

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL

ANNA AMELIA SILVA RIOS ROMAN

**PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO
NO EFEITO SEDATIVO E ANTINOCICEPTIVO
DOS AGONISTAS α_2 -ADRENÉRGICOS**

NITERÓI
2004

ANNA AMELIA SILVA RIOS ROMAN

**PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO
NO EFEITO SEDATIVO E ANTINOCICEPTIVO
DOS AGONISTAS α_2 - ADRENÉRGICOS**

Tese apresentada ao Departamento de Patologia da
Universidade Federal Fluminense para obtenção do
grau de Doutor em Patologia Experimental

Orientadores: Professor Miguel Benito Farah
Professora Heloisa Werneck de Macedo
Co- Orientador: Professor Roberto Soares de Moura

NITERÓI
2004

ANNA AMELIA SILVA RIOS ROMAN

**PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NO EFEITO SEDATIVO E
ANTINOCICEPTIVO DOS AGONISTAS α_2 - ADRENÉRGICOS**

Tese apresentada ao Departamento de Patologia da Universidade Federal Fluminense, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Patologia Experimental.

Aprovado em

BANCA EXAMINADORA

Prof _____
Alberto Esteves Gemal

Prof _____
Ângela de Castro Resende

Prof _____
Marcos Raimundo de Freitas

Prof _____
Miguel de Lemos Neto

Prof _____
Tânia Tano

NITERÓI
2004

Roman, Anna Amélia Silva Rios

Participação do Óxido Nítrico no Efeito Sedativo e Antinociceptivo dos Agonistas α_2 - Adrenérgicos./Anna Amélia Silva Rios Roman. - 2004.

Xv, 91p, il 20

Orientador: Professor Miguel Benito Farah
Co- Orientador: Professor Roberto Soares de Moura

Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal Fluminense,
Departamento de Patologia Experimental.

Clonidina. 2. Sedação. 3. Antinocicepção. 4. Óxido Nítrico. 5.
Camundongos. Rilmenidina. 6

I. Farah, Miguel Benito. II Universidade Federal Fluminense.III
Título

A minha família, sem a qual não seria possível esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Roberto Soares de Moura os meus mais sinceros agradecimentos pela orientação firme e objetiva, sem as quais não seria possível realizar o trabalho.

Ao Professor Miguel Benito Farah pelo apoio e transmissão dos conhecimentos para a elaboração do trabalho.

A Professora Tânia Tano pelo apoio, transmissão de conhecimentos, sugestões, críticas e incentivo nos momentos difíceis ao longo desta jornada.

A Professora Heloisa Werneck de Macedo pelo incentivo e compreensão ao longo do trabalho.

Aos demais colegas do Laboratório de Farmacologia da Universidade Estadual do Rio de Janeiro.

Aos colegas anestesiólogos do Hospital Universitário Antônio Pedro pelo incentivo e colaboração ao longo desta jornada.

Aos Bioteristas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro e do Instituto Vital Brasil que tanto colaboraram para a realização da parte experimental do trabalho.

Ao meu querido Claiton pela inestimável ajuda no trabalho de formatação, incentivo e compreensão ao longo do trabalho.

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização do trabalho.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α MDOPA	Alfa-metildopa
AMPA	ácido 2-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
APUD	Figuras 2, 3, 4 e 5
C	Controle
Clo	Clonidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDRF	Fator de relaxamento derivado do endotélio
i.p.	Intra-peritoneal
i.v.	intra-venosa
GMP c	monofosfato de guanosina cíclico
L-NAME	nitro ^ω -L-arginine methyl ester
NALX	Naloxona
NMDA	N-metil D aspartato
NMMA	N ^G -monometil-L-arginina
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
eNOS	Óxido Nítrico Síntese endotelial
iNOS	Óxido Nítrico Síntese induzível
nNOS	Óxido Nítrico Síntese neuronal
ODQ	1H-[1,2,4] oxadiazole [4,3-a] quinaxalin-1-one
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
Ril	Rilmenidina
S	Salina 0,9%
7-NI	7-Nitroindazole
TFL	“tail-flick”

LISTA DE ILUSTRAÇÕES:

FIGURA 1 - Padrão das contorções abdominais apresentadas por camundongos tratados com ácido acético 0,6%	7
FIGURA 2 - Mediadores da excitabilidade do nociceptor	8
FIGURA 3 - Ativação das vias nociceptivas por estimulação periférica	10
FIGURA 4 - Representação esquemática da sinapse excitatória medular	12
FIGURA 5 - Representação esquemática do sistema supressor da dor	13

LISTA DE GRÁFICOS:

- GRÁFICO 1 - Efeito da administração venosa de clonidina no tempo de sono.... 35
- GRÁFICO 2 - Efeito da injeção de clonidina no tempo de sono induzido pelo Tiopental sódico 36
- GRÁFICO 3 - Efeito do 7-NI (15mg/kg) na potencialização do tempo de sono induzido pelo tiopental causada pela clonidina 37
- GRÁFICO 4 - Efeito da NG-nitro-L-arginina-metil-éster na potencialização induzida pela clonidina 38
- GRÁFICO 5 - Efeito da NG-nitro-L-arginina-metil-éster na potencialização do tempo de sono induzido pelo tiopental i.p., induzida pela α -metildopa e midazolam 39
- GRÁFICO 6 - Efeito do L-NAME no tempo de sono induzido por barbitúricos em animais tratados com rilmenidina 40
- GRÁFICO 7 - Efeito antinociceptivo da clonidina i.v. no teste das contorções abdominais 42
- GRÁFICO 8 - Efeito antinociceptivo da clonidina i.p. no teste das contorções abdominais e “tail-flick” 44
- GRÁFICO 9 - Efeito do 7- Nitroindazol (7-NI) no efeito antinociceptivo da clonidina (A) medido pelas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e (B) no teste do “tail-flick” 46
- GRÁFICO 10- Efeito do 1H-[1,2,4]oxadiazole[4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ) no efeito antinociceptivo da clonidina avaliado pelas contorções abdominais indu-

zidas pelo ácido acético 0.6% (A) e pelo teste do “tail- flick” (B).....	48
GRÁFICO 11- Efeito da naloxona (Nlx) no efeito antinociceptivo da clonidina ou morfina avaliado pelas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0.6% (A) e pelo teste de retirada da cauda (B)	50
GRÁFICO 12- Efeito da atropina (0.5 mg/kg) na antinocicepção induzida pela clonidina no teste do “tail-flick” em camundongos	51
GRÁFICO 13 - Efeito da L-Arginina na antinocicepção induzida pela clonidina no teste “tail-flick”	52
GRÁFICO 14- Efeito antinociceptivo da rilmenidina no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (A) e no teste do “tail-flick” (B).....	54
GRÁFICO 15- Efeito do 7- Nitroindazol (7-NI) no efeito antinociceptivo da rilmenidina avaliado pelas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0.6 % (A) e no teste do “tail-flick” (B)	56

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	vii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	viii
LISTA DE GRÁFICOS	ix
SUMÁRIO	xi
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 EFEITO SEDATIVO DOS AGONISTAS α_2 -ADRENÉRGICOS	3
1.2 EFEITO ANTINOCICEPTIVO DOS AGONISTAS α_2 -ADRE- NÉRGICOS	6
2- OBJETIVO DO TRABALHO	22
2.1 OBJETIVOS PRINCIPAIS.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	22
3- MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 ANIMAIS UTILIZADOS.....	24
3.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO SEDATIVO PELA PERDA DO REFLEXO POSTURAL E PELO PROLONGAMENTO DO TEMPO DE SONO INDUZIDO PELO TIOPENTAL SÓDI- CO	
3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS MODELO DO TEMPO DE	24

SONO.....	
a) <u>Tempo de sono do barbitúrico</u>	25
b) <u>Efeito sedativo da clonidina e da rilmenidina</u>	25
c) <u>Efeito do 7-NI no tempo de sono induzido pela Clonidina</u>	26
d) <u>Efeito do L-NAME na potencialização induzida pela clonidina ou rilmenidina no tempo do sono do barbitúrico</u>	26
e) <u>Efeito do L-NAME na potencialização do tempo de sono do barbitúrico induzido pela α-metildopa midazolam</u>	26
3.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA CLONIDINA E RILMENIDINA	
3.4.1 Teste das contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético 0.6% em camundongos	26
3.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS CONTORÇÕES ABDOMINAIS.....	27
a) <u>Contorções abdominais induzidas pela administração intraperitoneal de ácido acético a 0,6%</u>	27
b) <u>Efeito antinociceptivo da Clonidina e Rilmenidina</u>	27
c) <u>Ação do 7-NI no efeito antinociceptivo da Clonidina</u>	28
d) <u>Efeito do ODQ no efeito antinociceptivo da clonidina</u>	28
e) <u>Efeito da naloxona no efeito antinociceptivo da clonidina</u>	28
3.6 TESTE “TAIL-FLICK” EM CAMUNDONGOS	28
3.7 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS “TAIL-FLICK”.....	29
a) <u>Tempo de latência da retirada da cauda</u>	29

b) <u>Efeito antinociceptivo da clonidina e da rilmenidina</u>	30
c) <u>Ação do 7-NI no efeito antinociceptivo da clonidina e da rilmenidina</u>	31
d) <u>Efeito do ODQ no efeito antinociceptivo da clonidina</u>	31
e) <u>Efeito da naloxona no efeito antinociceptivo da clonidina</u>	
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
3.9 FÁRMACOS E SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS	32
4 RESULTADOS	32
4.1 EFEITO SEDATIVO DA CLONIDINA	33
4.1.1 <u>Efeito dos inibidores da NO sintase, 7- NI e L-NAME, no efeito antinociceptivo da clonidina</u>	34
	35
	35
	37
4.1.2 <u>Efeito do L-NAME na potencialização do tempo do sono do barbitúrico induzida pela α-metildopa e midazolam</u>	39
4.1.3 <u>Efeito da inibição da NO sintase pelo e L-NAME no efeito sedativo da rilmenidina</u>	40
	40
4.2 CONTORÇÕES ABDOMINAIS e TESTE “TAIL-FLICK”.	42
4.2.1 <u>Efeito da administração de clonidina</u>	42
4.2.2 <u>Efeito da inibição da NO- sintase e guanilato- ciclase no efeito</u>	

<u>antinociceptivo da clonidina</u>	45
4.2.3 <u>Efeito da administração de naloxona no efeito antinociceptivo da clonidina</u>	49
4.2.4 <u>Efeito da administração de atropina</u>	51
4.2.5 <u>Efeito da administração de L- arginina</u>	52
4.2.6 <u>Atividade antinociceptiva dose dependente a rilmenidina</u>	53
4.2.7 <u>Efeito da inibição da NO- sintase no efeito antinociceptivo da rilmenidina</u>	55
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
ANEXO- TRABALHOS PUBLICADOS	

RESUMO

O mecanismo do efeito sedativo da clonidina (CLO), um agonista α_2 -adrenérgico não é claro. Como a ativação dos receptores α_2 -adrenérgicos induz a liberação de Óxido Nítrico (NO) das células endoteliais, testamos a hipótese de que o efeito sedativo e antinociceptivo da CLO sistêmica dependeria de mecanismos relacionados a via NO-GMPc. O 7-NI reduziu significativamente o tempo de sono induzido pela clonidina. O tempo de sono induzido pelo tiopental (TST) foi aumentado pela CLO, α -metildopa, rilmenidina (RIL) and midazolam. O L-NAME reduziu o prolongamento do TST da CLO, α -metildopa, RIL, sem alterar o efeito do midazolam. O efeito inibitório do L-NAME no prolongamento do TST com a CLO foi revertido pela L-arginine. Os resultados sugerem mecanismos NO-dependentes no efeito sedativo da clonidina. Esses efeitos parecem ser específicos para a ação sedativa dos agonistas α_2 -adrenérgicos. Avaliamos também a possível ligação envolvendo opóides e a via do NO-GMPc no efeito antinociceptivo da CLO. O efeito antinociceptivo induzido pela administração sistêmica de CLO e RIL foi avaliado utilizando o teste das contorções abdominais em camundongos e o teste "tail-flick". A CLO (3–120 μ g/kg) and RIL induziram efeito antinociceptivo dose-dependente no teste das contorções abdominais e TFL. O efeito antinociceptivo da CLO foi significativamente reduzido pela inibição da NO-synthase and guanylyl ciclase. O efeito da RIL também foi reduzido pelo 7-NI. O efeito antinociceptivo da morfina foi inibido pela naloxona, que não inibiu o efeito da CLO. Nossos resultados sugerem que o efeito da CLO sistêmica não envolve receptor opióide e é modulado por uma via NO-GMPc.

Palavras chave: Clonidine, Rilmenidine, Sedation, 7-NI, L-NAME, ODQ, L-Arginine, Morphine; Naloxone, antinociception

ABSTRACT

The mechanism of sedative effect of clonidine (CLO), an α_2 -adrenoceptor agonist remain unclear. As the activation of α_2 -adrenoceptors induces release of nitric oxide (NO) from endothelial cells, which has led us to test the hypothesis that sedative and antinociceptive effect from systemic CLO depends on the NO-cGMP pathway mechanisms. The sleeping time in rats induced by CLO was significantly decreased by 7-NI. Thiopental sleeping time (TST) was increased by CLO, α -methyldopa, rilmenidine (RIL) and midazolam. L-NAME reduced the prolongation effect of clonidine, α -methyldopa, RIL, but did not alter the effect of midazolam on the TST. The inhibitory effect of L-NAME on CLO -dependent prolongation of TST was reversed by L-arginine. These results suggest that NO-dependent mechanisms are involved in the sedative effect of CLO. In addition, this effect seems to be specific for the sedative action of α_2 -adrenoceptors agonists. The possible involvement of an opioid and NO-GMPc pathway link in the antinociceptive effect of CLO was also evaluated. The antinociceptive effect induced by systemic administration of CLO and rilmenidine (RIL) was evaluated using the mice writhing tests and TFL. CLO (3–120 μ g/kg) and RIL induces a dose-dependent antinociceptive effect in the writhing tests and TFL. The antinociceptive effect of CLO was significantly reduced by NO-synthase and guanylyl cyclase inhibition. RIL effect was also reduced by 7-NI. The antinociceptive effect of morphine, but not CLO, was inhibited by naloxone. Our current results suggest that the antinociceptive effect of systemic clonidine does not involve the opioid receptor and is modulated by the NO-cGMP pathway. Key Words: Clonidine, Rilmenidine, Sedation, 7-NI, L-NAME, ODQ, L-Arginine, Morphine; Naloxone, antinociception

1 INTRODUÇÃO

A clonidina, um agonista α_2 –adrenérgico, foi sintetizada na Alemanha em 1962 pelo laboratório Boehringer Ingelheim, sugerida como um novo descongestionante nasal. Entretanto, ao contrário do esperado, a clonidina nos testes clínicos produziu um importante efeito vasodilatador, tornando-se o protótipo dos anti-hipertensivos de ação central (Hoefke & Kobinger, 1966).

A ação sedativa observada em doses terapêuticas é considerada um dos principais efeitos colaterais dos agonistas α_2 -adrenérgicos (Schmitt,1977; Kobinger,1978; Drew et al., 1977, 1979; Dollery, 1988; Hossmann et al., 1980), quando utilizados no tratamento da hipertensão arterial. O efeito sedativo apresenta intensidade comparável a sedação causada pelos benzodiazepínicos (Scheinin et al., 1989). O marcante efeito sedativo, desestimulou a ampla utilização clínica da clonidina como anti-hipertensivo, e vários trabalhos sugeriram que a clonidina poderia ser interessante como medicação pré-anestésica (Scheinnin et al., 1989; Carabine et al.,1991; Correa-Salles et al., 1992). Atualmente, os agonistas α_2 –adrenérgicos são utilizados com frequência pelos anestesiológicos como adjuvantes da anestesia geral em situações clínicas, como por exemplo, para estabilizar parâmetros hemodinâmicos no per-operatório (Ghignone et al.,1987; Maze & Tranquilli, 1991; Hayashi & Maze, 1993) e potencializar os efeitos dos anestésicos gerais inalatórios. Os agonistas α_2 –adrenérgicos reduzem o consumo e a concentração alveolar mínima dos anestésicos gerais inalatórios (Miller et al., 1975; Mueller et al., 1975; Segal et al., 1989). A clonidina reduz ainda a incidência de tremores no período pós operatório (Goldfarb et al., 1989) e a utilização de oxigênio pelo sistema nervoso central (Quintin et al., 1991), protegendo tanto o cérebro quanto o coração dos danos isquêmicos (Payen et al., 1990; Talke et al., 1993). A

clonidina diminui a tolerância observada pelo uso crônico de opióides e pode ser utilizada no tratamento da síndrome de abstinência a opióides (Gold et al., 1978).

O mecanismo da ação anti-hipertensiva dos agonistas α_2 -adrenérgicos não está completamente esclarecido. Parecendo envolver principalmente a ativação dos receptores α_2 -adrenérgicos no sistema nervoso central, reduzindo a liberação de neurotransmissor na terminação adrenérgica, acarretando diminuição do tônus simpático em órgãos periféricos (Henning, 1984). A α -metildopa possui um mecanismo de ação semelhante ao da clonidina. A α -metildopa necessita ser captada por neurônios noradrenérgicos onde é descarboxilada e hidroxilada dando origem ao composto α -metilnoradrenalina, que é menos ativo que a noradrenalina nos receptores α_1 -adrenérgicos e também possui atividade agonística α_2 -adrenérgica.

