mouse IgG, Santa Cruz, em TBS-T com leite 5% 1:1000) *overnight* a 4°C, ou actina conjugada à peroxidase (1:5000, Santa Cruz) por 1 h a temperatura ambiente. A membrana com anti-TNF foi lavada com TBS-T e em seguida incubada com o anticorpo secundário anti-mouse conjugado a peroxidase (1:5000 em TBS-T com leite 5%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 1 h a temperatura ambiente e em seguida lavado uma última vez com TBS-T.

A revelação se iniciou com a incubação da membrana no kit de quimiluminescência (ECL; Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) por 1 minuto e logo em seguida a colocação da membrana no fotodocumentador (ChemiDoc, BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA). As análises quantitativas das bandas de proteínas reveladas foram realizadas por densitometria com o auxílio do programa Image Lab (versão 4.1; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), normalizadas em relação à actina e apresentadas como unidade arbitrária desta comparação relativa.

3.9 Análise Estatística

Os dados foram analisados através do programa *Statistica 7*[®]. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA. Para a avaliação dos dados das vias de administração, IHQ para proteína c-Fos e *Western Blotting*, utilizou-se o ANOVA de uma via. Já para a avaliação dos dados de TEP e DA que passaram por intervenções farmacológicas antes do tratamento com o tramadol, utilizou-se o ANOVA de duas vias. Sempre que encontrado $p > 0.05$ era adotada a análise com o pós-hoc Newman-Keuls. Todos os gráficos foram elaborados no programa *GraphPad Prism 5*[®].

4 RESULTADOS

4.1 Confirmação do efeito analgésico e anti-edematogênico do Tramadol injetado pela via intratecal

Inicialmente, foi feita a avaliação do efeito analgésico e anti-edematogênico do tramadol 10 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$ injetado pela via intratecal, sendo a mesma dose de tramadol também injetada pela via subcutânea, gerando o primeiro protocolo experimental (Fig. 4.1).

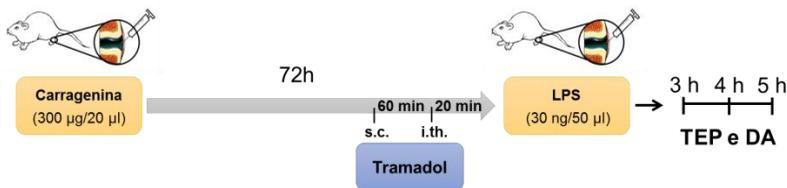


Figura 4.1: Protocolo Experimental 1. Os animais receberam carragenina na articulação direita, 72 h depois receberam LPS na mesma articulação. Tratamentos prévios com tramadol pela via subcutânea (s.c.) ou intratecal (i.th.) foram feitos 60 e 20 minutos antes da injeção de LPS, respectivamente. O TEP e o DA foram mensurados nas horas 3, 4 e 5 após o LPS.

Foi possível confirmar neste experimento que o tramadol pela via intratecal é capaz de reduzir o TEP (Fig. 4.2A), assim como o DA (Fig. 4.2B), quando comparado com o animal que recebeu solução salina pela mesma via. A injeção intratecal de tramadol não alterou a contagem total ou diferencial de células do líquido sinovial, nem as alterações morfológicas provocadas pela indução da ReA (ANEXO A). A mesma dose de tramadol injetada pela via subcutânea (s.c.) não produz efeitos analgésicos, tampouco impediu a formação do edema articular, comprovando a especificidade desta dose e seu sítio de injeção (Fig. 4.2A e B).

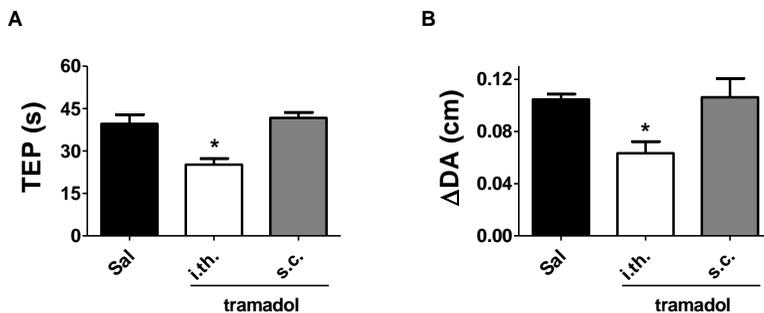


Figura 4.2: Efeito da injeção de tramadol em diferentes vias de administração sobre a incapacitação articular (A) e o diâmetro articular (B). Os animais foram pré-tratados com salina pela via intratecal (Sal), ou tramadol pela via intratecal (i.th.) ou subcutânea (s.c.) na dose de 10 µg. As barras representam média ± EPM de um n=8 e * representa diferença estatística com $p < 0.05$ comparado ao grupo Sal e s.c. no teste de ANOVA de uma via seguida de post-hoc Newman-Keuls.

A quantificação de TNF- α no líquido sinovial desses animais foi feita por meio da técnica de *Western Blotting*, e, apesar de não haver diferença estatística, podemos observar um padrão de resposta indicando o aumento da quantidade desta citocina no líquido sinovial de animais com artrite reativa tratados com salina pela via intratecal, enquanto que o tratamento com tramadol por esta mesma via parece impedir esse aumento (Fig. 4.3).

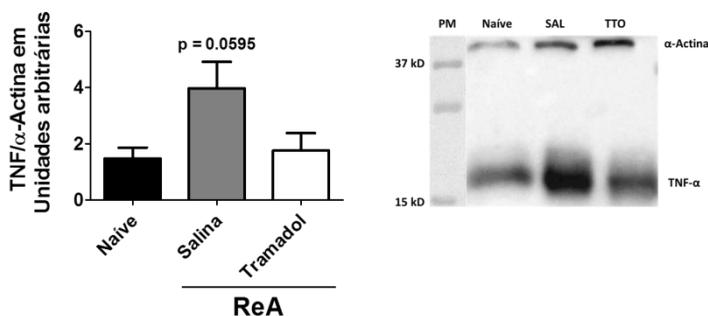


Figura 4.3: Quantificação de TNF- α no líquido sinovial. Animais *naïve* não receberam indução da artrite reativa (ReA), nem nenhum tratamento farmacológico, e animais com indução de ReA receberam tratamento intratecal de salina ou tramadol 10µg/20µL. As barras representam média ± EPM de um n=4. ANOVA de uma via.

4.2 Avaliação da expressão de proteína c-Fos no corno dorsal espinal após tratamento com tramadol

Após perfusão, foi realizada a remoção da região lombar da medula espinal de animais com indução de artrite reativa e tratados com salina ou tramadol pela via intratecal, assim como de animais *naïve*, isto é, animais que não passaram por nenhum procedimento experimental, e analisada a imunomarcagem de proteína c-Fos (Fig. 4.4). A proteína c-Fos é indicativa de atividade neuronal, e sua imunomarcagem neste protocolo nos indica se o tramadol é capaz de inibir a neurotransmissão medular.

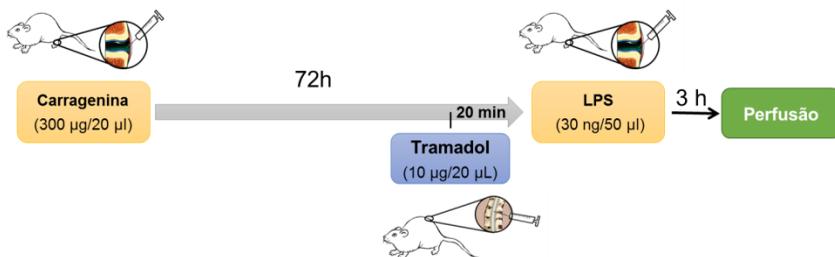


Figura 4.4: Protocolo Experimental 2. Os animais receberam carragenina na articulação direita, 72 h depois receberam LPS na mesma articulação. Tratamento prévio com tramadol intratecal foi feito 20 minutos antes da injeção de LPS. Na terceira hora após o LPS os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca para coleta de material.

A fotomicrografia do corno dorsal da região lombar foi dividida em regiões anatômicas, permitindo a avaliação das lâminas I e II (Fig. 4.5 A-B). Foi possível observar que animais *naïve* expressam pouca proteína c-Fos nesta região, e que a indução da artrite reativa com carragenina/LPS produz um aumento da expressão desta proteína, indicando alta atividade neuronal, enquanto que o tratamento com o tramadol reduz substancialmente o conteúdo de c-Fos (Fig. 4.5 C-E), chegando a níveis comparáveis com o *naïve*. A representação gráfica deste resultado pode ser vista na Fig. 4.6. A marcação positiva para proteína c-Fos em motoneurônios presentes no corno ventral de animais de todos os grupos experimentais mostram que a inibição da atividade neuronal é restrita ao sítio de injeção da droga (Fig. 4.5 F-H).

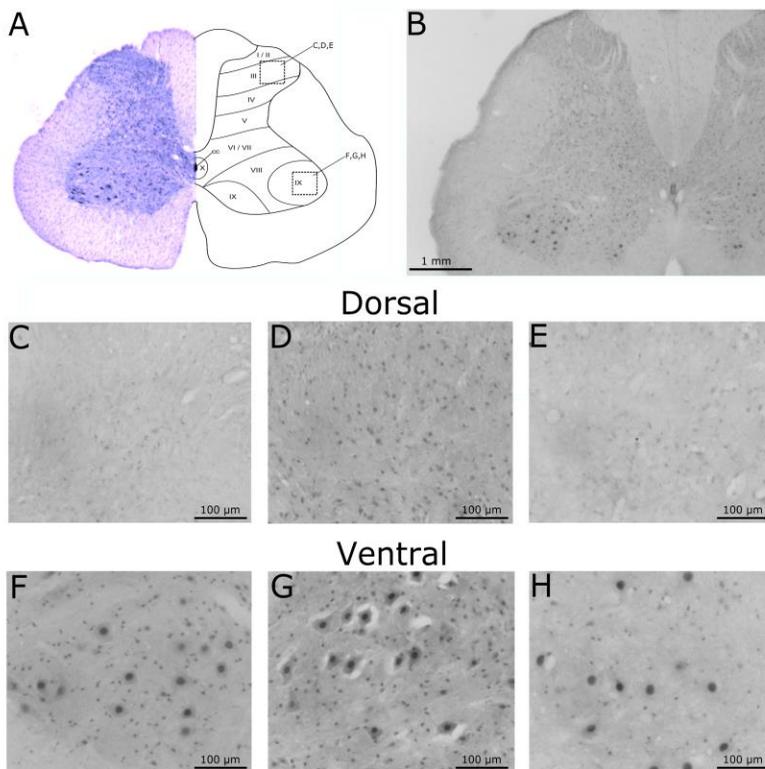


Figura 4.5: Imagens representativas da região de avaliação da imunomarcagem para proteína c-Fos. Em (A) está descrita a divisão anatômica das lâminas na medula e destacado os pontos das fotos do corno dorsal (C, D e E) e do corno ventral (F, G e H). (B) Representa uma foto inteira de uma secção medular da região lombar no aumento de 10x. As fotos (C) (D) e (E) representam as lâminas I e II do corno dorsal dos grupos naïve, salina e tramadol, respectivamente. As fotos (F) (G) (H) representam a lâmina IX do corno ventral dos grupos naïve, salina e tramadol, respectivamente, destacando os motoneurônios. As fotos de C-H foram tiradas no aumento de 20x.

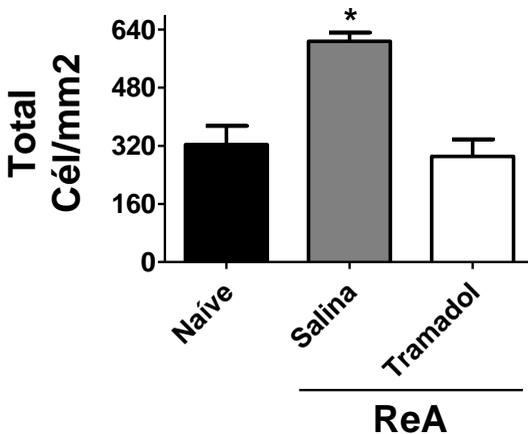


Figura 4.6: Efeito da injeção intratecal de tramadol sobre a expressão de proteína c-Fos. O grupo naïve não recebeu indução da artrite reativa, nem nenhum tipo de tratamento farmacológico, e os animais com artrite reativa induzida (ReA) receberam salina ou tramadol (10 µg) pela via intratecal, 20 min antes do desafio com LPS, e as medulas foram coletadas 3 h após este desafio. As barras representam média ± EPM de um n=4 e * representa diferença estatística com $p < 0.05$ comparado aos grupos *naïve* e tramadol. ANOVA de uma via seguida de post-hoc Newman-Keuls.

Este conjunto de resultados dá suporte à hipótese de que uma dose baixa de tramadol injetado pela via intratecal é capaz de alterar a neurotransmissão medular e desta forma diminuir a nocicepção e a inflamação periférica.

4.3 Efeito da inibição do co-transportador NKCC1 na ação do Tramadol

O Reflexo da Raiz Dorsal é o mecanismo pelo qual se explica a capacidade da medula espinhal em influenciar um quadro de inflamação periférica (WILLIS, 1999), e o co-transportador NKCC1 tem papel importante na deflagração do RRD, sendo um dos principais fatores que potencializam a resposta antidrômica (WILLIS, 1999; FOLETTI, 2015). Desta forma, o NKCC1 foi bloqueado com a bumetanida e

injetamos o tramadol após 15 min, a fim de estabelecer o envolvimento do RRD na ação do tramadol (Fig. 4.7).

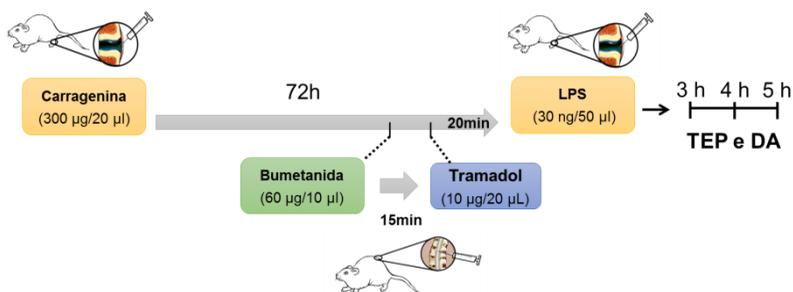


Figura 4.7: Protocolo Experimental 3. Os animais receberam carragenina na articulação direita, 72 h depois receberam LPS na mesma articulação. Primeiramente foi injetado bumetanida pela via intratecal e 15 min depois o tramadol pela mesma via, 20 minutos antes da injeção de LPS. O TEP e o DA foram mensurados nas horas 3, 4 e 5 após o LPS.

