

Efeito Analgésico Local do Tramadol em Modelo de Dor Provocada por Formalina em Ratos*

Local Effect of Tramadol on Formalin Evoked Flinching Behavior in Rats.

Angela Maria Sousa, TSA¹, Paula Andrea Baptista Franco², Hazem Adel Ashmawi, TSA³, Irimar de Paula Posso, TSA⁴

RESUMO

Sousa AM, Franco PAB, Ashmawi HA, Posso IP — Efeito Analgésico Local do Tramadol em Modelo de Dor Provocada por Formalina em Ratos.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: O cloridrato de tramadol é um fármaco analgésico de ação central, utilizado no tratamento de dores moderadas e intensas. Foi demonstrado efeito analgésico local do tramadol, mas seu mecanismo de ação não foi estabelecido.

MÉTODO: Estudou-se o efeito da administração local, sistêmica e por bloqueio de nervo periférico do tramadol sobre o comportamento de elevação da pata gerado pela injeção de 50 µL de formalina a 1% na região dorsal da pata de ratos. O número de elevações da pata foi observado pelo período de 60 minutos.

RESULTADOS: A administração local de tramadol em concentrações maiores (2,5 e 5 mg) levou ao bloqueio praticamente completo do comportamento de elevação da pata durante todo o teste. A administração sistêmica e por bloqueio de nervo periférico não afetou o comportamento de elevação da pata na fase I e diminuiu parcialmente na fase II.

CONCLUSÕES: O tramadol apresentou efeito analgésico local no modelo de comportamento de elevações da pata com formalina,

que é diferente de sua ação central. Esse efeito, nesse modelo, não parece ser ligado a efeito anestésico local.

Unitermos: ANALGÉSICOS: tramadol; ANIMAIS: ratos; DOR, Experimental: formalina; FARMACOLOGIA, Farmacodinâmica: mecanismos de ação.

SUMMARY

Sousa AM, Franco PAB, Ashmawi HA, Posso IP — Local Effect of Tramadol on Formalin Evoked Flinching Behavior in Rats.

BACKGROUND AND OBJECTIVES: Tramadol hydrochloride is known as a centrally acting analgesic drug, used for the treatment of moderate to severe pain. A local analgesic effect has been demonstrated, but its mechanism of action remains unclear.

METHODS: In this study, we examined the effect of local, systemic and nerve block tramadol on the nociceptive flinching behavior elicited by injection of 50 µL of 1% formalin into the dorsal region of hind paw of rats. Nociceptive flinching behavior was observed for 60 minutes.

RESULTS: Local tramadol in higher concentrations (2.5 and 5mg) almost eliminated flinching behavior during the entire test. Systemic and neural block tramadol did not affect flinching behavior in phase I and partially decreased it in phase II.

CONCLUSIONS: Tramadol presented a local analgesic effect in formalin nociceptive flinching behavior that is different from its central analgesic effect. This analgesic effect, in this model, seems not to be linked to a local anesthetic like effect.

Key Words: ANALGESICS: tramadol; ANIMALS: rats; PAIN: Experimental: formalin; PHARMACOLOGY, Pharmacodynamic: action mechanisms.

*Recebido do (Received from) Laboratório de Investigação Médica — LIM-08 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM/USP), São Paulo, SP

1. Mestre em Farmacologia pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP; Médica Assistente da Equipe de Controle de Dor da Divisão de Anestesia do Instituto Central do Hospital das Clínicas da FM/USP e do Laboratório de Investigação Médica — LIM 08, FM/USP

2. Anestesiologista; Médica Assistente do Serviço de Anestesia do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da FM/USP

3. Doutor em Medicina; Professor Adjunto do Departamento de Medicina do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos; Professor Colaborador do Departamento de Cirurgia FM/USP e Laboratório de Investigação Médica — LIM-08 da FM/USP

4. Livre-Docente pela FM/USP; Professor-Associado do Departamento de Cirurgia da FM/USP; Supervisor da Equipe de Controle de Dor da Divisão de Anestesia do Instituto Central do Hospital das Clínicas da FM/USP

Apresentado (Submitted) em 13 de novembro de 2007

Aceito (Accepted) para publicação em 14 de abril de 2008

Endereço para correspondência (Correspondence to):

Dr. Hazem Adel Ashmawi

LIM-08, Anestesiologia Experimental

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Av. Dr. Arnaldo, 455, 2º andar

01246-903 São Paulo, SP

E-mail: hazem@hcnnet.usp.br, hazem@ufscar.br

© Sociedade Brasileira de Anestesiologia, 2008

INTRODUÇÃO

O cloridrato de tramadol — cloridrato de (1RS, 2RS)-2-[(di-metilamino)-metil]-1(3-metoxifenil)-ciclohexanol — é um fármaco analgésico de ação central utilizado principalmente no tratamento de dores moderadas e intensas, agudas ou crônicas^{1,2}. É um análogo sintético da codeína, presente como mistura racêmica de dois enantiômeros [(+)- e (-)-tramadol], que apresentam diferentes propriedades farmacológicas, sobretudo na afinidade pelo receptor. Têm atividades sinérgica e complementar que resultam no efeito

analgésico do tramadol¹⁻⁴. O tramadol apresenta dois mecanismos de ação conhecidos. O tramadol e seu metabólito ativo M1 têm pouca afinidade pelos receptores opióides μ ^{1,2,5}. Também desempenha ação indireta sobre receptores monoaminérgicos, por meio da inibição da recaptação da noradrenalina e serotonina, bloqueando as aferências nociceptivas medulares^{1,4,6-10}. A utilização prévia de antagonistas do receptor α_2 , como a ioimbina e idazoxan ou de antagonistas de receptor opióide μ , naloxona, reduz os efeitos analgésicos do tramadol^{1,11,12}. As ações do tramadol nos receptores opióides μ e sobre as monoaminas são sinérgicas no efeito analgésico⁴.

Tem sido observado em estudos clínicos que o tramadol apresenta efeito analgésico local quando administrado por via intradérmica⁹, reduzindo a dor à injeção do propofol¹³, prolongando o tempo de bloqueio do plexo braquial quando adicionado à mepivacaína^{11,14} e reduzindo a dose de lidocaína em anestesia regional venosa¹². Os efeitos analgésicos periféricos do tramadol em modelos experimentais de dor foram demonstrados em modelo de hiperalgisia térmica¹⁵, em modelo de inflamação por carragenina intraplantar¹⁶, não devido à ação inibitória direta sobre as endoperóxido prostaglandinas sintetases¹⁷ e em medidas de potenciais evocados somatossensitivos medulares¹⁸.