Recentemente foi demonstrado que o efeito antihipertensivo da clonidina é, pelo menos em parte, dependente da liberação do Óxido Nítrico (NO) pela ativação dos receptores α_2 -adrenérgicos (Soares de Moura & Cardoso Leão, 1997; Soares de Moura et al. 2000).

Em adição ao efeito anti-hipertensivo e sedativo (Hoefke & Kobinger, 1966), a clonidina também possui atividade analgésica. A clonidina possui marcante atividade analgésica no homem (Coombs et al., 1985), provavelmente causada pela ativação dos receptores α_2 -adrenérgicos centrais (Yaksh & Reddy, 1981; Mason & Angel, 1983; Maze & Tranquilli, 1991).

O NO além de relaxar a musculatura lisa vascular, inibe a agregação plaquetária, constituindo importante mecanismo de regulação do fluxo sanguíneo e perfusão tecidual inclusive no sistema nervoso central onde participa no mecanismo

de controle do fluxo sanguíneo cerebral e no mecanismo fisiopatológico da degeneração neuronal pós-isquêmica. No sistema nervoso central o NO pode agir como mensageiro intracelular e neurotransmissor excitatório liberado pelas terminações nervosas (Moncada, 1991), participando em mecanismos como o da memória e percepção da dor. A clonidina aumenta a liberação do NO ou EDRF no modelo experimental de ratos expostos ao exercício crônico (Chen & Chiang, 1996). Este efeito pode ser antagonizado pela aplicação do antagonista da NO-sintase, a L-arginina-metil éster (L-NAME) (Chen & Chiang, 1996).

Recentemente nosso laboratório demonstrou que o efeito anti-hipertensivo da clonidina pode ser reduzido pela inibição da Óxido Nítrico sintase, sugerindo que este efeito é devido não só à ativação de receptores α_2 -adrenérgicos centrais como também pela liberação de NO (Soares de Moura et al., 2000). Foi demonstrado recentemente que o efeito anti-hipertensivo da clonidina e rilmenidina pode ser atenuado pela administração de azul de metileno ou L-NAME (Soares de Moura et al., 2000).

1.1 EFEITO SEDATIVO DOS AGONISTAS α_2 -ADRENÉRGICOS

A clonidina apresenta importante efeito sedativo no homem, quando utilizada como anti-hipertensivo. Trabalhos experimentais demonstram que a administração de clonidina em ratos e camundongos reduz a atividade motora e prolonga o tempo de sono induzido por barbitúricos de maneira dose dependente (Laverty & Taylor, 1969; Delbarre & Schmitt, 1971; Drew et al., 1979). O efeito sedativo da clonidina pode se dar pela ativação de receptores α_2 -adrenérgicos centrais (Schmitt, 1977; Zebrowska-Lupina et al., 1977; Kobinger, 1978; Drew et al., 1979; Timmermans et al., 1981). Este efeito pode ser evitado pela administração de

antagonistas α_2 -adrenérgicos (Delbarre & Smith, 1971, Timmermans et al., 1981; Maze & Tranquilli, 1991).

Alguns autores sugeriram que o efeito sedativo dos agonistas α_2 -adrenérgicos envolvessem a ativação do receptor α_2 -adrenérgico no Locus Coeruleus, levando a redução do tônus simpático (Redmond et al., 1976; Amaral & Sinnamon, 1977; Timmermans et al., 1981; De Sarro et al., 1987). O locus coeruleus é constituído por um grupo de corpos celulares de neurônios noradrenérgicos situados na parte dorsal da ponte. É considerado como crucial no controle do ciclo sono-vigília (Cespuglio et al., 1982; Jouvet, 1973). Foi descrito por Nassif et al. (1983) que a lesão neuroquímica do “locus coeruleus”, causada pela administração de 6-hidroxidopamina em ratos, embora deplete quase completamente a noradrenalina no córtex cerebral e cerca de 1/3 da noradrenalina no tronco cerebral, não produza supressão da atividade sedativa da clonidina no teste para avaliação de atividade locomotora “open field”. Como as lesões produzidas quimicamente não destroem totalmente as projeções do locus coeruleus, foi sugerido que a sedação induzida pela clonidina seja causada por ativação dos receptores α_2 -adrenérgicos pós-sinápticos, e que talvez esses terminais possam liberar serotonina (Nassif et al., 1983).

A clonidina e a dexmedetomidina, em doses sedativas, diminuem a concentração de GMPc no sistema nervoso central. Este efeito pode ser revertido pela administração de ioimbina em vários tecidos, como por exemplo, no córtex cerebral, hipocampo e núcleo caudado. A diminuição do GMPc no sistema nervoso central sugere que o efeito sedativo possa ser mediado pela ativação do receptor α_2 -adrenérgico acoplado a um sistema NO dependente (Vulliemoz et al., 1996).

A rilmenidina é um fármaco imidazolínicico que também possui atividade agonística no receptor α_2 -adrenérgico e tem sua estrutura relacionada com a clonidina (Van-Zwieten et al.,1986; Feldman et al., 1990), parece não compartilhar das propriedades sedativas dos agonistas α_2 -adrenérgicos como a clonidina, α -metildopa e dexmedetomidina (Van-Zwieten et al.,1986). Talvez a possível explicação para tal fato, se deva a maior afinidade da rilmenidina por receptores imidazolidínicos no núcleo reticular lateral da medula oblongata ventro-lateral, e por possuir menor afinidade por neurônios do locus coeruleus (Bousquet et al.,1984; Bricca et al., 1989; Feldman et al., 1990). Existem evidências de que a rilmenidina possa se ligar à sítios específicos no sistema nervoso central denominados de receptores imidazolínicos (Bousquet et al.,1984; 2000), que seriam importantes para a regulação da pressão arterial. Estes receptores seriam numerosos na medula ventro-rostralateral. A rilmenidina é entre os agonistas α_2 -adrenérgicos, o agente anti-hipertensivo mais potente no homem (Weerasuriya et al.,1984; Laubie et al.,1985; Fillastre et al.,1988; Koenig-Bernard et al.,1988). A afinidade da clonidina por receptores α_1 -adrenérgicos é cerca de 135 vezes maior do que a rilmenidina, porém a afinidade da rilmenidina é cerca de 5 vezes maior que a da clonidina pelo receptor α_2 -adrenérgico (Verbeuren et al.,1989). No entanto, ao contrário da clonidina, a rilmenidina não promove sedação ou diminuição da atividade motora em seres humanos sendo indicada no tratamento de pacientes diabéticos hipertensos.

1.2 EFEITO ANTINOCICEPTIVO DOS AGONISTAS α_2 -ADRENÉRGICOS:

Dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável evocada por estímulo lesivo real ou potencial, ou atribuída a tal, de acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP). Portanto a dor refere-se à seres humanos, enquanto a nocicepção é um mecanismo de proteção e

alerta contra à injúria tecidual. Diversos modelos de dor podem ser utilizados para avaliar experimentalmente a nocicepção em animais. Vários autores sugerem que para avaliar a atividade antinociceptiva de fármacos é necessária a utilização de mais de um teste, devido a variação da sensibilidade dos mesmos na avaliação do efeito antinociceptivo a nível periférico e central (Dennis & Melzack, 1980 ; Abbott et al., 1982).

Como demonstrado em trabalhos anteriores (Koster et al., 1959), a administração intra-peritoneal de 1,0 ml/100g de peso corporal ácido acético à 0.6% produz contorções abdominais, sintoma caracterizado pelo surgimento de hiperextensão do pescoço, extensão de uma ou duas patas posteriores, contrações intermitentes da musculatura abdominal, arqueamento do dorso e alongamento do corpo (Figura 1). Tais contorções podem ser atenuadas pela administração prévia de analgésicos narcóticos ou anti-inflamatórios não esteroidais, a atividade antinociceptiva pode ser expressa como percentagem de inibição das contorções obtidas no teste, em relação ao grupo controle (Siegmund & Cadmus, 1957; Eckhardt et al., 1958; Carrol & Lim, 1958; Hendershot & Forsaith, 1959). As contorções abdominais podem resultar da liberação de mediadores químicos e autacóides como a histamina, bradicinina, serotonina (Vander-Wende & Margolin, 1956; Siegmund et al., 1957). Foi postulado que a liberação de mediadores inflamatórios causa irritação em terminações nervosas peritoneais (Eckhardt et al., 1958). Autacóides como a bradicinina, promovem contorções abdominais, aumentam a permeabilidade dos capilares peritoneais e estimulam diretamente as terminações nervosas reduzindo o limiar de percepção a dor (Whittle, 1964). Procedimentos como injeção intra-peritoneal do anestésico local procaina, transecção da medula espinhal, ablação do cerebelo, evisceração do estômago ou

intestino, podem abolir as respostas reflexas envolvidas no mecanismo das contorções abdominais (Carrol & Lim, 1958). Segundo Okun et al. (1963), a liberação de catecolaminas poderia inibir o surgimento das contorções abdominais.

Este modelo de teste nociceptivo tem sido utilizado para avaliar a resposta antinociceptiva de fármacos e no estudo da organização do sistema endógeno de modulação da dor.



Figura 1- Padrão das contorções abdominais apresentadas por camundongos tratados com ácido acético 0,6% intra-peritoneal.

Um outro método amplamente utilizado para o estudo antinociceptivo de fármacos é através da estimulação térmica com calor radiante incidindo na porção média da cauda de ratos (D'Amour & Smith, 1941) ou a imersão da cauda em água quente ($50 \pm 1^\circ\text{C}$) produzindo um brusco movimento da cauda

ou do corpo (“tail-flick”). Este método avalia os mecanismos espinhais envolvidos na antinocicepção (Camarata & Yaksh,1985).

Na Figura 2, estão representados vários mediadores químicos, liberados na resposta inflamatória, que podem modular a resposta nociceptiva, ativando diretamente o nociceptor ou tornando-o mais sensível à estimulação e também os receptores farmacológicos envolvidos.

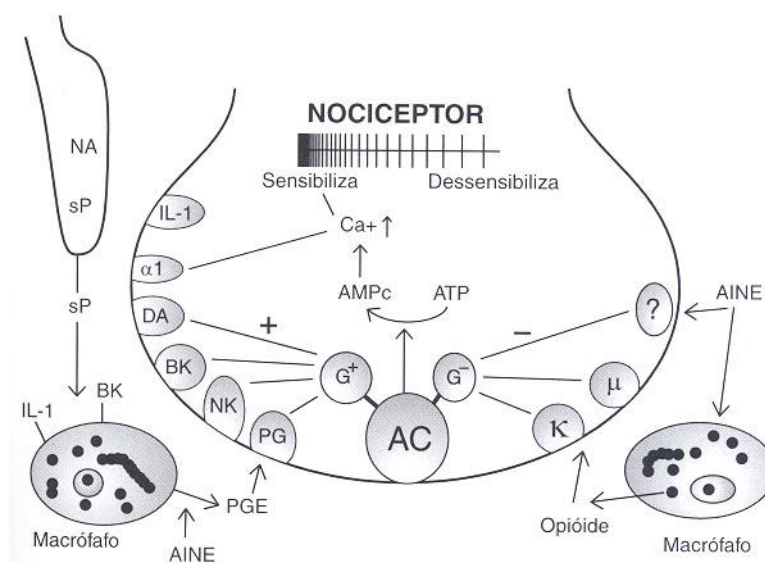


Figura 2- Nociceptor- mediadores da excitabilidade do nociceptor. Apud Luis Fernando de Oliveira. Master Dor organizado por Sérgio de Oliveira. São Paulo, 1998. p:13

Noradrenalina (NA), substância P (sP), bradicinina(BK), anti-inflamatório não esteroide (AINE), prostaglandina E (PGE), interleucina 1 (IL-1), receptor $\alpha 1$ adrenérgico ($\alpha 1$), dopamina (DA), NK (neurotensina), Ca^{+} (cálcio), proteína G (PG), adenilato-ciclase (AC), monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), trifosfato de adenosina (ATP), receptor opioide kapa (K), receptor opioide μ (μ).

No processamento da dor, a informação nociceptiva é transmitida periféricamente pelas fibras aferentes do tipo C (amielínicas) e A-delta (mielínicas finas), enquanto as informações não nociceptivas são carregadas por fibras grossas mielínicas A-beta. Na medula espinhal os neurônios nociceptivos aferentes fazem sinapse na ponta posterior com neurônios das lâminas I, II, III, IV e V. Na lâmina I

(zona marginal), neurônios de diferentes tamanhos, inclusive as células gigantes de Waldeyer contribuem para a formação do trato espinotalâmico contralateral e conexões locais.

As células que dão origem às fibras espino-talâmicas e espino-reticulares, localizam-se nas lâminas I e V. Nas lâminas II e III (Substância gelatinosa) situam-se interneurônios inibitórios que modulam a transmissão entre os aferentes primários e os neurônios de projeção.

Melzack & Wall descreveram, em 1965, um sistema de modulação medular segmentar da passagem do sinal nociceptivo pelas sinapses entre os aferentes periféricos e as fibras de projeção espino-talâmicas e espino-reticulares, que foi denominado de “Mecanismo de Controle do Portão Medular” “Gate-Control”.

Por essa teoria, os impulsos não nociceptivos ativam um sistema inibitório mediado pelos interneurônios da substância gelatinosa, que controla ao nível segmentar a passagem do impulso nociceptivo. Já nessa época os autores propuseram a existência de um mecanismo central eferente, de controle do limiar medular à nocicepção.

Na Figura 3, estão representadas as vias que carregam o estímulo nóstico e as respectivas conexões com a medula espinhal.

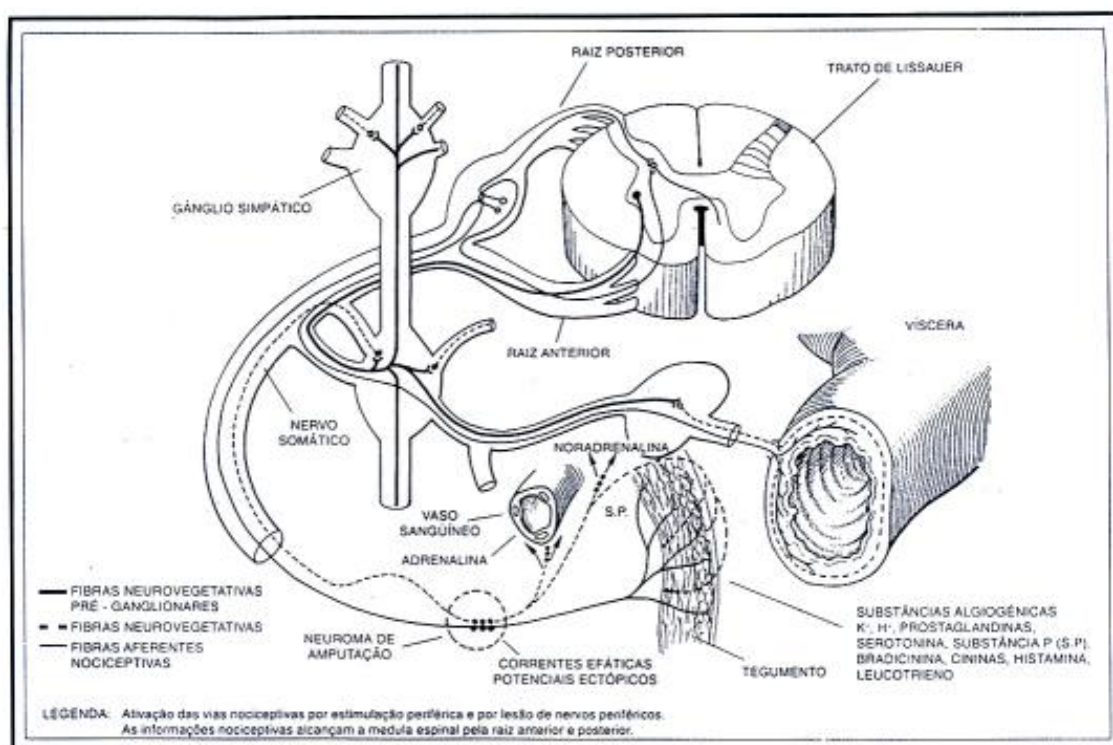


Figura 3- Ativação das vias nociceptivas por estimulação periférica. As informações nociceptivas alcançam a medula espinhal pela raiz anterior e posterior. APUD Luis Fernando de Oliveira Master dor organizado por Sérgio de Oliveira. São Paulo, 1998.

Os axônios de neurônios que formam os tratos ascendentes, projetam-se para áreas do tálamo e daí seguem em direção ao neo-córtex e sistema límbico. As fibras paleo-espino-talâmicas enviam ramificações para a formação reticular no tronco cerebral, mesencéfalo (região periaqueductal) e hipotálamo (próximo ao terceiro ventrículo). Os tratos paleo-espinotalâmico e espino-mesencefálico, dirigem-se aos núcleos medial e intra-laminar do tálamo, de onde surgem projeções para o sistema límbico e lobo frontal, áreas correlacionadas com o componente afetivo da percepção da dor, fortemente influenciado por experiências pregressas. O trato neo-espino-talâmico projeta-se ao neo-córtex, e suas fibras projetam-se por sua vez para os núcleos póstero-látero-ventral e posterior do tálamo, onde fazem sinapses com neurônios que se projetam para a

neo-córtex somato-sensorial. Essas vias são primariamente correlacionadas com a percepção cognitiva (localização, intensidade e natureza do estímulo) e reconhecimento consciente da dor.

