

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM FARMACOLOGIA CLÍNICA**

**ESTUDO DO EFEITO ANALGÉSICO DO TOPIRAMATO EM MODELOS DE DOR
AGUDA E NEUROPATIA DIABÉTICA.**

LUCIANO DA SILVA LOPES

FORTALEZA – 2007

L854e Lopes, Luciano da Silva

Estudo do efeito analgésico do topiramato em modelos de dor aguda e neuropatia diabética/ Luciano da Silva Lopes; orientadora: Francisca Cléa Florenço de Sousa . - 2007.
114 f. : il.

Dissertação – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2007.

1. Analgésicos. 2. Anticonvulsivos. 3. Dor. 5. Medição da Dor. I. Sousa, Francisca Cléa Florenço de (Orient.). II. Título.

CDD 615.783

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM FARMACOLOGIA CLÍNICA

ESTUDO DO EFEITO ANALGÉSICO DO TOPIRAMATO EM MODELOS DE DOR
AGUDA E NEUROPATIA DIABÉTICA

LUCIANO DA SILVA LOPES

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia Clínica.

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa.
Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida

FORTALEZA
2007

LUCIANO DA SILVA LOPES

**ESTUDO DO EFEITO ANALGÉSICO DO TOPIRAMATO EM MODELOS DE DOR
AGUDA E NEUROPATIA DIABÉTICA**

Dissertação aprovada em _____ de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa.
(Orientadora)

Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Maria Elizabete Amaral de Moraes
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará

DEDICATÓRIA

*“Dedico este trabalho a meus pais, grandes
incentivadores de minhas conquistas”*

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Dirijo meus especiais agradecimentos àqueles que tornaram possível à realização deste trabalho:

À minha orientadora Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa, pela ajuda na decisão sobre a linha de pesquisa a ser seguida em meu estudo e pela prestatividade que sempre demonstrou.

A Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida pelo grande apoio e por ter aceitado me co-orientar. A você muito obrigado!

Aos colegas do Núcleo de Pesquisa em Plantas Mediciniais da UFPI: Serginho, Talvani, Luciane, Caio, Manoel e Fred sem os quais não poderia ter realizado meus trabalhos experimentais.

Aos colegas de Mestrado e agora amigos, pelo companheirismo e pelos momentos de alegria que passamos juntos.

Aos funcionários da UNIFAC, pela alegria e cumplicidade do convívio.

À minha esposa, Fabíola, pelo constante incentivo e compreensão no decorrer deste Mestrado.

A Deus, pela realização deste momento.

RESUMO

ESTUDO DO EFEITO ANALGÉSICO DO TOPIRAMATO EM MODELOS DE DOR AGUDA E NEUROPATIA DIABÉTICA. Luciano da Silva Lopes. Orientadora: Francisca Cléa Florenço de Sousa. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2007.

No presente estudo, o Topiramato (TP) foi avaliado em modelos de dor aguda e de dor neuropática diabética. Camundongos Swiss machos foram utilizados nos testes de nociceção aguda (formalina, placa quente e capsaicina) e ratos Wistar machos no teste de dor neuropática (filamentos de von Frey). No teste da formalina (2 %; 20 µL/i.pl.), foi quantificado o tempo que o animal lambia a pata que recebeu o estímulo durante 0-10 min (fase 01) e 20-40 min (fase 02). Os resultados mostraram uma redução na segunda fase (***p<0,001) nas três doses utilizadas do TP, enquanto que apenas a maior dose mostrou efeito na primeira fase do teste (***p<0,001). O efeito do TP (80 mg/Kg) foi revertido pela naloxona 2 mg/Kg na segunda fase do teste da formalina, mas não pela glibenclamida 3mg/Kg, ciproheptadina 5 mg/Kg e ondansetrona 0,5 mg/Kg quando comparado com o controle em ambas as fases. No teste da placa quente (52°) foi verificada a reação do camundongo ao estímulo térmico onde o animal responde tentando pular ou lambe uma de suas patas traseiras. Os animais foram submetidos a placa aos 00, 30, 60, 120 e 240 min após os tratamentos e comparou-se os grupos que receberam TP nas diferentes doses (20, 40 e 80 mg/Kg) e o grupo controle. Nesse modelo, TP demonstrou atividade aos 90 e 120min (**p<0,01; ***p<0,001) apenas na maior dose utilizada (80 mg/Kg). Em outro protocolo, os animais receberam capsaicina (20 µL, 2 µg/ i.pl), sendo quantificado o tempo durante 5 min que estes lambeiram ou mordeiram a pata estimulada, com comparação posterior entre os grupos. Não se verificou efeito significativo de TP em todas as doses utilizadas quando comparado com o controle. Para avaliação da ação antinociceptiva em dor neuropática, os animais foram inicialmente induzidos a diabetes com estreptozotocina 40 mg/Kg i.p e após trinta dias foram submetidos ao teste com filamentos de von. Não se verificou efeito significativo do TP nas doses utilizadas quando comparado com o controle. O TP não alterou a frequência de locomoção dos animais no teste do campo aberto e no teste do Rota rod e não aumentou o número de quedas nem diminuiu o tempo de permanência na barra giratória, sugerindo que o TP não exerce sua atividade antinociceptiva por ação depressora ou relaxante muscular. Em conclusão, a partir desses resultados podemos sugerir que o TP apresenta efeito antinociceptivo frente a diferentes estímulos de dor aguda, mas não na dor neuropática diabética. O efeito analgésico nos testes de dor aguda, provavelmente envolve sistema opióide, porém não os canais de potássio sensíveis ao ATP e sistema serotoninérgico.

Palavras chave: Analgésicos. Anticonvulsivos. Dor. Medição da dor.

ABSTRACT

STUDY OF THE ANALGESIC EFFECT OF THE TOPIRAMATE IN ACUTE PAIN AND DIABETIC NEUROPATHIC ANIMAL MODELS. Luciano da Silva Lopes. Supervisor: Francisca Cléa Florenço de Sousa. Master degree's thesis. Program of Post graduation in Pharmacology Clinical. Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, 2007.

In the present study, Topiramate (TP) was evaluated in acute pain and diabetic neuropathic animal models. Male Swiss mice were used in the tests of acute nociception (formalin, hot plate and capsaicin) e male Wistar rats in the neuropathic pain test (filaments of von Frey). In the formalin test (2%, 20 μ L/i.pl), it was measured the time spent by the animal licking the left hind paw which received the stimulation during 0-10 min (phase 01) and 20-40 min (phase 02). The results showed a reduction of the second phase (*** $p < 0.001$) in the three doses used of TP while only the biggest dose showed effect in the first stage of test (*** $p < 0.001$). The TP effect (80 mg/Kg) was reverted by naloxone 2 mg/kg in the second phase of the test of the formalin, but not for glibenclamide 3 mg/kg, cyproheptadine 5 mg/kg and ondansetron 0.5 mg/kg when compared to control in both phases. In the hot plate test (52°) was analysed the reaction of the mouse to the thermal stimulation where the animal respond trying to jump or to lick one of its brack legs. The animals had been submitted the plate to 00, 30, 60 and 120 min after the treatments and compared the groups that had received TP in the different doses (20,40 e 80 mg/kg). The results showed, TP demonstrated activity to 90 and 120 min (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) only in the biggest dose used (80mg/kg). In another protocol, the animals received capsaicin (20 μ L/2 μ g/i.pl), but the results ere not significant. For evaluations of the antinociceptive action in neuropathic pain, the animals had been initially induced diabetes with streptozotocine 40 mg/Kg i.p. and after thirty days had been submitted to the test with filaments of von Frey. No significant effect of TP was observed in all doses used when compared with the controls. TP did not modify the frequency of locomotion of the animals in the open field and presented no effect in the Rota rod test suggesting that the TP does not exert its analgesic effect by depressive actions or relaxant muscular activity. In conclusion, the results may suggest that TP presents antinociceptive effect front the different stimulations of acute pain, but not in diabetic neuropathic pain. The analgesic effect in acute pain, probably involves system opioid, and seems do not involve potassium canals or serotonergic system.

Keys Word: Analgesic. Anticonvulsants. Pain. Mensuration of pain.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Estrutura molecular do Topiramato	44
Figura 02: Teste da Capsaicina	57
Figura 03: Teste da Formalina	58
Figura 04: Teste as Placa Quente	60
Figura 05. Indução da Diabetes e Teste de von Frey	61
Figura 06. Teste do Campo Aberto e Rota Rod	63
Figura 07: Efeito analgésico do Topiramato no teste da capsaicina em camundongos	67
Figura 08: Efeito analgésico do TP no teste da formalina em camundongos	70
Figura 09: Efeito analgésico do TP no teste da formalina associado com Naloxona em camundongos	72
Figura 10: Efeito analgésico do TP no teste da formalina associado com Glibenclamida em camundongos	74
Tabela 11: Efeito analgésico do TP no teste da formalina associado com Ondansetrona em camundongos	76
Figura 12: Efeito analgésico do TP no teste da formalina associado com Ciproheptadina em camundongos	78
Figura 13: Efeito analgésico do TP no teste da placa quente em camundongos	81
Figura 14: Efeito antinociceptivo do TP no teste dos filamentos de von Frey em ratos	84
Figura 15: Efeito do TP na frequência de locomoção em camundongos	87
Figura 16: Efeito do TP no número de quedas da barra giratória em camundongos	89
Figura 17: Efeito do TP no número no tempo de permanência em segundos na barra giratória (Rot Rod) em camundongos	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Efeito do TP no Teste da nocicepção induzida por Capsaicina em camundongos	66
Tabela 02: Efeito do TP no teste da formalina em camundongo	69
Tabela 03: Efeito do TP no teste da formalina em camundongos – Associação TP X Naloxona	71
Tabela 04: Efeito do TP no teste da formalina em camundongos – Associação TP x Glibenclamida.	73
Tabela 05: Efeito do TP no teste da formalina em camundongos – Associação TP x Ondansetrona	75
Tabela 06: Efeito do TP no teste da formalina em camundongos – Associação TP x Ciproptadina	77
Tabela 07: Efeito do TP no teste da Placa quente em camundongos.	80
Tabela 08: Efeito do TP no teste dos Filamentos de von Frey em camundongos.	83
Tabela 09: Efeito do TP na frequência de locomoção no teste do campo aberto em camundongos	86
Tabela 10: Efeito do topiramato no número de quedas e tempo de permanência (s) na barra giratória (Rot rod) em camundongos	88

ABREVIACÕES

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
µg	Microgramas
µL	Microlitros
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
AINE	Analgésicos e antiinflamatórios não esteroidais
AL	Anestésicos locais
Ca ⁺⁺	Cálcio
CCK	Colecistoquinina
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CP	Ciproptadina
COX	Cicloxigenase
COX I	Cicloxigenase I
COX II	Cicloxigenase II
cm	Centímetro
CYP	Citocromo
°C	Grau centígrado
DAE	Drogas anticonvulsivantes
E.P.M	Erro Padrão Médio
<i>et al.</i>	e colaboradores
FR	Formação reticular
g	Gramas
GAL	Galanina
GABA	Ácido gama amino butírico.
GLB	Glibenclamida
h	Hora

5-HT	Serotonina
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
i.m	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
IP3	Inositol trifosfato
K ⁺	Potássio
K ATP	Canais de potássio sensíveis ao ATP
Kg	Quilograma (s)
IL - 1 β	Interleucina - 1 β
L2-L3	Lombar 2 e 3
m	Metro (s)
mg	Miligrama (s)
Mg ⁺⁺	Magnésio
min	Minuto (s)
n ou n ^o	Número (s)
Na ⁺	Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NGF	Fator de crescimento neural
NPPM	Núcleo de Pesquisa de Plantas Medicinais
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
ONDST	Ondansetrona
PGs	Prostaglandinas
PPSE	Potencial pós-sinapse excitatório
PPSI	Potencial pós-sinapse inibitório
rpm	Rotações por minuto
s.c.	Subcutânea
s	Segundo (s)
SAMP	Sistema ascendente multissináptico próprio espinhal
SNC	Sistema Nervoso Central
SPCD	Sistema pós sináptico da coluna dorsal
t	Tempo
T2 -T3	Torácica 2 de 3
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TP	Topiramato

TST	Trato espinotalâmico
TSC	Trato espinocervical
TSR	Trato espinorreticular
TSM	Trato espinomesencefálico
TTXs	Tetrodotoxina
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFPI	Universidade Federal do Piauí
v.o.	Via oral
vs	Versus
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Resumo	VII
Abstract	IX
1.0 Introdução	20
1.1 Generalidades sobre a dor	21
1.2 Fisiopatologia da dor	23
1.3 A dor aguda	24
1.4 As vias de condução da dor	27
1.4.1 Sistema nociceptivo ascendente	28
a) Trato espinotalâmico (TST)	29
a-1) via paleo-espinotalâmico	29
a-2) via neo-espinotalâmico	30
b) Outros tratos envolvidos na ascensão de impulsos dolorosos	31
1.5 Mediadores da dor	32
1.6 A neuromodulação central da dor	35
1.7 A dor neuropática	38
1.8 Os anticonvulsivantes e seus efeitos analgésicos	42
1.9 O Topiramato	43
2.0 Objetivos	50
2.1 Gerais	51
2.2 Específicos	51
3.0 Materiais	52
3.1 O Topiramato	53
3.2 Os animais	53
3.3 Drogas e reagentes	53
3.4. Equipamentos	55
4.0 MÉTODOS	56
4.1. Atividade Antinociceptiva	57
4.1.1. Teste da capsaicina	57
4.1.2 Teste de formalina	58
4.1.3 Placa quente	59
4.1.4 Teste dos filamentos de von Frey	60
4.1.5 Avaliação da atividade motora espontânea	62
4.1.6 Análise estatística	63
5.0 RESULTADOS	64
5.1. Efeito do TP na nocicepção induzida por capsaicina em camundongos	65
5.2. Efeito do TP na nocicepção induzida por formalina em camundongos	68
5.3. Efeito do TP no teste da placa quente em camundongos	79
5.4 Efeito analgésico do TP no teste dos filamentos de von Frey em ratos	82
5.5. Efeito do TP na frequência de locomoção no teste do campo aberto em camundongos	85

5.6. Efeito do TP no número de quedas e tempo de permanência (s) na barra giratória (Rot rod) em camundongos	85
6.0 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	91
7.0 CONCLUSÕES.	104
8.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS	106
9.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

INTRODUÇÃO

1.0 INTRODUÇÃO

1.1. Generalidades sobre a dor.

A dor é parte integrante da vida, presente ao longo de todo o ciclo de desenvolvimento, desde o nascimento até a morte. Aparece associada a várias doenças, processos inflamatórios, traumatismo tecidual e procedimentos cirúrgicos. Embora, na maioria dos casos, seja uma sensação desagradável e estressante, a dor é essencial para a sobrevivência humana, pois exerce uma função protetora e de alerta para o organismo. Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor, ela pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com uma lesão tecidual ou descrita em termos dessa lesão. Normalmente é resultado de um dano nos tecidos e desaparece quando essa injúria se resolve (TENG, 2003; OKUSE, 2006).

A sensação dolorosa é um processo neurológico extremamente complexo em que várias células nervosas estão envolvidas na sua transmissão sob influência de várias outras células que produzem substâncias neurotransmissoras e neuromoduladoras excitatórias ou inibitórias (VALE, 2000).

Os neurotransmissores excitatórios normalmente produzem uma despolarização na membrana pós-sináptica, o que se conhece como potencial pós sináptico excitatório (PPSE), enquanto que os neurotransmissores inibitórios estão associados com uma hiperpolarização gerando um potencial pós-sináptico inibitório (PPSI) ou ainda podem atuar na estrutura pré-sináptica impedindo a liberação de neurotransmissores excitatórios (VALE, 2000).

Para muitos a dor é o primeiro sintoma que leva uma pessoa a buscar cuidados médicos. De uma forma geral, ela é responsável por cerca de 10 a 50% das consultas médicas em clínicas gerais. Nos Estados Unidos, acredita-se que

mais de um terço da população sofra de dor crônica, sendo que 66 milhões de americanos apresentam incapacidade funcional parcial ou total devido a algum tipo de síndrome dolorosa (DRUMMOND, 2005).

Vários são os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da dor e o entendimento desses mecanismos é de grande importância, pois permitirá uma decisão racional com relação ao plano da terapêutica para o paciente (JONES, 2001).

Os estudos modernos de dor, tanto do ponto de vista clínico ou da pesquisa básica, assim como no sentido neurofisiológico ou terapêutico, apresentam três marcos históricos fundamentais. Primeiro quando Bonica, em seu tratado, passou a considerar a dor como uma afecção e não como um sintoma. Para este autor, a dor se constitui em um dos capítulos mais fascinantes e interessantes da história da Medicina (BONICA, 1991). Em segundo lugar quando foi descoberta a teoria do portão por Melzack e Wall em 1965 que por sua vez foi complementada pelos trabalhos de Reynolds em 1969 e que levaram a posterior identificação dos opióides endógenos. A terceira e última grande contribuição foi a de que o sistema nervoso central apresenta alterações funcionais e tróficas quando submetido a estímulos nociceptivos. Isto originou o conceito de neuroplasticidade neuronal na dor, o que por sua vez levaria ao conceito de que um foco doloroso em uma condição aguda, quando cronificado, poderia torna-se um foco nociceptivo irreversível. Estas contribuições levaram ao desenvolvimento de toda uma linha de pesquisa nessa área, em uma escala crescente de complexidade de conhecimento chegando a uma estreita relação entre os estudos básicos e clínicos, além do estabelecimento de uma terapêutica mais racional para o tratamento de síndromes dolorosas (DRUMMOND, 2000). Estes pontos foram importantes na evolução do estudo da dor, considerando o grande número de pacientes que sofrem com este fenômeno e da necessidade constante de atualização dos profissionais de saúde em relação ao tema (BONICA, 1987).

Do ponto de vista farmacológico, várias drogas são utilizadas como analgésicas. Devido ao complexo mecanismo fisiopatológico do processo doloroso, diferentes grupos de drogas podem ser utilizados para o alívio deste desconforto. Dentre os vários grupos farmacológicos, citamos, por exemplo, os analgésicos e antiinflamatórios não esteroidais (AINE), os anestésicos locais (AL), os analgésicos opióides, os antidepressivos, os anticonvulsivantes e até mesmo drogas adrenérgicas como a clonidina. Há de se considerar o enorme avanço nessa área da farmacologia, que se deu principalmente devido ao melhor conhecimento da farmacocinética e farmacodinâmica das drogas analgésicas, também pela introdução de novas drogas no arsenal terapêutico no alívio da dor, o que termina por estimular várias pesquisas com drogas outrora utilizadas para outras finalidades, mesmo que do ponto de vista farmacodinâmico já apresentassem propriedades analgésicas potenciais (VALE, 2000).

1.2. Fisiopatologia da dor.

A dor pode surgir normalmente por dois mecanismos: em primeiro lugar pela estimulação direta de nociceptores, que são terminações das fibras C. Isto pode acontecer devido a um dano tecidual e esta dor é classificada como nociceptiva sendo esse mecanismo encontrado em condições mais agudas. O segundo mecanismo estaria relacionado a uma lesão nos neurônios do sistema nervoso central ou periférico. É a chamada dor neuropática que normalmente está associada a uma inibição dos sistemas inibitórios ou a uma hiperexcitabilidade das fibras de condução do impulso doloroso. Tais condições podem ser causadas por um número muito grande de estímulos ou etiologias e isso inclui lesões neurais, amputações, traumatismos, inflamações crônicas ou distúrbios metabólicos (SHANNON *et al*, 2005).

Lembramos ainda que a dor visceral é provocada por lesões nas vísceras como, por exemplo, no estômago, intestino e vias urinárias. Essas lesões incluem distensão ou compressão por um tumor, isquemias e lesões inflamatórias. No

entanto, nem sempre é proporcional ao estímulo que a provocou (SHANNON *et al*, 2005).

1.3. A dor aguda.

A dor aguda está fortemente relacionada a um dano nos tecidos e a resposta inflamatória a esta lesão. Portanto, os testes para essa condição devem preferencialmente verificar estes dois parâmetros. Alguns conceitos são importantes para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nessa situação. São eles: hiperalgesia, alodinia e nocicepção.

Hiperalgesia é conceituada como sendo o aumento da resposta a um estímulo que normalmente já seja doloroso. É uma hipersensibilidade dos nociceptores. Pode ser primária e secundária, sendo o primeiro tipo associado diretamente à área de tecido que sofreu a lesão e o segundo as áreas adjacentes a esse dano, sendo normalmente mediada por ações medulares e pode ainda ser responsável pela sensibilidade de estruturas mais distantes como vísceras ou outras estruturas somáticas (RICE, 1998).

A presença de uma inflamação pode levar a uma hiperalgesia crônica que leva a ativação de nociceptores mesmo na presença de estímulos que em outras condições seriam inofensivos podendo ocorrer mesmo depois de algum tempo de cessado o estímulo doloroso (RICE, 1998).

Alodinia seria a manifestação de uma resposta dolorosa mediante um estímulo que normalmente não provocaria dor (RICE, 1998). Uma condição na qual podemos observar a alodinia é na dor neuropática. Um estado de natureza complexa que se caracteriza por uma lesão neuronal no sistema nervoso central ou periférico (ZIMMERMANN, 2001).