A administração prévia de veículo seguida da injeção de salina (Veh + salina) mostra a expressão de comportamento de dor (Fig. 4.8A) e o aumento no diâmetro articular (Fig. 4.8B), efeitos que são revertidos nos animais veículo que receberam tramadol (Veh + tramadol). A bumetanida por si só (Bum + salina) é capaz de reduzir os parâmetros de dor e de inflamação. A administração prévia de bumetanida seguida da injeção de tramadol (Bum + tramadol) não potencializou nem a resposta analgésica, nem a anti-edematogênica do tramadol, que se mantém no mesmo nível da resposta dos animais que receberam veículo previamente. Esse resultado indica que o tramadol e a bumetanida exercem seus efeitos utilizando a mesma via.

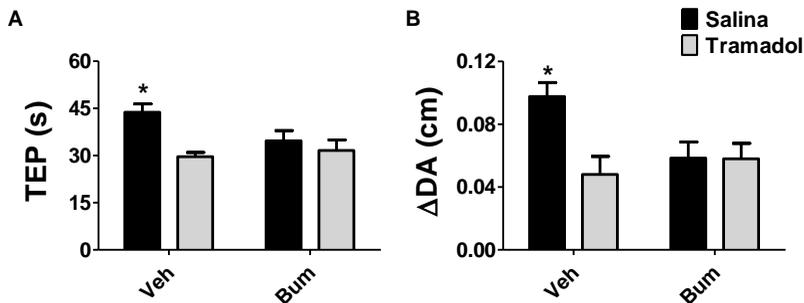


Figura 4.8: Efeito da administração prévia de bumetanida na ação do tramadol sobre o TEP (A) e o DA (B). Bumetanida (Bum; 60 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$) ou veículo (Veh; bicarbonato de sódio 1.29%; 10 μL) foram injetados pela via intratecal 15 minutos antes do tramadol (10 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$), que foi injetado 20 min antes do desafio com LPS. As barras representam média \pm EPM de um $n=7-8$ e * representa diferença estatística com $p<0.05$ do grupo Veh + Salina comparado ao restante. ANOVA de duas via seguida de post-hoc Newman-Keuls.

4.4 Efeito da dessensibilização das fibras aferentes primárias na ação do Tramadol

A inibição do NKCC1 pela Bumetanida não potencializou o efeito do tramadol, nos indicando que o tramadol pode agir inibindo a deflagração do RRD. Além do NKCC1, também podemos destacar as fibras sensitivas primárias como pivô da inflamação neurogênica. Fibras de pequeno calibre (C e A δ) participam da transmissão nociceptiva e também da resposta antidrômica do RRD (WILLIS, 1999), liberando SP e CGRP na periferia. Essas fibras têm como característica importante a expressão do canal TRPV1, que é um grande facilitador da indução nociceptiva, porém passível de dessensibilização, tendo um efeito final analgésico (NOLANO et al., 1999; SZOLCSÁNYI; JANCÓS-GABÓR, 1975).

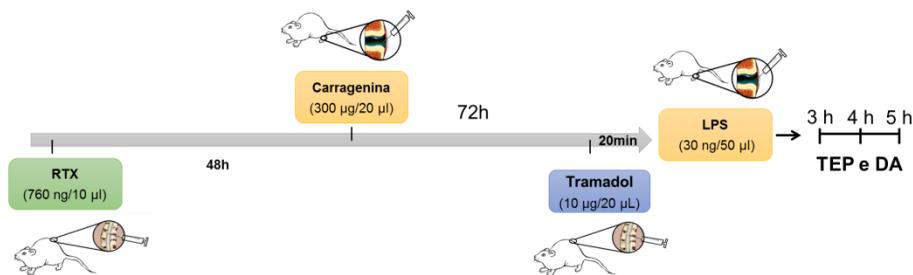


Figura 4.9: Protocolo Experimental 4. A injeção intratecal de RTX foi feita dois dias antes da carragenina. Após as 48 h, os animais receberam carragenina na articulação direita, 72 h depois receberam LPS na mesma articulação. O tramadol foi administrado pela via intratecal 20 minutos antes da injeção de LPS. O TEP e o DA foram mensurados nas horas 3, 4 e 5 após o LPS.

A injeção intratecal da resiniferatoxina (RTX), um potente agonista deste canal, é capaz de causar uma dessensibilização lenta e duradoura e de forma seletiva ao terminal central da fibra, mantendo a sua atividade periférica normal (BISHNOI; BOSGRAAF; PREMKUMAR, 2011; JEFFRY et al., 2009). Desta forma, foi injetada RTX pela via intratecal previamente ao tramadol com o objetivo de investigar a participação das fibras C e A δ no efeito do mesmo (FOLETTI, 2015) (Fig. 4.9).

A injeção prévia do veículo não interferiu nas respostas dos grupos salina ou tramadol intratecal. O grupo Veh + salina manteve uma resposta álgica (Fig. 4.10A) e o aumento do diâmetro articular (Fig. 4.10B), enquanto que o grupo Veh + Tramadol reduziu ambos os parâmetros. A injeção da RTX, mesmo em uma dose baixa como a utilizada, se mostrou aversiva para alguns animais, levando inclusive a óbito por hipotermia. Os animais que receberam a RTX não apresentaram nenhuma resposta de incapacitação articular (RTX + salina), e quando tratados posteriormente com o tramadol (RTX + tramadol) mantiveram baixa esta resposta.

Ao se avaliar o diâmetro articular, a RTX por si só mantém alto o diâmetro articular dos animais (RTX + salina), e o tratamento com o tramadol é ineficaz, isto é, a RTX aboliu a capacidade anti-edematogênica do tramadol (RTX + tramadol). Este resultado indica que a integridade e funcionamento das fibras aferentes primárias é

importante para o efeito anti-edematogênico do tramadol, e reforça a inibição do RRD como via deste efeito.

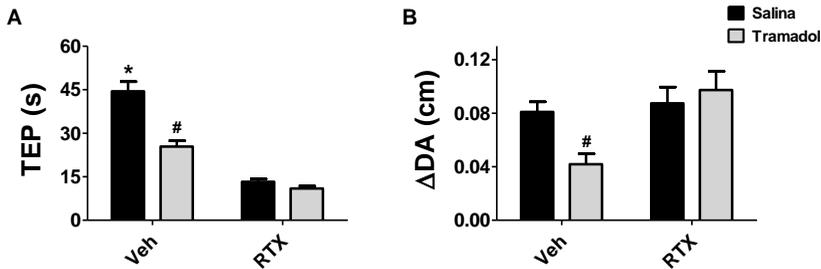


Figura 4.10: Efeito da administração prévia de RTX na ação do tramadol sobre o TEP (A) e o DA (B). RTX (3.8 μg/kg/10 μL) ou seu veículo (Veh; PBS + tween 7%; 10 μL) foram injetados pela via intratecal cinco dias antes do tramadol (10 μg/20 μL), que foi injetado 20 min antes do desafio com LPS. As barras representam média ± EPM de um n=5 para os grupos RTX + Salina e RTX + Tramadol e n=7 para os grupos Veh + Salina e Veh + Tramadol. * e # representam diferença estatística com p<0.05 quando comparado o grupo Veh + Salina e Veh + Tramadol, respectivamente, ao restante dos grupos. ANOVA de duas via seguida de post-hoc Newman-Keuls.

4.5 Efeito do antagonista seletivo de receptores μ-opioides na ação do tramadol

Os receptores opioides são de grande importância para a transmissão nociceptiva (OSSIPOV et al., 2004). A ativação de receptores do tipo μ-opioide pode inibir neurônios de forma pré e pós-sináptica, aumentar o *input* descendente inibitório da dor (DICKENSON, 1995; MILLAN, 2002) além de inibir a deflagração do RRD (WILLIS, 1999). Considerando nossos resultados até então, e a afinidade relativa do tramadol a receptores μ-opioides (HENNIES; FRIEDERICHS; SCHNEIDER, 1988), decidimos investigar a participação dos receptores μ-opioides no efeito do tramadol injetado pela via intratecal. Para isto, utilizamos um antagonista seletivo μ-opioide, o CTOP (HAWKINS et al., 1989) (Fig. 4.11).

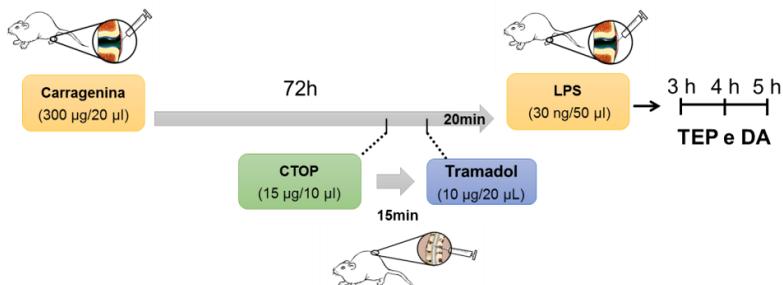


Figura 4.11: Protocolo Experimental 5. Os animais receberam carragenina na articulação direita, 72 h depois receberam LPS na mesma articulação. Primeiramente foi injetado CTOP pela via intratecal e 15 min depois o tramadol pela mesma via, 20 minutos antes da injeção de LPS. O TEP e o DA foram mensurados nas horas 3, 4 e 5 após o LPS.

Novamente, o efeito analgésico e anti-edematogênico do tramadol é mantido, ao reduzir o TEP (Fig. 4.12A) e o DA (Fig. 4.12B) quando comparado ao controle, grupo veículo + Salina. O CTOP por si só não tem efeito nem no TEP nem no DA, porém a administração prévia do CTOP seguida do tramadol mostra uma inibição do efeito anti-edematogênico, que é completamente bloqueado pelo CTOP. Esse resultado indica que os receptores μ -opioides têm um papel essencial na atividade anti-edematogênica do tramadol injetado pela via intratecal.

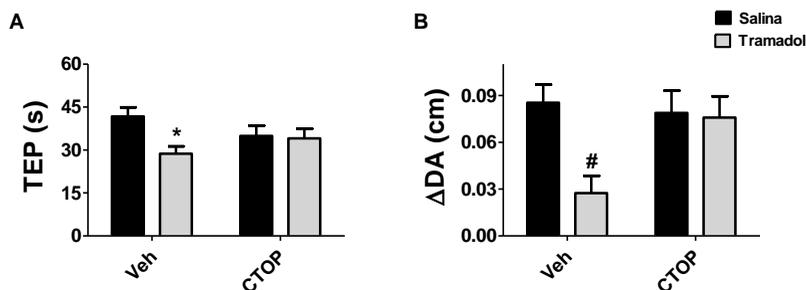


Figura 4.12: Efeito da administração do CTOP na ação do tramadol sobre o TEP (A) e o DA (B). CTOP (15 µg/10 µL) ou seu veículo (Veh; salina; 10 µL) foram injetados pela via intratecal 15 min antes do tramadol (10 µg/20 µL), que foi injetado 20 min antes do desafio com LPS. As barras representam média \pm EPM de um n=7-8 e * e # representam diferença estatística com $p < 0.05$ quando comparado o grupo Veh + Salina com Veh + Tramadol no TEP, e o grupo Veh + Tramadol ao restante dos grupos no DA, respectivamente. ANOVA de duas vias seguida de post-hoc Newman-Keuls.

4.6 Efeito da ablação das fibras descendentes serotoninérgicas na ação do tramadol

A administração do antagonista μ -opióide mostrou uma importante atividade deste receptor na ação antiedematogênica do tramadol, apesar de não parecer tão significativo para a resposta analgésica do mesmo. É sabido que o efeito analgésico do tramadol em diversos modelos se relaciona diretamente com a inibição da recaptação de monoaminas (DRIESSEN; REIMANN, 1989a, 1992), e o aumento das monoaminas na fenda sináptica no corno dorsal é responsável por uma resposta analgésica pronunciada (MILLAN, 2002). Sendo assim, a partir do uso da neurotoxina 5,7-DHT, conhecida pela sua capacidade de ablação das fibras descendentes serotoninérgicas (LEI et al., 2011), investigamos se a consequente redução de monoaminas no corno dorsal teria algum efeito na atividade do tramadol (Fig. 4.13). A 5,7-DHT é transportada para dentro do neurônio a partir do receptor (SERT OU NET) e causa uma neurotoxicidade com ativação das vias apoptóticas mitocondriais.

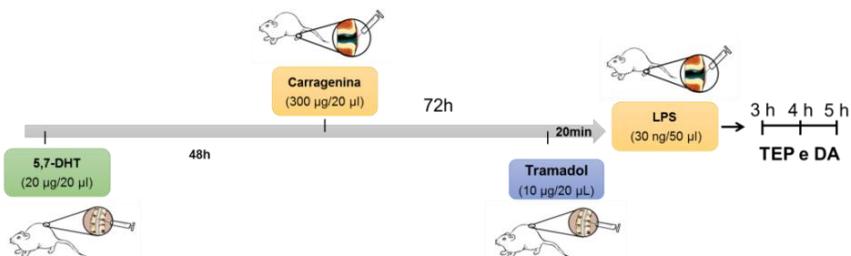


Figura 4.13: Protocolo Experimental 6. A injeção intratecal de 5,7-DHT foi feita 2 dias antes da carragenina. Após as 48 h, os animais receberam carragenina na articulação direita, 72 h depois receberam LPS na mesma articulação. O tramadol foi administrado pela via intratecal 20 minutos antes da injeção de LPS. O TEP e o DA foram mensurados nas horas 3, 4 e 5 após o LPS.

Os animais tratados com veículo e tramadol mantêm a redução do TEP (Fig. 4.14A) e do DA (Fig. 4.14B) quando comparado aos animais veículo + salina. A administração de 5,7-DHT por si só não interferiu na incapacitação articular, nem na resposta do tramadol neste parâmetro. Diferente do visto anteriormente com o CTOP, a 5,7-DHT não tem influência nenhuma na formação do DA. Logo, a atividade de inibição da recaptação das monoaminas exercida pelo tramadol não interfere no processo inflamatório periférico.