O trato espino-reticular projeta-se principalmente para o tronco cerebral e formação reticular mesencefálica. As informações processadas desencadeiam em cada um desses centros superiores uma resposta em consequência aos estímulos recebidos, por exemplo a ativação da formação reticular explica o estado de vigília, agitação e ansiedade que por muitas vezes acompanha a dor. Como o centro vasomotor está localizado nesta área é comum o aparecimento de aumento da pressão arterial, frequência cardíaca, sudorese e taquipnéia por aumento do tônus adrenérgico nos pacientes com dor.

Ao nível supra-espinhal há um mecanismo descendente de controle da dor originado na medula rostroventromedial com participação de outros núcleos do tronco cerebral como o núcleo do trato solitário, parabraquial, dorsal reticular, hipotalâmico e córtico cerebral, interagindo com fibras aferentes, interneurônios e neurônios de projeção (Millan, 2002). O sistema inibitório central de modulação da dor é também ativado por intermédio das aferências do fascículo antero-lateral ao tronco cerebral e mesencéfalo.

A região cinzenta periaquedutal recebe tanto impulsos provenientes da medula espinhal como do hipotálamo, tálamo, córtex, sistema límbico e ínsula. Estes impulsos seguem para estruturas pontinas, bulbares e da medula espinhal.

O sistema modulatório descendente parece originar dois tipos de modulação: inibitória ou excitatória. A atividade excitatória pode ser desencadeada pelo glutamato, provavelmente por ativação do receptor NMDA e inibido por opióides, através de ativação do receptor μ . Quando ocorre uma despolarização

prolongada ou repetitiva há aumento do influxo de cálcio na célula, estimulando a NO sintase. O NO é originado da L-arginina por ação da NO sintase. O aumento da produção do NO que age como segundo mensageiro, ativa as proteínas quinases responsáveis pela ativação dos canais iônicos AMPA e NMDA gerando despolarizações longas, e estimulando a liberação de mais glutamato, aumentando o período de ativação da sinapse. O aumento de cálcio e talvez do NO estimulam a produção de proto-oncogenes, como (c-fos e c-jun) que ativam a transcrição de RNA mensageiro e controladores da síntese de proteínas. Estas são fundamentais para o funcionamento de neurônios como os receptores do glutamato, aumentando a densidade dos receptores e a sensibilidade ao glutamato em vigência de doença ou processo inflamatório crônico (Millan, 2002). Na Figura 4 está esquematizado o funcionamento da sinapse excitatória medular.

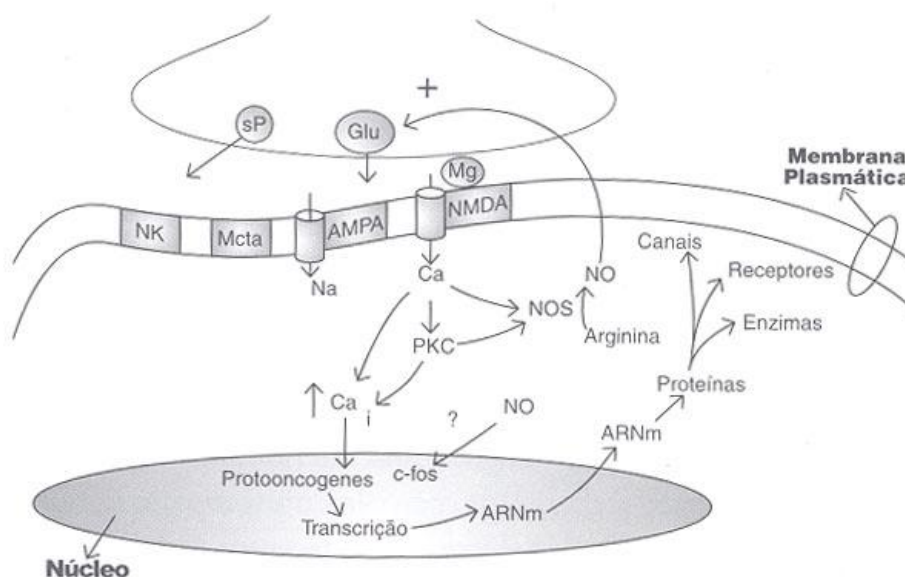


Figura 4- Sinapse excitatória medular. APUD Luis Fernando de Oliveira. Master Dor organizado por Sérgio de Oliveira. São Paulo, 1998.

Glutamato (Glu), substância P (sP), (NK), (Mctá), AMPA (ácido 2-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol propriônico), NMDA (N metil D aspartato), óxido nítrico (NO), fosfoquinase (PKC), RNA mensageiro (ARNm), cálcio (Ca), sódio (Na)

Além do mecanismo de controle segmentar da dor, um mecanismo analgésico central de controle, exercido por vias descendentes oriundas de áreas supra-espinhais. Este sistema também pode ativar receptores que modulam inibitoriamente a percepção do estímulo nociceptivo (Sistema Analgésico Central)

Figura 5.

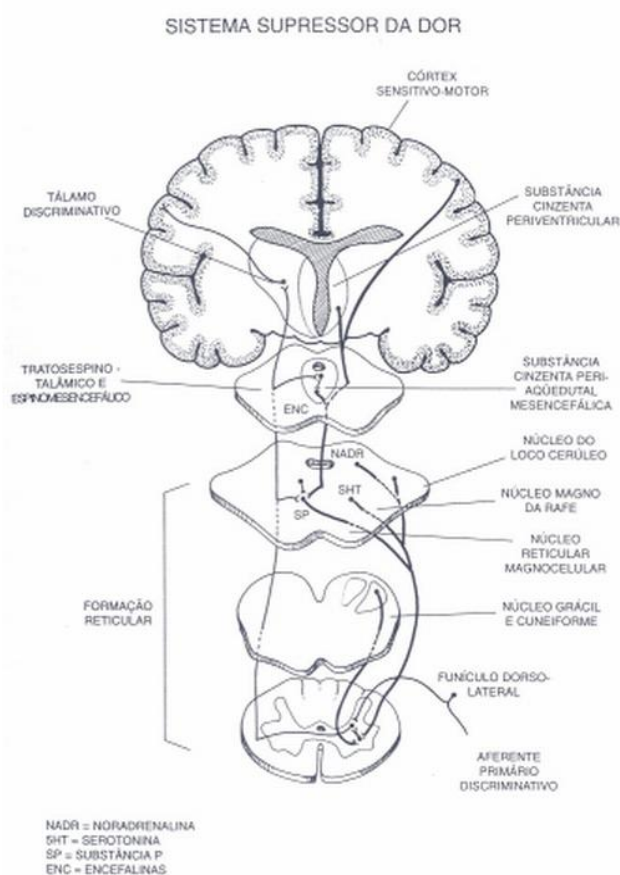


Figura 5 - Representação do sistema supressor da dor. As vias sensitivas discriminativas (-) ativam neurônios com atividade inibidora (-) no corno posterior da medula espinhal, tronco encefálico e diencefálico. APUD Luis Fernando de Oliveira. Master Dor organizado por Sérgio de Oliveira. São Paulo, 1998.

Encefalina (ENC), noradrenalina (NADR), serotonina (5HT) substância P(SP)

Trabalhos experimentais demonstram (Yaksh & Tyce, 1979; Vasko et al., 1984; Sukuki & Tagushi, 1986) que impulsos eferentes provenientes da região da rafe mediana bulbar, especialmente do núcleo Reticular Magno e do núcleo Paragigantocelular, via funículo dorso-lateral, exercem influência sobre o limiar nociceptivo medular, direta ou indiretamente através da Substância Gelatinosa. Fibras noradrenérgicas e serotoninérgicas parecem estar envolvidas no controle inibitório descendente, visto que a aplicação de serotonina no núcleo Magno da Rafe produz acentuada antinocicepção (Llewelyn et al., 1983). A administração de serotonina na substância gelatinosa medular diminui acentuadamente a atividade nociceptiva dos neurônios do corno posterior da medula espinhal (Headley et al., 1978). A liberação de serotonina na medula espinhal pode ser evocada pela estimulação elétrica da substância cinzenta periaquedutal ou do núcleo Magno da Rafe (Hammond, Tyce & Yaksh, 1985; Sorkin et al., 1987), ou através da microinjeção de morfina na substância cinzenta periaquedutal (PAG). Já a microinjeção de morfina no núcleo Magno da Rafe promove aumento da síntese de serotonina na medula espinhal (Sukuki & Tagushi, 1986; Vasko et al., 1984). Fármacos inibidores da recaptação neuronal de serotonina como o citalopram, potencializam a antinocicepção induzida pela injeção intracérebro-ventricular de morfina (Larsen & Arnt, 1984). Foram clonados cerca de 15 subtipos de receptores serotoninérgicos, alguns deles excitatórios, outros inibitórios (Millan et al., 2002). As vias noradrenérgicas que participam do controle da nocicepção originam-se principalmente no Locus Coeruleus, subcoeruleo e tegumento pontino dorso-lateral (Dahlstron & Fuxe, 1965; Westlund et al., 1983). A estimulação elétrica dos núcleos reticular

paragigantocelular libera noradrenalina ao nível da primeira sinapse sensorial (Camarata & Yaksh, 1985).

Os agonistas α_2 -adrenérgicos, como a clonidina e a dexmedetomidina produzem acentuada antinocicepção em ratos e camundongos (Paalzow, 1974). A clonidina começou a ser utilizada no tratamento das dores aguda e crônica de várias etiologias (Coombs et al., 1985) como único analgésico ou potencializando o efeito analgésico de fármacos como os opióides (Flacke et al., 1987), anticolinesterásicos (Hood et al., 1996). Ou ainda, associada a anestésicos locais, podendo ser administrada por diferentes vias de administração, como a oral (Flacke et al., 1987), intratecal (Racle et al., 1987), peridural (Eisenach et al., 1989) e transdérmica (Toon, 1989).

O uso clínico da clonidina no controle da dor tem alcançado a cada dia maior importância (Aunac et al., 2002; Aveline et al., 2002; Hager et al., 2002). No entanto, os mecanismos envolvidos em sua atividade analgésica não estão completamente elucidados, e parecem envolver tanto mecanismos centrais (Ossipov et al., 1985), quanto periféricos (Nakamura & Ferreira, 1988).

Os agonistas α_2 -adrenérgicos como a clonidina e dexmedetomidina promovem acentuada antinocicepção por ativar os receptores α_2 adrenérgicos da substância gelatinosa da medula espinhal (Fleetwood-Walker et al., 1985; Jones & Gebhart, 1985). O efeito antinociceptivo dos agonistas α_2 -adrenérgicos pode ser antagonizado por bloqueadores α_2 -adrenérgicos, sugerindo a existência de sistema inibitório adrenérgico envolvido com a nocicepção. Esses estudos são corroborados pela observação na prática médica de que a injeção venosa ou raquidiana de clonidina ou dexmedetomidina produz acentuado efeito analgésico no homem.

Experimentalmente a administração intratecal de antagonistas serotoninérgicos e ou adrenérgicos na medula espinhal é capaz de reduzir o efeito antinociceptivo da injeção de morfina na substância cinzenta periaquedutal, no teste “tail-flick” (Camarata & Yaksh, 1985; Jensen & Yaksh, 1986 b; Yaksh & Wilson, 1979).

É conhecido o fato de que a injeção intra-cérebro-ventricular de drogas colinérgicas é capaz de promover analgesia central e periférica por ativação de sítios supra espinhais ou espinhais (Metys et al., 1969; Headley & Spencer, 1969). A analgesia poderia estar relacionada ao aumento de GMPc ao nível do nociceptor (Ferreira & Nakamura, 1979).

A sensibilização central à dor pode ser induzida por estímulos nociceptivos intensos e prolongados, conduzidos pelas fibras aferentes desde a periferia até o corno posterior da medula espinhal. Esta excitação prolongada pode resultar em hipersensibilidade com amplificação das respostas aos estímulos nociceptivos (hiperalgesia) e alterações da resposta ao tato, com surgimento de alodinia (Meller et al., 1994). O aumento progressivo da frequência de disparos de neurônios nociceptivos espinhais resultante dessa hipersensibilização é conhecido como fenômeno “wind-up”, e é dependente da ativação de receptores NMDA pelo aminoácido excitatório glutamato (Woolf & Thompson, 1991). A liberação do NO na medula espinhal parece exercer efeito algogênico, através da ativação de receptores NMDA (Malmberg & Yaksh, 1993). O papel pró-nociceptivo do NO pode ser evidenciado em estudos utilizando modelos experimentais, em animais, de dor aguda ou crônica onde se observa aumento da enzima óxido nítrico-sintase da medula espinhal (Meller & Gebhart, 1993; Meller et al., 1994; Gordh et al., 1998). A hiperalgesia térmica induzida pela ativação dos receptores NMDA, pode ser revertida com o pré-tratamento com bloqueadores da síntese de NO tais como o L-

NAME (Kitto et al., 1992; Meller et al., 1993) ou ainda com pré-tratamento com azul de metileno (Meller et al., 1993). A administração intra-tecal de L-arginina, aminoácido precursor da síntese de NO, produz hiperalgesia térmica (Meller et al., 1993), no entanto, a administração sistêmica deste mesmo aminoácido, produz antinocicepção em camundongos (Kwabata et al., 1992; Kamei et al., 1994).

O pré-tratamento com inibidores da síntese de NO inibe o surgimento de hiperalgesia térmica induzida por ligadura do nervo ciático (Yamamoto & Shimoyama, 1995), também sugerindo uma ação pró-nociceptiva para o óxido nítrico na medula espinhal em modelos experimentais de dor crônica.

A administração de doses elevadas de antagonistas da síntese de NO, como o L-NAME, promove acentuado efeito antinociceptivo em ratos (Moore et al., 1991; Brignola et al., 1994). Ainda a inibição da enzima NOS pelo L-NAME aumenta a atividade antinociceptiva da morfina (Song et al., 1998). A administração de morfina intra-venosa em ovelhas anestesiadas aumenta a liberação de noradrenalina, acetilcolina e nitrito na raiz dorsal da medula espinhal. As evidências para isto seriam que o aumento de noradrenalina e acetilcolina na medula espinhal não é observado após a administração de naloxona ou transecção medular (Xu et al., 1997). Posteriormente o mesmo autor demonstrou que a administração sistêmica de morfina libera acetilcolina e NO na medula espinhal (Xu et al., 1996), contribuindo também para o aumento do efeito antinociceptivo espinhal após a administração de opioides em ratos. Esses dados sustentam a hipótese da participação do NO no efeito analgésico dos opióides sistêmicos, sugerindo ainda que talvez o NO ao nível de medula espinhal aumente a liberação de noradrenalina (Xu et al., 1997).

O NO liberado pelo endotélio, denominado antigamente fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) (Moncada, 1991), é sintetizado a partir do aminoácido L-Arginina (Palmer et al., 1988a) e a sua síntese pode ser inibida por análogos da arginina como a N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), L-NAME (Palmer et al., 1988b) e 7-Nitroindazole.

O NO pode ser sintetizado por isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS): a neuronal (n-NOS, tipo I), a induzível (i-NOS, tipo II), e a encontrada em células endoteliais (e-NOS, tipo III). As enzimas consideradas isoformas constitutivas da NOS (n-NOS e e-NOS), são localizadas principalmente, mas não exclusivamente, nos neurônios periféricos e centrais e no endotélio vascular. A enzima n-NOS participa na transmissão neuronal não adrenérgica não colinérgica relaxando os músculos lisos gastro-intestinal, genito-urinário e das vias aéreas.

As endotoxinas bacterianas podem ativar a NO-sintase aumentando a síntese de óxido nítrico e ativando mecanismos de defesa frente a infecções (Cobb et al., 1992; Schoedom et al., 1994; Komori e cols., 1994; Nakane et al., 1995). Na medula espinhal de ratos existem duas isoformas de NO -sintase: a do tipo II (i-NOS) (atividade maior supra-espinhal) e a do tipo I (n-NOS) (predominante na medula espinhal). A redução seletiva da isoforma do tipo I diminui acentuadamente a atividade antinociceptiva da morfina (Koleniskov et al., 1997). Já a diminuição da isoforma do tipo II inibe o desenvolvimento de tolerância à morfina (Koleniskov et al., 1997). O óxido nítrico poderia agir no processamento nociceptivo em diferentes níveis neuronais, como por exemplo, interagindo com mecanismos colinérgicos e noradrenérgicos no controle inibitório descendente da nocicepção.