A nociceção compreende a detecção dos estímulos nódicos e a conseqüente transmissão das informações codificadas aos centros nervosos superiores. Sendo assim podemos considerar a dor como sendo um processo perceptivo que se origina nesses centros. O conceito de nociceção é utilizado para definir a resposta normal a estímulos lesivos ou potencialmente lesivos ao organismo. Essa resposta por sua vez é composta por quatro componentes bastante complexos que são a transdução, transmissão, modulação e percepção do estímulo doloroso (DRUMMOND, 2000).

A transdução está associada ao mecanismo de formação de um potencial de ação no nociceptor. É a tradução da energia incidente em potenciais receptores. Isso ocorre em todos os tecidos que apresentam terminações sensitivas para estímulos dolorosos, ou seja, que apresentam nociceptores. Estas terminações estão em vários tecidos como, por exemplo, na pele, nos músculos, na polpa dental, nas articulações e vísceras. Estes nociceptores são terminações nervosas livres que podem se despolarizar mediante estímulos químicos, térmicos ou mecânicos o que normalmente ocorre após uma lesão tecidual. Os nociceptores estão associados ao primeiro neurônio, dentro da organização hierárquica do sistema de condução da dor. São capazes de transformar estímulos em corrente despolarizante (VALE, 2000).

Existem três tipos de fibras sensoriais que podem transmitir sensações dolorosas. São as fibras C e A-delta com pouca mielina e fibras A-beta com maior quantidade de mielina. Os primeiros ativados por estímulos mecânicos e térmicos e os últimos ativados por estímulos mecânicos, térmicos e químicos (polimodais). Existem na verdade 4 tipos de receptores aferentes primários: receptor mecânico A delta, receptor termomecânico A delta, receptor polimodal C e receptores para temperaturas extremas. A lesão tecidual provoca liberação de íons potássio e hidrogênio assim como o aumento de substâncias de natureza plasmática como a bradicinina que por sua vez vão ativar os nociceptores e desencadear a síntese de prostaglandinas que levam ao aumento da sensibilidade dos nociceptores sendo

responsáveis assim pelo fenômeno da hiperalgesia dos tecidos inflamados (BAKER, 2005).

O impulso doloroso que foi captado pela terminação nervosa é transmitido pelos seus respectivos axônios periféricos, constituído de fibras A δ e C. Estes neurônios apresentam corpo celular localizado no gânglio da raiz dorsal e são chamados neurônios de primeira ordem, onde a partir da medula ascendem para estruturas supramedulares através da conexão com outros neurônios chamados neurônios de segunda e terceira ordem. Sendo que estas células de primeira ordem realizam sinapse no corpo dorsal da medula. Dentro desse trajeto, vários neurotransmissores estão envolvidos nessas conexões. São encontrados alguns neurotransmissores excitatórios de ação rápida como L-glutamato, o N-metil-D-aspartato (NMDA) e adenosina trifosfato (ATP) e os de ação lenta, como as taquicininas (Neurocinina A) e outros neuropeptídios (o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina – CGRP-, a colecistoquinina – CCK- e galanina – GAL). Ressaltamos ainda que nos últimos anos, vários estudos de biologia molecular tem sido realizados para se esclarecer os mecanismos envolvidos nas vias de sinalização da dor. A identificação de novos canais expressos nos neurônios sensitivos e o uso de animais *knock-out* em modelos de dor tem contribuído para um maior conhecimento das vias moleculares envolvidas na transmissão dos estímulos dolorosos e das várias substâncias envolvidas (OKUSE, 2006).

Entre essas substâncias, temos como as mais importantes os aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato), que por sua vez são modulados por alguns peptídeos. Existem também aminoácidos inibitórios, como o GABA e a glicina.

O glutamato vai interagir com três tipos de receptores: NMDA, AMPA, Kainato também chamados de ionotrópicos, e os metabotrópicos (m GLUs – R). Os receptores ionotrópicos medeiam a ação sináptica rápida e ativam canais iônicos de Na⁺, K⁺ e Ca²⁺. Os receptores metabotrópicos são ligados à proteína G e localizam-se tanto na membrana pré como na pós-sináptica e estão envolvidos com a

modulação da liberação do glutamato. Os receptores AMPA/Kainato podem também estar envolvidos com distúrbios da homeostasia do cálcio e por isso envolvidos em processos de excitotoxicidade quando ativados excessivamente (POULSEN *et al*, 2004).

A liberação deste neurotransmissor é dependente da ação do Ca^{+2} . Este íon por sua vez, ativa a produção de NO e COX-2, enzima que em colaboração com os receptores NMDA pré-sinápticos, facilitam a entrada de cálcio na célula formando assim um círculo vicioso, isto é, mecanismos de retrocontrole positivo. O glutamato é considerado o neurotransmissor mais abundante do sistema nervoso central. Uma estimativa bruta seria que mais de 50% das sinapses centrais seriam glutaminérgicas. Além disso, existe numa proporção de duas a três vezes em relação à acetilcolina e noradrenalina (ARAÚJO, 2006). Importante mencionar que o glutamato está envolvido na transmissão dos impulsos dolorosos tanto nas fibras sensitivas primárias como na transmissão desses impulsos nas sinapses do sistema nervoso central, como por exemplo, no corno posterior da medula (OKUSE, 2006).

1.4 As vias de condução da dor.

O corpo humano apresenta um complexo mecanismo de resposta a um estímulo doloroso. A percepção de dor desenvolve-se essencialmente como um sistema de alerta ou de advertência para o organismo informando a presença de estímulos nocivos do ambiente. Esta sensação funciona então como um indicativo de dano tecidual e também como um sinal para a busca de readaptação ou recuperação orgânica.

De uma forma mais simples, podemos descrever as vias de condução do estímulo doloroso como um sistema composto por três neurônios. A percepção de dor começa com um impulso que ativa um receptor e é transmitido pelo sistema nervoso periférico. A parte periférica consiste de uma fibra nervosa com dendritos

espalhados por várias estruturas, como por exemplo, na pele, vísceras e vasos sanguíneos. O corpo desse neurônio encontra-se no gânglio da raiz dorsal dos nervos medulares fazendo em seguida uma sinapse com um neurônio no corno posterior da medula espinhal. Esse neurônio primário leva então o impulso doloroso para estruturas superiores onde se conecta a um outro neurônio na região do tálamo que por sua vez leva a informação ao córtex, onde provoca a ativação de reações emocionais, autonômicas, neuro-humorais e comportamentais (JONES, 2001). Os neurônios sensoriais são classificados de acordo com seu tamanho e grau de mielinização. Estes dois fatores influenciam diretamente na velocidade em que um impulso nervoso é transmitido para o sistema nervoso central. Esses neurônios sensoriais são chamados de nociceptores. O termo nocicepção refere-se à resposta do corpo para a percepção da dor. A ativação dessas células provoca alterações na membrana neuronal de forma que esta fica mais permeável aos íons Na^+ , os principais elementos envolvidos na geração de um impulso ou potencial de ação. Após serem formados, estes impulsos nervosos ascendem para o sistema nervoso central através da medula espinhal por um sistema chamado de sistema sensorial ou nociceptivo ascendente (JONES, 2001).

1.4.1 Sistema nociceptivo ascendente

Os axônios das células de projeção ou neurônios de segunda ordem apresentam seus corpos celulares na medula, especificamente no corno posterior. Estes axônios vão ascender para o sistema nervoso central através de tratos, vias ou feixes que totalizam um número de seis. São eles: o espinotalâmico (TST); o espinoreticular (TSR); o espinomesencefálico (TSM); o sistema pós sináptico da coluna dorsal (SPCD); trato espinocervical (TSC) e sistema ascendente multissináptico próprio espinhal (SAMP). Os dois primeiros feixes estão no quadrante anterolateral; o terceiro neste mesmo quadrante e no funículo dorso lateral; o quarto e o quinto estão localizados na coluna dorsal e o sexto se encontra em várias partes da medula (DRUMMOND, 2000; RAJ, 1996).

a) Trato espinotalâmico (TST)

É a via nociceptiva mais importante. Os neurônios desse trato fazem decussação à curta distância e projetam-se para o tálamo, lateralmente para o núcleo lateral póstero-ventral e na porção mediana para o complexo intralaminar, incluindo o núcleo lateral central. Apresenta duas subdivisões, sendo a projeção lateral chamada de sistema neoespinotalâmico e a projeção mediana, juntamente com o TSR e o TSM, são chamados de palioespinotalâmico.

a-1) Via Paleo-espinotalâmica:

É formado pelo STR, TSM e a parte medial do TTS. Também denominada espino-reticulodiencefálica. Está muito relacionada aos componentes afetivos da dor principalmente devido a conexões com estruturas como a formação reticular (FR). Além disso, essa via se conecta também com outras áreas do cérebro: hipotálamo medial, substância cinzenta que margeia o aqueduto de Sylvius (periaquedutal) e ao terceiro ventrículo do diencéfalo. Essas áreas comandam o comportamento de defesa e de fuga pela ação no sistema límbico. Tem corpos celulares em áreas profundas da substância cinzenta da medula e suas fibras, algumas longas e outras curtas, se projetam para a formação reticular, substância negra periaquedutal, hipotálamo, núcleos talâmicos intralaminares e mediais (RAJ, 1996).

A via paleo-espinotalâmica é responsável pela condução da dor lenta, pouco definida e de localização difusa, devido a presença de neurônios mais curtos e com maior número de sinapses e também devido a falta de somatotopia (RAJ, 1996).

a-2) Via Neo-espinotalâmica:

É formada por uma cadeia de três neurônios. O primeiro neurônio (aférente) tem suas terminações na periferia e aloja-se em gânglios situados próximos ao SNC e conduz a informação desde a periferia. Tem forma de T no próprio gânglio, onde um ramo se dirige à superfície e outro às vísceras; o outro ramo estabelece contato com o segundo neurônio (aférente secundário) que, por sua vez, faz sinapse com o terceiro neurônio (aférente terciário), localizado no tálamo. O tálamo recebe a maioria de informações sensoriais proveniente das várias regiões do corpo e mantém uma estreita ligação com o hipotálamo, assim como com os núcleos do sistema límbico e áreas sensitivas do córtex (BAKER, 2005).

O segmento neoespinotalâmico possui neurônios localizados nas lâminas I e V de Rexel. Apresenta fibras longas e mielinizadas que vão até o núcleo ventroposterolateral talâmico e de lá para o córtex somatossensorial primário (RAJ, 1996).

Por ser direta, rápida, fidedigna e específica para cada unidade sensorial, esta via permite boa discriminação do local e da intensidade da dor (somatotopia) e é responsável pela dor aguda, transmitindo principalmente dores em pontadas e dores devido a estímulos térmicos. Estas numerosas vias aferentes e eferentes realizam várias projeções dentro do sistema nervoso central e também conectam várias áreas do hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal, lócus cerúleo, núcleo magno da Rafe e núcleo do trato solitário. O interessante é que estas áreas do cérebro não são limitadas apenas à percepção das sensações dolorosas. Elas também participam do controle do sistema hormonal, sistema nervoso autônomo e sistema cardiovascular, o que justificaria a complexa resposta fisiológica durante uma sensação de dor (JONES, 2001).

b) Outros tratos envolvidos na ascensão de impulsos dolorosos:

Trato espinorreticular (TSR) é a via mais direta entre a medula e a formação reticular. Esta via desempenha importante papel nos mecanismos da dor, tanto em seus aspectos afetivo-emocionais como também nos mecanismos envolvidos na ativação dos reflexos correspondentes, somáticos ou autonômicos. O **Trato espinomesencefálico (TSM)** possui neurônios que se localizam na mesma região em que estão os neurônios do TST. Dirige-se para o colículo superior e ao núcleo intercolicular. Algumas terminações também se dirigem para a substância cinzenta periaquedutal e formação reticular adjacente. Acredita-se que esse feixe apresente ação inibitória sobre a atividade nociceptiva. Estas duas vias fazem parte do sistema medial de condução de estímulos dolorosos. Este sistema é polissináptico, composto por fibras finas e não apresentam organização somatotópica (RAJ, 1996).

O Sistema pós-sináptico da coluna dorsal (SPCD) possui fibras que se projetam para os núcleos da coluna dorsal, principalmente o núcleo grácil, cujas células neuronais projetam-se para o núcleo talâmico lateral posteroventral (VPL), do lado oposto. A transmissão da dor por esse sistema é questionável, podendo este transmiti-la apenas de forma eventual e alternativa, pois lesões da coluna dorsal não alteram o limiar da dor. Postula-se que esse sistema apresente também um importante papel modulador. O **Trato espinocervical (TSC)** possui fibras que se dirigem para o funículo dorsolateral do mesmo lado e núcleo cervical de onde se projetam até o tálamo contralateral. Normalmente esse sistema pouco participa do processo de condução do impulso doloroso em seres humanos. Esses tratos fazem parte do sistema lateral de condução da dor. Esse sistema possui fibras que são longas, de condução rápida e que apresentam discreta organização somatotópica. Existem evidências que esse sistema transmite informações rápidas que permitem a discriminação sobre o local da injúria tecidual (RAJ, 1996).

O Sistema ascendente multissináptico propioespinhal (SAMP) é hoje um sistema em que se acredita ter importante papel no processo de condução dolorosa

nos casos de injúrias viscerais e na dor crônica. Isso tem sido mostrado em ratos, sendo que posteriormente esse sistema foi envolvido com a dor crônica (DRUMONND, 2005).

Além destes, citamos ainda como importante o sistema trigeminal e os sistemas por onde transitam informações provenientes das vísceras até a entrada no sistema nervoso central. O sistema trigeminal é também chamado de trato trigeminoespinal. Esse conjunto de fibras é muito importante na transmissão de informações nociceptivas originadas da face e da boca, inclusive da polpa dentária. Tal estrutura é responsável por um grande número de neuralgias do crânio e da face. As inervações dos órgãos viscerais se derivam de várias fibras aferentes primárias via sistema nervoso simpático e normalmente penetram na medula pelos níveis de T2-T3 e L2-L3. Correspondem a cerca de 10% das fibras que percorrem a raiz dorsal. Lembramos apenas que nas regiões viscerais é mais complexo o conceito de nociceptores, pois existe uma diferença entre os estímulos que normalmente são a distensão, a isquemia e a inflamação do órgão (BAKER, 2005).

Muito importante ainda é o sistema de controle descendente da dor. Esse sistema é composto por 4 estruturas centrais que são o sistema diencefálico e cortical, sistema mesencefálico com parte da substância cinzenta, núcleo magno da rafe e núcleo adjacente e por último alguns neurônios do corno dorsal da medula. Os neurônios desse sistema são serotoninérgicos e terminam entre os neurônios das lâminas I, II e IV de Rexed e deste modo inibem a transmissão do impulso nociceptivo destas fibras (RAJ, 1996).

1.5. Mediadores da dor.

Os nociceptores são na verdade ativados por várias substâncias químicas como íons hidrogênio, serotonina, bradicinina, histamina, ATP e adenosina. São sensibilizados por prostaglandinas, leucotrienos, substância P, óxido nítrico,

peptídeo relacionado com o gene da calcitonina, fator de crescimento neural e citocinas. As substâncias álgicas podem provocar aumento da permeabilidade capilar, elevada vasoconstrição ou vasodilatação e são chamadas genericamente de mediadores da dor e inflamação (NISHIMURA *et al*, 2004).

Estas substâncias álgicas estão localizadas em várias partes do corpo humano e são responsáveis por sensibilização periférica. Em nível central, vários estudos evidenciam que o glutamato provavelmente seja a substância mais importante na sensibilização central atuando principalmente nos receptores NMDA e AMPA-kainato (NISHIMURA *et al*, 2004).

Além dessa substância temos ainda, exercendo um importante papel no processo no processo de ativação e sensibilização de nociceptores periféricos, a bradicinina e as derivadas do ácido araquidônico ou eicosanóides.

A **bradicinina** é um autacóide que tem sua origem a partir de precursores inativos teciduais que são ativados mediante uma lesão tecidual. Esse mediador é produzido em uma cascata metabólica que começa com a ativação do fator XII do complemento à exposição de uma superfície negativa como o colágeno. Esta ativação resulta da transformação da precalicreína em calicreína que por sua vez facilita a transformação do cininogênio plasmático em bradicinina que é um potente ativador de nociceptores. Pode também ser produzida por células do sistema imunológico, principalmente os mastócitos. A bradicinina é uma das mais potentes substâncias álgicas que se conhece, sendo que sua atividade se dá principalmente para ativação direta dos nociceptores (RICE, 1998). Consiste de uma estrutura de nove aminoácidos e é um mediador inicial do processo inflamatório e da indução da dor (OKUSE, 2006).

Trabalhos recentes demonstram que este mediador também apresenta a capacidade de provocar hiperalgesia atuando em mecanismos distintos daqueles

supracitados. Provavelmente essa ação se dá por sinergismos entre a bradicinina e outros mediadores como a substância P, IL - 1 β e TNF- α , além do fator de crescimento neural (NGF), das prostaglandinas e outros eicosanóides. A bradicinina apresenta dois tipos de receptores: B₁ e B₂. Ambos são ligados à proteína Gq e Gi e ativam a fosfolipase A₂ e fosfolipase C. A ativação desta última leva a ativação de proteína quinase C com suas isoformas que estão envolvidas na ativação de canais de sódio e de receptores da capsaicina. A ativação de fosfolipase A₂ está envolvida com a liberação de ácido araquidônico da membrana celular que por sua vez produz prostanóides como a prostaglandina E₂ a partir da ação da cicloxigenase ou COX (OKUSE, 2006).

O primeiro tipo de receptor (B₁) tem sua expressão fortemente ativada durante o processo inflamatório, sendo esta supra-regulação influenciada principalmente pelas citocinas. O segundo tipo, o receptor B₂, é o mais clássico e se encontra presente em vários tecidos normais. Ao receptor B₁ liga-se tanto a bradicinina como seu metabólito des-Arg-bradicinina proveniente da ação da cininase I. Produtos da ação da cininase II (enzima conversora de angiotensina) sobre a bradicinina não apresentam ação sobre esses receptores (RICE, 1998; OKUSE, 2006).

As prostaglandinas são substâncias que fazem parte do grupo dos Eicosanóides. Este grupo é derivado do ácido araquidônico com uma estrutura apresentando vinte átomos de carbono. Desempenham várias funções fisiológicas no organismo humano. Dentre elas podemos citar a gastro-proteção, a manutenção da função renal e em parte o controle da homeostase cardiovascular. Dentro deste grupo, as prostaglandinas são substâncias importantes envolvidas no mecanismo de formação e manutenção da dor (OKUSE, 2006).

Tais mediadores são formados a partir do ácido araquidônico liberado dos fosfolípidios da membrana, que é metabolizado por diversas enzimas como a lipoxigenase que leva à formação dos leucotrienos e pela cicloxigenase (COX) que

promove a formação das prostaglandinas. Hoje sabemos que existem duas isoformas da COX. Uma é constitutiva (COX-1) que existe no endotélio com importantes funções antiagregante sistêmica, assim como reguladora da perfusão renal e também na mucosa gástrica onde desempenha um papel protetor (OKUSE, 2006).

A outra isoforma tem sua produção induzida durante o processo inflamatório nos tecidos lesados. A COX 2 é indutível por diversos agentes, principalmente as citocinas pró- inflamatórias como o $TNF\alpha$ e $IL-1\beta$ no local da inflamação. A COX medeia a conversão de ácido araquidônico em precursores de prostaglandinas como a $PG-G_2$ e $PG-H_2$ que por sua vez se transformam em várias outras prostaglandinas biologicamente ativas ($PG-D_2$, $PG-E_2$ e $PG-I_2$). Estes mediadores atuam em receptores ligados à proteína G que ativam proteína a quinase A e a proteína quinase E, que por sua vez medeiam a concentração intracelular de cálcio (OKUSE, 2006).

A serotonina ou 5-HT é uma substância que apresenta atividade complexa, pois atua em 14 receptores distintos que estão distribuídos em vários tecidos do corpo. De todos esses receptores apenas o $5-HT_3$ não ativa a proteína G, pois está ligado a ativação de canais de sódio aumentando o influxo deste íon para dentro da célula. Antagonistas do receptor $5-HT_3$ como a ondansetrona apresentam efeito antinociceptivo atuando a nível central e periférico (OKUSE, 2006).

1.6. A neuromodulação central da dor.

Após a sensibilização e ativação de nociceptores periféricos, os estímulos dolorosos são transmitidos ao sistema nervoso central. A maior parte dos neurônios que transmitem a dor entra pela parte posterior da medula espinhal pela raiz dorsal. É importante lembrar que 20 a 30% são fibras ventrais. Os impulsos na medula seguem para estruturas superiores como o tálamo, formação reticular, sistema

límbico e córtex, mediante uma complexa interação de neurotransmissores excitatórios e inibitórios, assim como de alguns neuromoduladores (RICE, 1998).

Das substâncias envolvidas na neurotransmissão central é importante considerar a substância P e principalmente o glutamato. Os mecanismos espinhais de hiperalgesia secundária estão predominantemente mediados através dos receptores NMDA do glutamato, provavelmente facilitado por neurocininas ou eicosanóides e provavelmente por outras moléculas (RICE, 1998).