O teste da formalina é amplamente utilizado para se avaliar a ação de fármacos analgésicos, sendo considerado um modelo confiável de dor tônica do tipo inflamatória¹⁹⁻²¹. A administração subcutânea de formalina na pata de rato gera comportamentos estereotipados. Entre esses comportamentos, a elevação da pata é um parâmetro confiável de comportamento doloroso²². A resposta nociceptiva à formalina ocorre de maneira bifásica: há um curto período inicial (fase I, com duração de 5 a 10 minutos); posteriormente, após um curto período de remissão de comportamentos, inicia-se a fase II, que consiste em um período mais longo (20 \pm 40 minutos) de atividade sustentada²³⁻²⁵. Em geral, a resposta inicial é atribuída à ativação direta de nociceptores^{26,27}, enquanto a fase II está associada à liberação de mediadores endógenos locais, que geram resposta inflamatória local, responsável pela sensibilização de aferentes primários e de neurônios medulares subsequente a ativação de nociceptores^{23,28}.

Este estudo teve como objetivos verificar a ocorrência de efeito analgésico local do tramadol em modelo de dor por formalina e investigar possível mecanismo de ação.

MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados em ratos Wistar machos, com peso entre 280 e 380 g, que tinham acesso livre à comida e água, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clí-

nicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e realizado de acordo com as resoluções do Comitê para Pesquisa e Assuntos Éticos da IASP²⁹. Todos os experimentos comportamentais foram realizados entre 09h00min e 15h00min e nas mesmas condições de temperatura.

MODELO DE COMPORTAMENTO DE ELEVAÇÕES DA PATA PROVOCADO POR FORMALINA

A dor foi induzida pela administração de 50 μ L de solução de formalina a 1% na região dorsal da pata posterior direita. Antes da administração, os animais foram colocados em uma câmara de observação transparente por 20 minutos para reconhecimento e adaptação ao local. Posteriormente, foram removidos para a administração do fármaco e recolocados na câmara de observação. Um espelho foi colocado atrás da câmara para facilitar as observações das elevações da pata quando o animal estava com a pata fora do campo do observador. Os ratos foram observados logo após a administração da formalina durante 60 minutos. O número de elevações da pata foi quantificado a cada 5 minutos. Considerou-se como comportamento de elevação da pata todo movimento não associado à locomoção, variando desde uma elevação discreta ou contração da musculatura da coxa do animal até movimento mais vigoroso da pata. As elevações eram de fácil quantificação^{23,24,30-33}.

Na primeira parte do estudo foram utilizados 25 animais, divididos em cinco grupos com cinco animais em cada grupo: FORM (50 μ L de formalina a 1% na pata posterior direita), TRA1.25 (1,25 mg de tramadol em volume de 50 μ L aplicados na pata posterior direita e 10 minutos depois, 50 μ L de formalina a 1% no mesmo local), TRA2.5 (2,5 mg de tramadol em volume de 50 μ L aplicados na pata posterior direita e 10 minutos depois, 50 μ L de formalina a 1% no mesmo local), TRA5 (5 mg de tramadol em volume de 50 μ L aplicados na pata posterior direita e 10 minutos depois, 50 μ L de formalina a 1% no mesmo local). Um grupo com tramadol por via intraperitoneal, TRA-IP (5 mg de tramadol em 100 μ L aplicados por via intraperitoneal e 10 minutos depois, 50 μ L de formalina a 1% na pata posterior direita), foi utilizado para evidenciar a ocorrência de efeito analgésico sistêmico. Na segunda parte do estudo, um grupo de cinco animais foi utilizado para bloqueio de nervos periféricos com tramadol na região dorsal da pata, TRA-BLOC (10 mg de tramadol em 50 μ L aplicados na região anterior do tornozelo, para bloquear os nervos fibulares profundo e superficial e 10 minutos depois a administração de 50 μ L de formalina a 1%). A comparação entre os números médios de elevações da pata nas fases I e II foi feita pela Análise de Variância (ANOVA). Quando foram observadas diferenças significativas na fase I, o procedimento de comparações múltiplas de Dunnet foi utilizado para a identificação dos grupos. Na fase II foi adotado o procedimento de comparações múltiplas de Tukey para a identificação dos grupos. Em todas as análises efetuadas os valores calculados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Efeitos no comportamento de elevação de pata.
 As elevações de pata foram agrupadas em duas fases, fase I, correspondendo às elevações nos primeiros 10 minutos (1 a 10 min), e fase II, correspondendo às elevações os 50 minutos restantes (11 a 60 min). As médias dos valores dos comportamentos de elevações da pata estão

mostradas na figura 1. O grupo FORM apresentou o comportamento bifásico típico da formalina. TRA-BLOC e TRA-IP também apresentaram comportamento bifásico, que não esteve presente nos grupos TRA1.25, TRA2.5 e TRA5 (Figura 1). Na fase I, o tramadol, quando administrado localmente, praticamente aboliu a resposta de elevação da pata nas três doses utilizadas, diferenças significativas ocorreram entre as médias de TRA1.25, TRA2.5 e TRA5 e as médias dos grupos-controle (FORM) e tramadol por via