Alguns trabalhos demonstram que a liberação de noradrenalina na medula espinhal pode estimular em parte interneurônios colinérgicos espinhais

liberando acetilcolina, contribuindo para o efeito antinociceptivo espinal da noradrenalina e explica a atividade antinociceptiva da clonidina (Detweiler et al., 1993; Lothe et al., 1994). No homem, assim como em animais, a clonidina intra-tecal ou peridural aumenta as taxas de acetilcolina no fluido cérebro-espinal (Detweiler et al., 1993). É interessante que somente em ratos a atropina reverte a atividade antinociceptiva dos agonistas α_2 -adrenérgicos (Gordh et al., 1998)

Por outro lado, a administração intra-tecal de neostigmina aumenta a atividade antinociceptiva da clonidina (Naguib & Yaksh 1994), em animais de laboratório e em seres humanos (Eisenach et al., 1993; Hood et al., 1996), sugerindo uma possível mediação colinérgica na analgesia da clonidina. No entanto, nos animais tratados com a dexmedetomidina, a neostigmina não potencializou a antinociceção e esse efeito não foi revertido pela administração de NMLA. Desta forma, os dados sugerem que a analgesia induzida pela dexmedetomidina não é causada pela liberação de acetilcolina e NO, como no caso da clonidina (Bouaziz et al., 1995). Estudos citoquímicos em ovelhas sugerem que a atividade da enzima NOS na medula espinal está restrita a superfície do corno posterior e região intermédio-lateral da medula espinal, onde há grande densidade de receptores muscarínicos. O NMMA antagonista da NOS, é capaz de reverter a bradicardia e hipotensão induzidas pela clonidina (Lothe et al., 1994). O mesmo autor sugere que a bradicardia e hipotensão podem ser mediadas pela ativação de receptores muscarínicos M2 (Lothe et al., 1994). A clonidina aumenta a concentração de nitrito no microperfusato de medula espinal. Este efeito pode ser antagonizado por idazoxan, atropina e L-NAME (Lothe et al., 1994). Utilizando o modelo experimental de alodinia em ratos, Pan et al. (1998) postularam a participação do NO no efeito antialodinia da clonidina intra-tecal na dor neuropática, visto que a administração de

inibidores da síntese de NO promove redução significativa da atividade antinociceptiva da clonidina intra-tecal. A clonidina aumenta também a produção de NO na medula espinhal do rato e de ovelhas (Xu et al., 1997), e a administração de L-arginina, aminoácido precursor da síntese de NO, também é capaz de aumentar a atividade antinociceptiva da clonidina intra-tecal.

Da mesma forma que no sistema nervoso central, na analgesia periférica parece ocorrer também liberação de acetilcolina com participação do NO, pois o efeito antinociceptivo da acetilcolina pode ser revertido com o uso de inibidores da síntese de NO, como o L-NMMA no modelo de pressão aplicada à pata (Duarte et al., 1990). O Nitroprussiato de sódio gerador não enzimático de NO, causa efeito antinociceptivo no teste de pressão na pata (Duarte et al., 1990). O análogo da arginina N-metil-L-Arginina (NMLA), bloqueador da síntese de NO, inibe a antinocicepção colinérgica.

A ativação de receptores α_2 -adrenérgicos por agonistas como a clonidina, pode modular a condução iônica de diversos neurônios (Hille, 1994). A clonidina ativa a proteína G (Sanchez- Blasquez & Garzon, 1991), formando mediadores intercelulares que levam “a abertura de canais iônicos como o de K^+ ATP- dependente e o K^+ mKv1.1 (Edwards & Weston, 1993), que por sua vez leva à hiperpolarização da membrana (Morita & North, 1981; Andrade & Aghajanian, 1985; Tatsumi, 1990), podendo ativar o canal de K^+ mKv1.1 potencializando a antinocicepção promovida pelo guanabenz e clonidina (Galleotti et al., 1999). O cromakalim, que também abre canais de K^+ ATP, aumenta a antinocicepção da clonidina no teste “tail-flick” (Ocaña et al., 1996).

Em adição drogas vasodilatadoras que abrem os canais de K^+ ATP como o diazóxido, minoxidil e pinacidil potencializam a atividade antinociceptiva da

clonidina em camundongos no teste da placa quente. Este teste avalia a atividade antinociceptiva supra-espinhal, sem no entanto, apresentar atividade antinociceptiva própria. Tal efeito pode ser bloqueado pela sulfoniluréia que bloqueia o canal K^+ ATP (Ocaña & Bayens, 1993; Raffa & Martinez, 1995).

A função do óxido nítrico na nocicepção não é muito clara uma vez que apesar de existirem inúmeros experimentos realizados com agonistas α_2 -adrenérgicos, os dados da literatura demonstram um papel dual para o óxido nítrico, apresentando tanto efeito pró-nociceptivo quanto antinociceptivo. No entanto, estudos recentes têm demonstrado que o óxido nítrico está envolvido no efeito vasodilatador e anti-hipertensivo da clonidina. Este trabalho visa investigar a participação da via L-Arginina-óxido nítrico-GMPc no efeito sedativo e antinociceptivo da clonidina. Em adição estudaremos o efeito sedativo e antinociceptivo da rilmenidina, um agonista primordialmente imidazolidínico, em comparação com a clonidina.

É Interessante não existirem trabalhos demonstrando a possível associação da via L-arginina-NO-GMP-c no mecanismo antinociceptivo da clonidina administrada sistemicamente e do papel do Óxido Nítrico no efeito antinociceptivo dos fármacos opióides e agonistas α_2 -adrenérgicos. Por esses efeitos ainda não serem suficientemente, claros, precisam ser mais estudados.

2. OBJETIVO DO TRABALHO

2.1- OBJETIVOS PRINCIPAIS

- a) Estudar a possível participação da via L-Arginina-NO-GMPc no efeito sedativo e antinociceptivo da clonidina .
- b) Estudar o possível efeito sedativo e antinociceptivo da rilmenidina comparado com o da clonidina..

2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Caracterizar o efeito sedativo da administração de clonidina e rilmenidina através da perda do reflexo postural induzido pela administração do agonista α_2 -adrenérgicos ou pelo prolongamento do tempo de sono induzido pelo barbitúrico tiopental sódico ($30 \text{ mg.kg}^{-1}\text{i.p.}$) em ratos.
- b) Avaliar os efeitos dos inibidores da NO-sintase, 7-nitroindazole (7-NI) (Moore e cols,1993) e a N^G -nitro-L-arginina (L-NAME) inibidor inespecífico da síntese de NO no efeito sedativo da clonidina, no modelo tempo de sono induzido pelo tiopental sódico em ratos.
- c) Caracterizar o efeito antinociceptivo da clonidina e rilmenidina pelos testes das contorções abdominais e imersão da cauda ("tail-flick") em camundongos.
- d) Verificar a possível participação do óxido nítrico no efeito antinociceptivo da clonidina e rilmenidina, através do pré-tratamento com inibidor da NO sintase 7-nitroindazole (7-NI).
- e) Avaliar a possível participação da via da guanilato-ciclase no efeito antinociceptivo da clonidina utilizando o 1H-[1,2,4] oxadiazole [4,3-a] quinaxalin-1-one (ODQ), um agente inibidor da síntese da guanilato ciclase.

- f) Avaliar o efeito do antagonista do receptor opióide Naloxona no efeito antinociceptivo da clonidina.
- g) Avaliar o efeito do antagonista do receptor muscarínicos atropina no efeito antinociceptivo da clonidina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Foram utilizados Ratos *Wistar* machos (250-350 g) no estudo do efeito sedativo da clonidina. No estudo do efeito analgésico da clonidina, avaliado pelos testes das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e pela retirada da cauda (“tail-flick”), foram utilizados camundongos *Swiss* machos (25-35 g). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro à temperatura menor que 21°C, tendo livre acesso à água e ração e mantidos em ciclo de sono-vigília de 12 h (luz às 6:00 h). Uma hora antes do teste os animais foram transferidos para o laboratório no intuito de se adaptarem às novas condições ambientais. O manuseio dos animais e respectivos protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

3.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO SEDATIVO PELA PERDA DO REFLEXO POSTURAL E PELO PROLONGAMENTO DO TEMPO DE SONO INDUZIDO PELO TIOPENTAL SÓDICO (30 mg.kg⁻¹i.p.)

O efeito sedativo foi avaliado pela perda do reflexo postural após a administração intravenosa de clonidina e pelo prolongamento do tempo de sono induzido pelo tiopental sódico após a administração intraperitoneal de clonidina, α -metildopa, rilmenidina ou midazolam. A injeção de dose única de barbitúrico induz hipnose e um estado comportamental semelhante ao sono. O intervalo de tempo (“sleeping time”) em que se observa a perda e a recuperação do reflexo de endireitamento do corpo (“righting reflex”), é medido em minutos com um cronômetro. Durante este período o animal perde o reflexo fica incapacitado em assumir outros decúbitos ou deambular. Para a avaliação do tempo de sono, os

ratos foram colocados em caixas de acrílico medindo 40 x 30 cm mantidos em ambiente iluminado e tranqüilo. Para a administração intravenosa de clonidina, um cateter heparinizado (500 IU/mL) foi implantado na veia jugular sob anestesia com éter, 24 horas antes dos experimentos. Para verificar o prolongamento do tempo de sono do barbitúrico, os animais eram submetidos a mesma dose prévia de clonidina antes da administração da dose única de tiopental sódico (30 mg.kg^{-1}) pela via i.p. Todas as drogas exceto o 7-NI foram dissolvidas em solução salina 0.9% administradas 30 minutos antes da clonidina ou do tiopental sódico. O 7-NI foi diluído com óleo de amêndoas e administrado via intra-peritoneal 60 minutos antes da clonidina.

3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

a) Tempo de sono do tiopental- efeito da clonidina e rilmenidina i.p.

A administração de 30 mg.kg^{-1} de tiopental sódico pela via i.p. após 30 minutos de tratamento com solução salina induziu à perda do reflexo de indireitamento, denominado de tempo de sono do barbitúrico “thiopental sleeping time”.

Para avaliar o prolongamento do tempo de sono induzido pelo tiopental (30 mg.kg^{-1} i.p.), os animais foram previamente tratados com 3 doses de clonidina (10, 30, 60 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ i.p.) administradas, 30 minutos antes do barbitúrico (n = 6 para todos os grupos).

Para avaliar o efeito sedativo da rilmenidina, os animais foram previamente tratados com rilmenidina (1.8 mg.kg^{-1}), administrada pela via i.p, 30 minutos antes do barbitúrico.

b) Efeito sedativo da clonidina i.v.

A administração intra-venosa de 80 (n = 6), 100 (n = 6) e 150 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (n = 7) de clonidina induziu à perda do reflexo postural, denominada de tempo de sono da clonidina (“clonidine sleeping time”).

c) Efeito do 7-NI no tempo de sono induzido pela clonidina

Para estudar a possível participação do NO no efeito sedativo da clonidina, os animais foram previamente tratados com o 7-NI, um inibidor da NO sintase neuronal, antes da administração de clonidina. Desta forma, o tempo de sono produzido pela administração de clonidina (100 e 150 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ i.v.) foi obtido em ratos pré-tratados durante 30 minutos com 7-NI (15 mg.kg^{-1}); (n = 8) ou salina (n = 6).

d) Efeito do L-NAME na potencialização no tempo do sono do tiopental induzida pela clonidina ou rilmenidina

O tempo de sono induzido pelo tiopental sódico (30 mg.kg^{-1} i.p.) foi medido em animais pré-tratados, durante 30 minutos, com salina (n = 10), clonidina (60 $\mu\text{g.kg}^{-1}$; n = 9), L-NAME (10 mg.kg^{-1}) (n = 6) ou clonidina mais L-NAME (n = 12). Neste grupo avaliamos também o efeito da L-Arginina na resposta induzida pelo L-NAME através do tratamento dos animais com clonidina (60 $\mu\text{g/kg}$) + L-NAME (10 mg.kg^{-1}) + L-arginina (200 mg.kg^{-1} ; n = 11). Para verificar o efeito do L-NAME na potencialização do tempo do sono do barbitúrico induzido pela rilmenidina, os animais foram pré-tratados, durante 30 minutos, com salina (n = 10), rilmenidina (1.8 mg.kg^{-1} , n = 18), L-NAME (10 mg.kg^{-1} , n=10) ou L-NAME + rilmenidina (n=12).

e) Efeito do L-NAME na potencialização do tempo do sono do tiopental induzido pela α -metildopa e midazolam.

O tempo de sono do tiopental (30 mg.kg^{-1}) foi obtido em ratos pré-tratados, durante 30 minutos, com solução salina ($n = 6$), α -metildopa (50 mg.kg^{-1} ; $n = 8$) ou α -metildopa (50 mg.kg^{-1}) + L-NAME (10 mg.kg^{-1} ; $n = 8$). O tempo de sono induzido pelo tiopental também foi obtido em ratos pré-tratados, durante 30 minutos, com salina ($n = 6$), midazolam (5 mg.kg^{-1} ; $n = 6$) ou midazolam (5 mg.kg^{-1}) + L-NAME (10 mg.kg^{-1} ; $n = 5$).

3.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA CLONIDINA E RILMENIDINA

3.4.1 Teste das contorções abdominais induzidas pela injeção intra-peritoneal de ácido acético a 0,6% em camundongos

Camundongos adultos, machos, pesando 25- 35 g foram inicialmente aclimatados ao ambiente do laboratório, mantidos em caixas com 40x 30 cm, em ambiente tranqüilo e iluminado por no mínimo duas horas antes do teste. Em cada grupo de 10 camundongos, foi injetado solução de ácido acético a 0,6%, no volume de 10 ml/kg pela via intraperitoneal, conforme descrito por Koster et al., 1959. Esta concentração de ácido acético foi escolhida segundo o trabalho de Bentley et al., (1981), que demonstrou que concentrações de ácido acético superiores a 0,6% não aumentaram significativamente o número de contorções abdominais em camundongos. As contorções abdominais, definidas como contração dos músculos da parede abdominal seguida de extensão das patas e alongamento do corpo do animal (Figura 1), foram contadas durante 10 minutos, iniciando-se a contagem 5 minutos após a injeção da solução de ácido acético i.p. Na resposta controle, os animais foram previamente tratados com solução salina, administrada 30 minutos antes da injeção de ácido acético i.p. Em outro grupo de animais, foram administradas doses crescentes da clonidina i.p. e 30 minutos após injetamos a

solução de ácido acético como no grupo controle. Para verificarmos a participação de mecanismos nitrérgicos, opiáceos e/ou colinérgicos no efeito antinociceptivo da clonidina, os animais foram pré-tratados com 7-nitroindazole (15 mg.kg^{-1}), ODQ (10 mg.kg^{-1}) ou naloxona (100 mg.kg^{-1}) intra-muscular, trinta minutos antes da administração do ácido acético. Cada protocolo ou grupo experimental era composto de pelo menos 6 animais. Para evitarmos a possível interação das drogas administradas com o ácido acético intraperitoneal, a clonidina e outras drogas inibidoras foram administradas pelas vias intra-venosa ou subcutânea, dependendo do protocolo experimental.

3.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS CONTORÇÕES ABDOMINAIS:

a) Contorções abdominais induzidas pela administração intraperitoneal de ácido acético à 0,6%.

Como a solução salina foi o veículo dos fármacos em estudo, no controle, administramos NaCl 0,9%, pelas vias intra-venosa ou subcutânea, 30 minutos antes da administração i.p. de solução de ácido acético 0,6%. Cinco minutos após a injeção da solução de ácido acético iniciou a contagem do número de contorções abdominais por um período de 10 minutos 74 ± 5 .

b) Efeito antinociceptivo da clonidina e rilmenidina

Para quantificar o efeito antinociceptivo da clonidina (3, 10 e 20 mg.kg^{-1} i.v.), da clonidina (30, 45 e 60 mg.kg^{-1} i.p.) e rilmenidina (100, 300 e 600 mg.kg^{-1} i.v.), os agonistas α_2 -adrenérgicos foram administrados pela via intra-venosa, cinco minutos antes da administração intra-peritoneal de ácido acético à 0,6%.

c) Ação do 7-NI no efeito antinociceptivo da clonidina

Para estudarmos a possível participação do Óxido Nítrico no efeito antinociceptivo da clonidina e rilmenidina, os animais foram previamente tratados com o 7-NI via intra-muscular, antes da administração de clonidina ou rilmenidina. Desta forma, o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético foram avaliados cinco minutos após a administração intra-venosa de NaCl 0,9% (n = 6) ou clonidina ($20 \mu\text{g.kg}^{-1}$; n= 6) ou rilmenidina ($100 \mu\text{g.kg}^{-1}$; n = 10). Em outro grupo experimental, os animais foram previamente tratados por 25 minutos com o 7-NI (15 mg.kg^{-1}); n= 6) antes da administração intra-venosa de solução salina. Para avaliarmos o efeito do 7-NI no efeito antinociceptivo da clonidina e rilmenidina, os animais foram previamente tratados com 7-NI (15 mg.kg^{-1}) por 25 minutos antes da administração intra-venosa dos agonistas α_2 -adrenérgicos.

d) Efeito do ODQ no efeito antinociceptivo da clonidina

O número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético foi avaliado cinco minutos após a administração intra-venosa de NaCl 0,9% (n = 6) ou clonidina ($20 \mu\text{g.kg}^{-1}$; n= 6). Em outro grupo experimental, os animais foram previamente tratados por 25 minutos com ODQ ($2,5 \text{ mg.kg}^{-1}$; n = 6) antes da administração intra-venosa de solução salina. Para avaliarmos o efeito do inibidor da guanilato ciclase efeito antinociceptivo da clonidina, os animais foram previamente tratados com ODQ ($2,5 \text{ mg.kg}^{-1}$) por 25 minutos antes da administração endovenosa de clonidina ($20 \mu\text{g.kg}^{-1}$).

e) Efeito da naloxona no efeito antinociceptivo da clonidina

O número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético foi avaliado cinco minutos após a administração intra-venosa de NaCl 0,9% (n = 6), morfina (1 mg.kg^{-1} ; n = 6) ou clonidina ($20 \mu\text{g.kg}^{-1}$; n= 6). Em outro grupo experimental, os animais foram previamente tratados por 25 minutos com naloxona ($0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$; n =

6) antes da administração endovenosa de solução salina (n = 6) ou morfina (n = 6) ou clonidina (n = 6).