De acordo com os dados experimentais existentes, acredita-se que no corno posterior da medula, os principais neurotransmissores liberados pelos aferentes nociceptivos primários, sejam o glutamato e a substância-P. O glutamato atua sobre diversos tipos de receptores. A estimulação dos receptores metabotrópicos (mGlu) acoplados a proteínas-G conduz à ativação da fosfolipase-C, com a conseqüente liberação de diacilglicerol que ativa cinases (capazes de alterar a transcrição de genes ou as propriedades de proteínas de membrana) e de inositol trifosfato (IP3) o qual induz a liberação de cálcio do sarcoplasma para o citosol. O glutamato atua ainda nos receptores AMPA que abrem canais de Na^+ , o que provoca despolarização da membrana (potencial pós-sináptico), e nos receptores NMDA que abrem canais de cálcio. Contudo, parece existir um mecanismo duplo de oclusão, já que quando a membrana está no potencial de repouso, o canal de Ca^{++} está obstruído pelo íon Mg^{++} (VALE, 2000).

A despolarização parcial da membrana obtida pela estimulação dos receptores AMPA ou pela substância-P, liberta o íon Mg^{++} do seu local de fixação no canal de cálcio, permitindo a estimulação dos receptores NMDA. Segundo alguns autores, para que o glutamato abra estes canais de cálcio é ainda necessário à ligação da glicina num outro local do receptor (VALE, 2002).

Por neuromodulação entende-se como o processo pelo qual a transmissão é facilitada ou inibida. Estes mecanismos envolvem vários momentos do processo e há a participação de muitos circuitos nervosos e diversas substâncias químicas endógenas. Essa modulação pode ocorrer, por exemplo, a nível medular pelo bloqueio de receptores ou da liberação das substâncias neurotransmissoras impedindo assim a transmissão nociceptiva. As principais substâncias envolvidas nesse sistema são: a noradrenalina, a dopamina e a serotonina. Podem ainda ter um papel importante a adenosina, a acetilcolina, a neurotensina, a somatostatina, dentre outras. Os aminoácidos inibitórios incluem o GABA e a glicina, localizados em estruturas pré e pós sinápticas. Com uma excitação prolongada, esses neurônios inibitórios são destruídos acarretando a perda do controle inibitório segmentar (TENG, 2003).

Na medula, temos ainda um outro mecanismo envolvido na modulação da transmissão da dor: É a teoria de controle do portão, descoberta por Melzack e Wall em 1965. De acordo com essa teoria, as fibras grossas ativariam a substância gelatinosa e as fibras finas a inibem. Esses neurônios quando ativados impediriam ou pelo menos dificultariam a transmissão do impulso doloroso, mediante atuação pré-sináptica. Centros nervosos superiores também participariam dessa inibição. A modulação que ocorre a nível medular é chamada de modulação segmentar. Existe ainda a modulação supra-segmentar. Esse tipo de modulação é mediada por regiões do diencéfalo, substância cinzenta periaquedutal e periventricular, núcleo magno da rafe, o núcleo adjacente, complexo lócus cerúleos/ subcerúleus e corno posterior da medula. Essa modulação reduz a liberação pré-sináptica de neurotransmissores nas terminações das fibras aferentes e diminui a ativação de fibras excitatórias e a ativação de fibras neuronais inibitórias (DRUMMOD, 2005).

Em termos de substâncias químicas, temos como exemplo daquelas moduladoras os neurotransmissores clássicos, os opióides endógenos e as substâncias não opióides. No primeiro grupo temos a acetilcolina, catecolaminas e serotonina. Possivelmente esses neurotransmissores participam da ativação de

fibras inibitórias descendentes. Os opióides envolvem as encefalinas, dinorfinas e beta-endorfinas/corticotropinas. Estas substâncias atuam em receptores próprios que são os receptores opióides *mu*, *kappa* e *sigma*. A ativação desses receptores provoca hiperpolarização celular e interrompe a transmissão do impulso doloroso. Dentre as substâncias não-opióides temos a substância P e a CCK ou colecistoquinina, além da somatostatina e calcitonina. Essas moléculas podem atuar principalmente devido à liberação de peptídeos opióides ou ainda devido à inibição da degradação dos mesmos, aumentando assim a disponibilidade para os receptores (DRUMMOND, 2005).

1.7. A dor neuropática.

Um outro tipo muito importante de dor é a neuropática. Esta síndrome dolorosa pode ser descrita como uma re-instalação elétrica do sistema nervoso, o que pode ocorrer em estruturas centrais ou periféricas, freqüentemente resultado de dano tecidual severo e/ou repetitivo. Além disso, os neurônios danificados podem gerar descargas espontâneas e repetitivas resultando em novos potenciais de ação que podem também ser responsáveis pela sensação dolorosa (JONES, 2001).

Segundo a IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor) a dor neuropática é definida como a dor decorrente de uma lesão ou disfunção do sistema nervoso central ou periférico. Este conceito abrange várias síndromes álgicas de diversas etiologias que podem não apresentar os mesmos mecanismos fisiopatológicos e, conseqüentemente, nem as mesmas manifestações clínicas (DRUMMOND, 2005).

A dor Neuropática pode ser devido a uma lesão primária no sistema nervoso periférico ou central, podendo existir algumas diferenças como conseqüência desta localização. Por exemplo, existem diferenças entre neuralgias de nervos periféricos como a neuralgia trigeminal e dor neuropática central, como a

síndrome talâmica. Porém, do ponto de vista fisiopatológico, há pouca distinção, pois os mecanismos envolvidos são semelhantes. Na dor neuropática a alodinia é provavelmente relacionada a uma alteração funcional dos neurônios aferentes nos cornos dorsais da medula espinhal que normalmente estão envolvidos com o processo de nocicepção (RICE, 1998).

Essa condição dolorosa, não desaparece com a cura da lesão e está relacionada a processos patológicos crônicos, não tendo mais a função biológica de alerta. Em geral, a dor crônica não envolve respostas neurovegetativas associadas e é mal delimitada no tempo e no espaço, tendo a depressão e a ansiedade como respostas emocionais freqüentemente associadas ao quadro. Existem várias condições que podem levar ao desenvolvimento da dor neuropática (ZIMMERMANN, 2001):

- Dano mecânico ao nervo - por exemplo, síndrome do túnel carpal.
- Hérnia em disco vertebral.
- Doença metabólica, por exemplo, polineuropatia diabética.
- Doença viral - por exemplo, herpes zóster, vírus da imunodeficiência humana – HIV.
- Neurotoxicidade farmacológica - por exemplo, provocada por quimioterapia antineoplásica ou por antituberculosos.
- Doença inflamatória e/ou por mecanismos imunológicos, por exemplo, na esclerose múltipla;

A injúria ou a disfunção de nervos periféricos, devido a causas diversas (diabetes, herpes zóster, traumatismo, etc), determina uma série de modificações moleculares, bioquímicas e estruturais no próprio axônio, no neurônio primário correspondente e no sistema nervoso central (SNC) que podem originar vários fenômenos como dor espontânea ou intermitente, alodinia, hiperalgesia e disestesia. Vários estados dolorosos são classificados como dor neuropática. Temos por exemplo a neuralgia do trigêmeo, complexo regional da síndrome dolorosa e

radiculopatias. Na verdade, existe um grupo bem heterogêneo de patologias que se caracterizam por apresentarem uma lesão neuronal e que se enquadrariam nesse conceito (PAPPAGALLO, 2003).

Vários mecanismos estão envolvidos, e os mesmos são divididos em periféricos e centrais. Dentro dos mecanismos periféricos temos a sensibilização de nociceptores que ocorre devido à lesão tecidual, uma inflamação ou devido à ativação de vias simpáticas. Nestas condições temos a sensibilização de fibras pouco mielinizadas A δ e fibras C por várias substâncias como íons H⁺, citocinas, noradrenalina, bradicinina, histamina, íons K⁺, prostaglandinas, leucotrienos, fator de crescimento do nervo e substância P. Dentro essa “sopa sensibilizante”, destacamos a participação das citocinas, principalmente do fator de necrose tumoral (TNF- α) e IL1 e IL6. Todas elas atuam diminuindo o limiar de ativação do nociceptor e conseqüentemente facilitando a ativação dessas fibras, além da adição de novas terminações sensitivas que são os nociceptores silenciosos ou adormecidos (DRUMMOND, 2005; PAPPAGALLO, 2003).

Além desse mecanismo periférico, temos ainda a formação de descargas ectópicas formada pela ativação elétrica dos neuromas e por alterações na membrana celular que ocorre na parte proximal do neurônio. Este mecanismo ocorre quando temos uma lesão nervosa periférica que secciona o axônio neuronal. Podem ser observadas ainda modificações na atividade dos canais iônicos de sódio na membrana celular (ZIMMERMAN, 2001).

São hoje conhecidos 9 canais de íons sódios (Na⁺) no sistema nervoso central e periférico, sendo divididos em canais resistentes e sensíveis à tetrodotoxina (TTXs) – uma potente toxina obtida do baiacu, peixe da família dos Tetrodontidae. Os primeiros, os TTX resistentes, são encontrados principalmente nas fibras C e os outros, os TTX sensíveis, são encontrados nas fibras A. Os canais de Na⁺ apresentam-se formados por subunidades α semelhantes as subunidades dos canais de Ca⁺⁺ e apresentam seis segmentos transmembranas. Estas estruturas estão envolvidas nos mecanismos de excitabilidade da membrana neuronal gerando

o processo de despolarização através do influxo de íons Na^+ . (ZIMMERMMAN, 2001; OKUSE, 2006).

Foi observado que após uma injúria neuronal, há uma reorganização qualitativa e quantitativa dos canais levando a formação de disparos espontâneos ou de frequência elevada nas células do gânglio da raiz dorsal, principalmente naquelas de pequeno e médio calibre. Essa modificação se daria possivelmente devido a um aumento do número de canais de sódio, a uma diminuição do período refratário e a um desvio da hiperpolarização no potencial de repouso desses neurônios. O bloqueio desses canais constitui a base terapêutica para a utilização de algumas drogas como anestésicos locais e anticonvulsivantes. Os canais resistentes a TTX, por exemplo, podem ser bloqueados por baixas concentrações de anestésicos locais como a lidocaína (ZIMMERMMAN, 2001). Lembramos ainda que tem importância os canais de cálcio e potássio nesse mecanismo, tendo em vista a participação desses canais no processo de liberação de neurotransmissores excitatórios.

Ainda como mecanismos periféricos, podemos mencionar as alterações no sistema nervoso simpático. Normalmente as fibras simpáticas exercem pouca influência sobre as fibras sensitivas periféricas, no entanto, após uma lesão, estas fibras ficam muito sensíveis aos terminais simpáticos e estes se constituem em importante fonte complementar de prostaglandinas e outras substâncias pró-inflamatórias e pró-nociceptivas. Esse tipo de mecanismo justifica a utilização de drogas como a reserpina no tratamento de algumas condições dolorosas devido a seu efeito depletivo de noradrenalina (BAKER, 2005).

Com relação aos mecanismos centrais, temos complexos mecanismos envolvidos na dor neuropática. Em nível experimental, vários trabalhos têm demonstrado que após uma lesão neuronal, ocorrem algumas modificações existentes em estruturas medulares e supramedulares. Dentre essas modificações, a sensibilização central é uma das mais importantes. Como foi dito anteriormente, durante a ocorrência de alterações periféricas, existe a formação de descargas ectópicas nas fibras sensitivas. Essas descargas são direcionadas para os

neurônios no sistema nervoso central e nessas células provocam profundas modificações no SNC, condição essencial para a gênese da dor neuropática. Essas modificações levariam então à sensibilização central que é uma facilitação da transmissão neuronal como consequência da estimulação continuada das fibras C. Essa facilitação se dá devido a um aumento da atividade espontânea celular, diminuição do limiar dos neurônios medulares, prolongamento de pós-descargas prolongadas a estimulação repetida e a expansão dos campos de recepção periférica dos neurônios. Dessa forma há a formação da alodinia (BAKER, 2005).

1.8. Os anticonvulsivantes e seus efeitos analgésicos.

Os anticonvulsivantes (AC) ou drogas antiepilépticas (DAE) devido as suas várias ações farmacológicas, especificamente seu bloqueio sobre vários canais iônicos, apresentam potencial analgésico importante principalmente nas dores neuropáticas e possivelmente em condições agudas. A semelhança entre os processos fisiopatológicos da dor neuropática e da epilepsia justifica a indicação e pesquisa dessas substâncias como analgésicos. Dado a capacidade das drogas antiepilépticas de diminuir a excitabilidade da membrana celular tanto em fibras periféricas como centrais, os anticonvulsivantes são potencialmente úteis para o tratamento de grande variedade de condições de dor neuropática; fenômenos como o *Wind up* que ocorre no corno dorsal da medula e o fenômeno de *Kindling* nos neurônios hipocâmpais na epilepsia, apresentam semelhança, pois em ambos parece haver uma ativação de receptores NMDA (THIENEL, 2004).

Assim como a dor neuropática, a epilepsia apresenta como característica fisiopatológica a hiperexcitabilidade neuronal. É conhecido que os anticonvulsivantes apresentam a capacidade de bloquear canais de sódio na membrana neuronal, assim como alterar a condutância do cálcio, potencializar a ação depressora do GABA ou ainda modificar a ação dos neurotransmissores excitatórios como o glutamato. Tudo isso levando a uma diminuição da atividade excitatória dos

neurônios, o que justificaria a utilização dessas substâncias em tais condições dolorosas neuropáticas (JACKSON II, 2006).

Dentre os anticonvulsivantes existentes o Topiramato (TP) chama a atenção devido ao seu mecanismo de ação. É um novo antiepiléptico que apresenta muitos mecanismos estabilizadores de membrana que pode ser válido para o tratamento de condições dolorosas, principalmente a dor neuropática (THIENEL, 2004).

Os anticonvulsivantes, ao contrário de outros grupos de drogas que atuam no sistema nervoso central, não possuem um único mecanismo de ação. Na verdade existem vários mecanismos envolvidos em suas ações farmacológicas. Citamos por exemplo, a carbamazepina que bloqueia canais de Na^+ e de cálcio tipo L; a fenitoína que bloqueia apenas canais de sódio; o ácido valpróico que aumenta a ação do GABA nas suas sinapses além de canais de cálcio tipo T; o fenobarbital que aumenta a atividade do GABA facilitando o influxo de íons cloretos e o TP que bloqueia canais de Na^+ , facilita a ação do GABA e bloqueia canal de cálcio tipo L (PERUCCA, 2005).

1.8.0 O Topiramato.

Topiramato (TP) é um novo agente neuroterápico aprovado em mais de 75 países para o tratamento coadjuvante de crises convulsivas parciais refratárias a outros tratamentos ou generalizadas tipo tônico-clônicas em pacientes adultos ou pediátricos acima de 2 anos. Também é aprovado como profilático para crises de migraine. Foi aprovado para adultos e crianças acima de dois anos nos Estados Unidos. Atualmente tem sido utilizado em vários protocolos para o tratamento de

desordens psiquiátricas como transtornos bipolares e estresse pós-traumático. (ARNONE, 2005).

Quimicamente o TP é um monossacarídeo sulfatado mono-substituído. Apresenta-se como um pó branco cristalino solúvel em solução alcalina contendo hidróxido ou fosfato de sódio com pH entre 9 e 10. Também é solúvel em acetona, clorofórmio, dimetilssufóxido e etanol. Dissolve-se ainda em uma solução de 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina a 25% (SHANNON, 2005). Quimicamente é o 2,3:4,5-Di-O-isopropilidene- β -D-frutopiranosose sulfato com fórmula molecular $C_{12}H_{22}NO_8S$. É um derivado da D-frutose apresentando estrutura diferente de todos os outros antiepilépticos. Normalmente é utilizado na dose de 200 a 400 mg por dia, podendo eventualmente ser utilizado até 1200mg por dia (GLAUSER, 1999; SHANK *et al*, 1994).

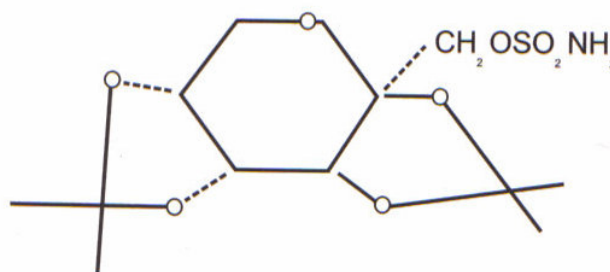


Fig 01- Estrutura molecular do Topiramato.

O preciso mecanismo de ação do TP não é conhecido. No entanto, vários estudos eletrofisiológicos e bioquímicos demonstram que essa substância apresenta diversas ações que contribuem para a sua eficácia como anticonvulsivante. *In vitro*, o TP evidencia vários mecanismos que modificam a atividade neuronal, incluindo o bloqueio de canais de Na⁺ e de Ca⁺⁺ voltagens dependentes, aumento da atividade do GABA, inibição dos receptores AMPA do glutamato e inibição da anidrase carbônica (ARNONE, 2005).

O TP é efetivo em convulsões induzidas por eletrochoque em ratos e camundongos, no entanto é ineficaz em convulsões clônicas induzidas por pentilenotretazol, picrotoxina e bicuculina (WHITE, 2005; SHANK *et al*, 1994).

Com relação ao bloqueio de canais de sódio, estudos em neurônios de hipocampo de ratos demonstram que o TP apresenta ação inibidora sobre canais de sódio voltagem dependente, mecanismo este que é compartilhado com outras DAE, como por exemplo, a fenitoína, carbamazepina e lamotrigina. Essa ação seria responsável pela redução da duração e frequência dos ataques convulsivos. Essa ação também foi observada em neurônios corticais e apresentou-se efeito dose dependente (WHITE, 2005).

No entanto o bloqueio dos canais de sódio não é suficiente para manifestar efeito analgésico em alguns testes, como por exemplo, com o teste da formalina, no qual a droga apresenta efeito antinociceptivo, apenas com doses maiores que as doses anticonvulsivantes (SHANNON, 2005).

Adicionalmente, o TP apresenta efeito modulador sobre o receptor do glutamato, um neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central. Essa ação se dá por bloqueio do receptor AMPA-KA, ou seja, por antagonismo em receptor não MND A (PETROFF *et al*, 2001).

Comparando com as outras DAE, esse efeito é exclusivo dessa substância e contribui para a diminuição da atividade excitatória neuronal. Dessa forma o TP interfere com o influxo de cálcio neuronal, tendo em vista que os receptores AMPA-KA aumentam o influxo celular destes íons divalentes. Essa ação antagonista

poderia inclusive ser responsável pelo efeito neuroprotetor atribuído a essa substância (POUSEN *et al*, 2004; PERUCCA, 2005).

Outro componente importante do mecanismo de ação do TP é sua capacidade moduladora do GABA; essa propriedade foi demonstrada em cultura de neurônios corticais e se dá devido a diminuição da frequência de abertura do canal de cloreto deste neurotransmissor. O efeito do TP nesses canais foi semelhante aos benzodiazepínicos no receptor GABA α , no entanto, não foi antagonizado pelo flumazenil demonstrando assim que o sítio de ligação ao receptor é diferente daquele no qual se liga os benzodiazepínicos. Alguns trabalhos mostram que os níveis de concentração do GABA no cérebro estão aumentados após administração do TP (WHITE, 2005).

O TP demonstrou atividade inibidora sobre canais de cálcio tipo N e L voltagem dependente em neurônios piramidais com a técnica de *patch clamp* também demonstrando ser dose dependente. Além das ações já descritas o TP também apresenta ação inibidora sobre a anidrase carbônica, especificamente a isoforma C II e C IV. Comparando com a acetazolamida o TP é cerca de 10 a 100 vezes menos potente como inibidor dessa enzima. Esta propriedade inibidora se dá pela presença do grupo sulfato também presente na acetazolamida. Esta ação contribui para manutenção de uma membrana neuronal hiperpolarizada devido ao aumento da concentração intracelular de HCO_3^- . É ainda atribuída ao TP a capacidade de ativação de canais de potássio (THIENEL, 2004 *et al*; DODGSON, 2000).

Do ponto de vista farmacocinético o TP apresenta uma absorção por via oral quase completa podendo ser inclusive administrado com alimentos. Apresenta biodisponibilidade de 81%. Nesta condição há uma diminuição da velocidade de

absorção, porém, não há uma diminuição da quantidade absorvida como dose única diária de 100 a 1200 mg. Não há, portanto, diferença significativa entre a área sob a curva de concentração plasmática em função do tempo quando o TP é utilizado antes ou depois de um farto café da manhã. Após administração por via oral, essa droga apresenta um pico de concentração plasmático depois de duas horas. Apresenta discreto metabolismo e é eliminado quase que completamente pelo rim. A insuficiência renal compromete sua eliminação (GLAUSER, 1999).

Apresenta baixa ligação com proteínas plasmáticas, em torno de 9 a 17% e um volume de distribuição de 6 a 8 L/Kg de peso. É importante frisar que esta baixa ligação à proteínas plasmáticas diminui a possibilidade de interação do TP com outras drogas que apresentem elevada ligação à albumina. Apresenta meia vida de 19 a 23 horas em pacientes saudáveis. Possui metabolismo hepático formando metabólitos a partir de reações de glicuronidação, hidroxilação e hidrólise. É metabolizado principalmente pelo citocromo P450, isoenzima CYP2C19 sendo eliminado principalmente pelo rim (80 % da dose). Cerca de 50 a 80% de uma dose oral é eliminado sem sofrer metabolização. O uso em conjunto com drogas indutoras do metabolismo hepático pode dobrar a quantidade de TP metabolizada, levando a um aumento de 40 a 50 % na sua depuração. Em crianças, assim como em adultos a sua concentração plasmática aumenta linearmente proporcional a dose, no entanto a sua depuração é maior em crianças do que em adultos, conseqüentemente a concentração plasmática alcança níveis mais baixos em pacientes pediátricos que, no entanto, se igualam aos de um adulto durante a adolescência. Dessa forma, pacientes pediátricos precisam de maiores doses do TP para alcançar a mesma concentração plasmática do adulto (GARNETT, 2000).