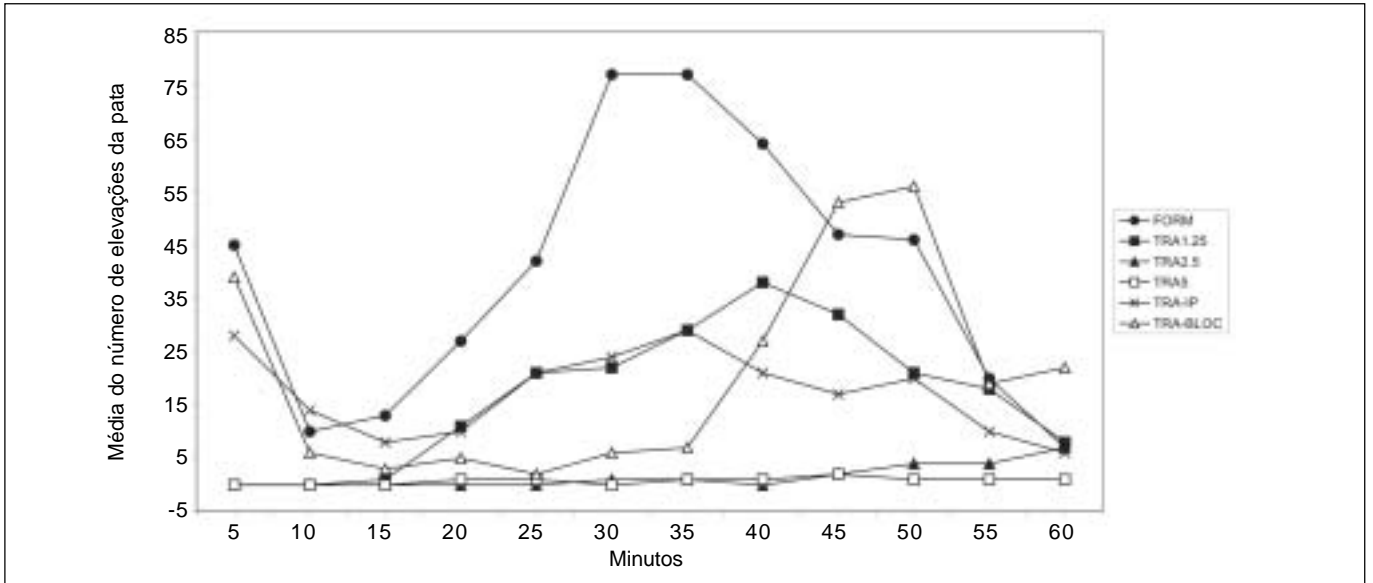


Figura 1 – Efeitos do Tramadol em Diferentes Concentrações e Locais de Administração sobre o Número de Elevações da Pata ao Longo do Tempo. O grupo FORM apresentou o típico comportamento bifásico da formalina. TRA-BLOC e TRA-IP também tiveram comportamento bifásico, ausente nos grupos TRA1.25, TRA2.5 e TRA5.

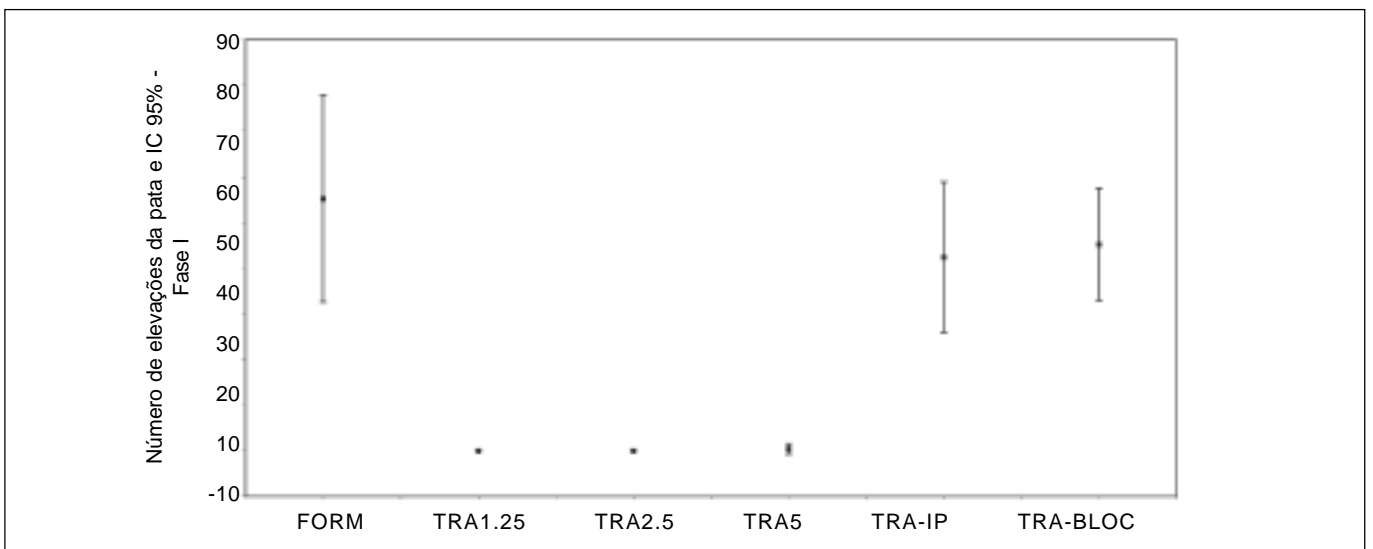


Figura 2 – Média e Intervalo de Confiança (95%) do Número de Elevações da Pata na Fase I. O comportamento foi abolido por completo nos grupos TRA1.25, TRA2.5 e TRA5. TRA-IP e TRA-BLOC não alteraram o número de elevações quando comparado com o FORM. (P < 0,05, * significativo em relação ao FORM, + significativo em relação ao TRA-IP, + significativo em relação ao TRA-BLOC).

sistêmica (TRA-IP), conforme mostra a figura 2. Na fase II, o número de elevações da pata nos grupos com tramadol local diminuiu com o aumento da dose de tramadol utilizada, com diferença significativa entre as médias do grupo TRA1.25 quando comparadas com as médias de TRA2.5 e TRA5. O comportamento de elevação da pata foi pratica-

mente abolido em doses mais altas (Figura 3). O grupo TRA-BLOC, na fase I, não foi diferente de FORM ou TRA-IP, mas apresentou diferenças significativas quando comparadas com os grupos com tramadol local (Figura 2). Na fase II, TRA-BLOC apresentou média semelhante à TRA-IP, mas diferente de FORM e dos grupos com tramadol local (Figura 3).