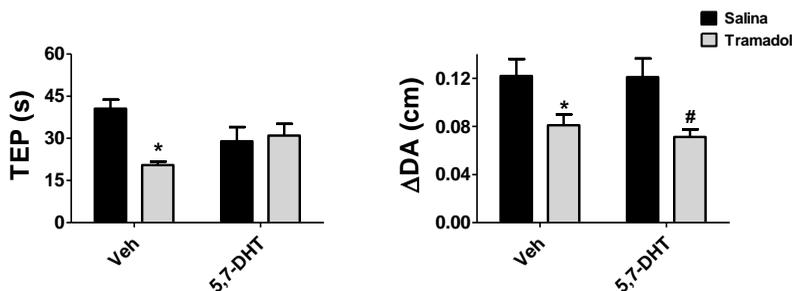


Figura 4.14: Efeito da administração de 5,7-DHT na ação do tramadol sobre o TEP (A) e o DA (B). 5,7-DHT (20 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$) ou seu veículo (Veh; ácido ascórbico 0.2%; 20 μL) foram injetados pela via intratecal cinco dias antes do tramadol (10 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$) que foi injetado 20 min antes do desafio com LPS. As barras representam média \pm EPM de um $n=7-8$ e * e # representam diferença estatística com $p<0.05$ quando comparado o grupo Veh + Salina com Veh + Tramadol no TEP e no DA, e o grupo 5,7-DHT + Salina e 5,7-DHT + Tramadol no DA, respectivamente. ANOVA de duas via seguida de post-hoc Newman-Keuls.

5 DISCUSSÃO

Em 2014, a OMS produziu um relatório sobre o tramadol através do Comitê Especializado em Dependência de Drogas incluindo e resumindo informações importantes sobre esta droga. Ficou claro que o tratamento farmacológico com tramadol na clínica é prática corriqueira, especialmente em casos de trauma e câncer, porém o seu uso em pacientes com dores articulares é bastante limitado, sendo utilizado somente em estados avançados de artrite reumatoide e osteoartrite. A sua boa atividade analgésica se deve principalmente à sua atividade opioide e a inibição da recaptção de monoaminas, ambos mecanismos de extrema importância. Apesar de ser uma droga relativamente segura, que não induz tolerância nem dependência, o seu uso crônico pode resultar em efeitos indesejáveis, limitando o uso em doenças com característica contínua (WHO, 2014).

Em seu trabalho, Callado (2017) comparou o uso do tramadol pelas vias oral e intratecal em dois modelos diferentes de dor articular, e observou que, em ambos os modelos, o tramadol tinha um bom efeito analgésico, necessitando de doses 1500 vezes mais baixas pela via intratecal do que pela via oral para obter o mesmo efeito. Mais ainda, foi observado que somente pela via intratecal o tramadol também era capaz de reduzir o diâmetro articular dos animais em ambos os modelos, sendo mostrado pela primeira vez uma atividade de controle edematogênico do tramadol intratecal (CALLADO, 2017). Anterior a isso, somente dois trabalhos evidenciaram a diminuição do edema após tratamento com tramadol, um pela via intraperitoneal (SACERDOTE et al., 1997) e outro pela via intra-articular (GARLICKI et al., 2006). O atual trabalho vem reforçar a proposta do uso por via intratecal do tramadol no tratamento de doenças articulares crônicas, tendo ação analgésica e anti-edematogênica, reduzindo a dose e consequentemente os efeitos colaterais. Mais especificamente, objetivamos investigar o mecanismo pelo qual o tramadol é capaz de reduzir o edema periférico quando injetado pela via intratecal.

A maior parte dos trabalhos na literatura que utilizam tramadol pela via intratecal fazem uso de eletrofisiologia como metodologia para investigar o mecanismo analgésico do tramadol. Estes trabalhos registram a atividade tanto das fibras aferentes primárias (A β , A δ e C) quanto de neurônios medulares de projeção e motores. Foi observado que o tramadol foi o mais potente dos opiáceos testados (dentre eles

codeína e buprenorfina) na atividade depressora neuronal na dose de 10 µg (BERNATZKY; JURNA, 1986), e quando injetado na dose de 100 µg o efeito depressor não era revertido pela naloxona injetada de forma sistêmica (CARLSSON; JURNA, 1987). Quando utilizadas doses maiores de tramadol intratecal (1-2 mg), a naloxona injetada pela via intratecal também não reverteu o efeito depressor do tramadol (JOU et al., 2003).

Os dados anteriores nos indicam que a atividade do tramadol é em sítios medulares, e essa proposição pode ser reforçada pelo trabalho de Yamazaki e colaboradores (2015), que utilizaram tramadol (5 mg/kg) e seu metabólito M1 (1 mg/kg) pela via intra-peritoneal e continuaram observando redução de corrente excitatória e aumento de corrente inibitória em neurônios das lâminas I e II do corno dorsal da medula de ratos (YAMASAKI et al., 2015). Todos esses dados nos permitem confirmar que o efeito do tramadol, mesmo quando injetado de forma sistêmica, é via modulação da atividade neuronal no corno dorsal e acontece tanto nas fibras aferentes primárias, quanto nos neurônios de projeção e fibras motoras (BERNATZKY E JURNA, 1986; CARLSSON E JURNA, 1987; JOU et. al., 2003; YAMAZAKI et. al, 2015).

Nossos resultados com a imunomarcação de proteína c-fos nas lâminas I e II do corno dorsal da região lombar da medula concordam com esses resultados, mostrando que a injeção intratecal de tramadol reduz a marcação desta proteína, que é indicativa de atividade neuronal. De forma semelhante, Mei e colaboradores em 2013 observaram a redução de marcação de proteína c-fos, desta vez por imunofluorescência, no corno dorsal de animais com ligação de nervo após tratamento com tramadol na mesma dose e via que utilizamos (MEI et. al., 2013). Além disso, já foi observada a redução de atividade glial e de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1β, no corno dorsal de animais com dor neuropática tratados com 10 µg de tramadol intratecal, indicando que o tramadol não só reduz a atividade neuronal como a atividade glial e conseqüente sensibilização central gerada pela comunicação glia-neurônio (MEI et.al., 2013; ZHANG et. al., 2013).

Apesar da metodologia de imunohistoquímica utilizada impossibilitar a diferenciação entre as fibras primárias e as de projeção, consideramos que o resultado pode representar uma diminuição da atividade de forma global, já que nas lâminas I e II do corno dorsal há

uma grande densidade neuronal das fibras primárias e sinapses com as fibras de projeção (CERVERO; IGGO, 1980; FURUE; KATAFUCHI; YOSHIMURA, 2004; WILLIS; COGGESHALL, 2004). Nossos resultados diferem no fato de o tramadol não inibir as fibras motoras presentes no corno ventral. Neste caso, podemos inferir que o tratamento com uma dose mais baixa de tramadol (10 µg) é capaz de reduzir a atividade neuronal somente nas áreas de transmissão nociceptiva, mantendo a atividade normal de outras fibras, diferente dos tratamentos expostos nos trabalhos citados (100 µg e 1-2 mg).

Todos os trabalhos anteriores consideravam somente o efeito analgésico do tramadol. Porém, a ação depressora da atividade neuronal do tramadol não somente nos neurônios de projeção, que dariam continuidade à informação nociceptiva, mas também nas fibras aferentes primárias, reforçam a hipótese de que o tramadol pela via intratecal poderia estar reduzindo a formação do edema articular por um controle na deflagração do Reflexo da Raíz Dorsal. Partimos então para a manipulação farmacológica de dois pontos importantes na origem da atividade antidrômica: a atividade dos co-transportadores NKCC1 e a integridade da fibra aferente primária.

O NKCC1 está presente primordialmente no sistema nervoso central (BALLANYI; GRAFE, 1985; HARA et al., 1992; MISGELD et al., 1986), especialmente em áreas relacionadas com o processamento nociceptivo, como no terminal central medular das fibras aferentes primárias de pequeno calibre e no DRG (GILBERT et al., 2007; PRICE; HARGREAVES; CERVERO, 2006), o que o coloca em posição importante na deflagração de um potencial antidrômico (CHABWINE et al., 2009; WILLIS, 1999). Já foi demonstrado que o bloqueio farmacológico do NKCC1 inibe a deflagração do RRD induzido por GABA (JANG; JEONG; AKAIKE, 2001; VALENCIA-DE ITA, 2006), em consequência ao excesso de íons cloreto intracelular gerados por esse co-transportador, já que o NKCC1 parece ser o principal fator acumulador de íons cloreto dentro de neurônios (BRUMBACK; STALEY, 2008). Além disso, é citada a diminuição do edema periférico gerado por fibras neuronais (VALENCIA-DE ITA et al., 2006), inclusive em modelo de artrite reativa induzida por LPS (BRESSAN; PERES; TONUSSI, 2012) após a inibição deste canal.

A bumetanida é considerada um inibidor específico deste canal (RUSSELL, 2000), e por isso foi escolhida neste trabalho. Nossos

resultados estão de acordo com a literatura deste tema, mostrando a diminuição do comportamento de dor, assim como do edema periférico (FOLETTO, 2015; NORÕES, 2015; STEIN, 2016; VALENCIA-DE ITA, 2006). Ao se fazer um tratamento prévio com a bumetanida e em seguida o tramadol, observamos que não há diferença na resposta quando comparado à bumetanida ou ao tramadol sozinhos. Esse resultado nos indica que a bumetanida e o tramadol atuam pela mesma via, caso contrário uma somação de efeitos seria observada. Isto é, ambos bumetanida e tramadol atuam em alvos importantes para o controle da deflagração do RRD. A bumetanida inibindo o NKCC1, e o tramadol provavelmente pela sua atividade opioide hiperpolarizante. É importante destacar que o NKCC1 não é encontrado nas lâminas mais profundas da medula (MORALES-AZA et al., 2004), o que reforça a seletividade do local de injeção das drogas com o efeito gerado.

As fibras sensitivas responsáveis pela transmissão de estímulos polimodais da periferia para o Sistema Nervoso Central são em sua maioria fibras A δ e C (JULIUS E BASBAUM, 2001), e essas fibras de pequeno calibre são responsáveis pela transmissão do RRD (WILLIS, 1999). É característica dessas fibras a expressão de canais catiônicos que são receptores de estímulos nocivos, os canais TRP, especialmente o TRPV1 (CATERINA et al., 1997; NAGY; RANG, 1999). O estímulo da atividade desse canal com um agonista inicia um potencial de ação na fibra e gera uma resposta nociva, porém, devido a um aumento na concentração de Ca²⁺ nesta fibra gerada pelo próprio canal, acontece uma excitotoxicidade e essa fibra passa a não gerar mais potenciais de ação, ficando dessensibilizada, com um resultado final de efeito analgésico (JEFFRY et al., 2009; KISSIN, 2008; OLAH et al., 2001; TENDER et al., 2005). Agonistas seletivos como a capsaicina e a resiniferatoxina, sendo este último o mais potente agonista TRPV1 conhecido (APPENDINO; SZALLASI, 1997), são utilizados como ferramentas farmacológicas no estudo da atividade das fibras TRPV1-positivas.

Com uma alta lipossolubilidade e afinidade pelo TRPV1, baixas doses de RTX podem estimular o receptor de forma lenta e prolongada (RAISINGHANI; PABBIDI; PREMKUMAR, 2005). A injeção intratecal de RTX gera ablação do terminal nervoso induzindo analgesia (BROWN et al., 2005; KARAI et al., 2004; SZABO et al., 1999), e em baixas doses essa ablação é seletiva para o terminal central da fibra, mantendo suas respostas periféricas intactas (BISHNOI; BOSGRAAF;

PREMKUMAR, 2011; FOLETTTO, 2015). Em nossos resultados foi possível observar que a injeção da RTX foi capaz de inibir totalmente o efeito do tramadol. Nas respostas de incapacitação articular, observa-se que por não ter o terminal central da fibra funcional, os animais não demonstram comportamento nocifensivo, e com isso não é possível observar o efeito do tramadol quando injetado após a ablação com RTX. Já nos resultados do diâmetro articular é possível observar um aumento do diâmetro nos animais que receberam RTX. Esse aumento do DA mesmo quando há ablação do terminal central da fibra já foi observado anteriormente (FOLETTTO, 2015), e pode ser explicado de duas formas.

Primeiramente, a dessensibilização é um evento que ocorre após a ativação do receptor, então no momento da injeção intratecal da RTX pode ter havido a estimulação da liberação de peptídeos vasoativos na periferia que, mesmo após a dessensibilização central, mantiveram um ambiente pró-inflamatório formado na periferia (ACS et al., 1997; IMMKE; GAVVA, 2006; SZALLASI; BLUMBERG, 1999). Além disso, a ablação com a dose que utilizamos é seletiva ao corno dorsal, mantendo a atividade do DRG, que por si só é capaz de ativar fibras eferentes e estimular a liberação de SP e CGRP na periferia, aumentando a inflamação neurogênica (BISHNOI; BOSGRAAF; PREMKUMAR, 2011; FOLETTTO, 2015; JEFFRY et al., 2009). Com essa característica pró-inflamatória na periferia após a injeção de RTX, a indução com a Carragenina/LPS gera um aumento do diâmetro devido ao processo inflamatório periférico exacerbado. A injeção de tramadol nos animais que receberam RTX não reverteu o DA, indicando que o terminal central da fibra sensorial precisa estar intacto e funcional para o tramadol ter atividade.

A provável redução da atividade antidrômica de fibras aferentes primárias após o tratamento com o tramadol pela via intratecal diminuiu o edema periférico, assim como apresentou uma tendência a reduzir os níveis de TNF- α , apesar de não ter diminuído a contagem total e diferencial de leucócitos do líquido sinovial. O nosso resultado está de acordo com o apresentado por Bianchi e colaboradores (1999), onde o tramadol administrado pela via intraperitoneal não altera a contagem de células polimorfonucleares em patas inflamadas, nem interfere na quimiotaxia de macrófagos. Em contrapartida mostra uma redução nos níveis de PGE₂ no exsudato da pata (BIANCHI et al., 1999). Da mesma forma, foi observado o aumento de IL-2 e atividade de células *natural killers* após tramadol pela via subcutânea (SACERDOTE et al., 1997), e

redução de IL-6 após tramadol pela via intraperitoneal (LIU et al., 2008) em modelos utilizando roedores. Em humanos, foi observada a redução de TNF- α após tratamento crônico por via oral (KRAYCHETE et al., 2009). Nosso resultado de *westernblotting* para TNF- α é o primeiro registro de avaliação de citocinas no foco da inflamação após tratamento com tramadol intratecal, e a redução pode não ter sido tão pronunciada devido ao tratamento único, ao contrário do tratamento crônico descrito por Kraychete e colaboradores.