Em pacientes com déficit da função renal, foi mostrada uma diminuição da eliminação da droga, devendo por isso ser utilizado a metade da dose nesses pacientes. A hemodiálise diminui a meia vida do produto e durante este procedimento pacientes em uso dessa DAE, deve receber um suplemento de dose

para que não haja um comprometimento na eficácia dessa substância. Em pacientes com função hepática comprometida, o aumento na concentração plasmática do TP não é considerado clinicamente importante. Por isso, não deve ter suas doses ajustadas em tal situação (GARNETT, 2000).

Clinicamente o TP é bem tolerado. Normalmente seus efeitos adversos mais importantes são: a sonolência, a fadiga, perda de peso e devido a sua ação inibidora sobre a anidrase carbônica, pode precipitar a formação de cálculos renais. Está associado também com perda de memória e alguns pacientes reclamam da modificação do sabor de algumas bebidas como, por exemplo, as bebidas carbonadas. Além desses efeitos podem ainda ser citados: parestesias, nistagmo, náusea, diplopia, tremores, dificuldades de fala e tonturas (GLAUSER, 1999; WALIA *et al*, 2004).

Os eventos adversos são mais comuns nos primeiros três meses de terapia, que é o período correspondente à titulação da dose. Em adultos a incidência de efeitos adversos no sistema nervoso central é maior com doses de 1000mg/dia. Em crianças foram relatadas alterações comportamentais com sinais de agressividade. Tal reação é inclusive responsável pela interrupção do tratamento em alguns pacientes. Também foi relatada a ocorrência de depressão em cerca de 15% de pacientes adultos e 13% em pacientes pediátricos e psicose em 3% dos casos (REITH, 2003).

Muitos desses efeitos desapareceram com a continuidade da terapêutica. A redução do peso é mais acentuada com maiores doses e tende a se estabilizar após 12 a 18 meses de tratamento. No caso de intolerância por parte do paciente, a dose do TP pode ser reduzida em 100 a 200 mg por dia em intervalos semanais. Raros

efeitos graves também foram relatados com o TP, como por exemplo: acidose metabólica, miopatia aguda, crises de glaucoma e hipertermia (ARNONE, 2005).

O TP pode interagir com algumas drogas, dentre elas podemos citar os próprios anticonvulsivantes como a fenitoína e a carbamazepina que são indutores metabólicos. Essa interação leva a uma diminuição de mais 40% na concentração plasmática do TP quando comparamos àquela verificada com a administração do TP como monoterapia. O TP diminui a concentração sérica de digoxina em até 13% e os níveis séricos do componente estrogênico dos anticoncepcionais em até 30%, quando utilizado em doses de 400mg por dia sugerindo a necessidade de uso de elevadas doses de estrogênio em pacientes na idade fértil e possibilidade de gravidez em mulheres que estejam utilizando o TP (GARNETT, 2000).

Considerando todas essas propriedades farmacológicas do TP principalmente no que se referem as suas vantagens sobre os outros anticonvulsivantes com relação ao seu perfil de segurança, torna-se interessante a investigação de seus efeitos antinociceptivos, pois isso poderia contribuir para um melhor uso do TP como analgésico. Além do mais, tal investigação poderia contribuir de forma bastante significativa para o entendimento dos mecanismos moleculares de ação dessa droga.

OBJETIVOS

2.0 Objetivos:

2.1 Gerais:

Avaliar os efeitos analgésicos do Topiramato (TP) ao nível do sistema nervoso central e periférico, através de testes de dor aguda e de dor crônica, assim como a interação entre o TP e outras substâncias que possam interferir em seu efeito analgésico.

2.2 Específicos:

1. Estudar os efeitos antinociceptivos do TP nos seguintes modelos de dor aguda e crônica:
 - Teste da capsaicina
 - Teste da formalina
 - Teste da placa quente
 - Teste de von Frey
2. Estudar a interação entre TP, naloxona, ciproheptadina, ondansetrona e glibenclamida para avaliação dos possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo.
3. Avaliar o efeito do TP sobre o teste do campo aberto e Rota rod para observar a existência de efeito depressor central e/ou relaxante muscular que possa interferir na resposta nos teste de dor.

MATERIAIS

3.0 MATERIAIS

3.1. O TOPIRAMATO

O topiramato-TP (Mazi - lote YM 0060805) foi dissolvido em um veículo constituído de água deionizada contendo 1M de NaOH (2,5% vol: vol) sendo a solução final protegida contra a luz.

3.2- Animais.

Para os testes de dor aguda foram utilizados camundongos Swiss machos com peso variando entre 25 e 35 g provenientes do biotério do Núcleo de Pesquisa com Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí. Os animais utilizados no teste de dor neuropática foram ratos albinos que pesavam entre 200 e 250 g e foram provenientes do mesmo local.

Durante os experimentos os animais foram mantidos em gaiolas com no máximo 10 animais, em condições ambientais semelhantes, com ciclo de alternância claro/escuro de 12 horas, recebendo água *ad libitum*. Foi utilizado o menor número possível de animais, suficientes apenas para a realização dos testes. Os estímulos dolorosos foram os menores possíveis, tendo em vista o sofrimento desnecessário dos animais utilizados nos experimentos.

3.3 – Drogas e reagentes.

Substâncias	Origem
Capsaicina	Sigma, USA
Ciproptadina	Sigma, USA
Cloridrato de naloxona	Sigma, Brasil
Formaldeido	Dinâmica, Brasil
Glibenclamida	MAZE, Brasil
Hidróxido de sódio	ISO FAR, Brasil
Ondansetrona (Nause-dronf [®])	Cristália, Brasil
Sulfato de morfina (Dimorf [®])	Cristália, Brasil

3.4. Equipamentos

Equipamento

Balança para pesar animais

Balança analítica (mod. AR2140)

Campo aberto

Placa quente (mod. 7280)

Rota-rod

Seringas plásticas e agulhas

Vidrarias

Câmaras de observação - formalina

Origem

Filizola, Brasil

Toledo, Brasil

NPPM- PI

Ugo Basile, Itália

Insigth, Brasil

B-D, Brasil

Pirex, U.S.A

NPPM- PI

MÉTODOS

4.0 MÉTODOS

4.1. Atividade Antinociceptiva

4.1.1. Teste da capsaicina.

Camundongos Swiss machos, com peso de 25-30g, divididos em 5 grupos de 7 animais foram tratados por via oral com o TP (20; 40 e 80mg/kg) , morfina (5mg/kg i.p) e veiculo (solução 1M de NaOH- 2,5% vol:vol v.o) Após uma hora da administração oral do TP, foi administrado a capsaicina nos animais (1µg/pata) e a nocicepção foi avaliada através da quantificação do tempo que o animal permaneceu lambendo a pata que recebeu a solução de capsaicina por um período de 5 minutos. A morfina foi administrada 30 minutos por via i.p antes da administração da capsaicina e utilizada como controle positivo.

• Teste da Capsaicina

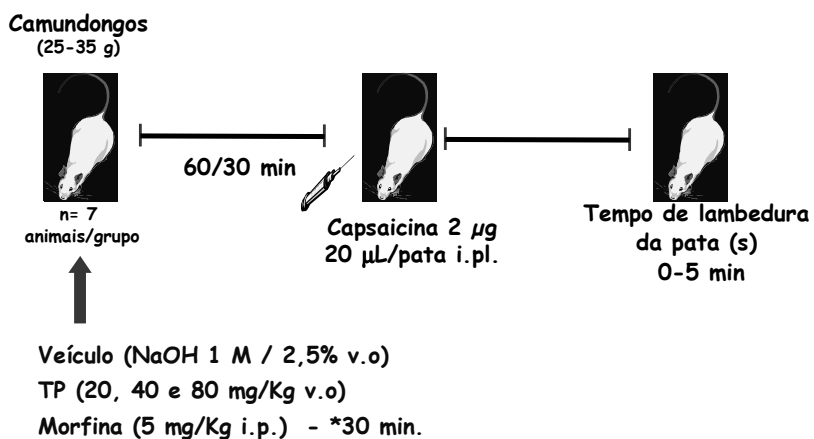


Fig 02.

4.1.2 Teste de formalina.

Foram utilizados camundongos Swiss machos, 25-35g, divididos em 5 grupos de 10 animais. Os grupos foram tratados com o TP nas doses de 20; 40 e 80 mg Kg v.o e veiculo (solução 1M de NaOH- 2,5% vol:vol v.o) administrados 1 hora antes do inicio da administração da solução de formalina. Morfina foi utilizada por via i.p na dose de 5 mg/Kg como controle positivo, 30 minutos antes da realização experimento. A nocicepção foi avaliada através da quantificação do tempo que o animal permaneceu lambendo a pata que recebeu formalina 2 % , 20 µL administrados na região intraplantar, de 0-10 minutos (primeira fase) e de 20-40 minutos (segunda fase).

• Teste da Formalina

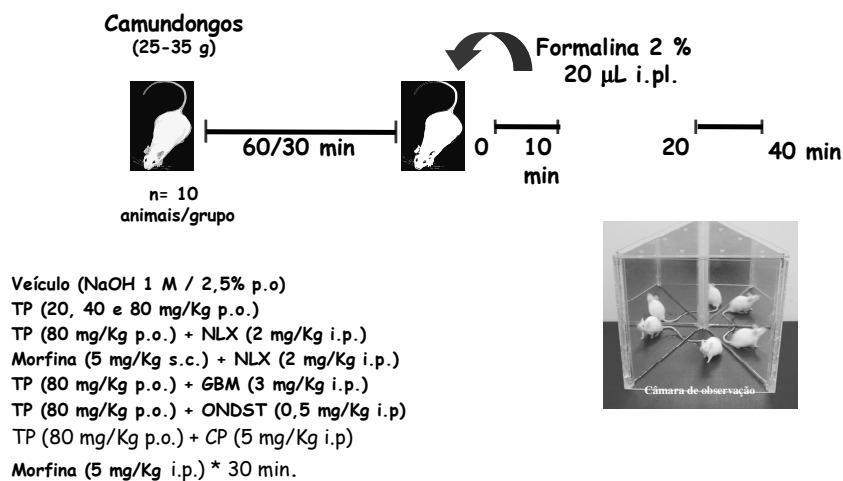


Fig 03.

Para avaliação da associação do TP com a naloxona (2mg/kg por via subcutânea, s.c.), utilizamos 6 grupos de camundongos Swiss machos, 25-30g com 6 animais cada. Um grupo recebeu TP (80 mg/Kg v.o) uma hora antes do experimento e um outro grupo recebeu TP (80 mg/Kg v.o) e naloxona (2mg/kg s.c) 45 minutos antes do experimento. Os demais receberam morfina (5mg/kg i.p), naloxona (2mg/kg s.c) e veiculo (solução 1M de NaOH- 2,5% vol:vol v.o).

Para a avaliação da associação de TP com glibenclamida 3mg/Kg, foi acrescentado um grupo dessa associação (TP 80mg/kg e glibenclamida 3mg/kg) sendo o TP administrado por via oral, uma hora antes do experimento e a glibenclamida administrada por via intraperitoneal 45 minutos antes da administração da formalina. Foram utilizados 6 animais por grupo. O efeito antinociceptivo foi avaliado como descrito anteriormente.

Avaliou-se também o efeito do TP (80 mg/Kg v.o) quando associado com a ciproptadina 5mg/Kg administrada por via intraperitoneal, 45 minutos antes da administração da formalina. Procedimento semelhante foi utilizado para realização da verificação do efeito da associação TP (80 mg/Kg p.o) com ondansetrona (0,5 mg/Kg). Foram utilizados 6 animais por grupo.

4.1.3 Placa quente.

O teste foi utilizado para avaliar a eficácia do TP contra a nocicepção térmica e de ação central. Foram utilizados camundongos Swiss machos, com peso de 25-35 g, divididos em 5 grupos de 10 animais, sendo os mesmos pré-selecionados pela passagem individual na placa quente mantida a $52 \pm 0,5$. Aqueles animais que mostraram tempo de reação (lamber as patas traseiras ou saltar) superior a 30 segundos foram descartados. O tempo de reação foi registrado antes e 30; 60; 90 e 120 minutos após a administração de TP (20; 40 e 80mg/kg v.o), morfina (5mg/kg i.p) e veiculo (solução 1M de NaOH- 2,5% vol:vol v.o). A nocicepção foi avaliada

através da quantificação do tempo que o animal permaneceu na placa sem saltar ou lambear as patas traseiras.

• Teste da Placa Quente

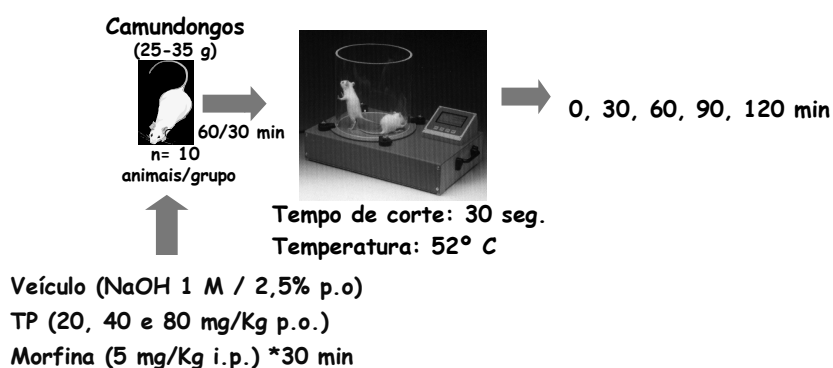


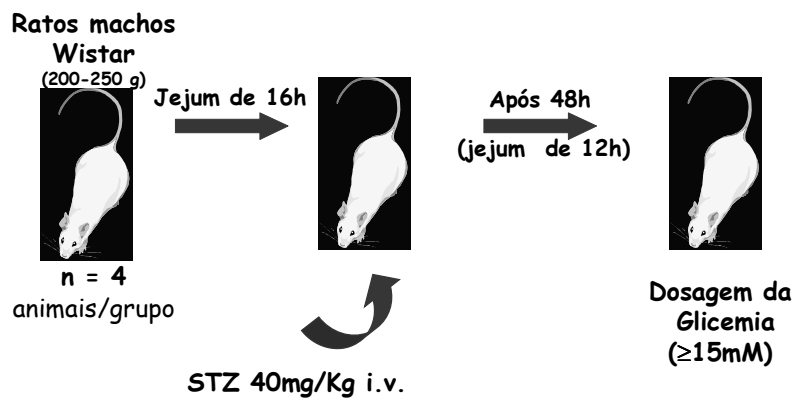
Fig 04.

4.1.4 Teste dos filamentos de von Frey.

Na avaliação do efeito do TP neste protocolo, foram utilizados ratos machos diabéticos divididos em 3 grupos de 4 animais, onde foram usadas as doses: 40 e 80 mg/Kg v.o de TP e o veículo (solução 1M de NaOH- 2,5% vol:vol v.o). As soluções foram administradas por via oral uma hora antes da realização do experimento. Induziu-se o diabetes experimental com estreptozotocina na dose de 40 mg/kg por via intravenosa. Para isto, os animais foram colocados em jejum por um período de 12 horas. Após 48 h a administração da estreptozotocina, foi realizada a dosagem de glicose nos animais para verificar a indução da diabetes e confirmado isso, os animais foram acompanhados durante um mês para a instalação da lesão neuropática (DA DELFINO, 2002; PUSHPARAJ, 2007). No fim dos 30 dias, foi

dosada a glicemia dos animais para verificar o nível da glicose. Após esse período, foi avaliada a sensibilidade tátil com os filamentos de von Frey (0,07-2 g)

• Indução do Diabetes



• Teste de von Frey

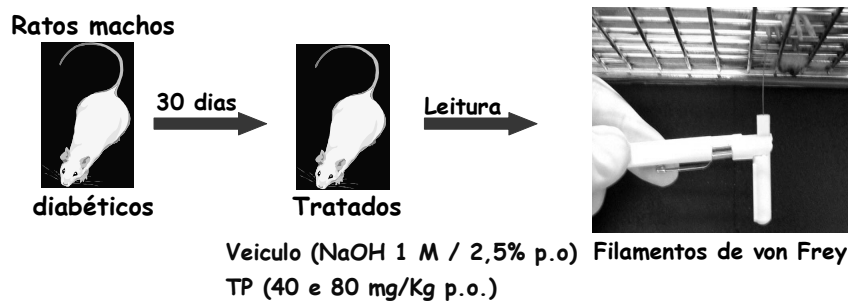


Fig. 05

4.1.5- Avaliação da atividade motora espontânea.

Teste do campo aberto.

A atividade exploratória dos animais foi verificada através de um campo aberto, quadrangular (30X30X15 cm), sendo sua base dividida em 9 quadrantes de diâmetros iguais. Foram utilizados camundongos Swiss machos, de 25-35 g, divididos em 3 grupos de 7 animais tratados com TP (80mg/kg v.o), veículo (solução 1M de NaOH- 2,5% vol:vol v.o) uma hora e diazepam (2,0 mg.kg, i.p) 30 minutos antes dos animais serem levados individualmente ao campo aberto e observados por um período de 5 minutos. Foram observados os seguintes parâmetros: número de quadrantes atravessados, número de *Rearing* e *Grooming*. Os animais foram inicialmente colocados na área do campo aberto por um período de 5 minutos. Imediatamente depois foram levados ao *Rota Rod* e foram avaliados por 1 minuto (Melo, 2005). Por *Rearing* entende-se o ato do camundongo levantar-se sobre as patas traseiras e por *Grooming* os movimentos de alto limpeza.

Teste do *Rota Rod*

O *Rota Rod* constitui-se de um instrumento que apresenta uma barra giratória com velocidade controlada onde os animais são colocados e avaliados quanto ao tempo de permanência nessa barra. Este procedimento avalia o grau de relaxamento muscular do animal. Para execução deste protocolo os camundongos foram pré-selecionados sem administração de nenhuma droga, sendo considerados aptos ao teste àqueles animais que permaneceram na barra giratória (velocidade de 12 rpm) por 60 segundos. Foram utilizados camundongos Swiss machos, 25-35g, divididos em 3 grupos de 7 animais cada.

Campo aberto e Rota Rod

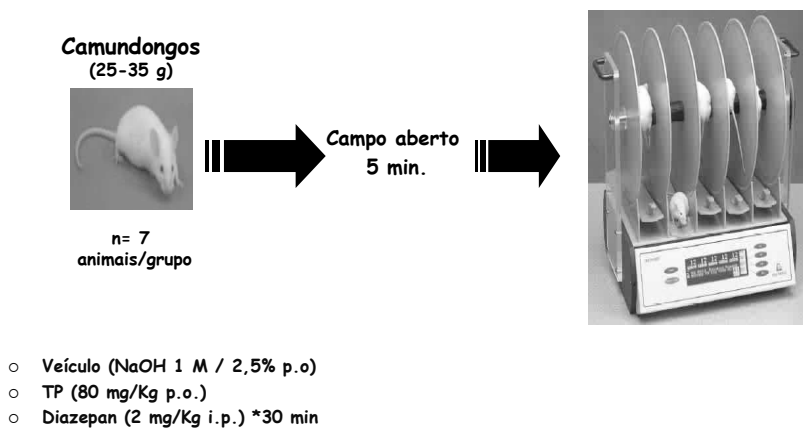


Fig 06

Vinte e quatro horas após a seleção, os animais foram tratados com veículo (controle) e com o TP na dose de 80 mg/Kg v.o, e transcorridos uma hora deste tratamento, os animais foram colocados nas barras giratórias e o tempo de permanência foi registrado sendo contado de forma cumulativa, limitando-se as observações ao tempo máximo de 1,0 minuto por animal ou três reconduções à barra.

4.1.6 – Análise estatística.

Os dados foram analisados pelo programa gráfico Prisma 3.0 e os resultados foram expressos como média +/- E.P.M dos valores. Para comparação múltipla dos dados paramétricos foi utilizada a análise de variância (*one way* - ANOVA), e a significância entre os grupos foi estabelecida pelo teste de *Tukey*. Em todas as análises estatísticas, considerou-se o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menor que 0,05 ($p < 0,005$).

RESULTADOS

5.0 RESULTADOS

5.1. Efeito do TP na nocicepção induzida por capsaicina em camundongos.

O TP nas doses de 20; 40 e 80 mg/Kg por via oral não reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) o tempo gasto pelos animais lambendo a pata, após a administração de capsaicina 2,0 μg ($13,93 \pm 1,62$ s.; $13,90 \pm 1,83$ s.; $15,91 \pm 2,32$ s respectivamente) na pata do animal em relação ao grupo controle ($18,98 \pm 2,08$ s), como mostrado na tabela 01 e figura 07.

A morfina (5 mg/kg), um analgésico opióide, demonstrou-se efetiva ($p < 0,001$) e provocou uma diminuição do tempo de lambida da pata do animal após a administração de capsaicina ($7,51 \pm 2,27$ s) quando comparado com o controle ($18,98 \pm 2,08$ s) (Tabela 01 e Figura 07).

TABELA 01- Efeito do TP no teste da nocicepção induzida por capsaicina em camundongos.