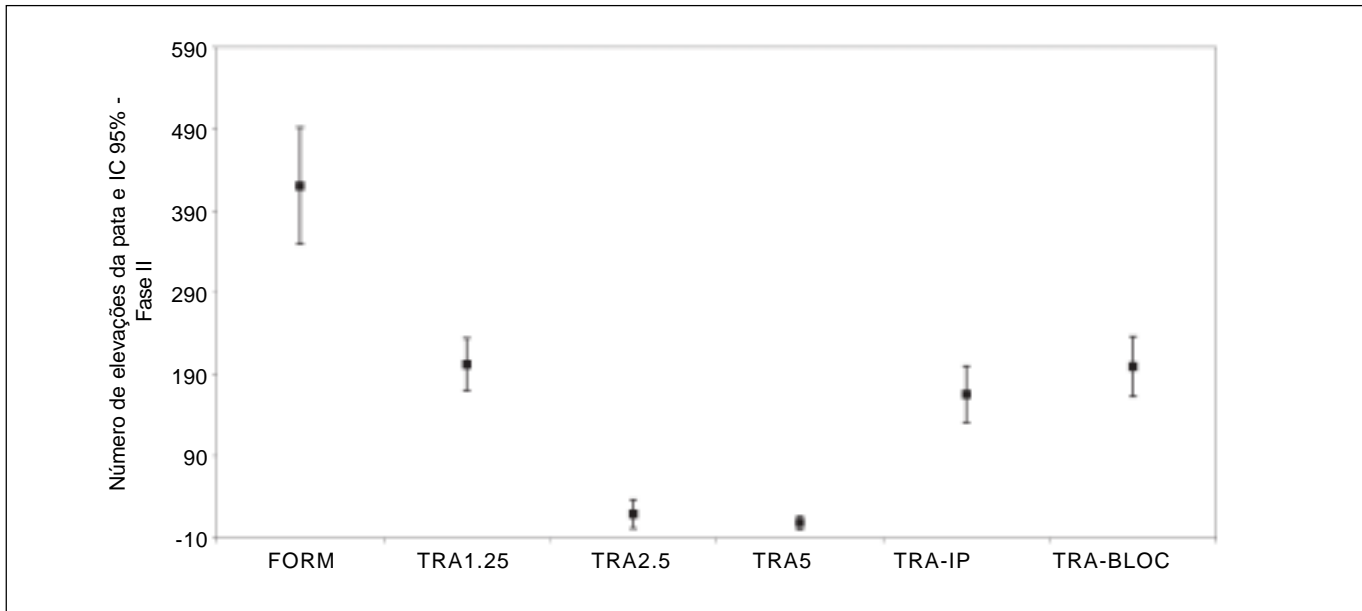


Figura 3 – Média e Intervalo de Confiança (95%) do Número de Elevações da Pata na Fase II. O comportamento foi quase abolido por completo nos grupos TRA2.5 e TRA5 e nos grupos TRA1.25, TRA-IP e TRA-BLOC o número de elevações da pata foi parcialmente diminuído quando comparado com o grupo. (P < 0,05, * significativo em relação ao FORM, + significativo em relação ao TRA-IP, + significativo em relação ao TRA-BLOC)

DISCUSSÃO

O número de elevações de pata tem correlação importante com o teste da formalina e com as respostas cardiovasculares causadas pela formalina na pata. Traz correlação confiável do comportamento doloroso em animais conscientes e não submetidos à restrição física²². Dentre os vários comportamentos estereotipados observados no teste da formalina, o número de elevações da pata é de simples observação e quantificação, sendo diretamente proporcional à concentração de formalina utilizada^{23-25,30-32}.

Efeito analgésico local do tramadol foi mostrado nesse modelo de dor com formalina em ratos. A analgesia ocorreu nas duas fases do teste comportamental. Alguns autores atribuem o efeito analgésico a efeito anestésico local^{18,34}, semelhante à clonidina¹² ou à ação antiinflamatória¹⁶. Neste estudo, a possibilidade de o efeito analgésico ser decorrente de efeito anestésico local foi testada. A técnica utilizada foi o bloqueio dos nervos que inervam a área do estímulo nociceptivo (nervos fibulares profundo e superficial). Dose

maior de tramadol foi utilizada nesse grupo de forma a evitar bloqueio insuficiente das fibras nervosas. Quando o tramadol foi empregado para bloquear a transmissão nervosa, o comportamento de elevação da pata não se modificou na fase I e mostrou pequena diminuição na fase II. Esses resultados dão suporte à hipótese que a ação analgésica do tramadol não esteja ligada à ação anestésica local no teste de elevação da pata provocado por formalina em pata de ratos.

Tsai e col., em 2001, relataram que a aplicação direta de tramadol sobre o nervo isquiático de ratos levava à redução na amplitude e velocidade de condução dos potenciais evocados somatossensitivos de forma dose-dependente. Essa inibição foi atribuída a efeito anestésico local do tramadol. As doses utilizadas foram as mesmas do presente estudo. A discrepância entre os resultados pode ser explicada pelo fato de o efeito anestésico local do tramadol, obtido por estudo eletrofisiológico e observado naquele estudo, talvez não tenha relevância clínica, e não foi verificado no presente estudo. A pequena diminuição registrada na fase II parece ser consequência de um efeito sistêmico do tramadol porque

não foi observada na fase I. O mesmo fenômeno foi notado quando o tramadol foi administrado por via intraperitoneal; entretanto, aqui o efeito foi menos pronunciado que nos grupos com administração local de tramadol. O efeito sistêmico ocorre quando o tramadol atinge o sistema nervoso central. A analgesia encontrada deve ter ocorrido por meio dos mecanismos clássicos, diminuição da recaptção de serotonina e noradrenalina, semelhante aos observados quando enantiômeros do tramadol e antagonistas de serotonina e noradrenalina foram utilizados no mesmo modelo de dor³⁵. O efeito do tramadol em receptores da serotonina no aferente primário é questionável. Receptores presentes, como 5-HT_{1A}, 5-HT₃ e 5-HT₄ têm ação pró-nociceptiva no aferente primário em modelo de dor provocada pela formalina, enquanto o receptor 5-HT_{2A} não parece afetar o componente doloroso^{30,32}. Para explicar o efeito local analgésico do tramadol por meio da ação em receptor serotoninérgico seria necessário conceber que o tramadol agisse de maneira diferente nos níveis central e periférico, diminuindo a recaptção de monoaminas centralmente e como antagonista do receptor da serotonina na periferia. Um possível efeito antiinflamatório do tramadol no modelo de dor provocada por formalina para explicar a analgesia encontrada pode ser possível. Apesar de classicamente se acreditar que a fase I esteja ligada à estimulação direta de nociceptores^{26,27}, alguns autores acreditam que a fase I também é consequência de inflamação local³². A fase II é conhecida como sendo inflamatória²⁰, e o tramadol apresenta ação antiinflamatória após injeção de levedura na pata, reduzindo o edema, apesar dessa redução ter sido pequena¹⁶. Entretanto, não é provável que apenas o efeito antiinflamatório do tramadol possa explicar a analgesia local encontrada no comportamento de elevação da pata, visto que a analgesia observada tenha sido completa e o efeito antiinflamatório parece ser parcial.

AGRADECIMENTOS

O cloridrato de tramadol foi gentilmente cedido por Cristália Prod. Quim. Farm., Brasil.

Local Effect of Tramadol on Formalin Evoked Flinching Behavior in Rats

Angela Maria Sousa, TSA, M.D.; Paula Andrea Baptista Franco, M.D.; Hazem Adel Ashmawi, TSA, M.D.; Irimar de Paula Posso, TSA, M.D.