Até então foi possível inferir a atividade antiedematogênica do tramadol intratecal como inibidor da deflagração do RRD a partir dos mecanismos específicos conhecidos deste processo, mas por qual via estaria o tramadol inibindo o RRD? O tramadol é um opioide fraco, com afinidade relativa aos receptores μ -opioides (FRINK et al., 1996; GILLEN et al., 2000; HENNIES; FRIEDERICHS; SCHNEIDER, 1985; RAFFA et al., 1992), e seu efeito já foi vinculado a diversos outros sistemas de receptores (para revisão ler MINAMI; OGATA; UEZONO, 2015). Porém, visto sua atividade comprovada em receptores opioides e a importância destes não somente no controle nociceptivo no corno dorsal (DICKENSON, 1995; OSSIPOV, 2004), mas também na modulação do edema periférico (BROCK; TONUSSI, 2008; FOLETTO; MARTINS; TONUSSI, 2013), decidimos investigar a atividade μ -opioide do tramadol nesta condição experimental.

O antagonismo seletivo do receptor μ -opioide a partir do uso do CTOP (HAWKINS et al., 1989) nos mostrou que quando comparado ao veículo, não houve diferença no comportamento de incapacitação e nem diâmetro articular dos animais tratados com CTOP, confirmando dados da literatura referente ao comportamento nociceptivo (ARAÚJO et al., 2017; KUMAR; REETA; RAY, 2012; YOON et al., 2008). Porém ao se administrar o tramadol após o tratamento com o CTOP, foi observado um antagonismo completo do efeito antiedematogênico do tramadol, nos indicando que a diminuição do edema articular gerada pela administração pela via intratecal de tramadol é via atividade no receptor μ -opioide. Sendo assim, acreditamos que esse é o primeiro trabalho que avalia o efeito do tramadol frente a um antagonista seletivo μ -opioide.

A diminuição de extravasamento plasmático e do edema de pata e alteração no conteúdo sinovial a partir da administração sistêmica de morfina já foram observados em diversos modelos animais (ALEBOUYEH; POURPAK; AHMADIANI, 2002; AMANN; LANZ;

SCHULIGOI, 2002; JORIS et al., 1990; PERROT; GUILBAUD; KAYSER, 1999; SACERDOTE; BIANCHI; PANERAI, 1996; WHITESIDE et al., 2005). A administração intratecal de morfina também é capaz de reduzir edema de pata e edema articular (BROCK; TONUSSI, 2008; FOLETTO; MARTINS; TONUSSI, 2013; STEIN et al., 2016). Doses baixas, como as utilizadas em administração central (10-100 µg), de morfina ou outros agonistas μ -opioides no local da inflamação, não foram capazes de diminuir o edema, indicando que os receptores μ -opioides na periferia não estão diretamente ligados à formação do edema, e que o efeito antiedematogênico provavelmente é desencadeado pela ativação central desses receptores (PERROT; GUILBAUD; KAYSER, 1999; SACERDOTE; BIANCHI; PANERAI, 1996; WHITESIDE et al., 2005). Ademais, resultados com modelos animais de inflamação tipicamente neurogênica como formalina, capsaicina, dessensibilização de aferente primário e estimulação antidrômica de fibras nervosas, estas duas diretamente envolvidas no processo do RRD, mostraram o envolvimento direto de receptores μ -opioides nos efeitos antiedematogênico e de extravasamento plasmático (BARBER, 1993; HONG; ABBOTT, 1995; MAINI; TAYLOR, 2000; MCDOUGALL; BAKER; HERMANN, 2004; PLANAS et al., 1995).

Alguns casos de formação de edema em membros inferiores em pacientes com tratamento crônico de opioides pela via intratecal já foram relatados (ALDRETE; COUTO DA SILVA, 2000; RAPHAEL et al., 2002; RUAN, 2007; VEIZI; TORNERO-BOLD; HAYEK, 2016), e em todos os casos uma mudança na dose, associação com diuréticos ou alteração do opioide utilizado foi suficiente para reverter a situação. O único caso relatado até então de edema gerado por tramadol foi por Yeo e colaboradores (2016), onde o tramadol pela via oral gerou edema em membro inferior, mas com a alteração da posologia o edema foi revertido (YEO; KOH; LIM, 2016). Nenhum outro trabalho, seja com administração por via oral, subcutânea ou intratecal, utilizou o tramadol em suas análises (CHANEY, 1995; GARDNER-NIX, 2002). A pouca informação sobre efeitos adversos do tramadol pela via intratecal nos faz acreditar que esse tratamento é relativamente seguro.

O antagonista opioide foi capaz de inibir o efeito antiedematogênico do tramadol, porém não apresentou diferença significativa na resposta nociceptiva. Isso pode ter acontecido pelo fato de somente uma parte do efeito antinociceptivo do tramadol ser por receptor opioide (DESMEULES et al., 1996; DHASMANA et al., 1989;

KAYSER; BESSON; GUILBAUD, 1991; MINAMI; OGATA; UEZONO, 2015; RAFFA et al., 1992). Desde o início dos estudos quanto ao mecanismo de ação do tramadol se acredita que parte de seu efeito seria sobre a atividade de monoaminas (DRIESSEN; REIMANN, 1989b, 1992; HENNIES et al., 1982). A inibição do tramadol na recaptação das monoaminas (noradrenalina e serotonina) foi comprovada em cultura celular de medula adrenal e sinaptossomas de tecido do córtex, *Locus coeruleus* e Núcleos da Rafe (BAMIGBADE et al., 1997; DRIESSEN; REIMANN, 1989a, 1992; HALFPENNY et al., 1999; SAGATA et al., 2002). A serotonina no corno dorsal da medula espinhal vem especialmente de fibras do sistema descendente (HEINRICHER et al., 2009; MILLAN, 2002). Desta forma a depleção de fibras serotoninérgicas a partir do uso da neurotoxina 5,7-DHT foi utilizada para avaliar a influência serotoninérgica no efeito do tramadol intratecal.

Nossos resultados mostraram que, semelhante a inibição do receptor μ -opioide, a degeneração de fibras serotoninérgicas não alterou de forma significativa o comportamento nociceptivo, assim como o diâmetro articular. Quando injetado o tramadol, a degeneração não interfere em seu efeito, mantendo a diminuição do TEP e do DA. Esses resultados nos permitem concluir que a serotonina presente no corno dorsal não participa da atividade antiedematogênica do tramadol. A literatura já apresenta dados com inibição de receptores serotoninérgicos influenciando de forma negativa na atividade analgésica do tramadol (BERROCOSO; DE BENITO; MICO, 2007; DHASMANA et al., 1989; HORISHITA et al., 2006; OGATA et al., 2004b; OLIVA et al., 2002). Adicionalmente, a depleção de fibras serotoninérgicas a partir do uso da 5,7-DHT injetada em ratos neonatos causou uma redução da eficácia analgésica do tramadol em diversos testes nociceptivos feitos nos ratos adultos (MUCHACKI et al., 2015). Como não existe afinidade do tramadol ou seu metabólito M1 pelos receptores 5-HT subtipos 1, 2 e 3 (FRINK et al., 1996), pelo menos, seu efeito não é diretamente nos receptores, e sim pelo aumento de disponibilidade de serotonina na fenda a partir da inibição do SERT (DRIESSEN; REINMANN, 1992; BAMIGBADE et al., 1997; SAGATA et al., 2002).

A presença de receptores serotoninérgicos em fibras de pequeno calibre já foi descrita, assim como em interneurônios presentes no corno dorsal (NICHOLSON et al., 2003; PIERCE et al., 1996), colocando a serotonina como um possível mediador da excitabilidade de fibras

primárias e interneurônios na medula e, conseqüentemente, do RRD (CERVERO; LAIRD, 1996; LIN; ZOU; WILLIS, 2000; WILLIS, 1999). Daher e colaboradores (2005) observaram que a serotonina injetada pela via intratecal tem efeito antiedematogênico bastante pronunciado, e esse efeito é mediado especialmente pelos receptores 5-HT₁ (DAHER; DE MELO; TONUSSI, 2005). De forma contrária, a ativação do receptor 5-HT₂ gera um processo hiperalgésico e aumento do edema periférico (DAHER; DE MELO; TONUSSI, 2005; EIDE; HOLE, 1991; KJØRSVIK-BERTELTSEN et al., 2003). O receptor 5-HT₃ tem atividade excitatória em nociceptor, porém não foi observado efeito importante deste no edema periférico (DAHER; DE MELO; TONUSSI, 2005; GREEN; SCARTH; DICKENSON, 2000). Desta forma, o equilíbrio entre a atividade inibitória (5-HT₁) e excitatória (5-HT₂ e 5-HT₃) dos receptores serotoninérgicos é importante no efeito analgésico final, porém sem grande influência no efeito antiedematogênico.

Hwang e Wilcox, em 1987, testaram os inibidores seletivos de recaptção de serotonina (ISRS) e noradrenalina (ISRN) injetados de forma intratecal e observaram que o efeito analgésico dos ISRS era moderado, somente, enquanto que o ISRN era pronunciado, indicando que, pelo menos para o processo analgésico, a NA livre na fenda sináptica é mais importante (HWANG; WILCOX, 1987). Os receptores α_2 -adrenérgicos são receptores com ação inibitória, diminuindo atividade neuronal, e amplamente expressos no corno dorsal (MILLAN, 2002; NORTH; YOSHIMURA, 1984; STAFFORD-SMITH et al., 1995), podendo ser um importante fator para a analgesia resultante do tramadol intratecal (LI et al., 2012). A neurotoxina 5,7-DHT é recaptada pelo SERT e provoca a degeneração das fibras serotoninérgicas por morte neuronal, porém, se não houver inibição dos NET, a sua seletividade é relativa e ela pode ser recaptada também por neurônios noradrenérgicos (SAWYNOK; REID, 1994). Como não utilizamos desipramina (inibidor de NET) antes da injeção intratecal da 5,7-DHT, não podemos descartar a possibilidade de interferência do sistema descendente noradrenérgico no nosso efeito. Logo, experimentos com inibição do NET ou neurotoxina seletiva para neurônios noradrenérgicos devem ser feitos para discriminar melhor os papéis das monoaminas na atividade do tramadol intratecal.

Considerando que nem o tratamento com antagonista μ -opiode nem a degeneração das fibras serotoninérgicas interferiram na atividade antinociceptiva do tramadol, é possível que neste modelo, para este

parâmetro, seja necessária uma atividade opioidérgica e uma atividade serotoninérgica no controle da dor, visto que uma atividade complementar ou sinérgica entre os enantiômeros do tramadol é possível (GILLEN et al., 2000; RAFFA et al., 1993). A mistura racêmica do tramadol é metabolizada no fígado (fase I e II) gerando misturas racêmicas de seus metabólitos de maior importância: M1 e M5 (LINTZ et al., 1981). O metabólito (+)-M1 é o que tem maior afinidade pelos receptores opioides, assim como eficácia e potência, seguido do (\pm)-M5 e do próprio (+)-tramadol (LINTZ et al., 1981; FRINK et al., 1996; GILLEN et al., 2000). Quanto à inibição da recaptação de monoaminas, os enantiômeros (-)-M1 e (-)-tramadol mostram maior afinidade por estes sítios, sendo o (-)-tramadol mais potente que o (-)-M1 (DRIESSEN; REIMANN, 1992; RAFFA et al., 1992; FRINK et al., 1996), desta forma justificando o efeito de mais de um sistema de neurotransmissão na resposta analgésica do tramadol.

A importância dos metabólitos não pode ser descartada, porém, tendo em vista que a administração de tramadol feita neste trabalho foi diretamente no canal medular, com uma dose muito baixa, e que o extravasamento do tecido medular para a circulação sistêmica por opioides fracos é muito baixo (CHANEY, 1995), acreditamos que a mistura racêmica (\pm)-tramadol por si só esteja exercendo as atividades analgésicas e antiedematogênicas, já que esta não alcança o fígado, nestas condições, para ser metabolizada. Logo, a resposta analgésica se deve à atividade do (+)-tramadol em receptores μ -opioides em conjunto com a atividade do (-)-tramadol em recaptadores de monoaminas, enquanto que para a resposta antiedematogênica fica claro o envolvimento dos receptores μ -opioides. Acreditamos que, via receptor μ -opioides, o tramadol deve estar diminuindo a atividade da fibra aferente primária e desta forma inibindo a deflagração do RRD e conseqüente diminuição da inflamação neurogênica na articulação.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho reforça a possibilidade do tramadol intratecal como tratamento em doenças articulares, especialmente as doenças de caráter crônico, sendo possível reverter não somente a dor, como já conhecido, mas também o edema articular e reduzir características inflamatórias. A administração de baixas doses da droga pela via intratecal diminui a probabilidade de efeitos adversos, que já são reduzidos no tratamento com tramadol quando comparado com outros opioides. Desta forma, o tramadol intratecal parece ser uma forma segura de se tratar doenças inflamatórias articulares. Apesar disso, mais estudos que avaliem o extravasamento da droga do canal medular, biodisponibilidade e segurança devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

ACS, G. et al. Differential Activation and Desensitization of Sensory Neurons by Resiniferatoxin. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 14, p. 5622–5628, 1997.

ALCALAY, M. et al. Post-traumatic reactive arthritis. Etiologic, clinical and diagnostic aspects. Apropos of 6 cases. **Rev Rhum Mal Osteoartic**, v. 56, p. 725–729, 1989.

ALCORN, N.; SAUNDERS, S.; MADHOK, R. Benefit-risk assessment of leflunomide: an appraisal of leflunomide in rheumatoid arthritis 10 years after licensing. **Drug Saf**, v. 32, p. 1123–1134, 2009.

ALDRETE, J. A.; COUTO DA SILVA, J. M. Leg edema from intrathecal opiate infusions. **European Journal of Pain**, v. 4, n. 4, p. 361–365, 2000.

ALEBOUYEH, M.; POURPAK, Z.; AHMADIANI, A. Increase in Serum Level of Interleukin-1 Alpha Mediates Morphine Anti-Inflammatory Effect in Carrageenan-Induced Paw Oedema in Mice. **Cytokine**, v. 19, n. 2, p. 102–105, 2002.

ALHASHEMI, J. A.; KAKI, A. M. Effect of intrathecal tramadol administration on postoperative pain after transurethral resection of prostate. **British Journal of Anaesthesia**, v. 91, n. 4, p. 536–540, 2003.

ALVAREZ, F. J. et al. Immunolocalization Of The Na⁺ K⁺ 2Cl⁻ Cotransporter In Peripheral Nervous Tissue Of Vertebrates. **Neuroscience**, v. 104, n. 2, p. 569–582, 2001.

AMANN, R.; LANZ, I.; SCHULIGOI, R. Effects of morphine on oedema and tissue concentration of nerve growth factor in experimental inflammation of the rat paw. **Pharmacology**, v. 66, n. 3, p. 169–172, 2002.