3.6 TESTE DA IMERSÃO DA CAUDA (“TAIL-FLICK”) EM CAMUNDONGOS

A escolha do teste de retirada da cauda como medida antinociceptiva, embora seja em parte arbitrária, teria como vantagens requerer aparelhagem simples e barata (Banho-Maria, termômetro e cronômetro) e permitir elevada reprodutibilidade dos dados obtidos. Além disso, apresenta como vantagem adicional a possível utilização de cada animal como seu próprio controle (Tierney, Carmody & Jamieson, 1991). Este modelo de teste antinociceptivo tem sido utilizado para estudar os efeitos antinociceptivos de fármacos e no estudo da organização do sistema endógeno de modulação da dor.

Utilizamos o teste de retirada da cauda (D'Amour & Smith, 1941) modificado (Ben- Bassat, Peretz & Sulman, 1959), onde estudamos o tempo de latência necessário para que o camundongo retire a cauda submersa em água quente ($50 \pm 1^\circ\text{C}$).

A estimulação térmica com calor radiante incidindo na porção média da cauda dos camundongos ou a imersão da cauda em água quente ($50 \pm 1^\circ\text{C}$) produz um movimento brusco da cauda ou do corpo do rato, denominado de “tail flick”. Este método é amplamente utilizado para avaliar os mecanismos espinhais envolvidos na antinocicepção. Neste teste empregamos camundongos adultos machos ,os quais foram colocados em um recipiente cilíndrico de plástico contendo um orifício para a devida ventilação do animal e outro para a saída da cauda. A cauda foi imersa em água quente ($50 \pm 1^\circ\text{C}$) e medimos o tempo até o momento que o animal retirou abruptamente a cauda da água quente, aguardando-se no

máximo até 10 segundos para evitar lesão na cauda (Sewell & Spencer, 1976). Neste teste cada animal foi submetido ao teste por três vezes, respeitando-se o intervalo de 10 minutos. A média do valor obtido foi considerada como valor de latência basal ou de controle sendo representado no gráfico como tempo 0 (zero). Para evitar possíveis danos teciduais, o estímulo térmico foi interrompido após 10 segundos de exposição “cut-off”. Este valor imposto como tempo de exposição máxima corresponde a 3 vezes o valor da latência observado no controle. Os animais foram expostos ao teste pela imersão da cauda após os 15, 30, 45 e 60 minutos da administração intraperitoneal de salina ou de clonidina. Os resultados foram expressos como média dos valores de latências observadas após o tratamento \pm EPM.

3.7 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS:

a) Tempo de latência da retirada da cauda

Neste protocolo experimental o teste da imersão da cauda foi realizado no tempo zero, isto é, antes da administração de salina e após 5, 15, 30, 45 e 60 minutos da administração da salina. Os valores de latência obtidos foram considerados como controle.

b) Efeito antinociceptivo da clonidina e da rilmenidina

Para avaliarmos, o efeito antinociceptivo do clonidina (10, 30, 60 e 120 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) e rilmenidina (100, 300, 600 e 1800 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), estes agonistas α_2 -adrenérgicos foram administrados pela via i.p, cinco minutos antes do início do teste (tempo zero). O teste da imersão da cauda foi realizado após 5, 15, 30, 45 e 60 minutos da administração da clonidina. No protocolo com a rilmedina, o teste da retirada da

cauda foi realizado também a cada 15 minutos até duas horas após a administração de salina ou rilmenidina.

c) Ação do 7-NI no efeito antinociceptivo da clonidina e da rilmenidina

Neste protocolo experimental foram administradas via i.p. salina, clonidina ($30 \mu\text{g.kg}^{-1}$) ou rilmenidina ($100 \mu\text{g.kg}^{-1}$), cinco minutos antes da realização do teste. Em outro grupo experimental, os animais foram previamente tratados com o veículo do 7-NI ou com 15 mg/kg de 7NI, administrados pela via subcutânea, 25 minutos antes da injeção i.p. de salina, clonidina $30 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ou rilmenidina $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ($n = 10$ para todos os grupos). O teste da imersão da cauda foi realizado nos tempos 5, 15, 30, 45 e 60 minutos após a administração i.p. de salina ou clonidina. No protocolo da rilmenidina, o efeito do 7-NI no efeito antinociceptivo da rilmenidina foi avaliado através da realização do teste a cada 15 minutos até 2 horas após a administração do 7-NI ou rilmenidina. Por não haverem estudos prévios da atividade antinociceptiva da rilmenidina e o efeito do 7-NI ser de curta duração.

d) Efeito do ODQ no efeito antinociceptivo da clonidina

A latência da retirada da cauda foi avaliada nos tempos 5, 15, 30, 45 e 60 minutos

após a administração i.p. de salina ou clonidina ($30 \mu\text{g.kg}^{-1}$). Em outro grupo experimental os animais foram previamente tratados com o veículo do ODQ (DMSO 15%) ou com ODQ (10 mg.kg^{-1}), administrados pela via subcutânea, 25 minutos antes da injeção i.p. de salina ou clonidina $30 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ($n = 8$ para todos os grupos). O teste da imersão da cauda foi realizado nos tempos 5, 15, 30, 45 e 60 minutos após a administração i.p. de salina ou clonidina

e) Efeito da naloxona no efeito antinociceptivo da clonidina

A latência da retirada da cauda foi avaliada nos tempos 5, 15, 30, 45 e 60 minutos após a administração i.p. de salina, morfina (1 mg/kg) ou clonidina (30 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). Em outro grupo experimental os animais foram previamente com a naloxona (0,1 mg.kg⁻¹), administrada pela via subcutânea, 25 minutos antes da injeção i.p. de morfina (1 mg.kg⁻¹) ou clonidina (30 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). O teste da imersão da cauda foi realizado nos tempos 5, 15, 30 e 45 minutos após a administração i.p. de morfina ou clonidina (n = 6 para todos os grupos).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão representados como média \pm EPM e analisados por meio da Análise de variância “one-way analysis of variance” (ANOVA) utilizada para comparar diferenças entre os diversos grupos experimentais, com posterior uso do teste Bonferroni. As diferenças entre dois grupos foram avaliadas pelo teste “t” de Student, sendo os valores considerados significativos quando $p < 0,05$.

3.9 FÁRMACOS E SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

1. Ácido acético 0.6%
2. Alfametildopa (Sigma St. Louis, MO, USA)
3. Cloridrato de clonidina (Hoescht Marion Roussel S/A)
4. Cloridrato de morfina (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brasil)
5. Dimetilsulfóxido
6. L-Arginina (Sigma St. Louis, MO, USA)
7. NaCl 0.9% (Merck S.A Indústrias Químicas)
8. Naloxona (Rhodia Farma Ltda, Brasil)
9. nitro^G-L-arginine methyl ester (L-NAME) (Sigma St. Louis, MO, USA)

10. 1H-[1,2,4]oxadiazol [4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) (Calbiochem-Novabiochem
Canadá)
11. Rilmenidina (Servier, França)
12. 7-Nitroindazol (Sigma St. Louis, MO, USA)
13. Sulfato de atropina (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brasil,
Brasil)
14. Tiopental sódico (Abbott Laboratórios do Brasil Ltda)

4 RESULTADOS

4.1. EFEITO SEDATIVO DA CLONIDINA

4.1.1. Efeito sedativo da clonidina avaliado pela perda do reflexo postural induzido pelo agonista α_2 -adrenérgico e pelo prolongamento do tempo de sono induzido pelo tiopental sódico.

A administração intra-venosa de clonidina em ratos, induziu efeito sedativo de maneira dose dependente, medido pelo “tempo de sono induzido pela clonidina” (Gráfico 1). Os valores da duração do sono induzido por 80, 100 e 150 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ foram $10,41 \pm 1,14$, $19,62 \pm 1,82$ e $32,86 \pm 1,75$ minutos, respectivamente.

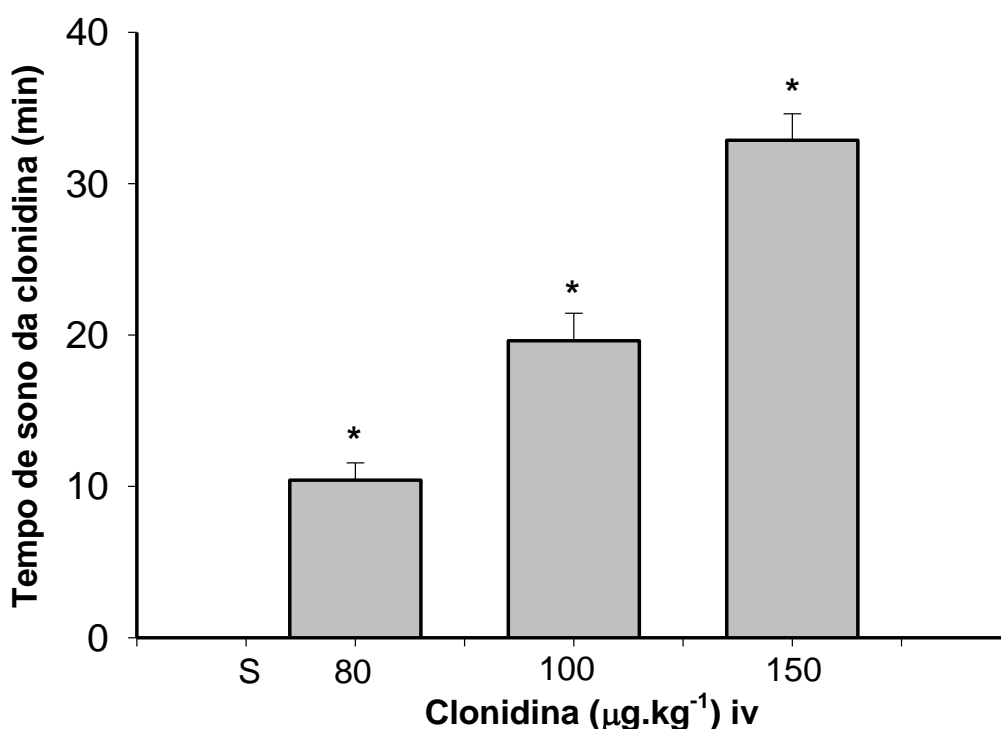


Gráfico 1 Efeito sedativo da clonidina (i.v.) avaliado pela perda da recuperação do reflexo postural. A administração de solução salina 0.9% (S) não provocou perda do reflexo postural ($*p < 0,01$) (n=6) (análise de variância)

A administração i.p. de clonidina (30 e 60 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) também potencializou significativamente a duração do sono induzido pelo tiopental quando comparados com os ratos tratados com solução salina (Gráfico 2). A duração do sono induzido pelo tiopental (30 mg.kg^{-1}) em animais pré-tratados com salina foi de $8,35\pm 0,66$ minutos, sendo prolongado para $10,59\pm 1,68$; $18,15\pm 1,71$ e $32,66\pm 2,62$ minutos na presença de 10, 30 e 60 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de clonidina, respectivamente.

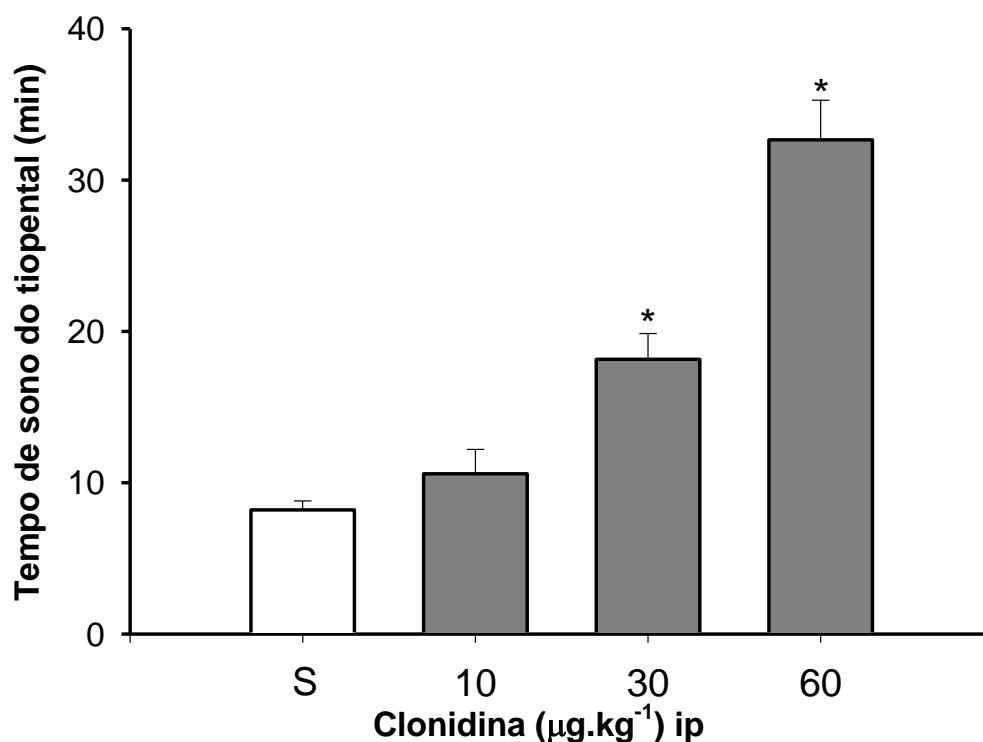


Gráfico 2- Efeito da injeção de Salina (S) e de clonidina i.p. no tempo de sono induzido pelo Tiopental sódico (30 mg.kg^{-1}) i.p. ($p^* < 0,01$) para o tratamento com clonidina (n=6) (análise de variância)

4.1.2 Efeito dos inibidores da NO sintase, 7-NI e L-NAME, no efeito sedativo da clonidina

O pré-tratamento com 7-NI não provoca perda do reflexo postural, no entanto reduz significativamente o tempo de sono induzido pela clonidina (100 e 150 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) administradas pela via intra-venosa (Gráfico 3).

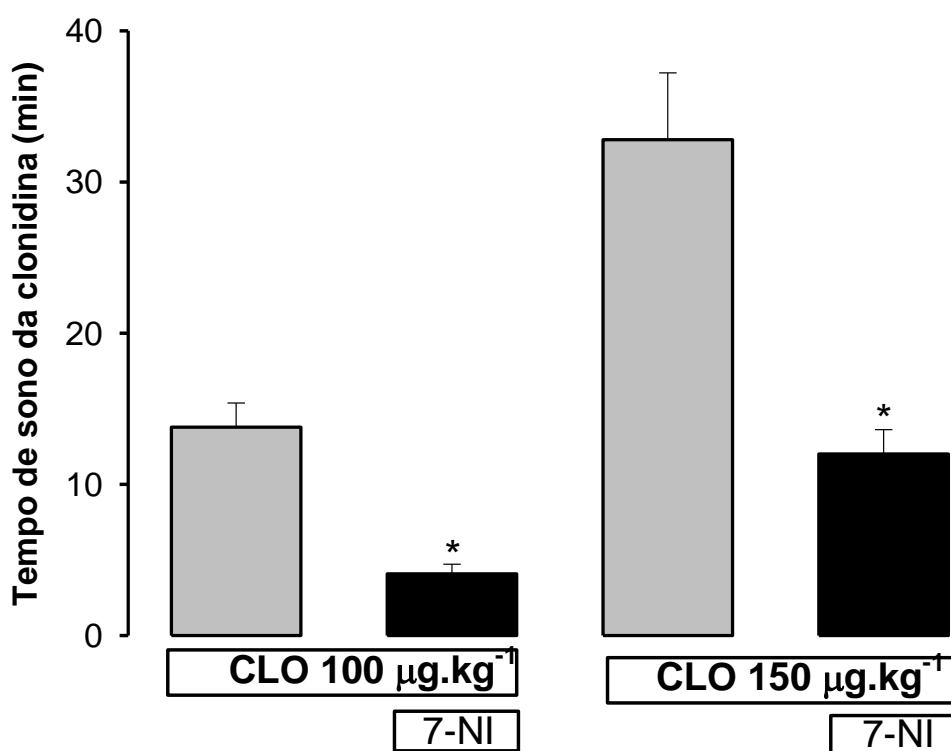


Gráfico 3. Efeito do 7-NI (15 mg.kg^{-1}) no tempo de sono induzido da clonidina (100 e 150 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) (* $p < 0.001$) (n=8) versus clonidina (n=8)

De maneira semelhante, o pré-tratamento com L-NAME sozinho embora não modifique o tempo de sono do tiopental, reduziu significativamente o prolongamento do sono do tiopental induzido pela clonidina ($30 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) (Gráfico 4). Posteriormente, o efeito inibitório do L-NAME no efeito potencializador do tempo de sono do barbitúrico pela clonidina foi revertido pelo tratamento com a L-arginina.