Grupo	Dose mg/Kg , via	Tempo de lambedura(s)	% inibição
Veículo	----, v.o	18,98 ± 2,08	-----
Morfina	5, i.p	7,51 ± 2,28***	60,43%
TP	20, v.o	13,93 ± 1,62	-----
	40, v.o	13,91 ± 1,84	-----
	80, v.o	15,91 ± 2,39	-----

Os valores representam a média ± E.P.M., do tempo gasto em segundos (s) pelos animais lambendo a pata por um período de 5 min após a injeção intraplantar de capsaicina (2,0 µg/pata). O veículo e Topiramato (TP) foram administrados 1 h antes da administração da capsaicina, enquanto a morfina 30 minutos antes. Foram utilizados 7 animais por grupo sendo considerado $p < 0,05$ como nível de significância. (ANOVA- Tukey) .

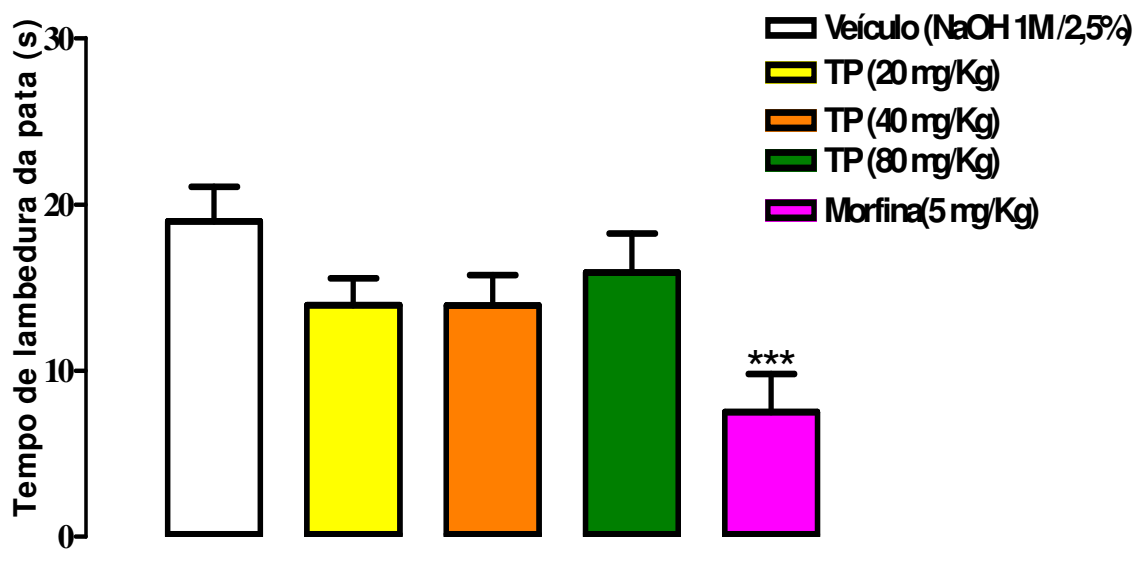


FIGURA 07 – Efeito analgésico do TP no teste da capsaicina em camundongos. O Topiramato (TP) (20; 40 e 80 mg/Kg v.o) e o veículo foram administrados 60 minutos e morfina (5 mg/ kg i.p) 30 minutos antes da injeção subplantar de capsaicina (2 μ g, 20 μ L i.pl.). A nocicepção foi avaliada através da quantificação do tempo que o animal permaneceu lambendo a pata que recebeu a capsaicina. A morfina foi usada como droga padrão. Os valores são representados como média \pm EPM do tempo gasto pelos animais lambendo a pata. Foram utilizados 7 animais por grupo. Não houve significância estatística entre os grupos que receberam TP e o veículo ($p < 0,05$. ANOVA-Tukey).

5.2. Efeito do TP na nocicepção induzida por formalina em camundongos.

O TP (80 mg/Kg) promoveu redução significativa ($p < 0,001$) do tempo em que o animal permaneceu lambendo a pata nas duas fases do teste quando comparado com o controle (1ª fase- TP 80: $9,27 \pm 3,28$ s e controle: $30,72 \pm 4,10$ s; 2ª fase- TP 80: $23,87 \pm 5,69$ s e controle $45,41 \pm 6,26$ s respectivamente). Correspondendo a uma diminuição de 69,82% na primeira fase e de 47% na segunda fase. Nas doses de 20 e 40 mg/Kg, o TP foi efetivo ($p < 0,001$) apenas na segunda fase, quando comparado com o controle ($17,31 \pm 2,58$ s; $23,82 \pm 4,34$ e $45,41 \pm 6,26$ respectivamente) levando a uma diminuição de 61,88 e 47,54% respectivamente como mostrado na Tabela 02 e Figura 08.

A morfina (5mg/Kg), demonstrou ser efetiva ($p < 0,001$) nas duas fases (1ª fase = $10,57 \pm 2,15$ s; 2ª fase = $9,42 \pm 3,29$ s) quando comparada com o controle (1ª fase = $30,72 \pm 4,10$ s; 2ª fase = $45,41 \pm 6,26$ s) (Tabela 02 e Figura 08)

A naloxona (2 mg/Kg), significativamente ($p < 0,001$) inibiu o efeito antinociceptivo da morfina, assim como a antinocicepção induzida pelo TP (80 mg/Kg) na segunda fase (20-40 min), onde podemos observar uma reversão do efeito antinociceptivo do TP ($24,51 \pm 8,42$ s. para $66,29 \pm 7,66$ s.) como mostrado na tabela 03 e figura 09.

A glibenclamida (3 mg/Kg) não reverteu significativamente o efeito do TP (80 mg/Kg) no teste da formalina. Essa inibição também não ocorreu quando da associação de TP (80 mg/Kg) e ondansetrona (0,5 mg/Kg) e ciproheptadina (5 mg/Kg) e como mostrado nas tabelas 04, 05 e 06 e figuras 10, 11 e 12

Tabela 02 – Efeito do TP no teste da formalina em camundongos.

Grupo	Dose mg/Kg - via	Tempo de lambedura(s)		% de inibição	
		1ª fase	2ª fase	1ª fase	2ª fase
Controle (veículo)	_____	30,72 ± 4,10	45,41 ± 6,26	-----	-----
Morfina	5 i.p	10,57 ± 2,15 ^a	9,42 ± 3,29 ^a	65,59	79,25
TP	20, v.o	22,68 ± 3,75	17,31 ± 2,58 ^{a,b}	26,17	61,88
	40, v.o	22,36 ± 2,48	23,82 ± 4,34 ^{a,b}	27,21	47,54
	80, v.o	9,27 ± 3,28 ^{a,b}	23,87 ± 5,69 ^{a,b}	69,82	47,43

Os valores representam a média ± E.P.M., do tempo gasto em segundos (s) pelos animais lambendo a pata por um período de 0-5 minutos (1ª fase) e 20-40 minutos (2ª fase) após a injeção intraplantar de formalina 2%, 20 µL/pata. O veículo e Topiramato (TP) foram administrados 1 hora antes da administração da formalina e morfina 30 minutos antes. Foram utilizados 10 animais por grupo sendo considerado p<0,05 como nível de significância. ^a p<0,001 vs controle, ^b p>0,05 vs morfina (ANOVA-Teste de Tukey).

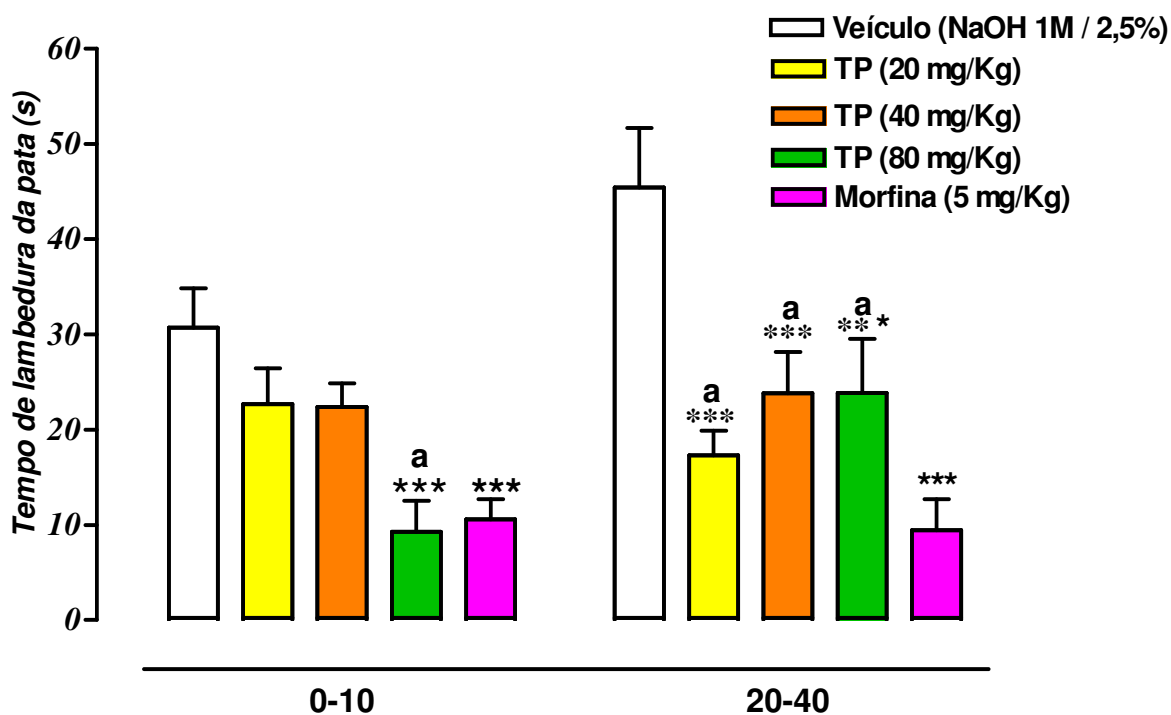


FIGURA 08 – Efeito analgésico do TP no teste da formalina em camundongos. O Topiramato (TP) (20; 40 e 80 mg/Kg v.o) e o veículo foram administrados 60 minutos e morfina (5 mg/ kg i.p) 30 minutos antes da injeção subplantar de formalina 2% (20 μ L i.pl.). A nocicepção foi avaliada através da quantificação do tempo que o animal permaneceu lambendo a pata que recebeu formalina 2 % nas fases de 0-10(1ª fase) e 20-40(2ª fase). A morfina foi usada como droga padrão. Os valores são representados como média \pm EPM e foram utilizados 10 animais por grupo sendo considerado $p < 0,05$ como nível de significância. Houve significância estatística na primeira fase (80mg/Kg) e na segunda fase (20; 40 e 80mg/Kg) de observação do experimento quando comparado com o controle *** $p < 0,001$ vs veículo; ^a $p > 0,05$ vs morfina (ANOVA- Tukey).

Tabela 03 – Efeito do TP no teste da formalina em camundongos.

Grupo	Dose mg/Kg - via	Tempo de lambedura(s)		% de inibição	
		1ª fase	2ª fase	1ª fase	2ª fase
Controle (veículo)	-----, v.o	40,06 ± 8,55	56,32 ± 6,77	-----	-----
Morfina	5 i.p	7,34 ± 0,94 ^a	8,74 ± 2,66 ^a	81,68	84,48
TP	80, v.o	14,34 ± 4,36 ^a	24,51 ± 8,42 ^a	64,21	56,48
TP + Naloxona	80/2, v.o/s.c	17,32 ± 4,88	66,29 ± 7,27 ^b	56,77	-----
Morfina + Naloxona	5/2, i.p/s.c	38,80 ± 6,46 ¹	41,01 ± 7,66 ²	-----	-----
Naloxona	2, s.c	50,40 ± 6,90	51,81 ± 4,88	-----	-----

Os valores representam a média ± E.P.M., do tempo gasto (s) pelos animais lambendo a pata por um período de 0-5 minutos (1ª fase) e 20-40 minutos (2ª fase) após a injeção intraplantar de formalina 2% 20 µL/pata. O veículo e Topiramato (TP) foram administrados 1 hora antes da administração da formalina. A morfina e a Naloxona foram administrada por via subcutânea e i.p, 30 e 45 minutos antes respectivamente. Foram utilizados 6 animais por grupo sendo considerado p<0,05 como nível de significância. ^a p<0,001 vs controle, ^b p>0,05 vs controle, ¹ p<0.001 vs morfina e ² p<0,05 vs morfina. (ANOVA- Teste de Tukey)

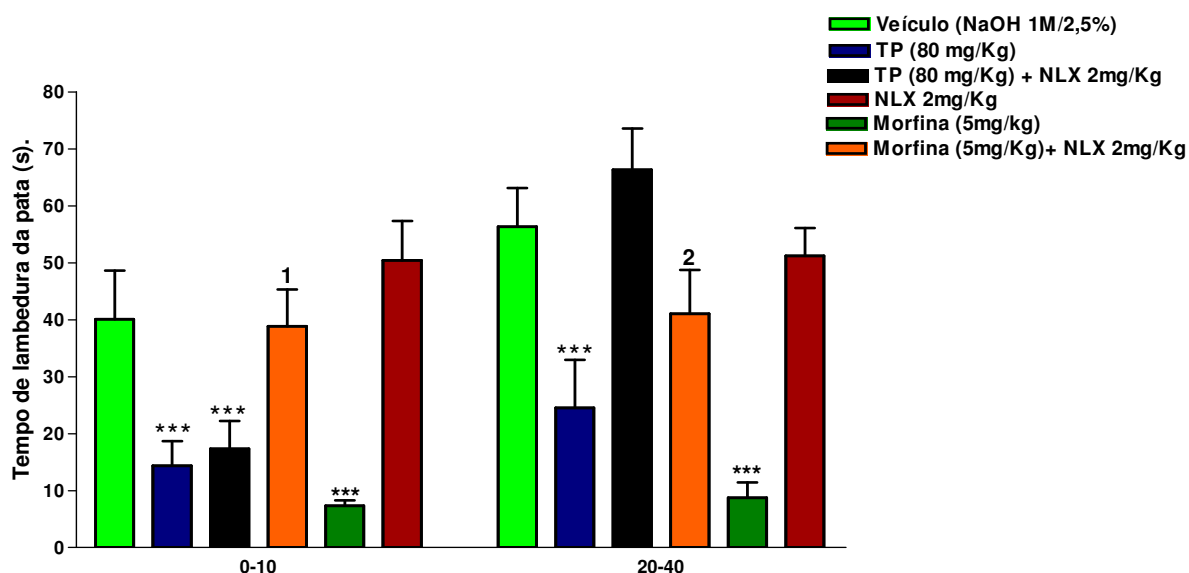


FIGURA 09 – Efeito analgésico do TP no teste da formalina em camundongos. O veículo e Topiramato (TP) foram administrados 1 hora antes da administração da formalina. A morfina 30 minutos e a Naloxona (NLX) foi administrada por via subcutânea 45 minutos antes. Foram utilizados 6 animais por grupo sendo considerado $p < 0,05$ como nível de significância. Os valores representam a média \pm E.P.M., do tempo gasto (S) pelos animais lambendo a pata por um período de 0-5 minutos (1ª fase) e 20-40 minutos (2ª fase) após a injeção intraplantar de formalina 2% , 20 μ L/pata. ¹ $p < 0,001$ vs morfina e ² $p < 0,05$ vs morfina e $***p < 0,001$ vs veículo (ANOVA- Tukey).

Tabela 04 – Efeito do TP no teste da formalina em camundongos.

Grupo	Dose mg/Kg , via	Tempo de lambedura(s)		% de inibição	
		1ª fase	2ª fase	1ª fase	2ª fase
Controle (veículo)	_____	40,07 ± 8,56	56,32 ± 6,77	-----	-----
Morfina	5 i.p	9,03 ± 1,89 ^a	7,53 ± 2,56 ^a	77,46	86,62
TP	80, v.o	13,11 ± 4,86 ^a	19,36 ± 5,37 ^a	67,28	65,62
TP+GLB	80/3, v.o/s.c	17,00 ± 4,40 ^{b,1}	22,45 ± 6,95 ^{a,1}	57, 22	60,13
GLB	3, s.c	31,01 ± 3,39 ^c	51,04 ± 5,65 ^c	-----	-----

Os valores representam a média ± E.P.M., do tempo gasto (s) pelos animais lambendo a pata por um período de 0-5 minutos (1ª fase) e 20-40 minutos (2ª fase) após a injeção intraplantar de formalina 2% 20 µL/pata. O veículo e topiramato (TP) foram administrados 1 hora antes da administração da formalina. A morfina e a glibenclamida (GLB) foram administradas por via i.p e s.c 30 minutos antes respectivamente. Foram utilizados 6 animais por grupo sendo considerado p<0,05 como nível de significância. ^a p<0,001 vs controle, ^b p<0,01 vs controle, ^c p>0,05 vs controle, ¹p>0,05 vs TP (ANOVA- Teste de Tukey)

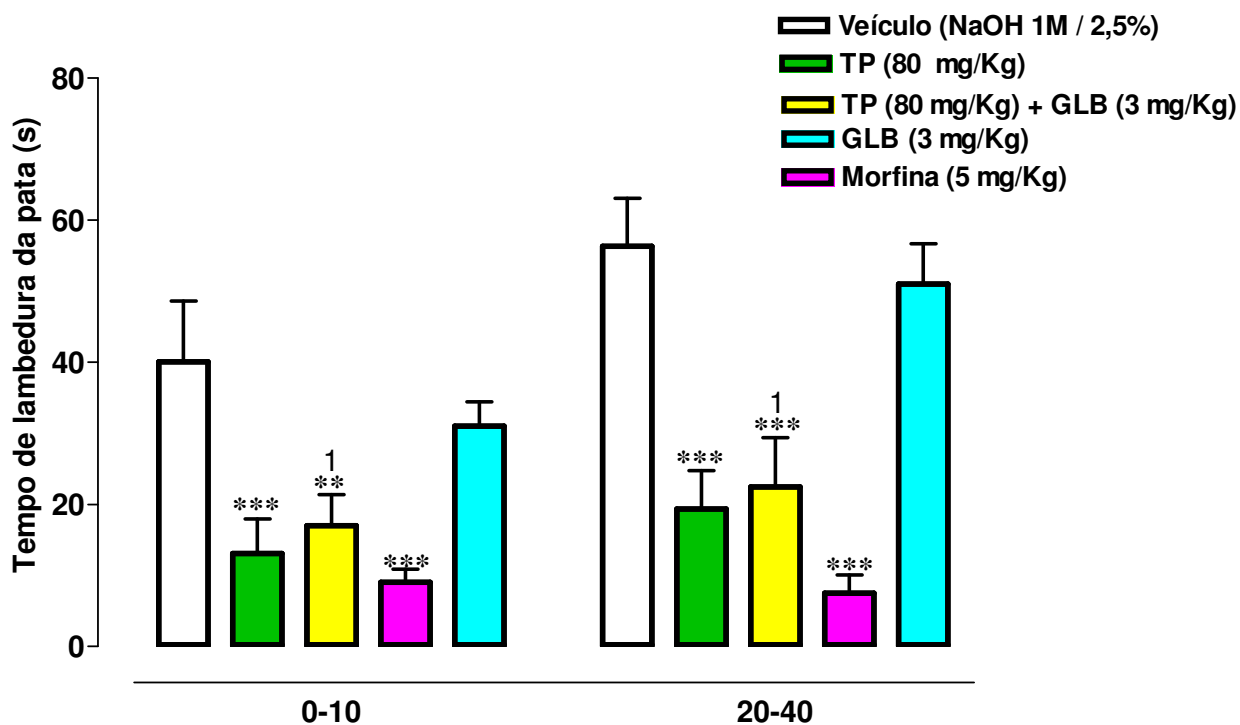


FIGURA 10 – Efeito analgésico do TP no teste da formalina em camundongos. O veículo e topiramato (TP) foram administrados 1 hora antes da administração da formalina. A morfina 30 minutos e a glibenclamida (GLB) foram administradas por via intraperitoneal 30 minutos antes. Foram utilizados 6 animais por grupo sendo considerado $p < 0,05$ como nível de significância. Os valores representam a média \pm E.P.M., do tempo gasto (s) pelos animais lambendo a pata por um período de 0-5 minutos (1ª fase) e 20-40 minutos (2ª fase) após a injeção intraplantar de formalina 2% 20 μ L/pata. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ vs veículo e ¹ $p > 0,05$ vs TP (ANOVA- Tukey).

Tabela 05 – Efeito do TP no teste da formalina em camundongos.