ANDURKAR, S. V.; GENDLER, L.; GULATI, A. Tramadol antinociception is potentiated by clonidine through α_2 -adrenergic and I2-imidazoline but not by endothelin ETA receptors in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 683, n. 1–3, p. 109–115, 2012.

ANGEL, I. F.; GOULD, H. J.; CAREY, M. E. Intrathecal morphine pump as a treatment option in chronic pain of nonmalignant origin. **Surgical Neurology**, v. 49, n. 1, p. 92–99, 1998.

APPENDINO, G.; SZALLASI, A. Euphorbium: Modern research on its active principle, resiniferatoxin, revives an ancient medicine. **Life Sciences**, v. 60, n. 10, p. 681–696, 1997.

ARAÚJO, I. W. F. et al. Role of central opioid on the antinociceptive effect of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Solieria filiformis* in induced temporomandibular joint pain. **International Immunopharmacology**, v. 44, p. 160–167, 2017.

AREND, W. P.; DAYER, J. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis.

Arthritis & Rheumatism, v. 38, n. March 2001, p. 493–507, 1995.

AVERBECK, B.; REEH, P.; MICHAELIS, M. Modulation of CGRP and PGE2 release from isolated rat skin by alpha-adrenoceptors and kappa-opioid-receptors. **NeuroReport**, v. 12, p. 2097–2100, 2001.

BALLANYI, K.; GRAFE, P. An intracellular analysis of gamma-aminobutyric-acid-associated ion movements in rat sympathetic neurones. **The Journal of physiology**, v. 365, p. 41–58, 1985.

BAMIGBADE, T. A. et al. Actions of tramadol, its enantiomers and principal metabolite, O-desmethyltramadol, on serotonin (5-HT) efflux and uptake in the rat dorsal raphe nucleus. **British journal of anaesthesia**, v. 79, n. 3, p. 352–356, 1997.

BANSBACK, N. et al. The economics of treatment in early rheumatoid arthritis. **Best practice & research. Clinical rheumatology**, v. 23, n. 1, p. 83–92, 2009.

BARBER, A. mu and kappa Opioid receptor agonists produce peripheral inhibition of neurogenic plasma extravasation in rat skin. **Eur J Pharmacol**, v. 236, p. 113–120, 1993.

BARRON, D. H.; MATTHEWS, B. H. C. The interpretation of potencial changes in the spinal cord. **J Physiol**, v. 92, p. 276–321, 1938a.

BARRON, D. H.; MATTHEWS, B. H. C. Dorsal root reflexes. **Journal of Physiology**, v. 94, p. 26–27, 1938b.

BARTH, H. et al. Long-Term Administration of the Centrally Acting Analgesic Tramadol Did Not Induce Dependence or Tolerance, 1987.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–284, 2009.

BASBAUM, A I.; FIELDS, H. L. Endogenous pain control mechanisms: review and hypothesis. **Annals of neurology**, v. 4, n. 5, p. 451–462, 1978.

BASBAUM, A I.; WOOLF, C. J. Pain. **Current biology : CB**, v. 9, n. 12, p. R429–R431, 1999.

BERNATZKY, G.; JURNA, I. Intrathecal Injection of Codeine, Buprenorphine, Tilidine, Tramadol and Nefopam Depresses the Tail-flick Response in Rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 120, p. 75–80, 1986.

BERROCOSO, E.; DE BENITO, M. D.; MICO, J. A. Role of serotonin 5-HT1A and opioid receptors in the antiallodynic effect of tramadol in the chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. **Psychopharmacology**, v. 193, n. 1, p. 97–105, 2007.

BIANCHI, M. et al. Effects of tramadol on experimental inflammation. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 13, n. 2, p. 220–225, 1999.

BIRKLEIN, F.; SCHMELZ, M. Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). **Neuroscience Letters**, v. 437, n. 3, p. 199–202, 2008.

BISHNOI, M.; BOSGRAAF, C.; PREMKUMAR, L. S. Preservation of acute pain and efferent functions following intrathecal resiniferatoxin-induced analgesia in rats. **J Pain**, v. 9, n. 12, p. 991–1003, 2011.

BLAESSE, P. et al. Cation-Chloride Co-transporters and Neuronal Function. **Neuron**, v. 61, p. 820–838, 2009.

BOERS, M. NSAIDS and selective COX-2 inhibitors : competition between gastroprotection and cardioprotection. **The Lancet**, v. 357, p. 1222–1223, 2001.

BOLASH, R.; MEKHAIL, N. Intrathecal pain pumps: indications, patient selection, techniques, and outcomes. **Neurosurg Clin N Am**, v. 25, p. 735–742, 2014.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRAZENOR, G. Long term intrathecal administration of morphine: a comparison of bolus injection via reservoir with continuous infusion by implanted pump. **Neurosurgery**, v. 21, p. 484–491, 1987.

BRESSAN, E.; CUNHA, F. Q.; TONUSSI, C. R. Contribution of TNF α , IL-1 β and CINC-1 for articular incapacitation, edema and cell migration in a model of LPS-induced reactive arthritis. **Cytokine**, v. 36, p. 83–89, 2006.

BRESSAN, E.; MITKOVSKI, M.; TONUSSI, C. R. LPS-induced knee-joint reactive arthritis and spinal cord glial activation were reduced after intrathecal thalidomide injection in rats. **Life Sciences**, v. 87, n. 15–16, p. 481–489, 2010.

BRESSAN, E.; PERES, K. C.; TONUSSI, C. R. Evidence that LPS-reactive arthritis in rats depends on the glial activity and the fractalkine-TNF- α signaling in the spinal cord. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 2, p. 947–958, 2012.

BROCK, S. C.; TONUSSI, C. R. Intrathecally injected morphine inhibits inflammatory paw edema: The involvement of nitric oxide and cyclic-guanosine monophosphate. **Anesthesia and Analgesia**, v. 106, n. 3, p. 965–971, 2008.

BROWN, D. C. et al. Physiologic and Antinociceptive Effects of Intrathecal Resiniferatoxin in a Canine Bone Cancer Model. **Anesthesia and Analgesia**, v. 103, n. 5, p. 1052–1059, 2005.

BRUMBACK, A. C.; STALEY, K. J. Thermodynamic Regulation of NKCC1-Mediated Cl⁻ Cotransport Underlies Plasticity of GABAA Signaling in Neonatal Neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 6, p. 1301–1312, 2008.

BRUYÈRE, O. et al. A consensus statement on the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) algorithm for the management of knee osteoarthritis-From

evidence-based medicine to the real-life setting. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 45, n. 4, p. S3–S11, 2016.

CALLADO, D. Efeito antinociceptivo e antiedematogênico do tramadol nos modelos de osteoartrite e artrite reativa. p. 1-78, 2017.

CAMÍ, J.; LAMAS, X.; FARRÉ, M. Acute effects of tramadol in methadone-maintained volunteers. **Drugs**, v. 47, n. 1, p. 39–43, 1994.

CARLSSON, K. H.; JURNA, I. Effects of tramadol on motor and sensory responses of the spinal nociceptive system in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 139, n. 1, p. 1–10, 1987.

CAROLAN, E. J.; CASALE, T. B. Effects of neuropeptides on neutrophil migration through noncellular and endothelial barriers. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 92, n. 4, p. 567–580, 1993.

CATERINA, M. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p. 816–824, 1997.

CEPEDA, M. et al. Tramadol for osteoarthritis. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 19, 2006.

CERVERO, F.; IGGO, A. Substantia gelatinosa of the spinal cord: A critical review. **Brain**, v. 103, p. 717–772, 1980.

CERVERO, F.; LAIRD, J. M. Mechanisms of allodynia: interactions between sensitive mechanoreceptors and nociceptors. **NeuroReport**, v. 7, p. 526–528, 1996.

CERVERO, F.; LAIRD, J. M.; GARCIA-NICAS, E. Secondary hyperalgesia and presynaptic inhibition: an update. **Eur J Pain**, v. 7, p. 345–351, 2003.

CHABWINE, J. N. et al. Differential contribution of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter NKCC1 to chloride handling in rat embryonic dorsal root ganglion neurons and motor neurons. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 4, p. 1168–1176, 2009.

CHANEY, M. A. Side effects of intrathecal and epidural opioids. **Canadian Journal of Anaesthesia**, v. 42, n. 10, p. 891–903, 1995.

CHANG, J.-K. et al. Tramadol/acetaminophen combination as add-on therapy in the treatment of patients with ankylosing spondylitis. **Clinical Rheumatology**, v. 32, n. 3, p. 341–347, 2013.

CHOPRA, B. et al. Chopra B, Giblett S, Little JG, Donaldson LF, Tate S, Evans RJ, Grubb BD. Cyclooxygenase-1 is a marker for a subpopulation of putative nociceptive neurons in rat dorsal root ganglia. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, p. 911–920, 2000.

CHOY, E.; PANAYI, G. Cytokine pathways and joint inflammation in reumathoid arthritis. **The New England journal of medicine**, v. 344, p. 907–916, 2001.

CICERO, T. J. et al. A postmarketing surveillance program to monitor Ultram® (tramadol hydrochloride) abuse in the United States.

Drug and Alcohol Dependence, v. 57, n. 1, p. 7–22, 1999.

CORONA-RAMOS, J. N. et al. The Antinociceptive Effects of Tramadol and/or Gabapentin on Rat Neuropathic Pain Induced by a Chronic Constriction Injury. **Drug Development Research**, v. 0, n. April, p. 217–226, 2016.

COSSMANN, M. et al. Tolerance and safety of tramadol use: results of international studies and data from drug surveillance. **Drugs**, v. 53, p. 50–62, 1997.

CRUWYS, S. C. Sensory denervation with capsaicin attenuates inflammation and nociception in arthritic rats. **Neuroscience Letters**, v. 193, p. 205–207, 1995.

CURTIS, J. R. et al. Changing Trends in Opioid Use among U.S. Rheumatoid Arthritis Patients. **Arthritis & Rheumatology**, 2017.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, n. 1, p. 8–16, 2008.

DAHER, J. B.; DE MELO, M. D.; TONUSSI, C. R. Evidence for a spinal serotonergic control of the peripheral inflammation in the rat. **Life Sciences**, v. 76, n. 20, p. 2349–2359, 2005.

DAHER, J. B.; TONUSSI, C. R. A spinal mechanism for the peripheral anti-inflammatory action of indomethacin. **Brain Research**, v. 962, n. 1–2, p. 207–212, 2003.

DE FELIPE, C. et al. Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. **Nature**, v. 392, n. 6674, p. 394–397, 1998.

DEER, T. R. et al. The Polyanalgesic Consensus Conference (PACC): Recommendations for Trialing of Intrathecal Drug Delivery Infusion Therapy. **Neuromodulation**, v. 20, n. 2, p. 133–154, 2017.

DEMIRARAN, Y.; KOCAMAN, B.; AKMAN, R. Y. A comparison of the postoperative analgesic efficacy of single-dose epidural tramadol versus morphine in children. **British Journal of Anaesthesia**, v. 95, n. 4, p. 510–513, 2005.

DESMEULES, J. A. et al. Contribution of monoaminergic modulation to the analgesic effect of tramadol. **British journal of clinical pharmacology**, v. 41, n. 1, p. 7–12, 1996.

DHASMANA, K. et al. Analgesic effect tramadol in rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 10, n. 4, p. 289–294, 1989.

DICKENSON, A. H. Spinal cord pharmacology of pain. **British journal of anaesthesia**, v. 75, p. 193–200, 1995.

DIXON, W. G. et al. Drug-specific risk of tuberculosis in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF therapy: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register (BSRBR). **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 3, p. 522–528, 2010.

DONAHUE, K. et al. **Drug therapy for rheumatoid arthritis in**

adults: an update Comparative Effectiveness Review. 2016. Disponível em: <www.ahrq.gov>.

DOUGHERTY, P. M.; STAAT, P. Intrathecal drug therapy for chronic pain: from basic science to clinical practice. **Anesthesiology**, v. 91, p. 1891–1918, 1999.

DRIESSEN, B.; REIMANN, W. Effects of tramadol on noradrenaline release from rat brain cortex slices. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 339, 1989a.

DRIESSEN, B.; REIMANN, W. Evidence for a non-opioid component on the analgesic action of tramadol. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 339, 1989b.

DRIESSEN, B.; REIMANN, W. Interaction of the central analgesic, tramadol, with the uptake and release of 5-hydroxytryptamine in the rat brain in vitro. **Br J Pharmacol**, v. 105, p. 147–151, 1992.

DRIESSEN, B.; REIMANN, W.; GIERTZ, H. Effects of the central analgesic tramadol on the uptake and release of noradrenaline and dopamine in vitro. **Br J Pharmacol**, v. 108, p. 806–811, 1993.

ECCLES, B. Y. J. C.; SCHMIDT, R. F.; WILLIS, W. D. Presynaptic inhibition of the spinal monosynaptic reflex pathway. **J Physiol**, v. 161, p. 282–297, 1962.

EIDE, P. K.; HOLE, K. Different role of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors in spinal cord in the control of nociceptive responsiveness. **Neuropharmacology**, v. 30, n. 7, p. 727–731, 1991.

FELSON, D. T. The sources of pain in knee osteoarthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 17, n. 5, p. 624–628, 2005.

FERREIRA, F.; ROMANEK, R.; POSSO, I. **Tratamento farmacológico da dor aguda e crônica**. São Paulo: Europa Press Comunicação Brasil Ltda., 2014.

FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. I. Brainstem control of spinal pain-transmission neurons. **Ann Rev Physiol**, n. 40, p. 217–248, 1978.

FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 356–61, 2003.

FOLETTTO, V. A medula espinhal modula a simetria da artrite induzida por CFA em ratos. p. 1-279, 2015.

FOLETTTO, V.; MARTINS, M.; TONUSSI, C. R. The involvement of potassium channels in the peripheral antiedematogenic effect of intrathecally injected morphine in rats. **Anesthesia and Analgesia**, v. 116, p. 232–238, 2013.

FOLLETT, K. A. et al. Response of intractable pain to continuous intrathecal morphine: a retrospective study. **Pain**, v. 49, n. 1, p. 21–25, 1992.

FRANCESCHINI, D.; LIPARTITI, M.; GIUSTI, P. Effect of acute and chronic tramadol on [3H]-norepinephrine-uptake in rat cortical

synaptosomes.pdf. v. 23, 1999.

FRINK, M. et al. Influence of tramadol on neurotransmitter systems of the rat brain. **Arzneimittelforschung**, v. 46, p. 1029–1036, 1996.

FURUE, H.; KATAFUCHI, T.; YOSHIMURA, M. Sensory processing and functional reorganization of sensory transmission under pathological conditions in the spinal dorsal horn. **Neuroscience Research**, v. 48, n. 4, p. 361–368, 2004.