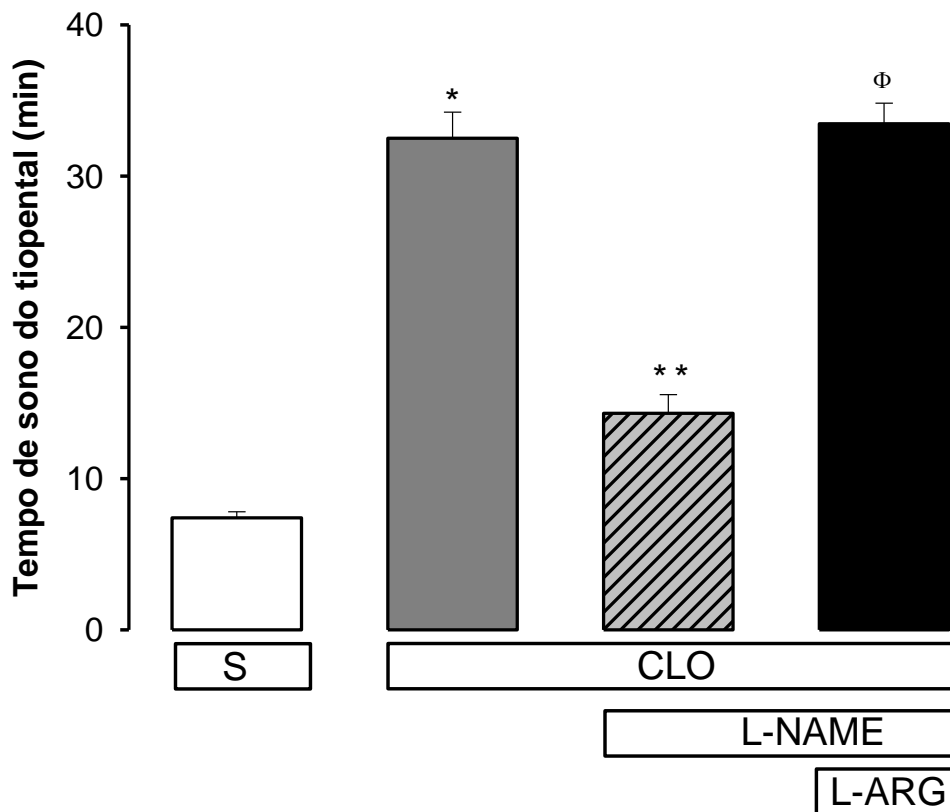


Gráfico 4. Efeito do N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME)($10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) na potencialização induzida pela clonidina (CLO) ($60\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)($n=9$) no tempo de sono induzido pelo tiopental, e reversão do efeito inibitório do L-NAME pela L-arginina (L-ARG) ($200\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) (* $p<0.001$) versus tiopental (S);** ($p<0.001$) versus clonidina sozinha, φ $P<0.001$ versus clonidina associada ao L-NAME ($n=12$).

4.1.3 Efeito do L-NAME na potencialização do tempo do sono do tiopental induzida pela α -metildopa e midazolam

A α -metildopa e o midazolam potencializaram a duração do sono do tiopental (Gráfico 5). A potencialização do tempo de sono do tiopental induzida pela α -metildopa foi significativamente inibida em ratos tratados com α -metildopa + L-NAME. No entanto, a potencialização do tempo de sono do barbitúrico induzida pelo benzodiazepínico não foi alterada pelo pré-tratamento com o inibidor da NO sintase, L-NAME.

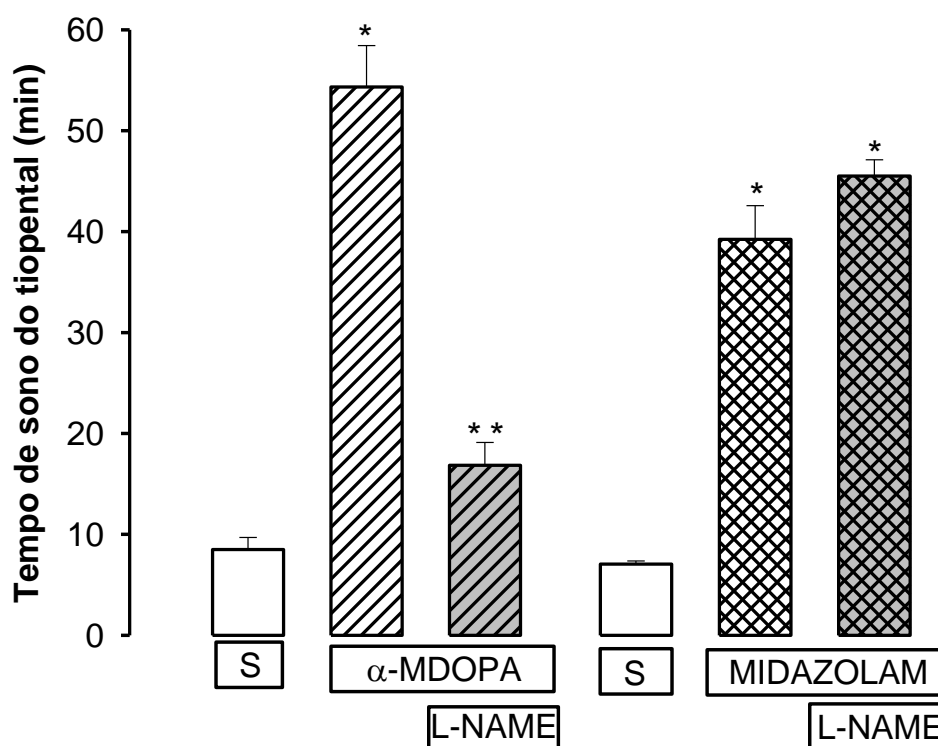


Gráfico 5. Efeito da N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) (10 mg.kg⁻¹) na potencialização do tempo de sono do tiopental, induzida pela α -metildopa (α -MDOPA) 50 mg.kg⁻¹ (n=8) e midazolam (5 mg.kg⁻¹) (n=5) *p<0.001 versus salina (S); (**p<0.001) versus α -MDOPA administrada isoladamente (n=8).

4.1.4 Efeito da inibição da NO sintase sobre o efeito sedativo da rilmenidina

No gráfico 6 estão representados os resultados da administração i.p. de rilmenidina. O valor considerado controle ($8,35 \pm 0,66$ min.), coluna representada em branco, foi tratado com solução de NaCl 0.9% (veículo de todas as soluções utilizadas) e 30 minutos após foi administrado tiopental sódico (30mg.kg^{-1} i.p.). As colunas em cinza correspondem aos valores obtidos após a administração de rilmenidina (1.8 mg.kg^{-1} i.p.) 30 minutos antes da administração do tiopental sódico (30 mg.kg^{-1}). A rilmenidina na dose (1.8 mg.kg^{-1}) prolongou de maneira significativa o tempo de sono induzido pelo tiopental sódico ($*p < 0.05$). O tratamento com L-NAME (10 mg.kg^{-1}) não causou modificação no o tempo de sono induzido pelo tiopental, no entanto, quando utilizamos o L-NAME (10 mg.kg^{-1}), em animais tratados com rilmenidina (1.8 mg.kg^{-1}) observamos redução significativa do tempo de sono da rilmenidina ($\phi p < 0.05$).

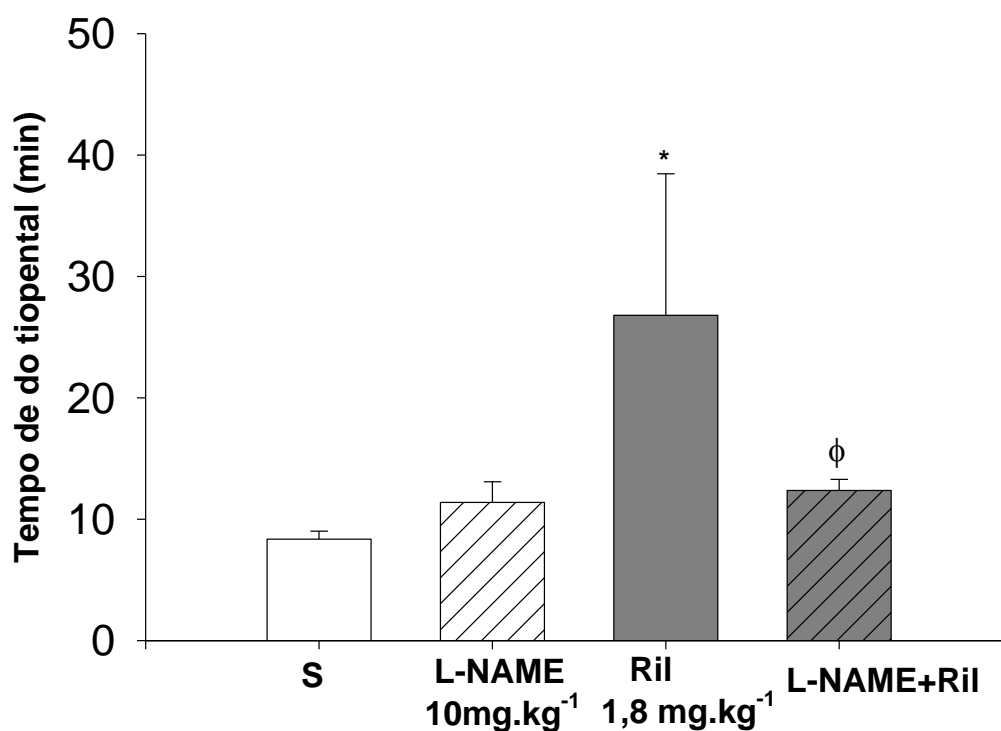


Gráfico 6. Efeito sedativo da rilmenidina (1.8mg.kg^{-1}) i.p. avaliado pelo prolongamento do tempo de sono induzido pelo tiopental (30mg.kg^{-1}) i.p. e reversão do efeito sedativo pelo L-NAME ($n=12$) ($*p<0.001$) versus rilmenidina isoladamente ($n=18$).

4.2 EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA CLONIDINA AVALIADO PELOS TESTES DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS E DE IMERSÃO DA CAUDA “TAIL-FLICK” EM CAMUNDONGOS:

4.2.1 Efeito da administração de clonidina

Pela via intra-venosa, a clonidina também mostrou ser eficaz em reduzir significativamente o número de contorções abdominais, de maneira dose-dependente conforme os dados apresentados no gráfico 7.

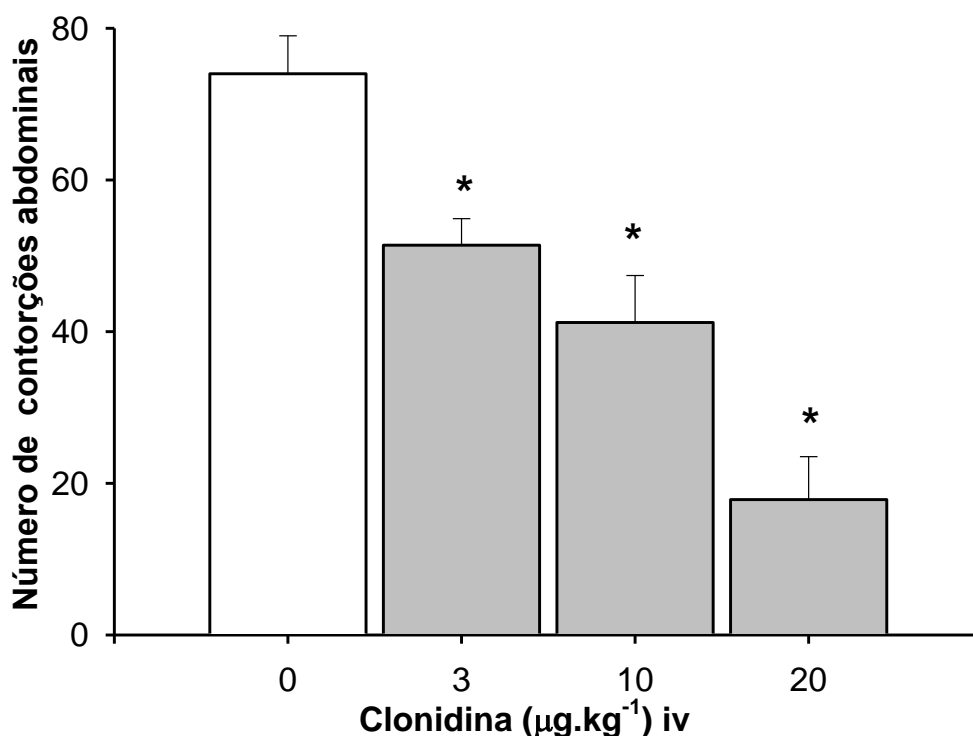


Gráfico 7 . Efeito antinociceptivo da clonidina venosa (3, 10 e 20 µg.kg⁻¹ i.v) no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0.6% em camundongos. A coluna branca representa o número de contorções observadas no grupo controle. Os resultados são expressos como a média ± EPM de 6 animais para cada grupo. * $p < 0.05$ (ANOVA e Teste de Bonferroni para comparações múltiplas).

No Gráfico 8A estão representadas as médias ± EPM do número de contorções abdominais induzidas pela administração intra-peritoneal de ácido acético 0.6%, observadas durante o período de 10 minutos. A administração de

clonidina i.p. (30, 45 e 60 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) reduz de maneira significativa ($*p<0.01$) o número de contorções abdominais. A dose de 60 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ é capaz de praticamente abolir o surgimento de contorções abdominais. Não ocorreu diferença significativa na resposta observada com as doses de clonidina de 30 e 45 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

No Gráfico 8B estão também representadas as médias \pm EPM das latências no teste de imersão da cauda “tail-flick”, induzidas pela administração intraperitoneal de salina (controle) ou clonidina (30, 60 e 120 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). A clonidina aumentou de maneira significativa ($*p<0.01$) os valores das médias das latências em todos os intervalos de tempo (5, 15, 30, 45 e 60 minutos).

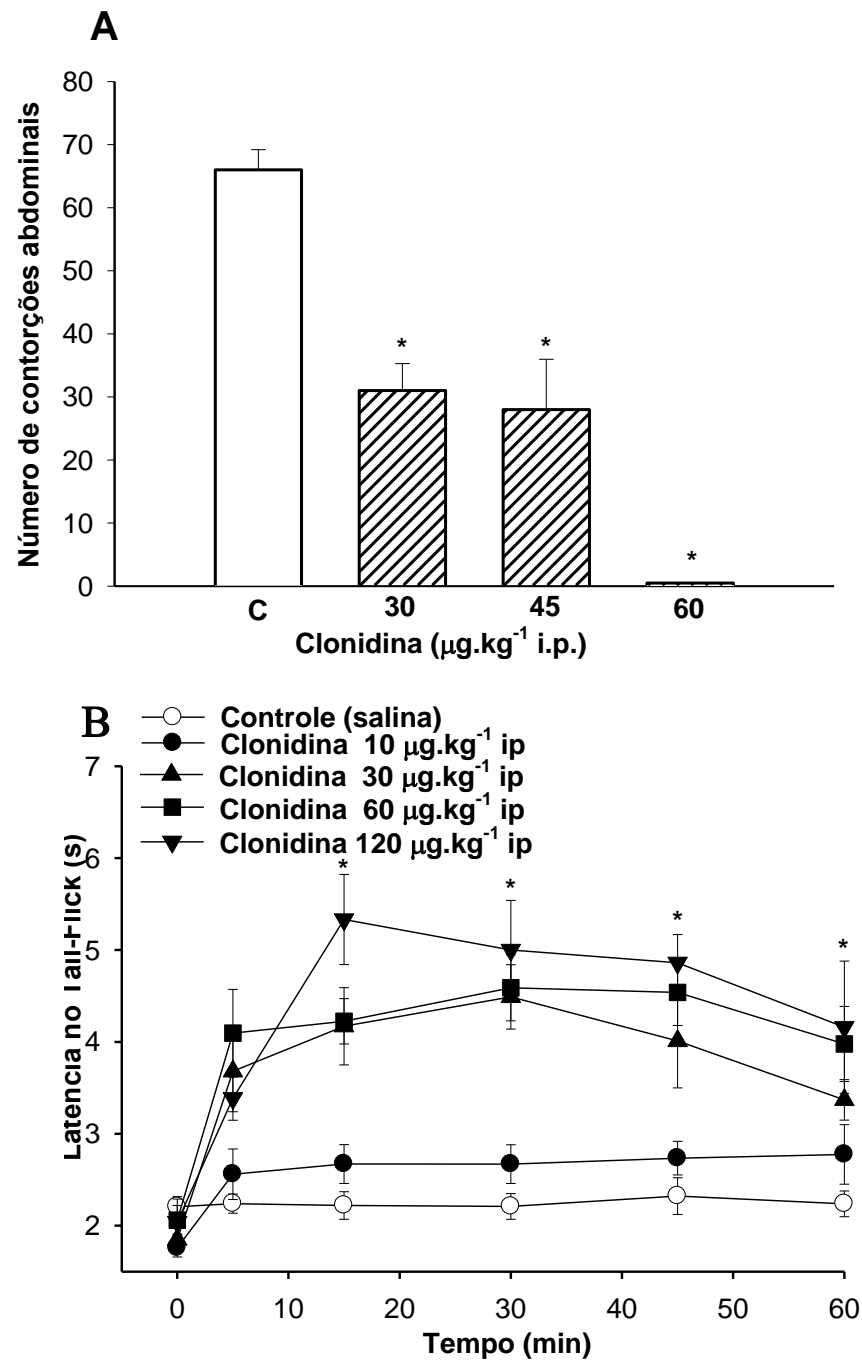


Gráfico 8. Efeito antinociceptivo da clonidina medido pelas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0.6% (A) e pelo teste de retirada da cauda (B) em camundongos. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão. * $p < 0.05$ ($n=6$) quando comparados ao grupo controle ANOVA e Teste comparativo múltiplo de Bonferroni.

4.2.2 Efeito da inibição da NO- sintase e guanilato- ciclase no efeito antinociceptivo da clonidina

A inibição da NO-sintase pelo 7-NI (15 mg.kg^{-1}) não modificou o número de contorções abdominais, porém o 7-NI reduziu significativamente ($p < 0.05$) o efeito antinociceptivo da clonidina ($20 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$) i.v. como demonstrado no Gráfico 9-A. Na parte inferior estão apresentados os resultados obtidos após a inibição da NO-sintase pelo 7-NI (15 mg.kg^{-1}) que não modificou o valor controle, porém reduziu significativamente a antinocicepção induzida pela clonidina ($*p < 0.05$). No Gráfico 9 B demonstra-se o tempo de latência do teste de retirada da cauda após a administração de salina (controle), 7-NI, clonidina ($30 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$) i.p e a reversão do efeito antinociceptivo da clonidina pela prévia administração de 7-NI.