Grupo	Dose mg/Kg – via	Tempo de lambedura(s)		% de inibição	
		1ªfase	2ªfase	1ª fase	2ª fase
Controle (veículo)	-----	41,24 ± 8,35	51,20 ± 5,49	-----	-----
Morfina	5, i.p	7,56 ± 0,90 ^a	7,31 ± 2,42 ^a	81,66	85,72
TP	80, v.o	10,77 ± 5,28 ^b	23,32 ± 4,36 ^b	73,88	54,45
TP/ONDST	80/0,5. v.o/i.p	18,94 ± 2,72 ^{b,1}	25,16 ± 5,03 ^{b,1}	54,07	50,85
ONDST	0,5. i.p	45,43 ± 3,27 ²	49,975 ± 4,85 ²	-----	-----

Os valores representam a média ± E.P.M., do tempo gasto (s) pelos animais lambendo a pata por um período de 0-5 minutos (1ªfase) e 20-40 minutos (2ªfase) após a injeção intraplantar de formalina 2% 20 µL/pata. O veículo e TP foram administrados 1 hora antes da administração da formalina. A morfina e a ondansetron (ONDST) foram administradas por via intraperitoneal 30 minutos antes. Foram utilizados 6 animais por grupo sendo considerado p<0,05 como nível de significância. ^a p<0,001 vs controle, ^b p<0,01 vs controle ¹p>0,05 vs TP e ²p>0,05 vs controle (ANOVA- Teste de Tukey)

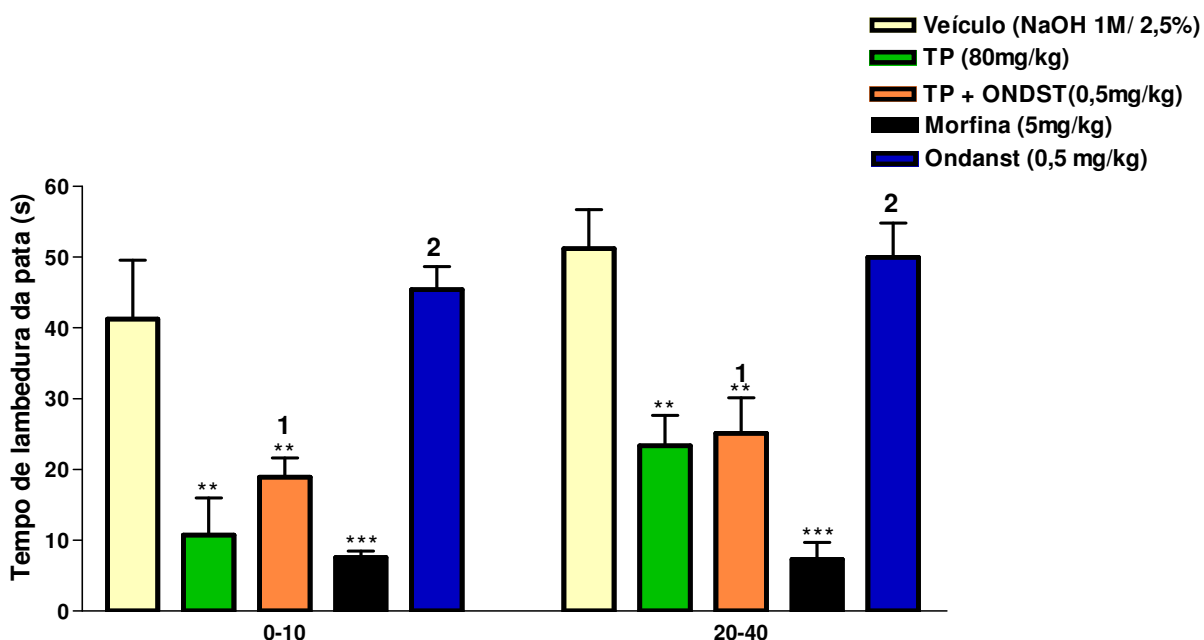


FIGURA 11 – Efeito analgésico do TP no teste da formalina em camundongos. Os valores representam a média \pm E.P.M., do tempo gasto (s) pelos animais lambendo a pata por um período de 0-5 minutos (1^a fase) e 20-40 minutos (2^a fase) após a injeção intraplantar de formalina 2%, 20 μ L/pata. O veículo e Topiramato (TP) foram administrados 1 hora antes da administração da formalina. A morfina e a ondansetron (ONDST) foi administrada por via intraperitoneal 30 minutos antes. Foram utilizados 6 animais por grupo sendo considerado $p < 0,05$ o nível de significância. *** $p < 0,001$ vs controle, ** $p < 0,01$ vs controle; ¹ $p > 0,05$ vs TP e ² $p > 0,05$ vs controle (ANOVA-Tukey)

Tabela 06 – Efeito do TP no teste da formalina em camundongos.

Grupo	Dose mg/Kg, via	Tempo de lambedura(s)		% de inibição	
		1 ^a fase	2 ^a fase	1 ^a fase	2 ^a fase
Controle (veículo)	----, p.o	40,34 ± 6,67	48,99 ± 5,19	-----	-----
Morfina	5, i.p	7,39 ± 0,94 ^a	8,748 ± 2,66 ^a	81,68	82,15
TP	80, p.o	12,70 ± 4,86 ^a	20,34 ± 4,85 ^a	68,51	58,48
TP/CP	80/0,5,p.o;i.p	21,61 ± 2,18 ^{b,1}	20,37 ± 4,32 ^{a,1}	46,43	58,42
CP	0,5- i.p	38,34 ± 2,72 ²	55,57 ± 6,79 ²	-----	-----

Os valores representam a média ± E.P.M., do tempo gasto (s) pelos animais lambendo a pata por um período de 0-5 minutos (1^afase) e 20-40 minutos (2^afase) após a injeção intraplantar de formalina 2% 20 µL/pata. O veículo e topiramato (TP) foram administrados 1 hora antes da administração da formalina. A morfina e a ciproptadina (CP) foi administrada por via intraperitoneal 30 minutos antes. Foram utilizados 6 animais por grupo sendo considerado p<0,05 como nível de significância. ^a p<0,001 vs controle, ^b p<0,01 vs controle ¹p>0,05 vs TP e ²p>0,05 vs controle (ANOVA- Teste de Tukey).

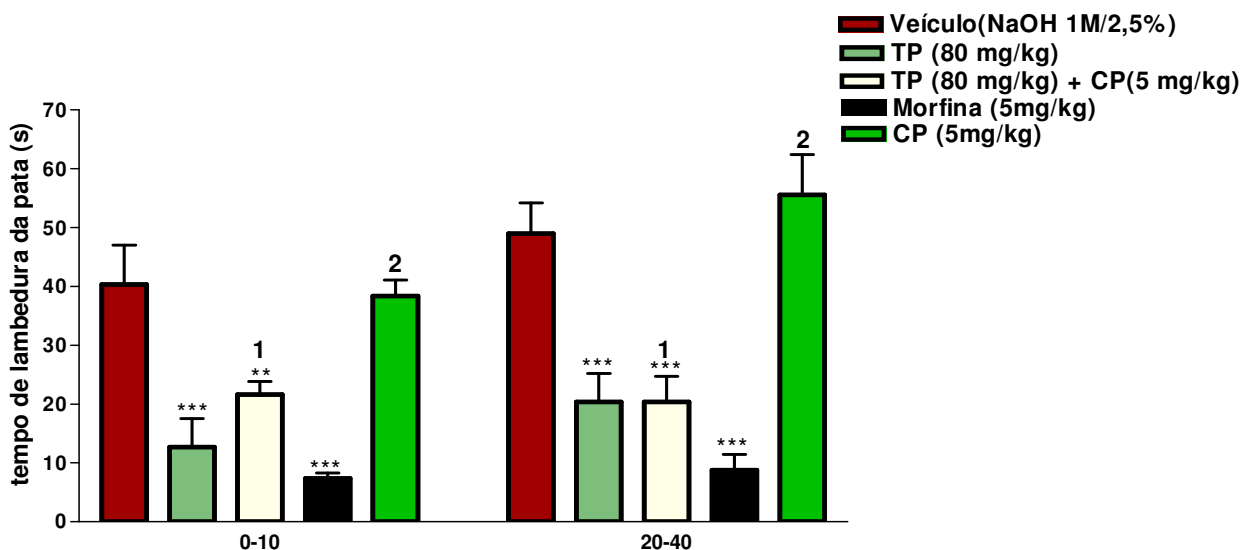


FIGURA 12 – Efeito analgésico do TP no teste da formalina em camundongos. O veículo e Topiramato (TP) 80 mg/Kg foram administrados 1 hora antes da administração da formalina. A morfina 5 mg/Kg, 30 minutos e a ciproetadina (CP) 5 mg/Kg foi administrada por via intraperitoneal 30 minutos antes. Foram utilizados 6 animais por grupo sendo considerado $p < 0,05$ como nível de significância. Os valores representam a média \pm E.P.M., do tempo gasto (s) pelos animais lambendo a pata por um período de 0-5 minutos (1ª fase) e 20-40 minutos (2ª fase) após a injeção intraplantar de formalina 2% , 20 μ L/pata. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ vs veículo, ¹ $p > 0,05$ vs TP e ² $p > 0,05$ vs veículo (ANOVA- Tukey).

5.3. Efeito do TP no teste da placa quente em camundongos.

O TP foi efetivo ($p < 0,05$) apenas na dose de 80 mg/Kg, por via oral, quando comparado com o controle nos intervalos de 90 ($16,80 \pm 2,44$ s; $7,15 \pm 1,02$ s. respectivamente) e 120 minutos ($19,05 \pm 2,64$ s; $5,79 \pm 0,98$ s. respectivamente) como mostrado na Tabela 07 e Figura 13.

A morfina, um analgésico opióide, mostrou-se efetiva em todos os tempos registrados ($t = 00$ min: $11,76 \pm 1,08$ s.; $t = 30$ min: $19,84 \pm 2,31$ s.; $t = 60$ min: $19,66 \pm 1,97$ s.; $t = 90$ min: $17,45 \pm 2,31$ s; e $t = 120$ min: $15,18 \pm 1,67$ s) quando comparada com o controle ($t = 00$ min.: $12,11 \pm 1,19$ s.; $t = 30$ min: $12,55 \pm 1,93$ s.; $t = 60$ min: $9,23 \pm 1,72$ s.; $t = 90$ min: $7,15 \pm 1,02$ s.; e $t = 120$ min: $5,79 \pm 0,98$ s) como mostrado na Tabela 07 e figura 13.

Tabela 07 – Efeito do TP no teste da Placa quente em camundongos.

Grupo	Dose mg/Kg - via	Tempo de reação (s)				
		T=0	t=30	t=60	t=90	t=120
Controle (veículo)	----, p.o	12,11 ± 1,197	12,55 ± 1,93	9,230 ± 1,72	7,15 ± 1,02	5,79 ± 0,96
Morfina	5, i.p	11,760 ± 1,08	19,84 ± 2,31	19,66 ± 1,98 ^a	17,45 ± 2,32 ^b	15,18 ± 1,67 ^c
TP	80, v.o	10,11 ± 1,36	12,96 ± 1,88	15,55 ± 1,90	14,84 ± 2,33 ^c	15,93 ± 2,95 ^c
TP	40, v.o	12,51 ± 0,59	13,900 ± 1,67	14,24 ± 1,00	11,79 ± 1,20	13,12 ± 2,52
TP	20, v.o	10,47 ± 0,61	11,14 ± 0,92	11,08 ± 0,90	8,58 ± 0,66	10,43 ± 0,97

Os valores representam a média ± E.P.M., do tempo de reação (s) á placa quente (52 ± 0,5), que consiste em os animais saltarem ou lamberem as patas traseiras, registrado antes (t=0) e 30, 60, 90 e 120 minutos após os tratamentos. Foram utilizados 10 animais por grupo sendo considerado p<0,05 como nível de significância. ^ap< 0,001 vs controle, ^bp< 0,01 vs controle e ^cp< 0,05 vs controle (ANOVA- Teste de Tukey).

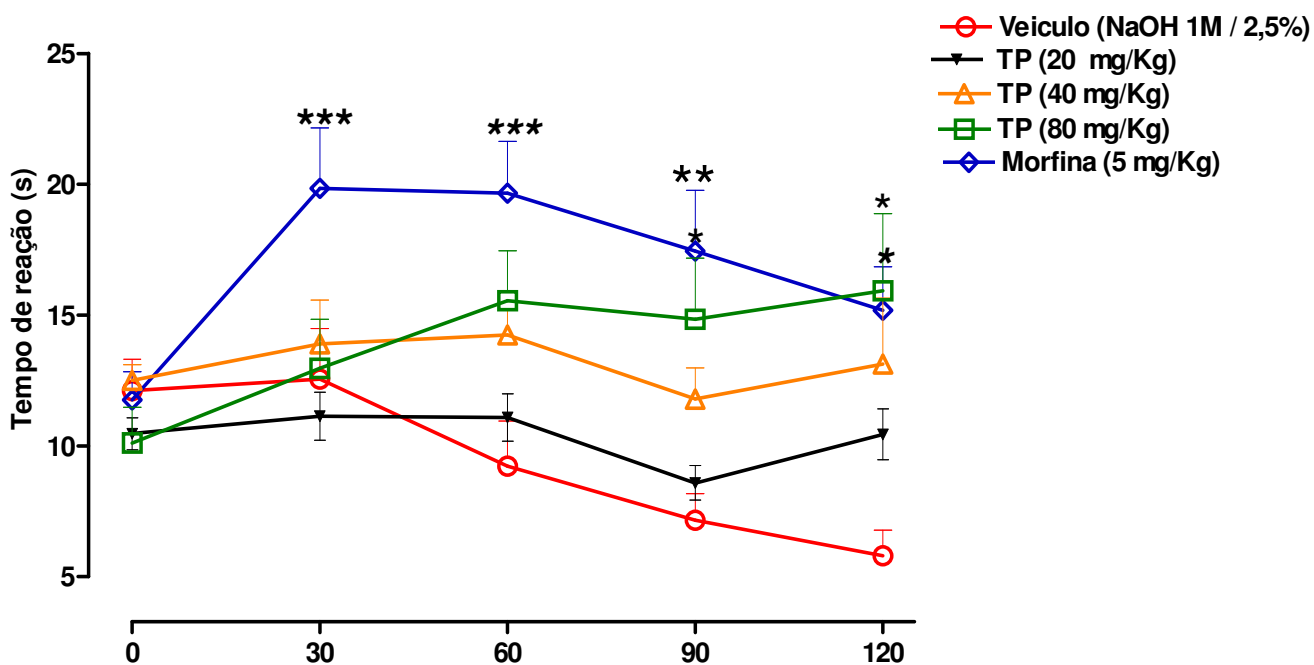


FIGURA 13 – Efeito analgésico do TP no teste da placa quente em camundongos. Os valores representam a média \pm E.P.M., do tempo de reação (s) á placa quente ($52 \pm 0,5$ °C), que consiste em os animais saltarem ou lamberem as patas traseiras, registrado antes (t=0) e 30, 60, 90 e 120 minutos após os tratamentos. Foram utilizados 10 animais por grupo sendo considerado $p < 0,05$ como nível de significância. *** $p < 0,001$ vs controle, ** $p < 0,01$ vs controle e * $p < 0,05$ vs controle (ANOVA- Tukey).

5.4 Efeito analgésico do TP no teste dos filamentos de von Frey em ratos.

O TP (40 e 80 mg/Kg) por via oral não foi efetivo considerando $p < 0,05$, em diminuir a dor neuropática no modelo dos filamentos de von Frey quando comparado com controle (Tabela 08 e figura 14).

Tabela 08 – Efeito do TP no teste dos Filamentos de von Frey em camundongos.

Grupo	Dose mg/Kg, via	Limiar de sensibilidade nos tempos de observação (min)		
		T=0	T=60	T=120
Controle (veículo)	----, v.o	0,34 ± 0,06	0,44 ± 0,10	0,50 ± 0,05
TP	80, v.o	0,28 ± 0,06	0,33 ± 0,10	0,24 ± 0,11
TP	40, v.o	0,28 ± 0,06	0,40 ± 0,00	0,44 ± 0,10

O topiramato (TP 40 e 80 mg/Kg v.o) e veículo foram administrados 60 min antes do experimento. Na avaliação do efeito do topiramato na dor neuropática, induziu-se o diabetes experimental com estreptozotocina (40 mg/kg i.v.) em ratos machos Wistar e após 1 mês a sensibilidade tátil foi avaliada utilizando-se os filamentos de von Frey (0,07-2g). Os valores são representados como média ± EPM e foram utilizados 4 ratos por grupo. As medidas foram realizadas no tempo 0, 60 e 120 minutos após a administração do Topiramato. Não houve significância estatística no experimento. ($p < 0,05$. ANOVA- Tukey). T=0, tempo: zero; T=60, tempo: 60 minutos e T=120, tempo: 120 minutos.

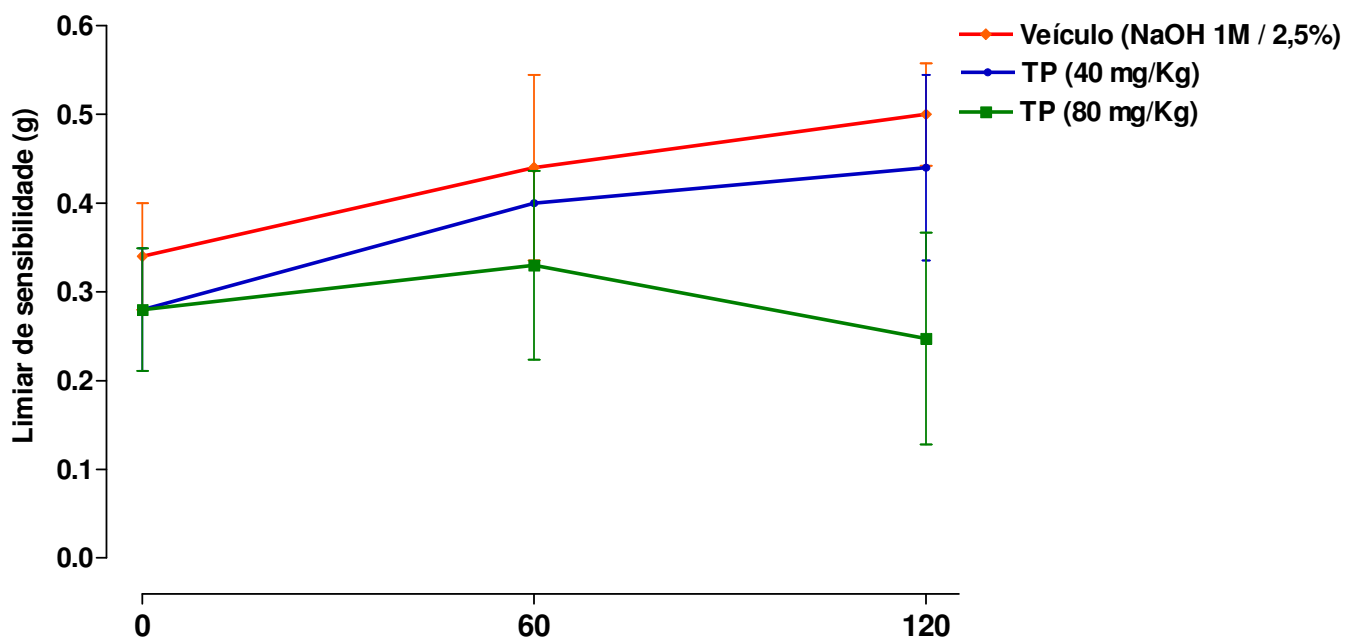


Figura 14. Efeito antinociceptivo do TP no teste dos filamentos de von Frey em ratos. O Topiramato (TP) (40 e 80 mg/Kg v.o) e veiculo foram administrados 60 minutos antes do experimento. Na avaliação do efeito do Topiramato (TP) na dor neuropática, induziu-se o diabetes experimental com estreptozotocina (40 mg/kg i.v.) em ratos machos Wistar e após 1 mês a sensibilidade tátil foi avaliada com os filamentos de von Frey (0,07-2 g). Os valores são representados como média \pm EPM e foram utilizados 4 ratos por grupo. As medidas foram realizadas no tempo 0, 60 e 120 minutos após a administração do TP. Não houve significância estatística no experimento. ($p < 0,05$. ANOVA- Tukey).

5.5. Efeito do TP na frequência de locomoção no teste do campo aberto em camundongos.

O TP na dose de (80 mg/Kg) por via oral, não diminuiu significativamente a frequência de locomoção dos animais no teste do campo aberto por um período de 5 minutos. Diazepan (2mg/Kg, i.p.) reduziu, de maneira significativa ($p < 0,001$), a frequência de locomoção os animais para $15,71 \pm 5,20$ quando comparado ao controle $81,50 \pm 3,69$ (Tabela 09 e figura 15).

5.6. Efeito do TP no número de quedas e tempo de permanência (s) na barra giratória (Rota Rod) em camundongos.

O TP na dose de (80 mg/Kg) por via oral, não aumentou significativamente a frequência de quedas dos animais no teste do *Rota rod* por um período de 1 minuto. Diazepan (2mg/Kg, i.p.) aumentou de maneira significativa ($p < 0,001$), a frequência de quedas dos animais para $2,28 \pm 0,36$ seg quando comparado ao controle $0,28 \pm 0,18$ (Tabela 10 e figura 11). Com relação ao tempo de permanência, o TP (80 mg/Kg) por via oral não diminuiu o tempo de permanência na barra giratória quando comparado com o controle ($p > 0,05$). O Diazepan (2mg/Kg, i.p.) diminuiu esse tempo para $33,87 \pm 9,49$ s. quando comparado com o controle ($p < 0,05$). (Tabela 11, figura 16).

Tabela 09 – Efeito do TP na frequência de locomoção no teste do campo aberto em camundongos.