INTRODUCTION

Tramadol hydrochloride (1RS, 2RS)-2-[(dimethylamino)methyl]-1(3-methoxyphenyl)-cyclohexanol hydrochloride is a centrally acting analgesic drug used mainly for treatment of

moderate to severe, as well as acute and chronic pain^{1,2}. A synthetic analog of codeine, tramadol is a 1:1 racemic mixture of two enantiomers [(+)- and (-)-tramadol] with different pharmacological properties, mainly in receptor affinities, which have synergic and complementary actions that result in the analgesic effect of tramadol¹⁻⁴. Two mechanisms of action are known for tramadol. Tramadol and its active metabolite M1 exhibit a low and selective affinity for μ opioid receptors^{1,2,5}. Tramadol presents indirect action on monoaminergic receptors through noradrenaline and serotonin reuptake inhibition, blocking nociceptive inputs at the medullar level^{1,4,6-10}. Pre-treatment with α_2 adrenergic receptor antagonists, yohimbine and idazoxan, and μ opioid receptor antagonist, naloxone, reduced analgesic effects of tramadol^{1,11,12}. Its direct action on μ opioid receptors and indirect action in inhibition of monoaminergic reuptake are synergic for analgesic effect⁴.

It has been observed in clinical studies that tramadol has a local analgesic effect when injected intradermally⁹, reducing propofol pain injection¹³, prolonging brachial plexus blockade when added to mepivacaine^{11,14} and reducing consumption of lidocaine in intravenous regional anesthesia¹². Tramadol analgesic effects in experimental pain models were shown in thermal hyperalgesia model¹⁵, intraplantar carrageenan inflammation¹⁶, not being related to a direct inhibitory action on prostaglandin endoperoxidase synthases¹⁷, and in spinal somatosensory evoked potential measurements¹⁸.

The formalin test is widely used to evaluate analgesic drugs, being considered a reliable model of tonic inflammatory pain¹⁹⁻²¹. Subcutaneous injection of formalin into a rat hind paw evokes an array of stereotyped behaviors. Among these behaviors, flinching (elevating and withdrawing the injected paw) is a reliable parameter of pain behavior²². Nociceptive response to formalin occurs in a biphasic pattern: there is an initial acute period (phase I, duration of 5 ± 10 min), and then after a short period of remission, phase II begins, consisting of a longer period (20 ± 40 min) of sustained activity²³⁻²⁵. The initial response is usually attributed to a direct activation of nociceptors^{26,27}, whereas phase II is associated with the release of local endogenous mediators, leading to local inflammation responsible for sensitisation of primary and spinal sensory neurons and subsequent activation of nociceptors^{23,28}.

This study aimed to verify whether there is a local analgesic effect for tramadol in a formalin pain model and to investigate a possible mechanism of action.

METHODS

All experiments were performed on Wistar male rats (280 – 360 g), which had free access to food and water and were supplied by own breeding facilities of the University of São Paulo Faculty of Medicine. The experiments were approved by the Bioethics Committee of the Hospital das Clínicas of

the University of São Paulo Faculty of Medicine in accordance with the Committee for Research and Ethical Issues of IASP (29). All behavioral experiments were conducted between 9:00 a.m. and 3:00 p.m. and under the same temperature.

Formalin-evoked nociceptive flinching behavior test

Pain was induced with formalin 1% (50 μ L) in the dorsal region of a right hind paw. Before receiving the injection, the rats were placed in an open plexiglass observation chamber for 20 minutes to acclimate them to the surroundings, then removed for the drug administration and returned to the observation chamber. A mirror was placed behind the chamber to enable unhindered observation of the formalin-injected paw. The rats were observed for nociceptive behavior immediately after formalin injection, every 5 minutes until 60 minutes after injection. Nociceptive flinching behavior was quantified as the number of flinches of the injected paw during the observation period. Such behavior varied from a simple lifting of the paw (not associated with locomotion) to a vigorous shaking of the limb, or a rippling of the back muscles associated with movement. The flinches were discrete and easily quantifiable ^{23,24,30,31-33}.

In the first part of the study, twenty five animals were used, divided into five groups, containing five animals each: FORM (formalin 1%, 50 μ L in hind paw), TRA1.25 (50 μ L containing 1.25 mg of tramadol in hind paw and 10 minutes later, 50 μ L of 1% formalin solution in hind paw), TRA2.5 (50 μ L containing 2.5 mg of tramadol in hind paw and 10 minutes later, 50 μ L of 1% formalin solution in hind paw) TRA5 (50 μ L containing 5mg of tramadol in hind paw and 10 minutes later, 50 μ L of 1% formalin solution in hind paw). A group with tramadol via intraperitoneal route, TRA-IP (100 μ L containing

5mg of tramadol intraperitoneally, and 10 minutes later 50 μ L of 1% formalin solution in hind paw), was used to show possible systemic analgesic effect. In the second part of the study a group of five animals was used for neural blockade of the dorsal region of hind paw with tramadol, TRA-BLOC (50 μ L containing 10mg of tramadol at the anterior region of ankle, to block nervus fibularis profundus and superficialis and 10 minutes later, 50 μ L of 1% formalin).

The mean number of flinches was compared by ANOVA. When a significant difference was observed in phase I, Dunnet multiple comparisons procedure was used to identify the noteworthy groups. Tukey multiple comparisons procedure was used in phase II. A value of $p < 0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

Effects on nociceptive flinching behavior.