O 7-NI não modificou os valores da latências de retirada da cauda quando comparados com o valor controle, no entanto, reverteu significativamente ($*p < 0.05$) o efeito antinociceptivo induzido pela clonidina ($30 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$).

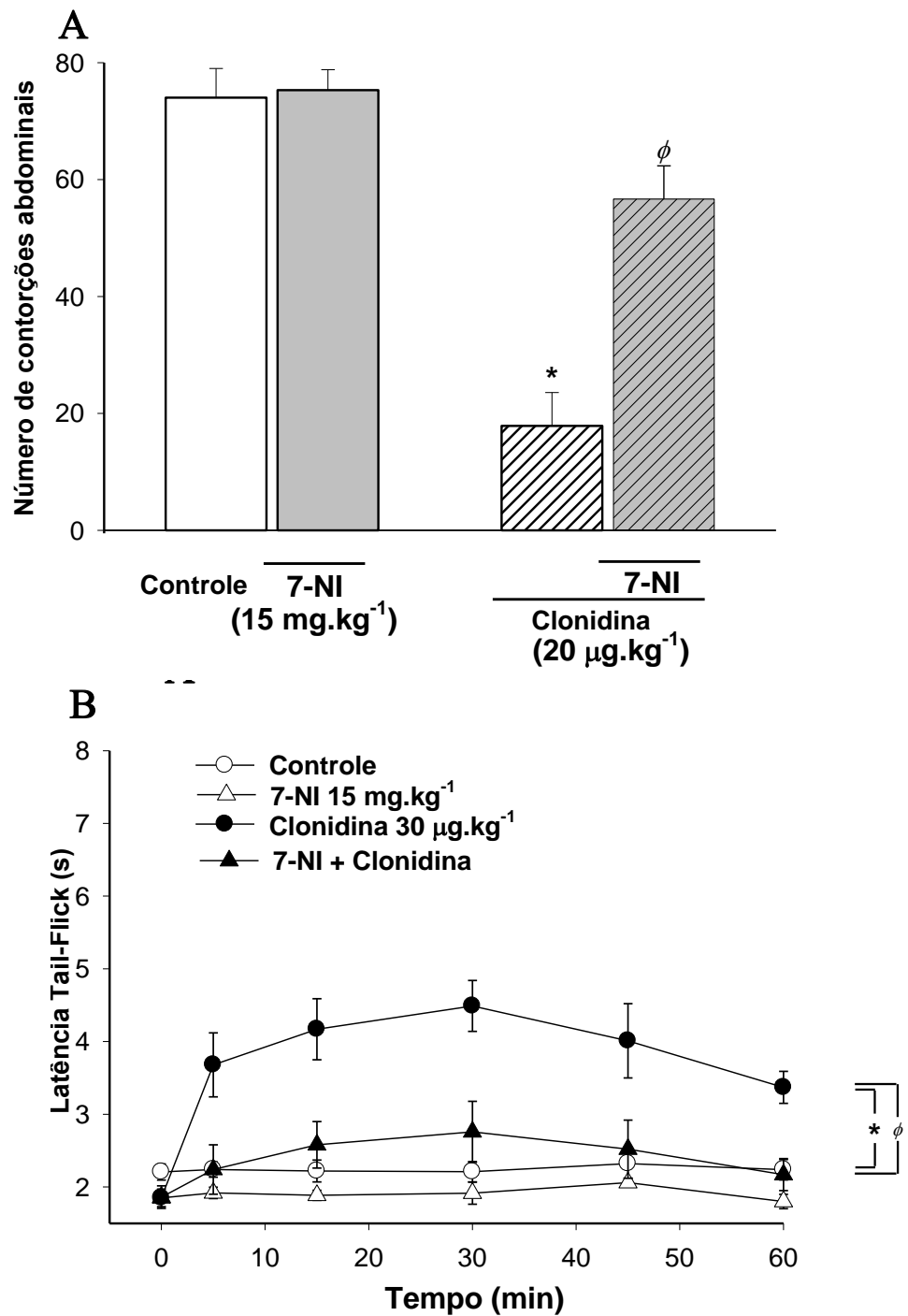


Gráfico 9. Efeito do 7- Nitroindazol (7-NI) no efeito antinociceptivo da clonidina medido pelas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0.6% (A) e pelo teste de retirada da cauda (B) em camundongos. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão. * $p < 0.05$ quando comparados ao grupo controle com salina $\phi p < 0.05$ comparado com as respostas da clonidina sem o 7-NI (teste t de Student)($n=6$ todos os grupos).

No Gráfico 10-A observamos que o pré-tratamento com o inibidor da enzima guanilato ciclase ODQ (10 mg.kg^{-1}) inibiu significativamente o efeito antinociceptivo induzido pela clonidina ($20 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$). Conforme o esperado observamos também no teste de imersão da cauda (Gráfico 10 B) que o pré-tratamento com o inibidor da guanilato ciclase ODQ (10 mg.kg^{-1}) inibiu significativamente ($*P < 0.05$) o efeito antinociceptivo nos camundongos tratados com clonidina ($30 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$), representado como valor das médias das latências observadas em segundos.

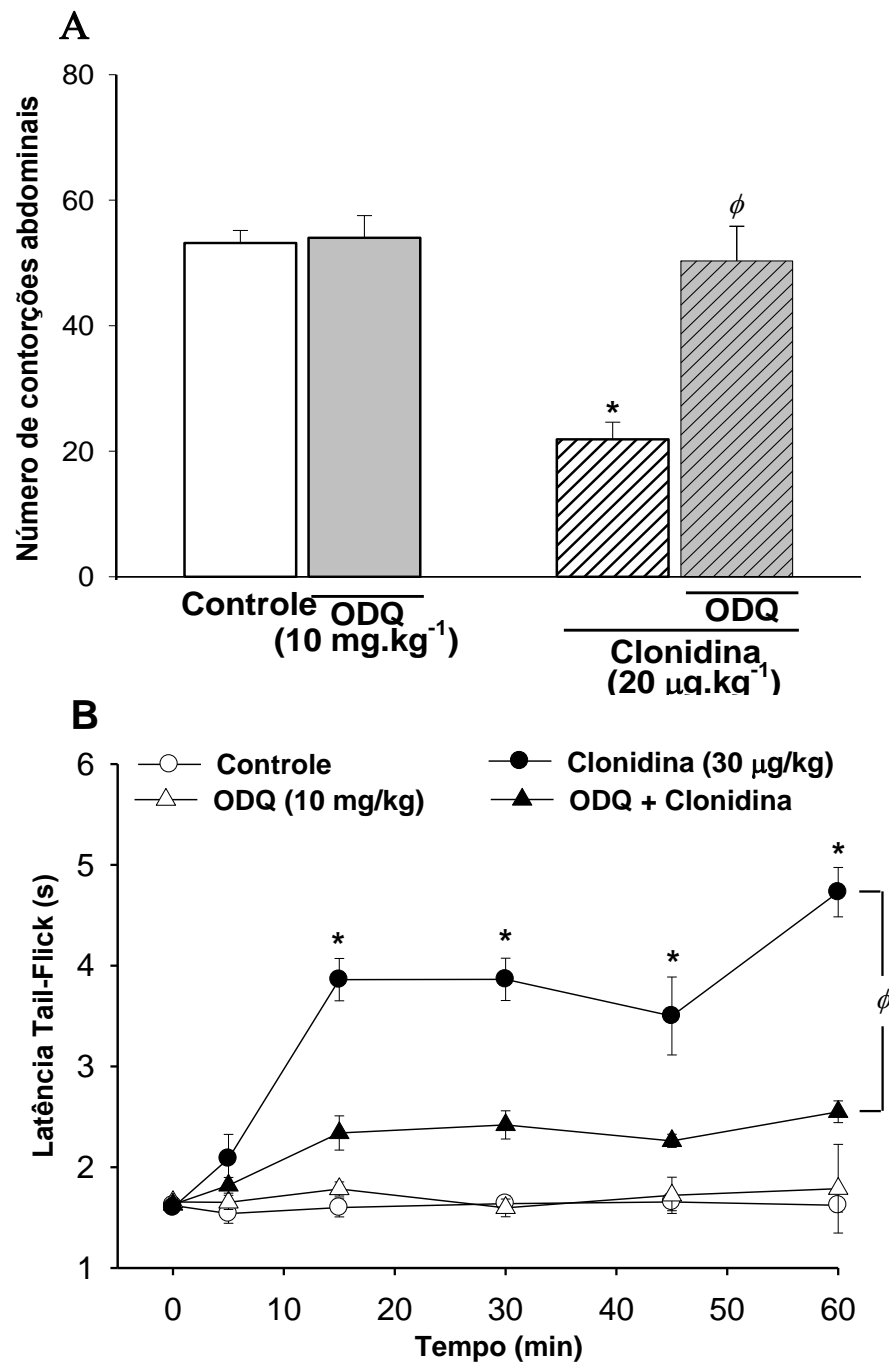


Gráfico 10. Efeito do 1H-[1,2,4]oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) no efeito antinociceptivo da clonidina medido pelas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0.6% (**A**) e pelo teste de retirada da cauda (**B**) em camundongos. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão de 6 animais para cada grupo. * $P < 0.05$ quando comparados ao grupo controle (salina) ϕ $P < 0.05$ comparado com as respostas da clonidina sem o ODQ (teste t de Student) ($n = 6$ todos os grupos).

4.2.3 Efeito da naloxona no efeito antinociceptivo da clonidina

O bloqueio dos receptores opioides pela naloxona não modificou o número de contorções abdominais em relação ao valor controle, Gráfico 11-A. A naloxona ($100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ i.p.) não foi capaz de modificar o número de contorções abdominais observadas, mesmo nos camundongos pré-tratados com clonidina ($30 \mu\text{g.kg}^{-1}$). Entretanto, o efeito antinociceptivo da morfina (1mg.kg^{-1}) é totalmente revertido pela naloxona conforme mostramos no Gráfico 11-B. Em contraste, o efeito antinociceptivo da clonidina nesse modelo experimental não foi antagonizado pelo bloqueio dos receptores opioides mostrado no Gráfico 11-C.

No teste de imersão da cauda, Gráfico 11 D podemos observar que a administração de naloxona ($100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ i.p.) não foi capaz de modificar valor das médias das latências observadas em segundos, mesmo nos camundongos pré-tratados com clonidina ($30 \mu\text{g.kg}^{-1}$ i.p.) No entanto, reduziu significativamente o efeito antinociceptivo da morfina (1mg.kg^{-1} i.p.).

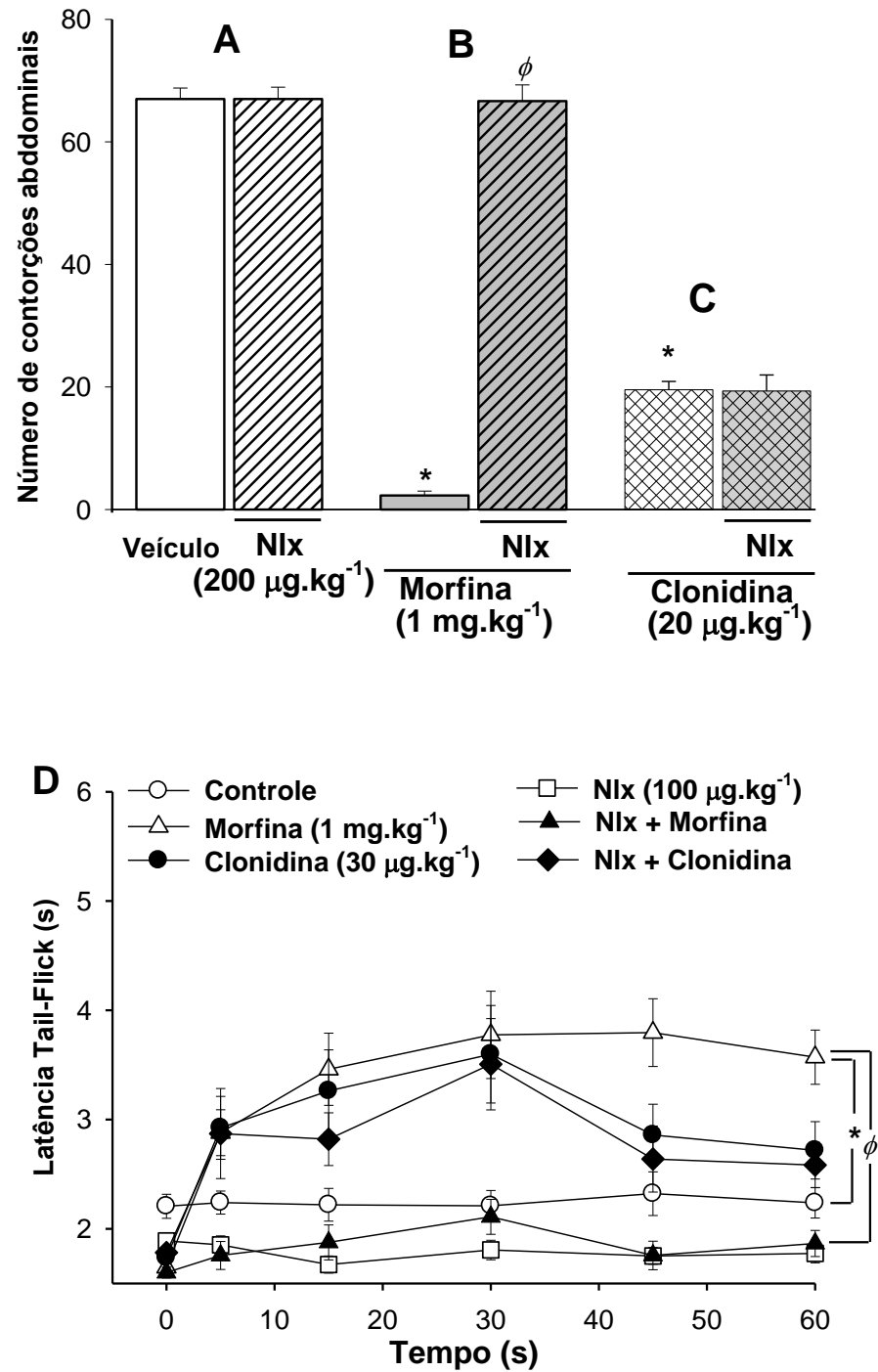


Gráfico 11 Efeito da naloxona (Nalox) no efeito antinociceptivo da clonidina ou morfina medido pelas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0.6% (A) e pelo teste de retirada da cauda (B) em camundongos. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão de 6 animais para cada grupo. * $p < 0.05$ quando comparados ao grupo controle (0, teste da contorção; ϕ = salina) ϕ $p < 0.05$ comparado com a resposta da morfina sem naloxona (teste t de Student).

4.2.4 Efeito da administração de atropina

Na Gráfico 12 podemos observar que a administração i.p. de atropina (0.5 mg.kg^{-1}) nos camundongos pré- tratados com clonidina ($30 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$) não promoveu modificação nos valores das médias das latências observadas em segundos no teste de imersão da cauda quando comparados ao grupo tratado somente com clonidina ($30 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1}$)

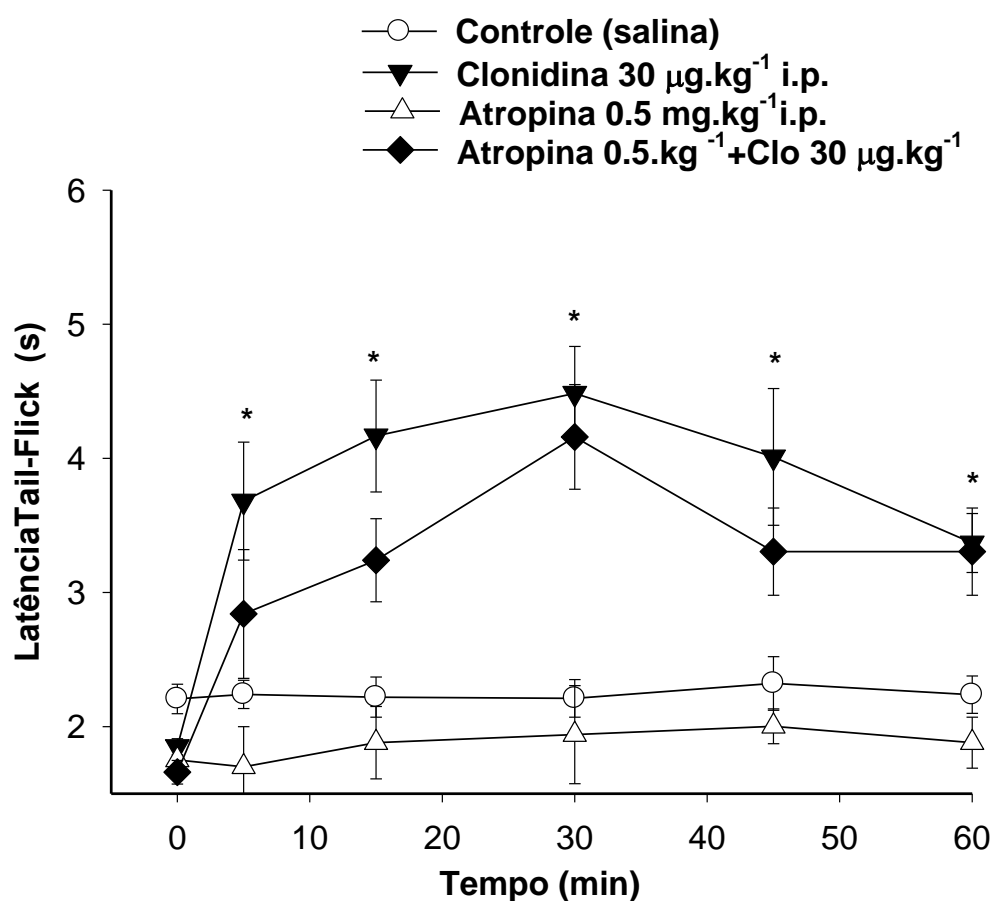


Gráfico 12. Efeito da atropina (0.5 mg.kg^{-1}) i.p. na antinocicepção induzida pela clonidina no teste de imersão da cauda “tail-flick” em camundongos. Os resultados são expressos como a média \pm EPM de 6 animais para cada grupo.* $p < 0.05$ comparado ao grupo controle (salina).