Grupo	Dose (mg/Kg – via)	Frequência de locomoção em 5 minutos
Controle (veículo)	---, p.o	81,50 ± 3,69
TP	80, v.o	78,71 ± 16,00
Diazepam	2, v.o	15,71 ± 5,20***

Os dados representam a média ± E.P.M da frequência de locomoção que consiste no ato do animal penetrar com as 4 patas em uma das divisões do campo aberto durante um período de 5 min., registrado 60 minutos após a administração do topiramato (TP) e 30 minutos após a administração do diazepam. Foram utilizados 7 animais por grupo. *** $p < 0,001$ vs controle (ANOVA e teste de Tukey)

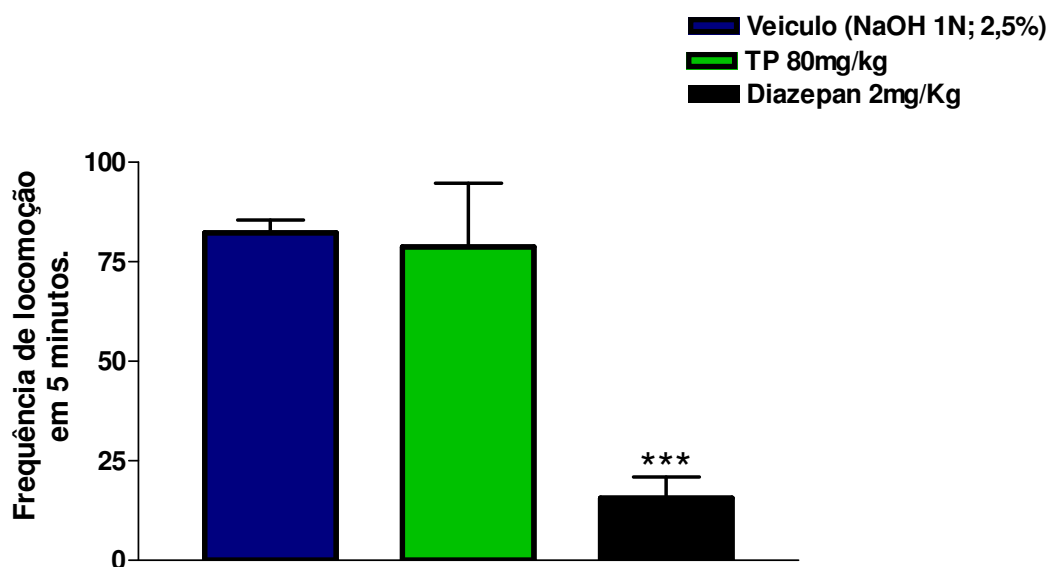


Figura 15. Efeito do TP na frequência de locomoção em camundongos. Os dados representam a média \pm E.P.M da frequência de locomoção que consiste no ato do animal penetrar com as 4 patas em uma das divisões do campo aberto durante um período de 5 min, registrado 60 minutos após a administração do Topiramato (TP) e 30 minutos após a administração do diazepam. Foram utilizados 7 animais por grupo. *** $p < 0,001$ vs controle (ANOVA- Tukey).

TABELA 10 – Efeito do TP no número de quedas e tempo de permanência (s) na barra giratória (Rot Rod) em camundongos.

Grupo	Dose (mg/Kg, via)	n° de quedas	tempo na barra (s)
Controle (veículo)	---, v.o	1,57 ± 0,2	58,15 ± 1,22
TP	80, v.o	1,27 ^a ± 0,18	57,64 ± 1,39 ^a
Diazepam	2, v.o	3,29 ± 0,29 ^{**}	33,87 ± 9,49 [*]

Os dados representam a media da freqüência de quedas e do tempo cumulativo ± E.P.M de permanência em uma barra giratória com velocidade de 12 rotações por minuto, registrado 60 minutos após a administração do Topiramato (TP) por via oral e 30 minutos após a administração do diazepam por via intraperitoneal. Foram utilizados 7 animais por grupo. **** p< 0,01, *p<0,05 vs controle, e ^a p >0,05 vs controle. (ANOVA - Tukey).**

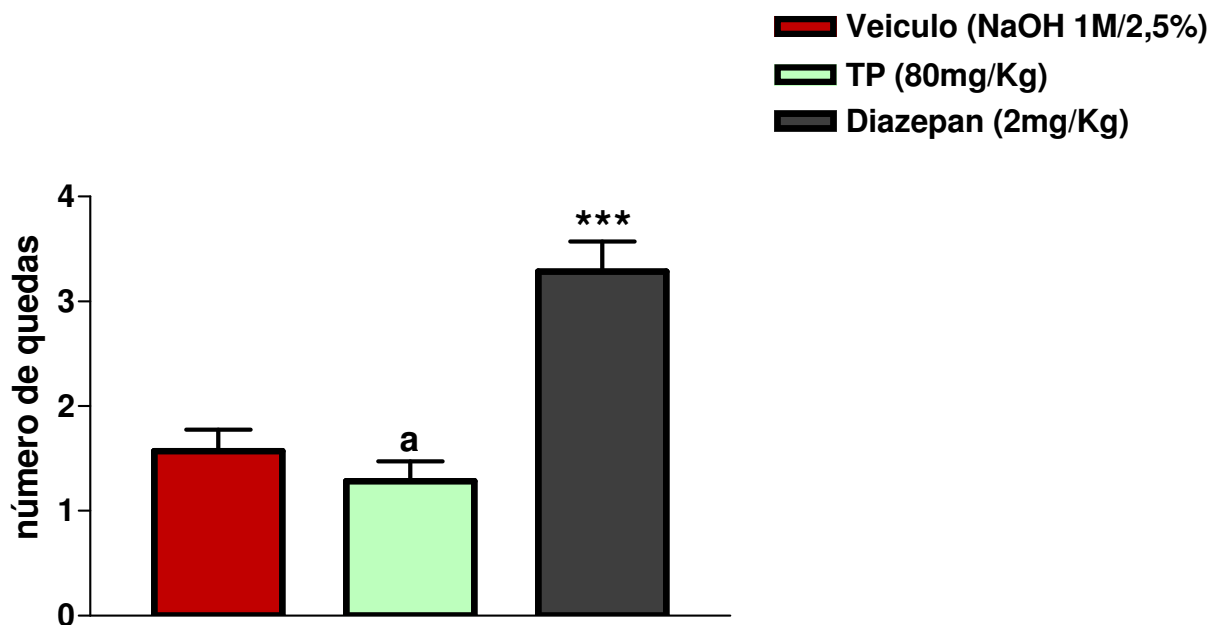


Figura 16 – Efeito do TP no número de quedas da barra giratória (Rot rod) em camundongos. Os dados representam a média da frequência de quedas de uma barra giratória com velocidade de 12 rotações por minuto, registrado 60 minutos após a administração do Topiramato (TP) por via oral e 30 minutos após a administração do diazepam por via intraperitoneal. Foram utilizados 7 animais por grupo. ** $p < 0,01$ vs controle e ^a $p > 0,05$ vs controle. (ANOVA - Tukey).

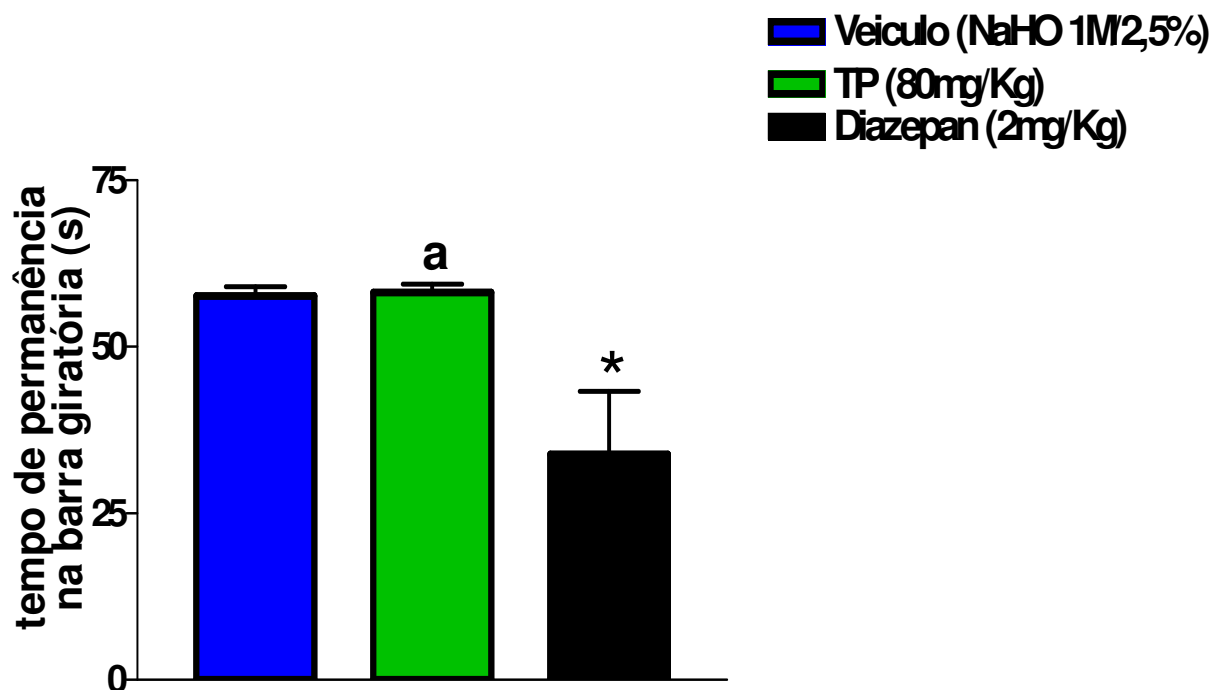


Figura 17 – Efeito do TP no número no tempo de permanência em segundos na barra giratória (Rot Rod) em camundongos. Os dados representam a média \pm E.P.M do tempo cumulativo de permanência em uma barra giratória com velocidade de 12 rotações por minuto, registrado 60 minutos após a administração do Topiramato (TP) por via oral e 30 minutos após a administração do diazepam por via intraperitoneal. Foram utilizados 7 animais por grupo. * $p < 0,05$ vs controle, ^a $p > 0,05$ vs controle (ANOVA - Tukey).

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.0 Discussão

Alguns agentes anticonvulsivantes são conhecidos como analgésicos. No entanto existe uma série de efeitos adversos que limitam o uso destas substâncias para este fim. Por exemplo, a fenitoína e a carbamazepina apresentam a necessidade da constante monitorização dos seus níveis sanguíneos devido à elevada incidência de suas reações adversas além da complexa farmacocinética da fenitoína. Já a lamotrigina apresenta uma maior incidência de desenvolvimento da síndrome de Stevens-Johnson. Isso justifica a necessidade do estudo de novos anticonvulsivantes em condições dolorosas (JACKSON, 2006).

Topiramato (TP) é usado como monoterapia ou junto a outros anticonvulsivantes para o tratamento de ataques epilépticos parciais, para ataques associados com síndrome de Lennox-Gastaut e para ataques primários tônicos clônicos generalizados. Devido ao seu mecanismo de ação como anticonvulsivante. Essa droga apresenta um potencial efeito analgésico. Evidências *in vitro*, sugerem que TP afeta a atividade dos neurônios e produz seus efeitos por vários mecanismos, incluindo modificação do Na^+ e/ou Ca^{2+} dependente de voltagem, aumento da atividade GABA, e inibição do receptor AMPA/kainato (KA) do glutamato (KUDIN, 2004).

Vários modelos experimentais podem ser utilizados para avaliar o efeito analgésico de uma substância. No presente trabalho, foi analisado o efeito analgésico do TP em três modelos de dor aguda em camundongos: teste da formalina (TJOLSEN *et al.*, 1992), teste da capsaicina (LAPA *et al.*, 2003) e teste da placa quente (Petrovski *et al.*, 2006). Para avaliar o efeito do TP em condições dolorosas crônicas foi utilizado utilizamos o teste dos filamentos de von Frey (ARAÚJO *et al.*, 2006).

O teste da formalina caracteriza-se por apresentar um padrão de resposta cuja quantificação permite a avaliação do comportamento nociceptivo. O método original foi descrito por Dubuisson e Dennis, 1977. Nesse modelo os resultados eram avaliados através do tempo despendido pelo animal em comportamentos assumidamente relacionados a dor, numa escala de quatro pontos. O teste da formalina em camundongos foi descrito posteriormente por Hunskaar e Hole em 1987 (LAPA *et al* , 2003).

Hoje, no entanto, o método é utilizado de forma modificada onde se verificar apenas um parâmetro: o tempo em seg. em que o animal passa lambendo ou mordendo a pata na qual foi injetada a formalina, este valor serve como índice de nocicepção. A substância numa concentração de 2%, é injetada num volume constante de 20 microlitros em uma das patas posteriores, na região subplantar. Os resultados são avaliados em duas diferentes fases, sendo a primeira logo após a aplicação do produto e com duração de 10 minutos. Esta é seguida de um intervalo de 10 minutos e precedida de uma nova fase de observação com duração de 20 minutos. (LAPA *et al*, 2003).

O teste da formalina é considerado um modelo de dor persistente, produzida pela injeção intraplantar dessa substancia que causa estimulação de nociceptores, podendo ser considerado um modelo bifásico de comportamento indicativo de dor. A primeira fase se dá pela estimulação de nociceptores, no qual normalmente drogas de ação central apresentam efeito. Há um intenso e imediato aumento da atividade das fibras aferentes primárias tipo C (Shannon *et al*, 2005).

É um teste considerado de dor aguda e tônica. Alguns trabalhos mostram que na primeira fase ocorre a participação da substância P e bradicinina, que pode ser suprimida por drogas de ação central como a morfina. Na segunda fase tem-se a participação de substâncias como histamina, serotonina, bradicinina, aminoácidos excitatórios e prostaglandinas. Esta fase é sensível à ação dos antiinflamatórios como indometacina. As duas fases refletem provavelmente tipos diferentes de dor

originadas pela ativação de nociceptores periféricos e sensibilização central como consequência de eventos que envolvem a transmissão nociceptiva (Blackburn-MUNRO *et al* 2002).

A segunda fase do teste da formalina seria responsável pelo desenvolvimento de uma resposta inflamatória causada por vários mediadores liberados e por um estado de hiperexcitabilidade medular. Neste momento as drogas antiinflamatórias funcionam (ARAÚJO *et al*, 2006).

Os resultados do presente trabalho mostraram que no modelo da formalina foi observado que o TP apresentou efeito significativo na primeira fase do teste apenas na dose de 80mg (* $p < 0,05$), e na segunda fase com as três doses utilizadas (TPM 20; 40 e 80 mg/kg *** $p < 0,001$). Nessa última fase não foi observada diferença estatística entre as doses de TP utilizadas e o controle positivo da morfina, um analgésico opióide que diminuiu a sensação dolorosa nas duas fases do teste.

Na primeira fase, sabe-se que a ação nociceptiva é provocada pela ativação de fibras C e fibras A δ . Foi demonstrado previamente que nestas fibras ocorre a participação de canais de Na⁺ que seriam ativados e assim drogas que atuam como bloqueadores de canais de Na⁺ podem por exemplo, apresentar efeito nesta fase (BLACKBURN-MUNRO *et al* 2002).

Considerando que o TP tem atividade bloqueadora destes canais, o efeito analgésico observado nesta fase poderia ser justificado. A dinâmica dos canais de sódio está relacionada com o aumento da sensibilidade dos aferentes primários ativados após uma injúria tecidual. Existem evidências de que substâncias que apresentam atividade bloqueadora de canais de sódio apresentam efeitos antinociceptivos após injeção de formalina em ratos (BLACKBURN-MUNRO *et al* 2002). Dessa forma, de acordo com os resultados observados na dose citada acima

(80 mg/kg), não se pode descartar o possível papel dos canais de sódio no efeito analgésico do topiramato.

A segunda fase do teste da formalina se caracteriza por desencadear uma reação mais complexa que envolve o desenvolvimento de uma resposta inflamatória e a sensibilização central de fibras da dor, havendo a participação de várias substâncias. Há de se considerar que nesta segunda fase há um aumento dos níveis medulares de diferentes mediadores, como por exemplo, as prostaglandinas, glutamato, óxido nítrico, taquicininas, entre outros peptídios e que tais substâncias seriam responsáveis pela sensibilização da medula espinhal (PIETROVSKI *et al* 2006).

A literatura mostra que a administração de um antagonista de receptores NMDA diminui a resposta ao estímulo pela formalina na segunda fase do teste, dessa forma demonstrando que o glutamato quando ligado a esse receptor, contribui para a manutenção da nocicepção nesse modelo de dor aguda (BLACKBURN-MUNRO *et al* 2002). O efeito observado do TP nesta fase não poderia ser explicado pela sua capacidade de antagonizar os efeitos do glutamato a nível central em receptores NMDA, pois é relatado que o TP é um antagonista desse neurotransmissor, porém, atuando em receptores AMPA-kainato. Isso então poderia se dar pela ação antagonista sobre outro mediador ou outro subtipo de canal, diferente do existente no receptor NMDA.

Alguns trabalhos demonstram também, que não existe uma correlação direta entre o mecanismo de ação das drogas anticonvulsivantes e seu efeito analgésico. Assim, possivelmente podem existir outros mecanismos envolvidos em seu efeito analgésico (SHANNON *et al*, 2005). Partindo dos pressupostos acima foi objetivo do presente trabalho estudar a associação do TP com antagonistas como naloxona, glibenclamida, ciproetadina e ondansetrona buscando investigar outros possíveis mecanismos que poderiam estar envolvidos no efeito analgésico do topiramato

observado nas duas fases do teste da formalina. Para isso foi utilizada a dose de TP que apresentou efeito analgésico em ambas as fases.

No primeiro experimento, o TP foi associado com naloxona, 2 mg/Kg. Esta qual reverteu o efeito antinociceptivo do TP na segunda fase obtendo-se valores iguais ao veiculo. Este efeito não foi observado na primeira fase, sugerindo a possível participação ou envolvimento do sistema opióide na modulação da dor pelo TP na segunda fase do teste da formalina.

Para comprovar a ação da naloxona 2 mg/Kg no teste utilizado, esta substância foi associada com a morfina e verificou-se que houve uma inibição do efeito analgésico opióide (1ª fase: $p < 0,001$ e 2ª fase: $p < 0,05$). Observou-se ainda que a naloxona 2 mg/Kg sozinha não apresentou efeito antinociceptivo no experimento.

Dando seqüência, foi investigada ainda a possível participação dos canais de K^+ ATP dependentes (K_{ATP}) na atividade antinociceptiva do topiramato no teste da formalina, utilizando glibenclamida 3 mg/Kg, um antagonista desses canais. Sabe-se que estas estruturas estão diretamente envolvidas em parte do efeito antinociceptivo da morfina. Os resultados mostraram que a glibenclamida não foi capaz de reverter o efeito analgésico do topiramato nas duas fases do teste. Isso leva hipótese de que tal efeito provavelmente não se relaciona com a ativação dos canais de K^+ , desde de que os mesmos foram bloqueados pela glibenclamida (K_{ATP}) devendo, portanto, existir assim outros mecanismos envolvidos. Semelhantemente aos experimentos anteriores, a morfina foi utilizada como controle positivo e inibiu significativamente (1ª e 2ª fase: $p < 0,001$) a nocicepção induzida por formalina nas duas fases do teste.

É importante relatar que alguns estudos de outros autores mostram que o TP não apresenta efeito no teste da formalina em ratos. Vale, entretanto, ressaltar que

em tais estudos, a dose utilizada foi menor, variando entre 3 e 30 mg/kg (SHANNON *et al*, 2005).

Baseando-se nestas informações, no presente trabalho também foi avaliado a participação do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo do TP no teste da formalina. Para isso foi utilizado um antagonista de receptores 5-HT₃, a ondansetrona, na dose de 0,5 mg/kg. Além dessa ferramenta, utilizou-se também a ciproheptadina, 5 mg/Kg que é antagonista 5-HT₂ além de bloquear receptor H₁ da histamina.

As vias serotoninérgicas estão envolvidas na condução de estímulos nociceptivos no sistema nervoso central e estudos mostram que o sistema serotoninérgico bulbo-espinhal pode suprimir a condução da dor em nível medular. As vias descendentes serotoninérgicas também modulam a transmissão de potenciais dolorosos por atuarem diretamente em neurônios ascendentes ou em interneurônios. Existem vários receptores para a serotonina e estudos mostram que os receptores 5-HT_{1A}, 5-HT₂ e 5-HT₃ modulam a transmissão de impulsos nociceptivos (PIETROVSKI *et al*, 2006).

Os resultados evidenciaram que não houve reversão do efeito antinociceptivo do TP quando associado com a ondansetrona ou ciproheptadina nas doses utilizadas. Isso sugere a não participação desses sistemas no efeito antinociceptivo do TP no teste da formalina. A morfina, um analgésico opióide, foi utilizada como controle positivo e, como esperado, reduziu significativamente (1ª fase e 2ª fase $p < 0,001$) a nocicepção induzida por formalina nas duas fases do teste.

O efeito analgésico também pode ser avaliado através do teste da dor neurogênica provocada pela administração de capsaicina, utilizada por via intraplantar, 1,0 microgramas por pata. Registra-se, então, durante 5 min, o período que o animal passa lambendo ou mordendo a pata injetada, medida esta, indicativa

de dor, sendo a capsaicina administrada uma hora após a administração da substância a ser testada. (LAPA et al, 2003). Esse teste avalia o possível efeito analgésico de drogas na dor neurogênica causada pela capsaicina. É considerado um modelo de dor direta, produzida pela injeção intraplantar dessa substância, que causa estimulação de nociceptores (ARAÚJO, 2006).

A capsaicina age através da ligação com receptores vanilóides (VR 1), um receptor similar ao canal de K^+ voltagem dependente encontrado nos neurônios sensoriais. Este receptor, conhecido por ser o receptor da capsaicina, está envolvido principalmente com o influxo de cátions, particularmente Ca^{++} e Na^+ , através de canal acoplado ao VR 1. A capsaicina age especificamente nas fibras C não mielinizadas e nas fibras A δ pouco mielinizadas e delgadas. Tais receptores também podem ser ativados por temperaturas acima de 43 ° C (OKUSE, 2006).