GALAN, A.; CERVERO, F. Painful stimuli induce in vivo phosphorylation and membrane mobilization of mouse spinal cord NKCC1 co-transporter. **Neuroscience**, v. 133, p. 245–52, 2005.

GARDNER-NIX, J. **Opioids Causing Peripheral Edema** *Letters*, 2002.

GARLICKI, J. et al. Effect of intraarticular tramadol administration in the rat model of knee joint inflammation. **Pharmacological Reports**, v. 58, n. 5, p. 672–679, 2006.

GEBHART, G. F.; JONES, S. L. Effects of morphine given in the brain stem on the activity of dorsal horn nociceptive neurons. **Progress in Brain Research**, v. 77, n. C, p. 229–243, 1988.

GILBERT, D. et al. Differential maturation of chloride homeostasis in primary afferent neurons of the somatosensory system. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 25, n. 7, p. 479–489, 2007.

GILLEN, C. et al. Affinity, potency and efficacy of tramadol and its metabolites at the cloned human mu-opioid receptor. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 362, n. 2, p. 116–121, 2000.

GIORDANO, J. The neurobiology of nociceptive and anti-nociceptive systems. **Pain physician**, v. 8, n. 3, p. 277–290, 2005.

GRAMFORS, K. et al. Salmonella lipopolysaccharide in synovial cells from patients with reactive arthritis. **Lancet**, v. 335, p. 685–688, 1990.

GRANADOS-SOTO, V.; ARGÜELLES, C. F. Synergic antinociceptive interaction between tramadol and gabapentin after local, spinal and systemic administration. **Pharmacology**, v. 74, n. 4, p. 200–208, 2005.

GREEN, G. M.; SCARTH, J.; DICKENSON, A. An excitatory role for 5-HT in spinal inflammatory nociceptive transmission; state-dependent actions via dorsal horn 5-HT₃ receptors in the anaesthetized rat. **Pain**, v. 89, n. 1, p. 81–88, 2000.

GROND, S.; SABLITZKI, A. Clinical Pharmacology of Tramadol. **Clin Pharmacokinet**, v. 13, n. 43, p. 879–923, 2004.

GUIDELLI, G. et al. One year in review: novelties in the treatment of rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 33, p. 102–108, 2015.

GUNELI, E. et al. Analysis of the antinociceptive effect of systemic administration of tramadol and dexmedetomidine combination on rat models of acute and neuropathic pain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 88, n. 1, p. 9–17, 2007.

HALFPENNY, D. M. et al. Effects of tramadol stereoisomers on norepinephrine efflux and uptake in the rat locus coeruleus measured by real time voltammetry. **British journal of anaesthesia**, v. 83, n. 6, p. 909–915, 1999.

HAMA, A.; SAGEN, J. Altered antinociceptive efficacy of tramadol over time in rats with painful peripheral neuropathy. **European Journal of Pharmacology**, v. 559, n. 1, p. 32–37, 2007.

HANNU, T. Reactive arthritis. **Best Practice and Research in Clinical Rheumatology**, v. 25, p. 347–357, 2011.

HARA, K.; MINAMI, K.; SATA, T. The effects of tramadol and its metabolite on glycine, gamma-aminobutyric acidA, and N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. **Anesthesia and Analgesia**, v. 100, n. 5, p. 1400–1405, 2005.

HARA, M. et al. Uneven distribution of intracellular Cl⁻ in rat hippocampal neurons. **Neuroscience letters**, v. 143, n. 1–2, p. 135–138, 1992.

HASSENBUSCH, S. J. et al. Long-term intraspinal infusions of opioids in the treatment of neuropathic pain. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 10, n. 7, p. 527–543, 1995.

HAWKINS, K. et al. [3H]-[H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂] ([3H]CTOP), a potent and highly selective peptide for mu opioid receptors in rat brain. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 248, p. 73–80, 1989.

HAYEK, S. M. et al. Intrathecal therapy for cancer and non-cancer pain. **Pain physician**, v. 14, p. 219–248, 2011.

HAYEK, S. M.; HANES, M. C. Intrathecal therapy for chronic pain: Current trends and future needs. **Current Pain and Headache Reports**, v. 18, n. 1, 2014.

HEINRICHER, M. M. et al. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. **Brain Research Reviews**, v. 60, n. 1, p. 214–225, 2009.

HELMICK, C. G. et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. **Arthritis and Rheumatism**, v. 58, n. 1, p. 15–25, 2008.

HENNIES, H. H. et al. Effect of the opioid analgesic tramadol on inactivation of norepinephrine and serotonin. **Biochemical Pharmacology**, v. 31, n. 8, p. 1654–1655, 1982.

HENNIES, H. H.; FRIEDERICHS, E.; SCHNEIDER, J. Influence of the methoxy group on receptor binding, analgesic and antinociceptive potency of tramadol and other selected opioids. **Naunyn-Schmiedeberg's**

Archives of Pharmacology, v. 329, 1985.

HENNIES, H. H.; FRIEDERICHS, E.; SCHNEIDER, J. Receptor binding, analgesic and antitussive potency of tramadol and other selected opioids. **Arzneimittelforschung**, v. 38, p. 877–880, 1988.

HILDEBRAND, C. et al. Anatomy of the rat knee joint and fibre composition of a major articular nerve. **The Anatomical record**, v. 229, n. 4, p. 545–555, 1991.

HONG, Y.; ABBOTT, F. V. Peripheral opioid modulation of pain and inflammation in the formalin test. **European Journal of Pharmacology**, v. 277, n. 1, p. 21–28, 1995.

HOOD, V. C. et al. Differential role of neurokinin receptors in human lymphocyte and monocyte chemotaxis. **Regulatory Peptides**, v. 96, n. 1–2, p. 17–21, 2000.

HORISHITA, T. et al. The tramadol metabolite, O-Desmethyl tramadol, inhibits 5-hydroxytryptamine type 2C receptors expressed in *Xenopus* oocytes. **Pharmacology**, v. 77, n. 2, p. 93–99, 2006.

HWANG, A. S.; WILCOX, G. L. Analgesic properties of intrathecally administered heterocyclic antidepressants. **Pain**, v. 28, n. 3, p. 343–355, 1987.

IMMKE, D.; GAVVA, N. The TRPV1 receptor and nociception. **Semin Cell Dev Biol**, v. 17, p. 582–591, 2006.

IWASAKI, A.; INOUE, K.; HUKUDA, S. Distribution of neuropeptide-containing nerve fibers in the synovium and adjacent bone of the rat knee joint. **Clin Exp Rheumatol**, v. 13, p. 173–178, 1995.

JANG, I. S.; JEONG, H. J.; AKAIKE, N. Contribution of the Na-K-Cl cotransporter on GABA(A) receptor-mediated presynaptic depolarization in excitatory nerve terminals. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 16, p. 5962–5972, 2001.

JEFFRY, J. A. et al. Selective targeting of TRPV1 expressing sensory nerve terminals in the spinal cord for long lasting analgesia. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, 2009.

JONES, S. L.; GEBHART, G. F. Inhibition of spinal nociceptive transmission from the midbrain, pons and medulla in the rat: activation of descending inhibition by morphine, glutamate and electrical stimulation. **Brain Research**, v. 460, n. 2, p. 281–296, 1988.

JORIS, J. et al. Opiates suppress carrageenan-induced edema and hyperthermia at doses that inhibit hyperalgesia. **Pain**, v. 43, n. 1, p. 95–103, 1990.

JOU, I.-M. et al. The effects of intrathecal tramadol on spinal somatosensory-evoked potentials and motor-evoked responses in rats. **Anesthesia and analgesia**, v. 96, n. 3, p. 783–788, table of contents, 2003.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. September, p. 203–210, 2001.

KANEKO, K. et al. The analgesic effect of tramadol in animal models of neuropathic pain and fibromyalgia. **Neuroscience Letters**, v. 562, p. 28–33, 2014.

KARAI, L. et al. Deletion of vanilloid receptor 1 – expressing primary afferent neurons for pain control. **The Journal of clinical investigation**, v. 113, n. 9, p. 1344–1352, 2004.

KATZ, J. N. et al. Cost-effectiveness of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and opioids in the treatment of knee osteoarthritis in older patients with multiple comorbidities. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 24, n. 3, p. 409–418, 2016.

KAYSER, V.; BESSON, J. M.; GUILBAUD, G. Effects of the analgesic agent tramadol in normal and arthritic rats: comparison with the effects of different opioids, including tolerance and cross-tolerance to morphine. **European Journal of Pharmacology**, v. 195, n. 1, p. 37–45, 1991.

KAYSER, V.; BESSON, J. M.; GUILBAUD, G. Evidence for a noradrenergic component in the antinociceptive effect of the analgesic agent tramadol in an animal model of clinical pain, the arthritic rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 224, n. 1, p. 83–88, 1992.

KELLY, S.; DUNHAM, J. P.; DONALDSON, L. F. Sensory nerves have altered function contralateral to a monoarthritis and may contribute to the symmetrical spread of inflammation. **European Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 4, p. 935–942, 2007.

KIMURA, M.; OBATA, H.; SAITO, S. Antihypersensitivity effects of tramadol hydrochloride in a rat model of postoperative pain. **Anesthesia and Analgesia**, v. 115, n. 2, p. 443–449, 2012.

KISSIN, I. Vanilloid-induced conduction analgesia: Selective, dose-dependent, long-lasting, with a low level of potential neurotoxicity. **Anesthesia and Analgesia**, v. 107, n. 1, p. 271–281, 2008.

KJØRSVIK-BERTELSEN, A. et al. Stimulation of spinal 5-HT_{2A/2C} receptors potentiates the capsaicin-induced in vivo release of substance P-like immunoreactivity in the rat dorsal horn. **Brain Research**, v. 987, n. 1, p. 10–16, 2003.

KOGA, A. et al. Tramadol produces outward currents by activating mu-opioid receptors in adult rat substantia gelatinosa neurones. **Br J Pharmacol**, v. 145, n. 5, p. 602–607, 2005.

KRAMES, E. S.; LANNING, R. M. Intrathecal infusional analgesia for nonmalignant pain: Analgesic efficacy of intrathecal opioid with or without bupivacaine. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 8, n. 8, p. 539–548, 1993.

KRAYCHETE, D. C. et al. Proinflammatory Cytokines in Patients with Neuropathic Pain Treated with Tramadol. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 59, n. 3, p. 297–303, 2009.

KRUSTEV, E.; RIOUX, D.; MCDUGALL, J. J. Mechanisms and Mediators That Drive Arthritis Pain. **Current Osteoporosis Reports**, v. 13, n. 4, p. 216–224, 2015.

KUDO, Y. et al. The chloride-dependent depression by GABA in the frog spinal cord. **Eur J Pharmacol**, v. 32, p. 251–9, 1975.

KUMAR, R.; REETA, K. H.; RAY, S. B. Antinociceptive effect of intrathecal loperamide: Role of mu-opioid receptor and calcium channels. **European Journal of Pharmacology**, v. 696, n. 1–3, p. 77–82, 2012.

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1258–1266, 2010.

LARA JÚNIOR, N. A. Infusão intratecal de opioides para o tratamento de dor crônica não decorrente de câncer. p. 1-267, 2006.

LEE, C.; MCTAVISH, D.; SORKIN, E. Tramadol. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in acute and chronic pain states. **Drugs**, v. 46, p. 313–340, 1993.

LEE, D. M.; WEINBLATT, M. E. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 358, n. 9285, p. 903–911, 2001.

LEI, J. et al. Sex-related differences in descending norepinephrine and serotonin controls of spinal withdrawal reflex during intramuscular saline induced muscle nociception in rats. **Experimental Neurology**, v. 228, n. 2, p. 206–214, 2011.

LEOMBRUNO, J.; EINARSON, T.; KEYSTONE, E. The safety of anti-tumour necrosis factor treatments in rheumatoid arthritis: meta and exposure-adjusted pooled analyses of serious adverse events. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 68, p. 1136–1145, 2009.

LEVINE, J. D.; MOSKOWITZ, M. A.; BASBAUM, A. The contribution of neurogenic inflammation in experimental arthritis. **J Immunol**, v. 135, p. 843–847, 1985.

LI, C. et al. The antinociceptive effect of intrathecal tramadol in rats: the role of alpha 2-adrenoceptors in the spinal cord. **Journal of Anesthesia**, v. 26, n. 2, p. 230–235, 2012.

LIN, Q.; ZOU, X.; WILLIS, W. D. A δ and C primary afferents convey dorsal root reflexes after intradermal injection of capsaicin in rats. **J Neurophysiol**, v. 84, p. 2695–2698, 2000.

LINTZ, W. et al. Biotransformation of tramadol in man and animal. **Arzneimittelforschung**, v. 31, p. 1932–1943, 1981.

LINTZ, W. et al. Bioavailability of enteral tramadol formulations. 1st communication: capsules. **Arzneimittelforschung**, v. 36, p. 1278–1283, 1986.

LIU, Y. et al. Effect of tramadol on immune responses and nociceptive thresholds in a rat model of incisional pain. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 9, n. 11, p. 895–902, 2008.

LOTZ, M.; CARSON, D.; VAUGHAN, J. Substance P Activation of Rheumatoid Synoviocytes: Neural Pathway in Pathogenesis of Arthritis. **Science**, v. 235, p. 893–895, 1987.

MAINI, R.; TAYLOR, P. Anti-cytokine therapy for reumathoid arthritis. **Annual Review of Medicine**, v. 51, p. 207–229, 2000.

MALONNE, H. et al. Long-term tolerability of tramadol LP, a new once-daily formulation, in patients with osteoarthritis or low back pain. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 30, n. 2, p. 113–120, 2005.

MARINCSÁK, R. et al. The analgesic drug, tramadol, acts as an agonist of the transient receptor potential vanilloid-1. **Anesthesia and Analgesia**, v. 106, n. 6, p. 1890–1896, 2008.

MATTIA, A. et al. Characterization of the unusual antinociceptive profile of tramadol in mice. **Drug Development Research**, v. 28, n. 2, p. 176–182, 1993.

MCDUGALL, J. J.; BAKER, C. L.; HERMANN, P. M. Attenuation of knee joint inflammation by peripherally administered endomorphin-1. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 22, n. 1–2, p. 125–137, 2004.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **N.Engl.J.Med.**, v. 365, n. 1533–4406 (Electronic), p. 2205–2219, 2011.

MCKEENA, F. et al. Celecoxib versus diclofenac in the management of osteoarthritis of the knee. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 30, p. 11–18, 2001.