The number of flinches were grouped in two phases, the first 10 minutes (1-10 minutes) and the following 50 minutes (11-60 minutes), recorded in two phases, first (0-10 minutes) and second (11-60 minutes). Nociceptive flinching behavior scores of all groups throughout the test are shown in figure 1. FORM displayed the typical biphasic behavior of formalin. TRA-BLOC and TRA-IP also presented biphasic behavior, not present in TRA1.25, TRA2.5 and TRA5 (Figure 1). In phase I, tramadol, when used locally, blocked almost completely flinching response with the three doses used, significant differences occurred among group means of TRA1.25, TRA2.5 and TRA5 and means of the control group (FORM) and systemic tramadol (TRA-IP), as shown

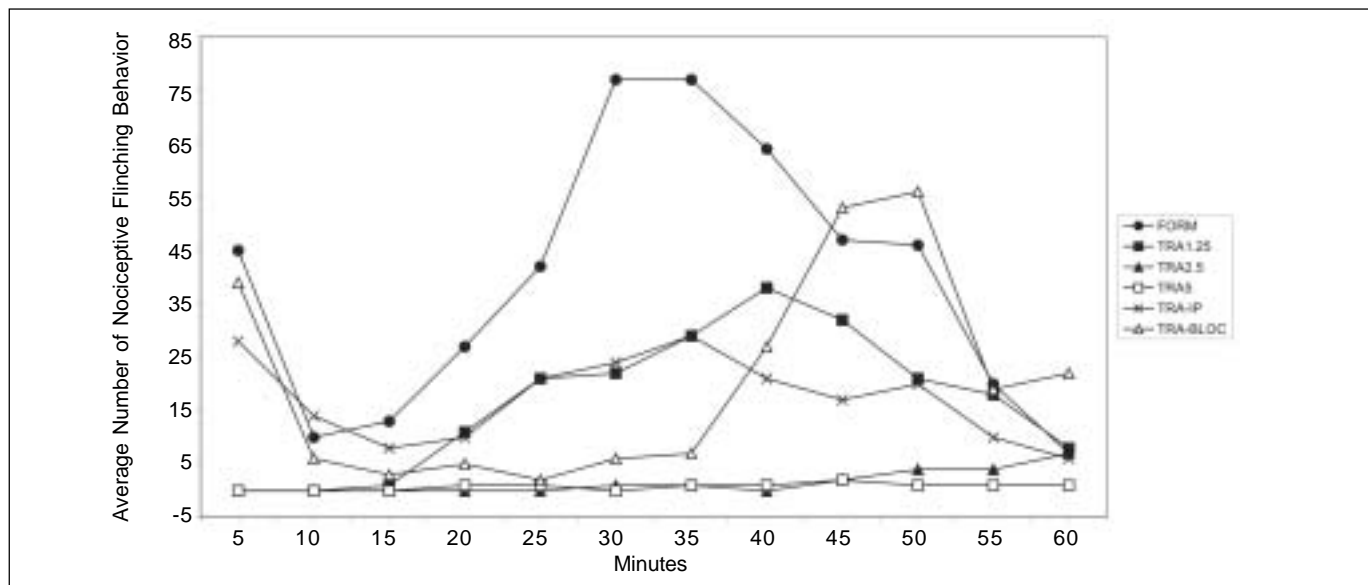


Figure 1 – Effects of Tramadol in Different Concentrations and Locals of Administrations on the Flinching Behavior Time Course. FORM showed the typical biphasic behavior of formalin. TRA-BLOC and TRA-IP also showed biphasic behavior, not present in TRA1.25, TRA2.5 and TRA5.

in figure 2. In phase II, the number of flinches in local injected tramadol groups decreased with the increase of amount of drug, with significant difference between TRA1.25 group mean compared to TRA2.5 and TRA5 means. The blockade of flinching response was almost com-

plete in higher doses (Fig. 3). TRA-BLOC in phase I was not different from FORM and TRA-IP, but it presented significant differences when compared to local injected groups (Figure 2). In phase II TRA-BLOC resulted in similar mean to TRA-IP, but different from FORM and local injected groups

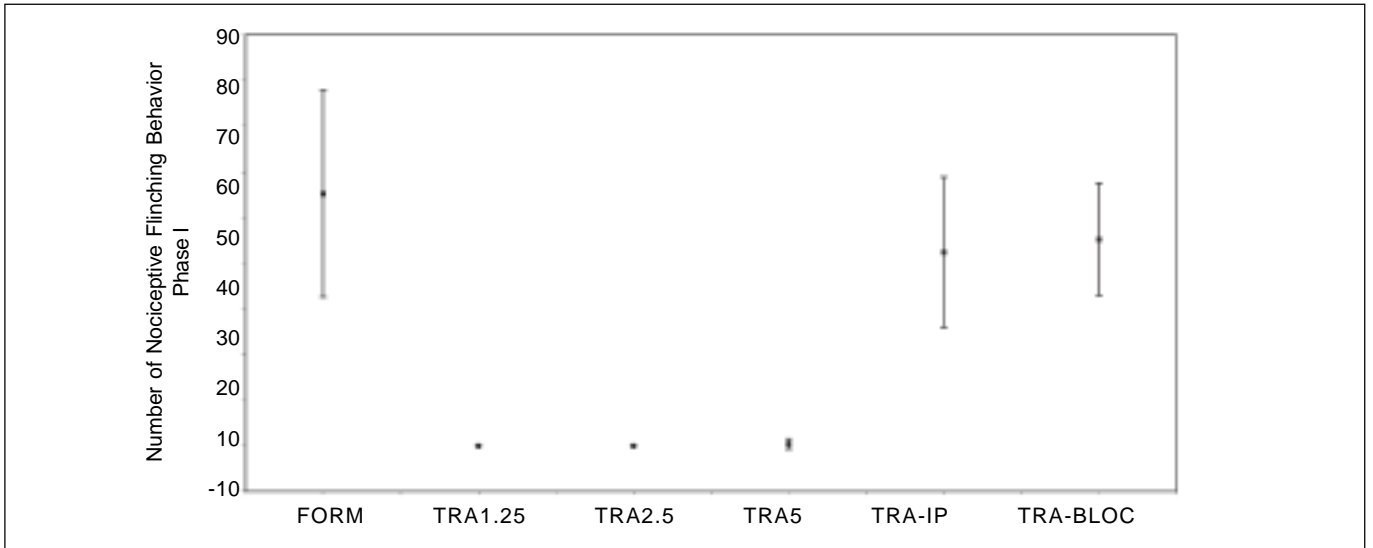


Figure 2 – Mean and Confidence Interval (95%) for the Number of Flinches in Phase I. Flinching behavior was completely blocked in TRA1.25, TRA2.5 and TRA5. TRA-IP and TRA-BLOC did not alter flinching behavior compared to FORM.