Diferentemente da morfina, os resultados mostraram que o TP não exerceu efeito sobre a resposta nociceptiva da capsaicina. Nas três doses utilizadas a substância apresentou efeito semelhante ao veículo o que sugere que pelo menos nas doses utilizadas, o TP não apresenta efeito antinociceptivo no teste da capsaicina.

Existem resultados que mostram que a capsaicina e a formalina apresentam sua ação nociceptiva devido à liberação do aminoácido excitatório glutamato e da substância P, ambos liberados nos neurônios sensoriais da medula espinhal. Em ambos há uma inibição da liberação pela administração previa da capsazepina. (AMARAL, 2004). Essa inibição ocorre apenas na primeira fase do teste da formalina, indicando que existem mecanismos semelhantes na transmissão dos impulsos nociceptivos entre o teste da capsaicina e formalina (1ª fase).

A ação do glutamato nesse mecanismo se dá principalmente no receptor NMDA que não é antagonizado pelo TP, pois essa droga antiepiléptica não atua

nesse tipo de receptor (WHITE, 2005). De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se supor que o efeito antinociceptivo do TP na 1ª fase do teste da formalina poderia se dar por mecanismos que não envolvem o receptor vanilóide.

Quando o animal é colocado sobre uma superfície aquecida a 52 graus, ocorre uma resposta característica, onde o animal troca rapidamente o apoio dos pés, levantando ou lambendo uma das patas. A latência para o aparecimento desta resposta, cronometrada em segundos, pode ser considerado, como indicativo da intensidade da resposta nociceptiva a um estímulo térmico. A resposta da placa quente decorre de uma resposta operante de integração central. Após a obtenção dos valores basais a resposta é novamente avaliada depois de decorridos 60, 120 e 180 min da administração das drogas (LAPA *et al*, 2003). Neste teste da placa quente pode-se ter duas respostas que pode ser a lambedura das patas posteriores ou um pulo da superfície aquecida (PIETROVSKI *et al* 2006). Vale salientar que neste teste, foi utilizado, porém, a temperatura de $52 \pm 0,5$ para se evitar resultados falsos negativos.

O TP dentre as doses estudadas demonstrou efeito significativo na maior dose de 80 mg/kg (* $p < 0,05$), sugerindo que essa substância apresenta condições de suprimir a nocicepção supra espinhal. Foi sugerido que na resposta a um estímulo térmico, existe uma participação de um grande numero de fibras delgadas e médio calibre (tipo C e tipo II A δ) quando a temperatura está em torno de 45^o e de fibras I A δ quando a temperatura é maior que 52^o (PIETROVSKI *et al* 2006). Desta forma, o TP poderia estar atuando deprimindo a resposta neste último tipo de fibra, porém estudos adicionais seriam necessários para confirmar essa hipótese, pois apenas o teste da placa quente não seria suficiente para isso.

Os mecanismos de ação do TP são relevantes para o seu potencial analgésico na dor neuropática. Dados da literatura mostraram que essa substância

apresentou efeito analgésico em modelos de injúria neuronal, assim como demonstrou ser benéfico em um estudo piloto duplo-cego em humanos (THIENEL *et al*, 2004). Outros estudos também mostraram que o TP foi eficaz no tratamento de neuragia intercostal e neuragia do trigêmeo, sendo porem ineficaz em estudos de dor central (TENG, 2003).

Estes achados, no entanto, são conflitantes quando se observam outros protocolos experimentais em animais. Alguns trabalhos mostram que o topiramato não apresenta efeito significativo quando utilizado em modelos de lesão neuronal por constrição do ciático, utilizando-se o teste de von Frey, não havendo diferenças significativas entre o TP e o veículo (BISCHOFFS *et al*, 2004). Outros trabalhos clínicos também mostram resultados semelhantes (JACKSON, 2006).

Por outro lado, estudo duplo cego, controlado por placebo, mostrou redução significativa nos escores de avaliação de dor com uso de TP, podendo por isso ser útil nesse tipo de condição dolorosa. No entanto, o que se observa na verdade é uma discordância entre vários achados de experimentos clínicos em seres humanos, o que também ocorre com outras drogas anticonvulsivantes. Recente estudo duplo-cego, controlado por placebo, demonstrou resultados inconsistentes ou não mostrou diferenças entre a fenitoína e o placebo em casos de neuropatia diabética (SPRUCÉ, *et al* 2003).

Em concordância, foram avaliados pacientes com dor neuropática induzida por diabetes, em três estudos duplo-cegos e observado que não houve diferenças entre o TP nas doses de 200 e 400 mg por dia, e o placebo na redução dos escores de dor (THIENEL, 2004). Isso pode se dar possivelmente pela incapacidade de ação do TP sobre os receptores do glutamato. O TP, como citado anteriormente, não atua como antagonista de receptores NMDA, mas apenas de receptores AMPA/Kainato (BISCHOFFS *et al* 2004). Possivelmente o glutamato agindo nos receptores NMDA,

seria o neurotransmissor mais importante no processo de condução e manutenção de estímulos dolorosos na dor neuropática (ZIMMERMANN, 2001).

Isso demonstra a necessidade de estudos sistemáticos bem delineados para uma melhor avaliação dos efeitos clínicos do topiramato para nocicepção. Como comentado previamente, alguns trabalhos mostram que não há uma correlação direta entre o efeito analgésico do TP e seus efeitos anticonvulsivantes, podendo existir outros mecanismos envolvidos (SHANNON *et al*, 2005).

Os filamentos de von Frey são utilizados para determinar o limiar mecânico de 50% para a retirada da pata posterior após um estímulo. Uma seqüência de filamentos é aplicada na pata posterior direita do animal, até que o filamento se dobre a metade. O levantar da pata do animal indica um sinal positivo de sensibilidade e um novo filamento é em seguida testado (ARAÚJO, 2006). O último filamento no qual o animal respondeu é considerado como limite. Cada filamento é testado 3 vezes na pata do animal. O teste avalia a sensibilidade da área da pata no qual é inervada pelo ciático (BISCHOFFS *et al*, 2004).

Sabe-se que o *Diabetes melitus* é outra condição que está associada a uma elevada incidência de dor neuropática. Entre 43 e 53% de todos os pacientes diabéticos há o desenvolvimento de sintomas dolorosos nos membros inferiores. É evidente hoje que existe uma relação direta entre o controle dos níveis glicêmicos sanguíneos e o desenvolvimento dos sintomas dolorosos, sendo estes sintomas mais evidentes com maiores níveis glicêmicos. Isso poderia se dar devido a uma glicação dos canais de sódio da membrana plasmática, o que levaria a um aumento do fluxo de correntes iônicas levando assim a formação de focos ectópicos (SPRUCE *et al*, 2002).

De acordo com os resultados deste estudo foi observado que nas doses utilizadas o TP não apresentou efeitos significativos nos animais com neuropatia diabética utilizando-se o modelo dos filamentos de von Frey. Nas duas doses utilizadas (40 e 80 mg/Kg), observou-se que o efeito do TP foi semelhante ao veículo, o que sugere ineficácia neste tipo de protocolo de dor neuropática. Vale Lembrar que embora a indução da neuropatia seja distinta nas varias condições clínicas, as alterações fisiopatológicas a nível celular são semelhantes.

Dessa forma os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os experimentos realizados anteriormente, que não observaram efeito do TP em condições de dor neuropática induzida por outros modelos, como por exemplo, o modelo que utiliza constrição neuronal (BISCHOFFS *et al*, 2004).

Teoricamente poderia se pensar no efeito contrário, visto que o TP apresenta um mecanismo de ação complexo que se relaciona diretamente com a fisiopatologia desse tipo de condição dolorosa. A capacidade inibitória sobre canais de sódio e cálcio, assim como sua propriedade de aumentar a atividade do GABA poderia levar ao surgimento do efeito analgésico. No entanto, o fato do TP não atuar nos receptores NMDA poderia ser a explicação para a ausência desse efeito analgésico em neuropatia diabética, tendo em vista a importância desse receptor na fisiopatologia do processo (SPRUCE *et al*, 2002).

As drogas com atividade antinociceptiva podem apresentar uma atividade depressora central com uma tendência de diminuir a atividade locomotora dos animais e isso pode interferir diretamente na resposta no teste da formalina e outros testes que verificam a atividade antinociceptiva. Para avaliar a possível interferência nessa ação, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto e *rota rod* (LAPA *et al*, 2003). O teste do *Rota-Rod* é uma metodologia utilizada na triagem de drogas com possível atividade mio-relaxante e consiste em avaliar a coordenação motora do animal, através do tempo de permanência deste em uma barra giratória. Este teste normalmente é realizado depois que o animal é submetido ao teste do

campo aberto. De acordo com os resultados, verificou-se que o TP não apresenta ação relaxante muscular, o que prova que os efeitos antinociceptivos observados, não são devido a essa ação. Isso pode ainda ser demonstrado a partir dos resultados observados no teste do campo aberto, onde se observou que não houve diferenças estatísticas entre o grupo do TP e o veículo, demonstrando não interferência na atividade motora.

CONCLUSÕES

No presente trabalho utilizando-se o Topiramato (TP), podemos observar que outros mecanismos desconhecidos podem estar envolvidos no efeito analgésico de substâncias anticonvulsivantes. Observamos que o (TP) apresentar efeito antinociceptivo mesmo em condições de dor aguda. Em nossos experimentos podemos verificar que nas doses utilizadas o TP pode ativar receptores opióides e que este efeito é revertido pela naloxona, mas não parece envolver ativação de canal de potássio dependente de ATP. Isso poderia justificar em parte os resultados observados e justificaria a necessidade da continuidade destes estudos com o fim de esclarecer melhor o real mecanismo envolvido destes efeitos. Além do mais a não reversão do efeito pela ondansetrona e ciproheptadina demonstra que sistemas como o serotoninérgico não participam do efeito analgésico do TP.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos neste estudo nos testes realizados com o Topiramato (TP), pode-se concluir que:

- TP 20; 40 e 80 mg/Kg não apresenta efeito antinociceptivo no teste da capsaicina.
- TP 80 mg/Kg apresenta efeito antinociceptivo nas duas fases do teste da formalina.
- TP 20 e 40 mg/Kg, apresenta efeito antinociceptivo apenas na segunda fase do teste da formalina.
- A naloxona inibe o efeito do TP na segunda fase do teste da formalina, o que sugere uma participação do sistema opióide nesse efeito.
- Não há participação de canais K^+ ATP dependente, visto que não houve inibição do efeito do topiramato pela glibenclamida 2 mg/Kg.
- A ondansetrona e a ciproheptadina não interferem no efeito do TP (80 mg/Kg) no teste da formalina sugerindo que não há participação do sistema serotoninérgico.
- No teste da placa quente, o TP 80 mg/Kg apresenta efeito antinociceptivo apenas nos tempos de 90 e 120 minutos.
- O TP 40 e 80 mg/Kg não apresentou efeito antinociceptivo no teste dos filamentos de Von Frey em animais com neuropatia diabética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9.0. Referências Bibliográficas.

AMARAL, J.F. Atividade antiinflamatória, antinociceptiva e gastroprotetora do óleo essencial de *Croton sonderianus* Muell. Arg. Fortaleza, Ce, 2004. 130p. (Dissertação- Mestrado – Universidade Federal do Ceará – Faculdade de Medicina).

ARNONE, D. Review of the use of Topiramate for treatment of psychiatric disorders. *Annals-general-psychatry*. 4:5.pp 2-14. 2005.

ABDOLLAHI, M.; SARKARATI, F.; ETEMAD, F. Interaction between Calcium Channel Blockers and Sweetening Agents on Morphine-Induced Analgesia in Mice by Formalin Test. *General Pharmaceutical*, v. 31, n. 3, pp. 431-435. 1998.

ARAÚJO, A. M.; MONTENEGRO, F. C.; MAFRA, R. A.; ALVES, A. R. A.; OLIVEIRA, F. A.; CRUZ, J.S.. Principais Sistemas de Neurotransmissão. *In: ALMEIDA, R. N. Psicofarmacologia – Fundamentos Práticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap 02, pp 25-45.2006.

BAKER, K. Recent advances in the neurophysiology of chronic pain. *Emergence Medicine Australasia*, 17, pp. 65-72. 2005.

BERGER, A.; DUKES, E.; MERCADANTE, S.; OSTER, G. Use of antiepileptics and tricyclic antidepressants in cancer patients with neuropathic pain. *European Journal of Cancer Care*, pp. 138-145. 2006.

BISCHOF, S.; ZELENKA, M.; SOMMER, C. Evaluation of topiramate as an anti-hyperalgesic and neuroprotective agent in the peripheral nervous system. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 9. pp. 70-8. 2004.

BLACKBURN-MUNRO, G.; IBSEN, N.; ERICHSEN, H. K. A comparison of the anti-nociceptive effects of voltage-activated Na⁺ channel blockers in the formalin test. *European Journal of Pharmacology* .445, pp. 231-8. 2002.

BONICA JJ. History of pain concepts and pain therapy. *The Mount Sinai journal of medicine*. 1991 May; 58(3):191-202.

BONICA JJ. Importance of effective pain control. *Acta anaesthesiologica Scandinavica. Supplementum*. 1987;85:1-16.

DELFINO, V. DA.; FIGUEIREDO, J.F.; MATSUO, T.; FAVERO, M.E.; MATNI, A.M; MOCELIN, J. *Diabetes mellitus* induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. 24(1):31-6, 2002.

DODGSON, S. J.; SHANK, R. P.; MARYANOFF, B. E.. Topiramate as an Inhibitor of Carbonic Anhydrase Isoenzymes. *Epilepsia*. 41(suppl. 1): S35-S9, 2000.

DRUMMOND, J. P. F. Fisiologia da nocicepção. *In: Drummond, J. P.F & Marques, J. O. Dor Neuropática – Fisiopatologia, clínica e terapêutica*. Curitiba: Editora Evidence, cap 02 pp. 35-54, 2005.

DRUMMOND, J. P. F. Fisiopatologia. *In: Drummond, J. P. F.& Marques, J. O. Dor Neuropática – Fisiopatologia, clínica e terapêutica*. Curitiba: Editora Evidence, Cap 03, pp. 55-85, 2005.

DRUMMOND, J. P. F. Neurofisiologia. *In: Drummond, J.P.F. Dor Aguda – Fisiopatologia, clínica e terapêutica*. Curitiba: Editora Atheneu, cap 01, pp. 01-25, 2000.

FISHER, A; WANG, X; COCK, H. R.; THOM, M; PATSALOS, P. N.; WALKER, M. C. Synergism between Topiramate and Budipine in Refractory Status Epilepticus in the Rat. *Epilepsia*, 45 (11), pp. 1300-1307, June. 2004.

GARNET, W, R. Clinical Pharmacology of Topiramate: A review. *Epilepsia*, 41(Suppl.1):S61-5, 2000.

GLAUSER, T, A. Topiramate. *Epilepsia*, 40(Suppl.5):S71-S80, 1999.

HUNTER, J. C.; GOGAS, K. R.; HEDLEY, L.R.; JACOBSON, L.O.; KASSOTAKIS, L.; THOMPSON, J.; FONTANA, D. The effect of novel anti-epileptic drugs in rat experimental models of acute and chronic pain. *European Journal of Pharmacology* 324, pp 153-160. 1997

JACKSON II, K, C. Pharmacotherapy for Neuropathic Pain. *Pain Practice*, v. 6, pp. 27-33. 2006.

JONES, B.J. Pathophysiology of acute pain: Implications for clinical management. *Emergency Medicine*. v 13, pp. 288-292. 2001.

KUDIN, A. P.; DEBSKA-VIELHABER, G.; VIELHABER, S.; ELGER, C. E.; KUNZ, W. S. The Mechanism of neuroprotection by Topiamate in Animal Model of Epilepsy. *Epilepsia*. 45(12): 1478-1487, 2004.

LAPA, J. A.; SOUCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M. S.A.; LIMA, T.C.M. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais/ Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais. Gráfica metrópole, Florianópolis, 2003.

LONGMIRE, D.R. Neurophysiologic studies. *In: Raj, P.P. Pain Medicine – A comprehensive review*. Mosby, cap 07, pp 73-82, 1996.

MELO, C. T. V.; MONTEIRO, A. P.; LEITE, C. P.; ARAÚJO, F. L. O.; LIMA, Vera T. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, M. M. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, GLAUCE S. B.; SOUSA, F. C. F. Anxiolytic-Like Effects of (*O*-Methyl)-*N*-2,6-dihydroxybenzoyl-tyramine (Riparin III) from *Aniba riparia* (NESS) MEZ (Lauraceae) in Mice. *Biological. Pharmaceutical Bull*, 29(3), pp. 451-4, March. 2006.

NISHIMURA, W.; MURATANI, T.; TATSUMI, S., SAKIMURA, K.; MISHINA, M.; MINAMI, T; ITO, S.. Characterization of N-methyl-D-aspartate receptor subunits responsible for postoperative pain. *European Journal of Pharmacology*. v 503, pp 71-5. 2004.

OKUSE, K. Pain signaling pathways: From cytokines to ion channels. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. Nov. 2006

PAPPAGALLO, M. Newer Antiepileptic Drugs: Possible Uses in the Treatment of Neuropathic Pain and Migraine. *Clinical Therapeutics*, v. 25, n. 10, pp. 2506-2538, September. 2003.

PERUCCA, E. An Introduction to Antiepileptic Drugs. *Epilepsia*, 46(4), pp. 31-37. 2005.

PIETROVSKI, E. F.; ROSA, K. A.; FACUNDO, V. A.; RIOS, K.; MARQUES, M. C. A.; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxilup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. *Pharmacology. Biochemistry and Behavior*, 83, pp. 90-9. 2006.

PETROFF, O.A.C.; HYDER, F.; ROTHMAN, D. L.; MATTSON, R. Topiramate Rapidly Raises Brain in Epilepsy Patients. *Epilepsia*, 42(4): pp.543-548, 2001.

POULSEN, C. F.; SIMEONE, T. A.; MAAR, T. E.; SMITH-SWINTOSKY, V.; WHITE, H. S.; SCHOUSBOE, A. Modulation by Topiramate of AMPA and Kainate Mediated Calcium Influx in Cultured Cerebral Cortical, Hipocampal and Cerebellar Neurons. *Neurochemical Research*, v. 29, n. 1, pp. 275-282, January. 2004.

PUSHPARAJ, P.N.; LOW, H.K.; MANIKANDAN, J.; TAN, B.K.H.; TAN, C.H. Anti-diabetic effects of *Cichorium intybus* in streptozotocine-induced diabetic rats. *Journal of Ethno-pharmacology*, 111, pp 430-434. 2007

REITH, D.; BURKE, C.; APPLETON, D. B.; WALLACE, G.; PELEKANOS, J. Tolerability of topiramate in children and adolescents. *Journal Paediatric Child Health*, 39, pp. 416-419. 2003.

RICE, A. S C. Recent developments in the pathophysiology of acute pain. *Acute Pain* .v 1 (2). pp 27-36. March 1998.

SHANK, R. P.; GARDOCKI, J. F.; VAUGHT, J. L.; DAVIS, C. B.; SCHUPSKY, J. J.; RAFFA, R. B.; DOGSON, S. J.; NORTEY, S. O. MARYANOFF, B. E. Topiramate: Preclinical Evaluation of a Structurally Novel Anticonvulsant. *Epilepsia*, 35(2): 450-460, 1994.

SHANNON, H. E.; EBERLE, E. L; PETERS, S. C. Comparison of the effects of anticonvulsant drugs with diverse mechanisms of action in the formalin test in rats. *Neuropharmacology* 48, pp. 1012-1020. 2005.

SPRUCE, M. C.; POTTER, J.; COPPINI, D. V. The pathogenesis and management of painful diabetic neuropathy: a review. *Diabetes UK. Diabetic Medicine*, 20, pp. 88-98. 2003.

TENG, J.; MEKHAIL, N. Neuropathic Pain: Mechanisms and Treatment Options. *Pain Practice*, v. 3, pp. 8-21. 2003.

THIENEL, U.; NETO, W.; SCHWABE, S. K.; VIJAPURKAR, U. Topiramate in painful diabetic polyneuropathy: findings from three double-blind placebo-controlled trials. *Acta Neurological Scand*, pp. 221-231, June. 2004.

TJOLSEN A; BERGE O.G; HUNSKAAR S; ROSLAND JH; HOLE K. The formalin test: an evaluation of method. *Pain*, Review article, 1992.

VALE, F. M. DOR. Novos aspectos fisiopatológicos e conseqüentes estratégias farmacológicas. *RFML*, III (5) 291-304, 2000.

WALIA, K. S.; KHAN, E., A.; KO, D., H.; R., SHARIQ S.; KHAN, N.Y. Side Effects of Antiepileptics – A Review. *Pain Praticce*, v. 4, issue 3, pp 194-203. 2004.

WELCH, K. M. Brain Hyperexcitability: The Basis for Antiepileptic Drugs in Migraine Prevention. *Headache*, 45, pp. 25-32. 2005.

WHITE, H. S. Molecular Pharmacology of Topiramate: Managing Seizures and Preventing Migraine. *Headache*, 45, pp. 48-56. 2005.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neurophatic pain. *European Journal of Pharmacology*, 429. pp. 23-37. 2001.