MEI, X. P. et al. Combination of tramadol with minocycline exerted synergistic effects on a rat model of nerve injury-induced neuropathic pain. **NeuroSignals**, v. 21, n. 3–4, p. 184–196, 2013.

MELLEU, F. F.; LINO-DE-OLIVEIRA, C.; MARINO-NETO, J. The mesencephalic GcT-ICo complex and tonic immobility in pigeons (*Columba livia*): a c-Fos study. **Brain Structure and Function**, v. 222, n. 3, p. 1253–1265, 2017.

MESTRE, C. et al. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 32, n. 4, p. 197–200, 1994.

MICHAUD, K. et al. Direct medical costs and their predictors in patients with rheumatoid arthritis: a three-year study of 7,527 patients. **Arthritis and rheumatism**, v. 48, n. 10, p. 2750–62, out. 2003.

MILLAN, M. J. The induction of pain: An integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1–164, 1999.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355–474, 2002.

MINAMI, K. et al. The Tramadol Metabolite O-Desmethyl

Tramadol Inhibits Substance P– Receptor Functions Expressed in *Xenopus* Oocytes. **Journal of Pharmacological Sciences J Pharmacol Sci**, v. 115, p. 421–424, 2011.

MINAMI, K. et al. μ -Opioid receptor activation by tramadol and O-desmethyltramadol (M1). **Journal of Anesthesia**, v. 29, n. 3, p. 475–479, 2015.

MINAMI, K.; OGATA, J.; UEZONO, Y. What is the main mechanism of tramadol? **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 388, n. 10, p. 999–1007, 2015.

MIOSSEC, P.; KORN, T.; KUCHROO, V. K. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. **The New England journal of medicine**, v. 361, n. 9, p. 888–898, 2009.

MISGELD, U. et al. The Role of Chloride Transport in Postsynaptic Inhibition of Hippocampal Neurons. **Science**, v. 232, p. 1413–1415, 1986.

MIYANO, K. et al. Tramadol and Its Metabolite M1 Selectively Suppress Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Activity, but Not Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Activity. **Anesthesia and Analgesia**, v. 120, n. 4, p. 790–798, 2015.

MONTEIRO, B. P. et al. Analgesic efficacy of tramadol in cats with naturally occurring osteoarthritis. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–13, 2017.

MORALES-AZA, B. M. et al. Inflammation alters cation chloride cotransporter expression in sensory neurons. **Neurobiology of Disease**, v. 17, n. 1, p. 62–69, 2004.

MORENO-ROCHA, L. A. et al. Effect of tramadol on metamizol pharmacokinetics and pharmacodynamics after single and repeated administrations in arthritic rats. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 6, p. 674–684, 2016.

MOTA, L. M. H.; LAURINDO, I. M. M.; SANTOS NETO, L. L. DOS. General principles for treatment of early rheumatoid arthritis. **Rev Assoc Med Bras**, v. 56, n. 3, p. 360–2, 2010.

MOTA, L. M. H. DA et al. Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia 2011 para o diagnóstico e avaliação inicial da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n. 3, p. 207–219, 2011.

MUCHACKI, R. et al. Impairment in pain perception in adult rats lesioned as neonates with 5,7-dihydroxytryptamine. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 24, n. 3, p. 419–427, 2015.

NAGY, I.; RANG, H. Noxious heat activates all capsaicin-sensitive and also a sub-population of capsaicin-insensitive dorsal root ganglion neurons. **Neuroscience**, v. 88, n. 4, p. 995–997, 1999.

NAKAMURA, M. et al. The effects of the tramadol metabolite O-desmethyl tramadol on muscarinic receptor-induced responses in *Xenopus* oocytes expressing cloned M1 or M3 receptors. **Anesthesia and Analgesia**,

v. 101, n. 1, p. 180–186, 2005.

NANCE, D. M.; SANDERS, V. M. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 6, p. 736–745, 2007.

NELSON, D.; LANDAU, W. Intraspinal steroids: history, efficacy, accidentality, and controversy with review of United States Food and Drug Administration reports. **J Neurol Neurosurg Psiquiatria**, v. 70, p. 433–443, 2001.

NICHOLSON, R. et al. Serotonin receptor mRNA expression in rat dorsal root ganglion neurons. **Neuroscience letters**, v. 337, p. 119–122, 2003.

NOLANO, M. et al. Topical capsaicin in humans: Parallel loss of epidermal nerve fibers and pain sensation. **Pain**, v. 81, n. 1–2, p. 135–145, 1999.

NORÕES, M. A administração por via intratecal dos imunossupressores teriflunomida e metotrexato inibe a incapacitação articular e o edema articular periféricos induzidos por LPS em ratas. p. 1-80, 2015.

NORTH, R. A.; YOSHIMURA, M. The actions of noradrenaline on neurones of the rat substantia gelatinosa in vitro. **The Journal of physiology**, v. 349, p. 43–55, 1984.

OGATA, J. et al. The inhibitory effects of tramadol on 5-hydroxytryptamine type 2C receptors expressed in *Xenopus* oocytes. **Anesthesia and analgesia**, v. 98, n. 5, p. 1401–6, table of contents, 2004a.

OGATA, J. et al. The inhibitory effects of tramadol on 5-hydroxytryptamine type 2C receptors expressed in *Xenopus* oocytes. **Anesthesia and Analgesia**, v. 98, p. 1401–1406, 2004b.

OLAH, Z. et al. Ligand-induced Dynamic Membrane Changes and Cell Deletion Conferred by Vanilloid Receptor 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 14, p. 11021–11030, 2001.

OLIVA, P. et al. The antinociceptive effect of tramadol in the formalin test is mediated by the serotonergic component. **European Journal of Pharmacology**, v. 445, n. 3, p. 179–185, 2002.

ORDOVAS-MONTANES, J. et al. The Regulation of Immunological Processes by Peripheral Neurons in Homeostasis and Disease. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 10, p. 578–604, 2015.

OSSIPOV, M. H. et al. Antinociceptive and nociceptive actions of opioids. **Journal of Neurobiology**, v. 61, n. 1, p. 126–148, 2004.

ÖZDOĞAN, Ü. K.; LÄHDESMÄKI, J.; SCHEININ, M. The analgesic efficacy of partial opioid agonists is increased in mice with targeted inactivation of the α 2A-adrenoceptor gene. **European Journal of Pharmacology**, v. 529, n. 1–3, p. 105–113, 2006.

PELLETIER, J. P. et al. Efficacy and safety of oral NSAIDs in the

management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 45, n. 4, p. S22–S27, 2016.

PENN, R.; PAICE, J. Chronic intrathecal morphine for intractable pain. **J Neurosurg**, v. 67, p. 182–186, 1987.

PERROT, S.; GUILBAUD, G.; KAYSER, V. Effects of intraplantar morphine on paw edema and pain-related behaviour in a rat model of repeated acute inflammation. **Pain**, v. 83, n. 2, p. 249–257, 1999.

PIERCE, P. A. et al. 5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: a polymerase chain reaction study. **Neuroscience (Oxford)**, v. 70, n. 2, p. 553–559, 1996.

PIMENTA, C. et al. Opiáceo intratecal na dor crônica não neoplásica. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 56, p. 398–405, 1998.

PLANAS, M. E. et al. Pharmacological evidence for the involvement of the endogenous opioid system in the response to local inflammation in the rat paw. **Pain**, v. 60, n. 1, p. 67–71, 1995.

PONGRATZ, G.; STRAUB, R. H. Role of peripheral nerve fibres in acute and chronic inflammation in arthritis. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 9, n. 2, p. 117–26, 2013.

PONGRATZ, G.; STRAUB, R. H. The sympathetic nervous response in inflammation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 16, n. 504, p. 1–12, 2014.

POPE, J. E. et al. Clinical Uses of Intrathecal Therapy and Its Placement in the Pain Care Algorithm. **Pain Practice**, v. 16, n. 8, p. 1092–1106, 2016.

PRESTON, K. L.; JASINSKI, D. R.; TESTA, M. Abuse potential and pharmacological comparison of tramadol and morphine. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 27, n. 1, p. 7–17, 1991.

PRICE, D. Central neural mechanisms that interrelate sensory and affective dimensions of pain. **Molecular Interventions**, v. 2, p. 392–403, 2002.

PRICE, T. J.; HARGREAVES, K. M.; CERVERO, F. Protein expression and mRNA cellular distribution of the NKCC1 cotransporter in the dorsal root and trigeminal ganglia of the rat. **Brain Research**, v. 1112, n. 1, p. 146–158, 2006.

RAFFA, R. B. et al. Opioid and Nonopioid Components Independently Contribute to the Mechanism of Action of Tramadol, an “Atypical” Opioid Analgesic. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 260, p. 275–285, 1992.

RAFFA, R. B. et al. Complementary and Synergistic Antinociceptive Interaction between the Enantiomers of Tramadol. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 267, n. 1, p. 331–40., 1993.

RAFFA, R. B. A novel approach to the pharmacology of analgesics. **Am J Med**, v. 101, p. S40–S46, 1996.

RAFFEINER, B. et al. TNF alpha blockers and infectious risk in rheumatoid arthritis. **Reumatismo**, v. 61, p. 165–173, 2009.

RAISINGHANI, M.; PABBIDI, R. M.; PREMKUMAR, L. S. Activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) by resiniferatoxin. **J Physiol**, v. 567, p. 771–786, 2005.

RAPHAEL, J. H. et al. Long-term experience with implanted intrathecal drug administration systems for failed back syndrome and chronic mechanical low back pain. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 3, p. 17, 2002.

RASBAND, W. ImageJ. U. S. National Institutes of Health Bethesda, Maryland, USA, 1997. Disponível em: <<http://imagej.nih.gov/ij/>>

REES, H. et al. The role of glutamate and GABA receptors in the generation of dorsal root reflexes by acute arthritis in the anaesthetized rat. **J Physiol**, v. 484, p. 437–445, 1995.

RUAN, X. Drug-related side effects of long-term intrathecal morphine therapy. **Pain physician**, v. 10, n. 2, p. 357–66, 2007.

RUDA, M.; BENNETT, G.; DUBNER, R. Neurochemistry and neural circuitry in the dorsal horn. **Progress in Brain Research**, v. 66, p. 219–268, 1986.

RUSSELL, J. Sodium-potassium-chloride cotransport. **Physiological Reviews**, v. 80, p. 211–276, 2000.

SAAG, K. G. et al. American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. **Arthritis Care and Research**, v. 59, n. 6, p. 762–784, 2008.

SACERDOTE, P. et al. Effects of tramadol on immune responses and nociceptive thresholds in mice. **Pain**, v. 72, n. 3, p. 325–330, 1997.

SACERDOTE, P.; BIANCHI, M.; PANERAI, A. E. Involvement of beta-endorphin in the modulation of paw inflammatory edema in the rat. **Regulatory Peptides**, v. 63, p. 79–83, 1996.

SAGATA, K. et al. Tramadol Inhibits Norepinephrine Transporter Function at Desipramine-Binding Sites in Cultured Bovine Adrenal Medullary Cells. **Anesthesia & Analgesia**, v. 94, n. 4, p. 901–906, 2002.

SALLIOT, C.; VAN DER HEIJDE, D. Long term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research. **Annals of the rheumatic diseases Rheum Dis**, v. 68, p. 1100–1104, 2009.

SANTER, V.; SRIRATANA, A.; LOWTHER, D. A. Carrageenin-induced arthritis: V. A morphologic study of the development of inflammation in acute arthritis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 13, n. 2, p. 160–168, 1983.

SATO, Y.; SCHAIBLE, H.-G. Discharge characteristics of sympathetic efferents to the knee joint of the cat. **J Auton Nerv Syst**, v. 19, p. 95–103, 1987.

SAWYNOK, J.; REID, A. Spinal supersensitivity to 5-HT₁, 5-HT₂ and 5-HT₃ receptor agonists following 5,7-dihydroxytryptamine. **European Journal of Pharmacology**, v. 264, p. 249–257, 1994.

SAWYNOK, J.; REID, A. R.; LIU, J. Spinal and peripheral adenosine A₁ receptors contribute to antinociception by tramadol in the formalin test in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 714, n. 1–3, p. 373–378, 2013.

SCHAIBLE, H. G.; STRAUB, R. H. Function of the sympathetic supply in acute and chronic experimental joint inflammation. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 182, p. 55–64, 2014.

SCHOELS, M. et al. Evidence for treating rheumatoid arthritis to target: results of a systematic literature search. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 4, p. 638–643, 2010.

SCHUG, S. A. The role of tramadol in current treatment strategies for musculoskeletal pain. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 3, n. 5, p. 717–723, 2007.

SCOTT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T. W. J. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 376, n. 9746, p. 1094–1108, 2010.

SCOTT, L.; PERRY, C. tramadol: a review of its use in perioperative pain. **Drugs**, v. 60, p. 139–176, 2000.

SHIGA, Y. et al. The Inhibitory Effects of Tramadol on Muscarinic Receptor-Induced Responses in *Xenopus* Oocytes Expressing Cloned M₃ Receptors. **Anesthesia and Analgesia**, v. 95, p. 1269–1273, 2002.

SHIRAIISHI, M. et al. Inhibition by tramadol of muscarinic receptor-induced responses in cultured adrenal medullary cells and in *Xenopus laevis* oocytes expressing cloned M₁ receptors. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 299, n. 1, p. 255–60, 2001.

SHIRAIISHI, M. et al. Inhibitory effects of tramadol on nicotinic acetylcholine receptors in adrenal chromaffin cells and in *Xenopus* oocytes expressing alpha 7 receptors. **British journal of pharmacology**, v. 136, n. 2, p. 207–16, 2002.

SIEPER, J.; BRAUN, J.; KINGSLEY, G. H. Report on the fourth International workshop on reactive arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 43, n. 4, p. 720, 2000.

SLUKA, K. et al. Fiber types contributing to dorsal root reflexes induced by joint inflammation in cats and monkeys. **J Neurophysiol**, v. 74, p. 981–989, 1995.

SLUKA, K.; LAWAND, N.; WESTLUND, K. Joint inflammation is reduced by dorsal rhizotomy and not by sympathectomy or spinal cord transection. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 53, p. 309–314, 1994.

SMITH, C. H. et al. Neuropeptides induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocytic infiltration in human skin. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 151, p. 3274–3282, 1993.

SMITH, S. R. et al. Comparative pain reduction of oral non-steroidal anti-inflammatory drugs and opioids for knee osteoarthritis: Systematic analytic review. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 24, n. 6, p. 962–972, 2016.

SMITH, S. R. et al. Cost-Effectiveness of Tramadol and Oxycodone in the Treatment of Knee Osteoarthritis. **Arthritis Care and Research**, v. 69, n. 2, p. 234–242, 2017.