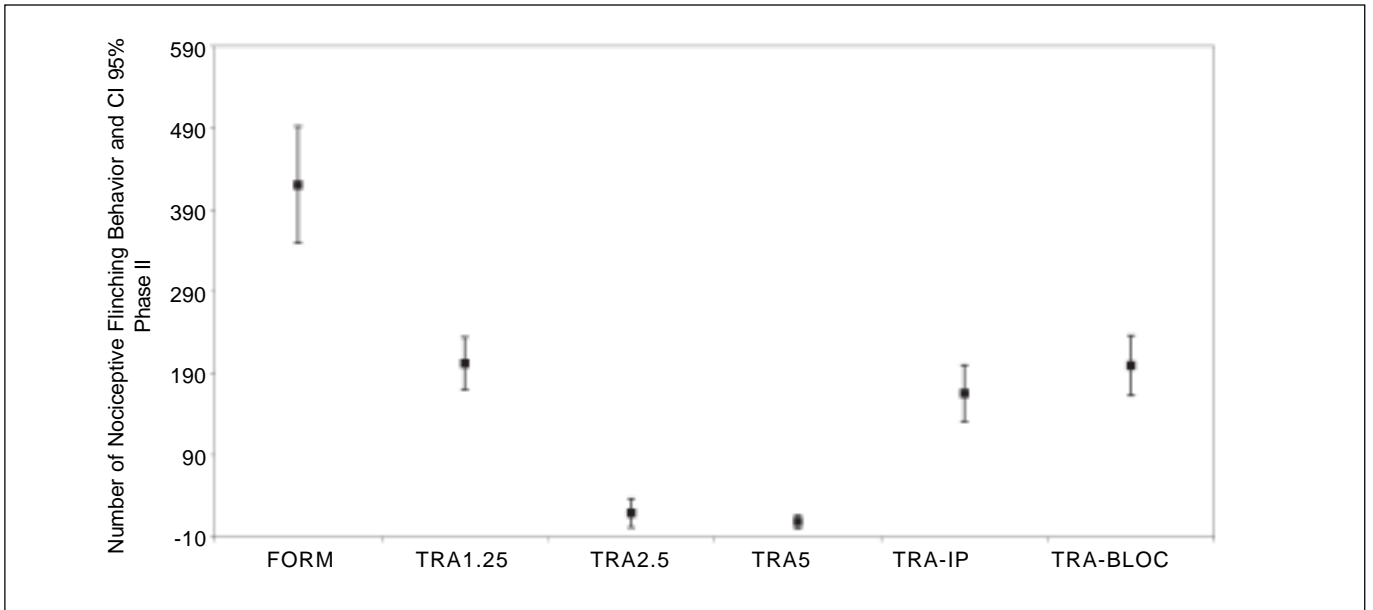


Figure 3 – Mean and Confidence Interval (95%) for the Number of Flinches in Phase II. TRA2.5 and TRA5 almost completely blocked flinching behavior, and in TRA1.25, TRA-IP and TRA-BLOC groups the flinching behavior was partially decreased compared to FORM.

(Figure 3).

DISCUSSION

In the present investigation, flinches were used to quantify formalin evoked pain behaviors since they correlate well with formalin evoked cardiovascular responses and provide a reliable correlation of pain in the conscious and freely moving rat²². Among various stereotyped behaviors observed in the formalin test, the frequency of flinches is simple to assess as well as directly proportional to formalin concentration^{23-25,30-32}.

A local analgesic effect of tramadol has been shown in this pain model with formalin in rats. Analgesia was found in both phases of the nociceptive flinching behavior test. Some authors have attributed the analgesic effect as part of local anesthetic effect^{18,34}, similar to clonidine¹² or anti-inflammatory effects¹⁶. In this study the possibility of this analgesic effect being due to a local anesthetic effect was tested. This was done through the use of a neural blockade of the area where the nociceptive stimuli was applied (nervus fibularis profundus and superficialis). A higher dose of tramadol was used in this group to avoid an insufficient block of the nerves. When tramadol was used to block neural transmission, nociceptive flinching behavior did not change in phase I and showed a small decrease in phase II. These results support the possibility that the analgesic action of tramadol observed is not linked to a local anesthetic effect in the flinching behavior elicited by formalin in rats hind paw.

In previous study, TSAI et al (2001) have found that direct application of tramadol in the sciatic nerve of rats led to a dose-dependent reduction in both amplitude and conduction speed of somatosensory evoked potentials when compared to pre-treatment measures. This inhibition was attributed to a local anesthetic effect of tramadol. The doses of tramadol used were the same in our and their study. The discrepancy between the results may be explained by the local anesthetic effect of tramadol (electrophysiological data) observed in their study, being of no clinical relevance as observed in ours. The small decrease observed in phase II seems to be consequence of a systemic effect of tramadol since it did not occur in phase I. The same phenomenon was observed when tramadol was used through the intraperitoneal route. However, systemic tramadol analgesia only occurred in phase II, and was less than that observed in local injected tramadol groups. It is expected that systemic effect occurs after tramadol reaches peak in CNS. These results may represent analgesia provided by tramadol central action through classical mechanisms, a decrease in serotonin and noradrenaline reuptake, similar to the findings observed in the same model using tramadol enantiomers via intraperitoneal route and serotonin and noradrenalin antagonists³⁵. Tramadol effect on serotonin receptors present on sensory afferent nerve endings is questionable. Serotonin receptors present, like 5-HT_{1A}, 5-HT₃ and 5-HT₄, have pronociceptive action on sensory afferent nerve endings on formalin pain

model while 5-HT_{2A} seems not to affect pain behavior^{30,32}. To explain local tramadol analgesia through action on serotonin receptors, it would be necessary to conceive that tramadol acts in different modes at central level and primary afferent neuron ending, decreasing reuptake of serotonin and noradrenalin in the former and acting as serotonin antagonist in the latter. A possible anti-inflammatory effect for tramadol in the formalin pain model to explain the analgesia observed may be present. Although phase I is believed to be linked to direct stimulation of nociceptors^{26,27}, some authors believe that phase I is also a consequence of local inflammation³². Phase II is known to be inflammatory²⁰ and tramadol presented anti-inflammatory action after yeast injection in paw, reducing paw edema, though this reduction was also small¹⁶. However, it is not probable that only the anti-inflammatory effect of tramadol may explain local analgesia obtained in evoked flinching behavior, since the analgesia observed was complete, and anti-inflammatory effect seems to be partial.

ACKNOWLEDGEMENTS

Tramadol hydrochloride was kindly provided by Cristália Prod. Quim. Farm., Brazil.

REFERÊNCIAS – REFERENCES

01. Dayer P, Desmeules J, Collart L — Pharmacologie du tramadol. *Drugs*, 1997;53 (Suppl 2):18-24.
02. Lewis KS, Han NH — Tramadol: a new centrally acting analgesic. *Am J Health Syst Pharm*, 1997;54:643-652.
03. Raffa RB, Friderichs E — The basic science aspect of tramadol hydrochloride. *Pain Rev*, 1996;3:249-271.
04. Scott LJ, Perry CM — Tramadol: a review of its use in perioperative pain. *Drugs*, 2000;60:139-176.
05. Gillen C, Haurand M, Kobelt DJ et al. — Affinity, potency and efficacy of tramadol and its metabolites at the cloned human mu-opioid receptor. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2000; 362:116-121.
06. Driessen B, Reimann W, Giertz H — Effects of the central analgesic tramadol on the uptake and release of noradrenaline and dopamine in vitro. *Br J Pharmacol*, 1993;108:806-811.
07. Lee CR, Mctavish D, Sorkin EM — Tramadol. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in acute and chronic pain states. *Drugs*, 1993;46:313-340.
08. Lehmann KA — Le tramadol dans les douleurs aiguës. *Drugs*, 1997; 53(Suppl 2):25-33.
09. Pang WW, Mok MS, Chang DP et al. — Local anesthetic effect of tramadol, metoclopramide, and lidocaine following intradermal injection. *Reg Anesth Pain Med*, 1998;23:580-583.
10. Sindrup SH, Andersen G, Madsen C et al. — Tramadol relieves pain and allodynia in polyneuropathy: a randomized, double-blind, controlled trial. *Pain*, 1999;83:85-90.
11. Kapral S, Gollmann G, Waltl B et al. — Tramadol added to mepivacaine prolongs the duration of an axillary brachial plexus blockade. *Anesth Analg*, 1999; 88:853-856.
12. Acalovschi I, Cristea T, Margarit S et al. — Tramadol added to lidocaine for intravenous regional anesthesia. *Anesth Analg*, 2001;92:209-214.
13. Pang WW, Mok MS; Chang DP et al. — The peripheral analgesic effect of tramadol in reducing propofol injection pain: a com-

- parison with lidocaine. *Reg Anesth Pain Med*, 1999;24:246-249.
14. Buttner J, Ott B, Klose R — Effects of adding clonidine to mevacaine: axillary brachial plexus blockade. *Anaesthetist*, 1992; 41:548-554.
 15. Bianchi M, Panerai AE — Anti-hyperalgesic effects of tramadol in rat. *Brain Res*, 1998;797:163-166.
 16. Bianchi M, Rossoni G, Sacerdote P et al. — Effects of tramadol on experimental inflammation. *Fundam Clin Pharmacol*, 1999; 13:220-225.
 17. Buccellati C, Sala A, Ballerio R et al. — Tramadol anti-inflammatory activity is not related to a direct inhibitory action on prostaglandin endoperoxidases synthases. *Eur J Pain*, 2000;4:413-415.
 18. Tsai YC, Chang PJ, Jou IM — Direct tramadol application on sciatic nerve inhibits spinal somatosensory evoked potentials in rats. *Anesth Analg*, 2001;92:1547-1551.
 19. Dubuisson D, Dennis SG — The formalin test: A quantitative study of analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 1977;4:161-174.
 20. Tjylsen A, Berge OG, Hunskaar S et al. — The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 1992;51:5-18.
 21. Abbott FV, Franklin KBJ, Westbrook RF — The formalin test: scoring properties of first and second phases of pain response in rats. *Pain*, 1995;60:91-102.
 22. Taylor BK, Peterson MA, Basbaum AI — Persistent cardiovascular and behavioural nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. *J Neurosci*, 1995;15: 7575-7584.
 23. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H et al. — Modified formalin test: characteristic bifasic pain response. *Pain*, 1989;38: 347-352.
 24. Wheeler-Aceto H, Cowan A — Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology (Berl)*, 1991;104:35-44.
 25. Teng CJ, Abbott FV — The formalin test: a dose-response analysis at three developmental stages. *Pain*, 1998;76:337-347.
 26. Hunskaar S, Hole K — The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, 1987;30: 103-114.
 27. Puig S, Sorkin LS — Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain*, 1996; 64:345-355.
 - 28.Coderre TJ, Vacarino AL, Melzack R — Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res*, 1990;535:155-158.
 29. Zimmermann M — Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 1983;16:109-110.
 30. Doak GJ, Sawynok J — Formalin induced nociceptive behavior and oedema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. *Neuroscience*, 1997;80:939-949.
 31. Granados-Soto V, Rufino MO, Lopes LDG et al. — Evidence for the involvement of the nitric oxide — cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. *Eur J Pharmacol*, 1997;340:177-180.
 32. Parada CA, Tambeli CH, Cunha FQ et al. — The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin induced nociception. *Neuroscience*, 2001;102:937-944.
 33. Ashmawi HA, Chambergo FS, Araujo Palmeira CA et al. — The effects of pyrilamine and cimetidine on mRNA C-fos expression and nociceptive flinching behavior in rats. *Anesth Analg*, 2003; 97:541-546.
 34. Mert P, Gunes Y, Ozcengiz, Gunay I et al. — Comparative effects of lidocaine and tramadol on injured peripheral nerves. *Eur J Pharmacol*, 2006;543:54-62.
 35. Oliva P, Aurilio C, Massimo F et al. — The antinociceptive of tramadol in the formalin test is mediated by the serotonergic component. *Eur J Pharmacol*, 2002;445:179-185.

RESUMEN

Sousa AM; Franco PAB, Ashmawi HA, Posso IP — Efecto Analgésico Local del Tramadol en Modelo de Dolor Provocado por Formalina en Ratones.

JUSTIFICATIVA Y OBJETIVOS: El clorhidrato de tramadol es un fármaco analgésico de acción central, utilizado en el tratamiento de dolores moderados e intensos. Quedó demostrado un efecto analgésico local del tramadol, pero su mecanismo de acción no fue establecido.

MÉTODO: Se estudió el efecto de la administración local, sistémica y por bloqueo de nervio periférico del tramadol sobre el comportamiento de elevación de la pata generado por la inyección de 50 µL de formalina a 1% en la región dorsal de la pata de los ratones. El número de elevaciones de la pata fue observado durante 60 minutos.

RESULTADOS: La administración local de tramadol en concentraciones mayores (2,5 y 5 mg) conllevó al bloqueo prácticamente completo del comportamiento de elevación de la pata durante todo el test. La administración sistémica y por bloqueo de nervio periférico, no afectó el comportamiento de elevación de la pata en la fase I y se redujo parcialmente en la fase II.

CONCLUSIONES: El tramadol presentó un efecto analgésico local en el modelo de comportamiento de elevaciones de la pata con formalina, que es diferente de su acción central. Ese efecto, en ese modelo, no parece estar vinculado al efecto anestésico local.