SMOLEN, J. S. et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 6, p. 964–975, 2010.

SMOLEN, J. S.; STEINER, G. Therapeutic Strategies For Rheumatoid Arthritis. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 473–488, 2003.

SMYTH, C. et al. Intrathecal Analgesia for Chronic Refractory Pain: Current and Future Prospects. **Drugs**, v. 75, n. 17, p. 1957–1980, 2015.

SOMMER, C.; SCHMIDT, C.; GEORGE, A. Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. **Experimental neurology**, v. 151, n. 1, p. 138–42, 1998.

STAFFORD-SMITH, M. et al. alpha2-Adrenergic receptors in human spinal cord: specific localized expression of mRNA encoding alpha2-adrenergic receptor subtypes at four distinct levels. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 34, p. 109–117, 1995.

STEIN, T. et al. Histaminergic Pharmacology Modulates the Analgesic and Antiedematogenic Effects of Spinally Injected Morphine. **Anesthesia and Analgesia**, v. 123, n. 1, p. 238–243, 2016.

STEIN, T. O núcleo tuberomamilar modula a nocicepção e a inflamação periférica via receptor h1 medular. p. 1-131, 2016.

STEINMAN, L. Elaborate interactions between the immune and nervous systems. **Nature immunology**, v. 5, n. 6, p. 575–81, 2004.

STRAUB, R. H. et al. Energy regulation and neuroendocrine-immune control in chronic inflammatory diseases. **Journal of Internal Medicine**, v. 267, n. 6, p. 543–560, 2010.

SUBEDI, A. et al. Analgesic effects of intrathecal tramadol in patients undergoing caesarean section: A randomised, double-blind study. **International Journal of Obstetric Anesthesia**, v. 22, n. 4, p. 316–321, 2013.

SURESH, E. Recent advances in rheumatoid arthritis. **Postgraduate Medical Journal**, v. 86, p. 243–250, 2010.

SZABO, T. et al. Epidural resiniferatoxin induced prolonged regional analgesia to pain. **Brain Research**, p. 92–98, 1999.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M. Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanisms. **Pharmacological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 159–211, 1999.

SZOLCSÁNYI, J.; JANCSÓ-GABÓR, A. Sensory effects of capsaicin congeners I. Relationship between chemical structure and pain producing potency of pungent agents. **Arzneimittelforschung**, v. 25, p. 1877–1881, 1975.

TENDER, G. C. et al. Selective ablation of nociceptive neurons for elimination of hyperalgesia and neurogenic inflammation. **Journal of neurosurgery**, v. 102, n. 3, p. 522–5, 2005.

TONUSSI, C. R.; FERREIRA, S. H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, v. 48, n. 3, p. 421–427, 1992.

TRACEY, I.; MANTYH, P. W. The Cerebral Signature for Pain Perception and Its Modulation. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 377–391, 2007.

UYAR, M. et al. The antinociceptive effect of tramadol-venlafaxine combination on the paw withdrawal threshold in a rat model of neuropathic pain. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v. 25, 2003.

VALENCIA-DE ITA, S. Role of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransporter in the Development of Capsaicin-Induced Neurogenic Inflammation. **Journal of Neurophysiology**, v. 95, n. 6, p. 3553–3561, 2006.

VALLE, L.; TEXEIRA, M.; CAVALTANTE, V. Drogas de ação analgésica por via espinhal: aspectos farmacológicos. **Rev Dor Pesquisa Clínica e Terapêutica**, v. 3, p. 83–88, 2001.

VANE, J. Inhibitor of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biology**, v. 231, p. 232–239, 1971.

VANE, J.; BAKHLE, Y.; BOTTING, R. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, p. 97–120, 1998.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. G. Descending control of persistent pain: Inhibitory or facilitatory? **Brain Research Reviews**, v. 46, n. 3, p. 295–309, 2004.

VEIZI, E.; TORNERO-BOLD, M.; HAYEK, S. M. Resolution of Intrathecal Hydromorphone or Morphine-induced Peripheral Edema by Opioid Rotation to Fentanyl: A Case Series. **Pain Practice**, v. 16, n. 6, p. E94–E98, 2016.

VER DONCK, A. et al. Intrathecal drug administration in chronic pain syndromes. **Pain practice : the official journal of World Institute of Pain**, v. 14, n. 5, p. 461–76, 2014.

WALLACE, M.; YAKSH, T. Long-term spinal analgesic delivery: a review of the preclinical and clinical literature. **Reg Anesth Pain Med**, v.

25, p. 117–157, 2000.

WEI, H. et al. Intrathecal administration of a gap junction decoupler, an inhibitor of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter 1, or a GABAA receptor agonist attenuates mechanical pain hypersensitivity induced by REM sleep deprivation in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 97, n. 2, p. 377–383, 2010.

WEIR, M. R. et al. Selective COX-2 inhibition and cardiovascular effects: A review of the rofecoxib development program. **American Heart Journal**, v. 146, n. 4, p. 591–604, 2003.

WHITE, A. G. et al. Direct and Indirect Costs of Pain Therapy for Osteoarthritis in an Insured Population in the United States. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 50, n. 9, p. 998–1005, 2008.

WHITESIDE, G. T. et al. The Role of Central and Peripheral mu-Opioid Receptors in Inflammatory Pain and Edema: A Study Using Morphine and DiPOA ([8-(3,3-Diphenyl-propyl)-4-oxo-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]dec-3-yl]-acetic Acid). **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 314, n. 3, p. 1234–1240, 2005.

WHITTLE, S. L.; RICHARDS, B. L.; BUCHBINDER, R. Opioid Analgesics for Rheumatoid Arthritis Pain. **JAMA**, v. 309, n. 5, p. 485–486, 2013.

WHO. Tramadol: Update review report. 2014.

WHO. WHO Expert Committee on Drug Dependence : thirty-sixth report. 2015.

WILLIS, W.; COGGESHALL, R. **Sensory Mechanisms of the spinal cord**. third ed. ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Press, 2004.

WILLIS, W. D. Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: A double-edged sword. **Experimental Brain Research**, v. 124, n. 4, p. 395–421, 1999.

WINKELMÜLLER, M.; WINKELMÜLLER, W. Long-term effects of continuous intrathecal opioid treatment in chronic pain of nonmalignant etiology. **Journal of neurosurgery**, v. 85, p. 458–467, 1996.

WOOLF, A.; PFLEGER, B. Burden of major musculoskeletal conditions. **Bull World Health Organ**, v. 81, n. 3, p. 646–56, 2003.

XANTHOS, D. N.; SANDKÜHLER, J. Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 1, p. 43–53, 2014.

YAMASAKI, H. et al. Effects of tramadol on substantia gelatinosa neurons in the rat spinal cord: An in vivo patch-clamp analysis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–16, 2015.

YANARATES, O. et al. Spinal 5-HT₇ 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**, v. 112, p. 696–710, 2010.

YEO, P. M.; KOH, W. L.; LIM, S. P. R. Tramadol-induced peripheral oedema. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 41, n. 5, p. 557–558, 2016.

YOON, M. H. et al. Roles of opioid receptor subtypes on the antinociceptive effect of intrathecal sildenafil in the formalin test of rats. **Neuroscience Letters**, v. 441, n. 1, p. 125–128, 2008.

YOSHIMURA, M.; JESSELL, T. Amino acid-mediated EPSPs at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord. **The Journal of physiology**, v. 430, p. 315–335, 1990.

ZHANG, J. et al. Tramadol and Propentofylline Coadministration Exerted Synergistic Effects on Rat Spinal Nerve Ligation-Induced Neuropathic Pain. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, 2013.

ANEXO A

Anexo a esta tese seguem alguns resultados complementares do trabalho de conclusão de curso da aluna de iniciação científica Elba Marina Miotto Mujica, o qual foi feito em conjunto à tese.

1. Contagem total e diferencial de células no líquido sinovial de animais com artrite reativa induzida por carragenina/LPS e tratados com tramadol.

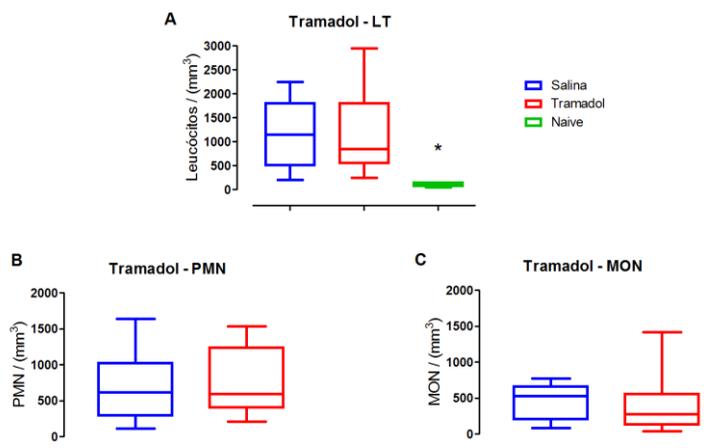


Figura A1.1: Efeito da administração intratecal do Tramadol (10 μ g/20 μ L) na migração celular. Os animais do grupo Salina e Tramadol receberam uma injeção i.a. de carragenina (300 μ g/20 μ L) e três dias após uma injeção i.a. de LPS (30ng/50 μ L) na mesma articulação. Foi coletado o líquido sinovial retirado da cápsula articular inflamada e em seguida realizada a contagem total de leucócitos (LT) – em **A** – e a contagem diferencial, observando-se o número de leucócitos Polimorfonucleares (PMN) – em **B** – e Mononucleares (MON) – em **C** – presentes na amostra. O grupo Naive não recebeu nenhum tratamento e não passou pelo processo de indução da artrite reativa.

2. Avaliação das alterações morfológicas na articulação de animais com artrite reativa induzida por carragenina/LPS e tratados com tramadol.

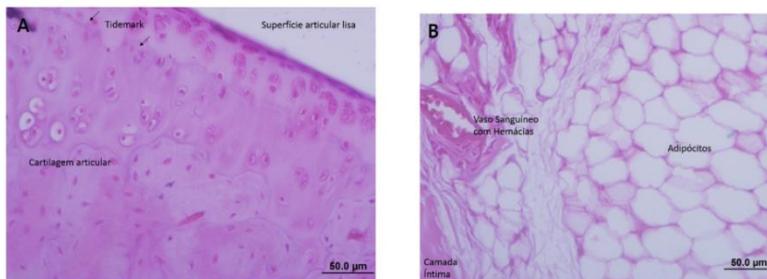


Figura A2.1: Fotomicrografia da cartilagem articular (A) e da membrana sinovial (B) da articulação do joelho dos animais Naive. Observa-se em **A** que a superfície articular está lisa, sem a presença de floculações, e a camada mais superficial da cartilagem articular está separada pela tidemark. Em **B** observa-se a presença de grande número de adipócitos na membrana sinovial, e de vasos sanguíneos contendo hemácias em seu interior. A coloração utilizada foi a de HE (Hematoxilina-Eosina) e a imagem foi obtida em lente objetiva de 40x.

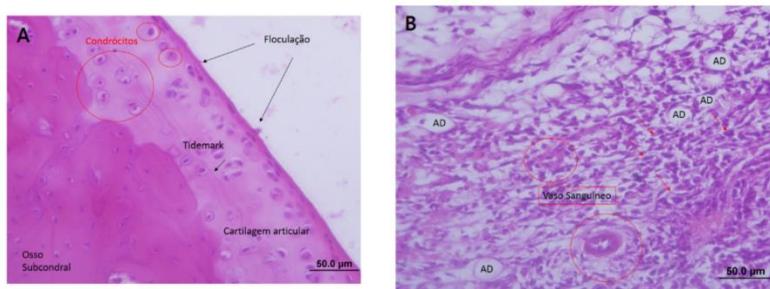


Figura A2.2: Fotomicrografia da cartilagem articular (A) e da membrana sinovial (B) da articulação do joelho dos animais com ReA tratados com Salina. Em **A** observa-se a presença de condrócitos na cartilagem articular, a presença de floculações na superfície articular e o osso subcondral delimitando a área da cartilagem articular. Em **B** observa-se a presença de intenso infiltrado inflamatório, que está indicado na figura pelas setas em vermelho, a redução no número de adipócitos (AD), quando comparado com as imagens do grupo Naive, e a presença de vasos sanguíneos. A coloração utilizada foi a de HE (Hematoxilina-Eosina) e a imagem foi obtida em lente objetiva de 40x.

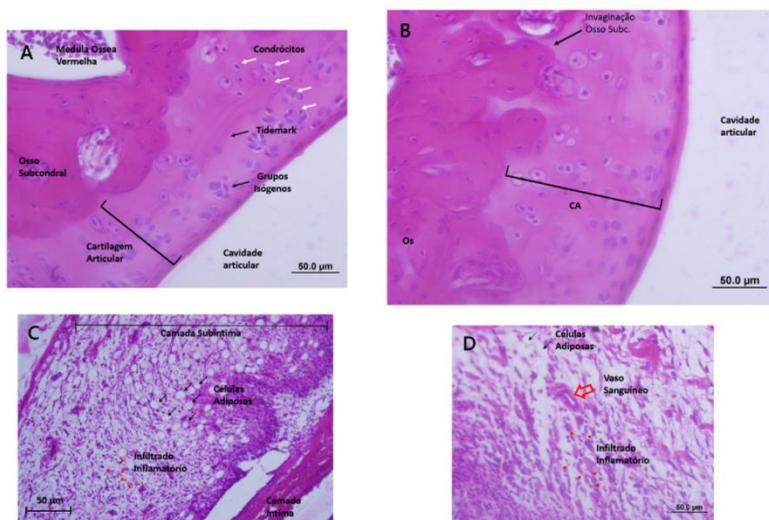


Figura A2.3: Fotomicrografia da cartilagem articular (A e B) e da membrana sinovial (C e D) da articulação do joelho dos animais com ReA tratados com Tramadol. Em **A** observa-se a tidemark delimitando a área mais superficial da cartilagem articular, com a presença de condrocitos, indicados na imagem pelas setas em branco, e de grupos isógenos. Em **B** observa-se a invaginação do osso subcondral (Os) e a faixa da cartilagem articular (CA). Em **C** observa-se a camada íntima e subíntima e a presença de células adiposas, indicada na imagem pelas setas em preto. Em **D** observa-se a presença de vaso sanguíneo, indicado na imagem pela seta maior em vermelho, e a presença de infiltrado inflamatório moderado, indicado na imagem pelas setas menores em vermelho. A coloração utilizada foi a de HE (Hematoxilina-Eosina) e a imagem foi obtida em lente objetiva de 40x.