4.2.5 Efeito da administração de L- arginina

No Gráfico 13 podemos observar que a administração de L- arginina (100 mg.kg^{-1}) i.p. não modificou as latências do teste de retirada da cauda quando comparados com os valores controle. No entanto, a administração prévia de L- arginina (100 mg.kg^{-1}) i.p. potencializou o efeito antinociceptivo da clonidina ($30 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$) i.p., valores expressos como médias das latências observadas em segundos no teste de imersão da cauda.

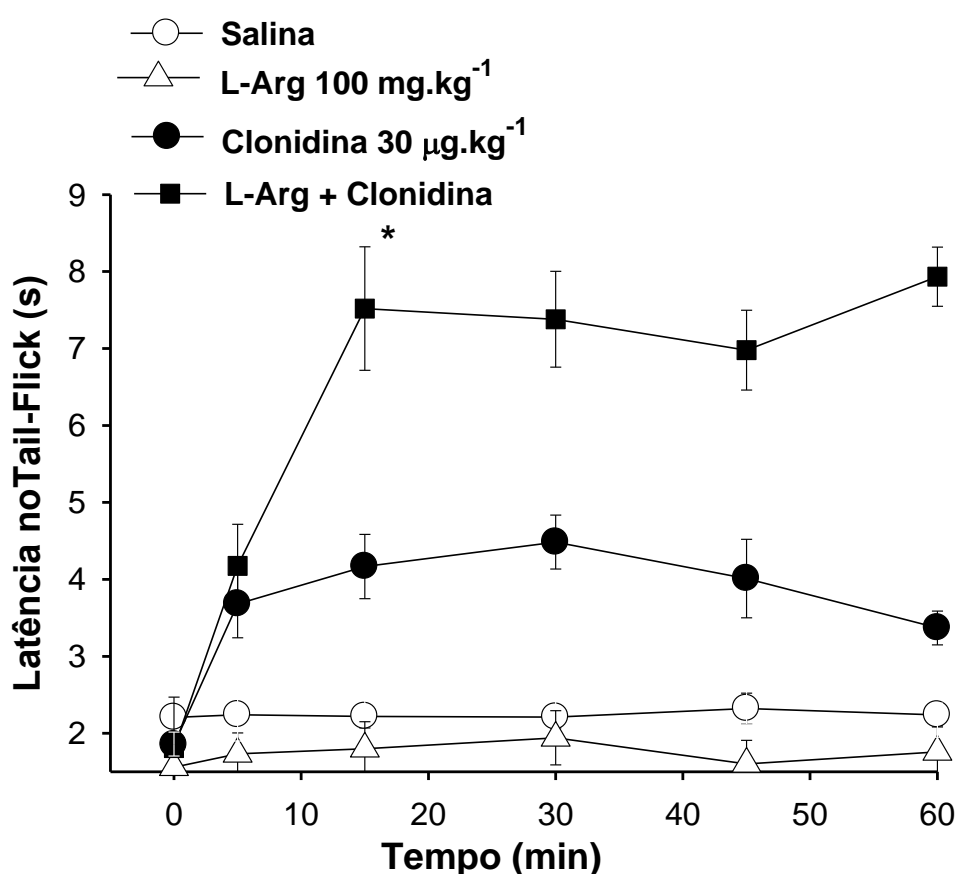


Gráfico 13. Efeito da L-arginina (100 mg.kg^{-1}) i.p. na antinocicepção induzida pela clonidina ($30 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$) no teste de imersão da cauda "tail-flick" em camundongos. Os resultados são expressos como a média \pm EPM ($n=6$). * $p<0.05$ comparado ao grupo controle (salina).

4.2.6 Atividade antinociceptiva dose dependente da rilmenidina

O Gráfico 14 A, mostra o efeito inibidor ($n=10$ $*p<0.01$) e dose dependente do número de contorções abdominais observadas nos camundongos tratados com rilmenidina (100, 300 e 600 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ i.v.). A dose de rilmenidina (600 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ i.p.) inibiu praticamente 100% o surgimento de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

No teste de imersão da cauda “tail-flick”, gráfico 14 B, a administração de rilmenidina (100, 600 e 1800 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) causou inibição significativa ($n=10$, $*p<0.01$) e dose dependente do valor das médias das latências observadas em segundos durante o período de 120 minutos.

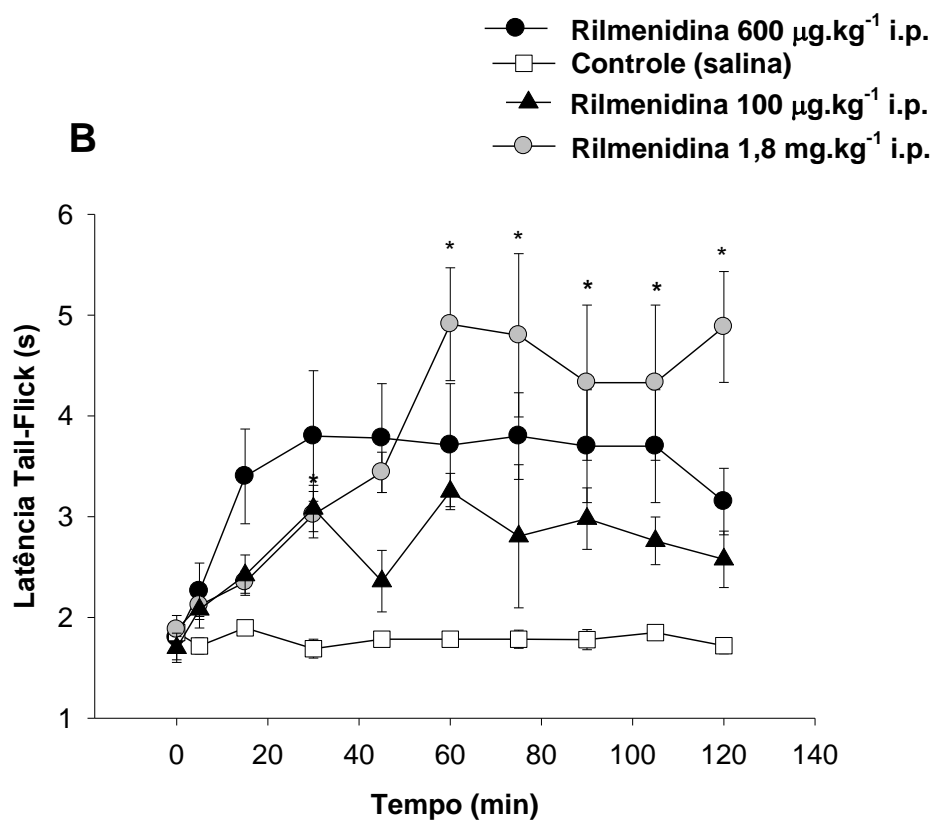
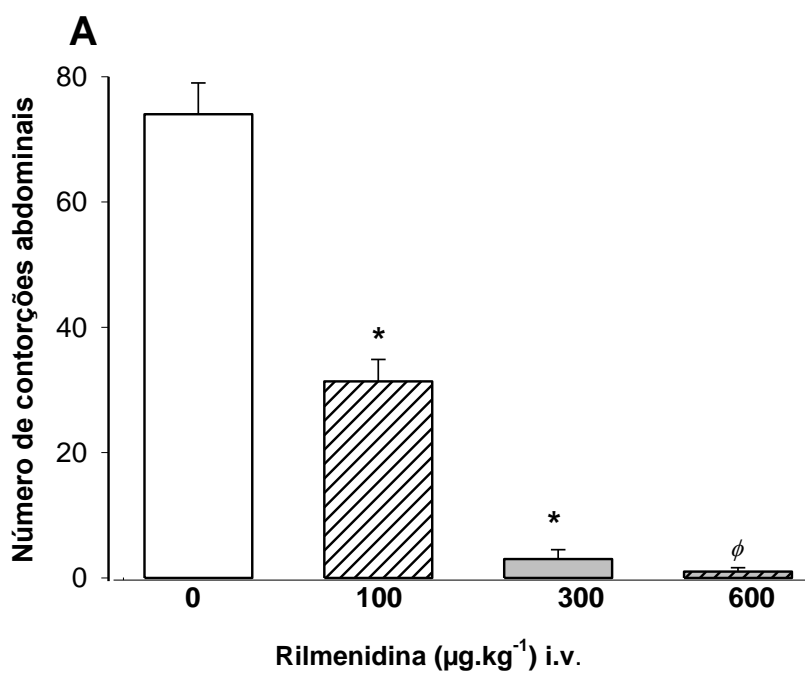


Gráfico 14. Efeito antinociceptivo da rilmenidina medido pelas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0.6% (A) e no teste de retirada da cauda (B) em camundongos. Os resultados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ quando comparados ao grupo controle (0= salina). ANOVA e Teste comparativo múltiplo de Bonferroni ($n=10$ todos os grupos).

4.2.7 Efeito da inibição da NO- sintase no efeito antinociceptivo da rilmenidina

A inibição da NO- sintase pelo 7-NI (15 mg.kg^{-1}) não modificou a antinocicepção comparando com o valor controle (salina), porém reduziu significativamente ($P < 0.05$) o efeito antinociceptivo da rilmenidina ($20 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$), (Gráfico 15).

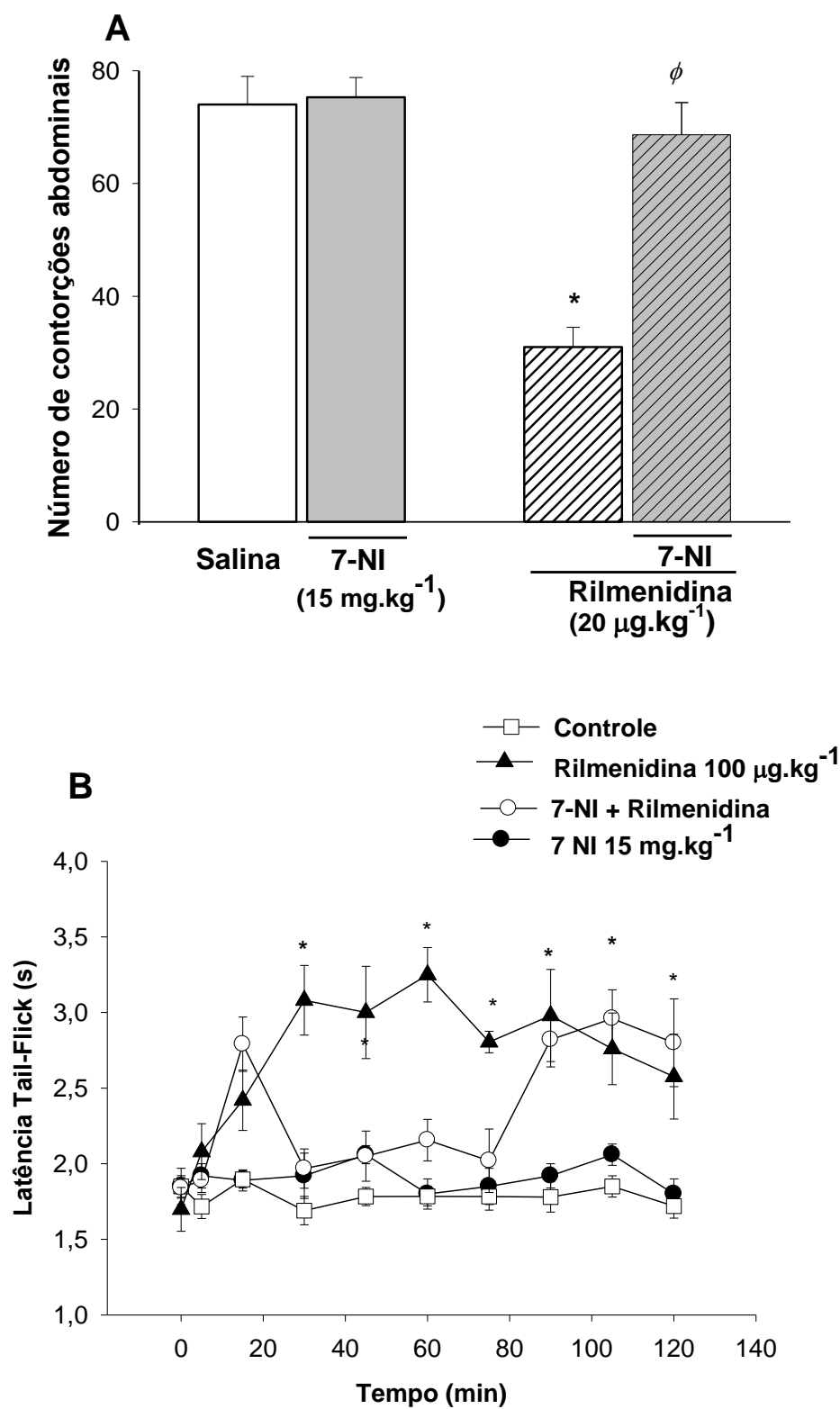


Gráfico 15. Efeito do 7- Nitroindazol (7-NI) no efeito antinociceptivo da rilmenidina medido pelas contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0.6% (A) e no teste de retirada da cauda (B) em camundongos. Os resultados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ quando comparados ao grupo controle (0 = controle salina) ϕ $p < 0.05$ comparado com as respostas da rilmenidina sem o 7-NI (teste t de Student)(n=6).

5 DISCUSSÃO

Nossos resultados estão em concordância com as observações de Mason & Angel (1983) de que os agonistas α_2 -adrenérgicos prolongam o tempo de sono induzido pelos barbitúricos. O estudo demonstrou que a administração venosa de clonidina produz sedação dose-dependente. Tanto a duração do sono induzido pela clonidina quanto o prolongamento do tempo de sono por barbitúrico, causado pela clonidina foram reduzidos de maneira significativa por bloqueadores da síntese do NO. Em contraste, o tempo de sono induzido pela injeção do barbitúrico tiopental sódico não foi modificado pela inibição da NO- sintase. O tempo de sono induzido pelo midazolam foi prolongado pelo barbitúrico, no entanto, esse efeito não foi modificado pela administração de inibidor de síntese do NO.

O óxido nítrico pode ser modulador do efeito sedativo da clonidina, visto que desempenha um papel importante na função neuronal (Garthwaite & Boulton, 1995) e pode ser o neurotransmissor envolvido no mecanismo da consciência, analgesia e anestesia (Tobin et al., 1994). O mecanismo pelos quais a clonidina modula as vias dependentes de NO no sistema nervoso central não são muito claros e devendo envolver a ativação de receptores α_2 -adrenérgicos. Recentemente nosso laboratório demonstrou que o efeito anti-hipertensivo da clonidina pode ser reduzido pela inibição da NO sintase, sugerindo que o efeito hipotensor deste agente deve-se não só à ativação de receptores α_2 -adrenérgicos centrais como também pela liberação de NO (Soares de Moura et al., 2000).

O efeito sedativo da clonidina parece ser dependente da ativação de receptores α_2 -adrenérgicos no locus coeruleus onde reduz o tônus simpático (Schmitt, 1977; Kobinger, 1978). A partir do trabalho publicado por Lothe et al., 1994

o óxido nítrico poderia ser responsável pela analgesia da clonidina intra-tecal, visto que a clonidina induz a liberação de óxido nítrico na medula espinhal (Xu et al., 2000). Além disso, a clonidina libera o óxido nítrico após a ativação de receptores α_2 -adrenérgicos endoteliais (Miiller & Vanhoutte, 1985). A partir das considerações acima tecemos a hipótese de que o óxido nítrico poderia modular o efeito sedativo da clonidina.

O trabalho fornece evidências experimentais de que o óxido nítrico poderia ser o modulador do efeito sedativo dos agonistas α_2 -adrenérgicos, pois demonstra pela primeira vez que o efeito sedativo da clonidina, rilmenidina e α -metildopa pode ser significativamente reduzido pelo 7-NI e L-NAME. O envolvimento do óxido nítrico é suportado pelo fato de que o efeito inibitório do L-NAME pode ser revertido pela L-arginina. Pelo fato do L-NAME causar um efeito vasoconstrictor sistêmico, poderíamos esperar alterações na farmacocinética dos agonistas α_2 -adrenérgicos e conseqüentemente no estudo do efeito sedativo. Entretanto, parece ser improvável que isso tenha ocorrido, visto que resultados inibitórios da sedação com clonidina obtidos com o 7-NI foram muito semelhantes aos do L-NAME e o 7-NI não produz efeitos vasculares (Moore et al., 1993). O L-NAME na dose utilizada no trabalho não modificou o tempo de sono do tiopental ou do midazolam nos levando a crer que o óxido nítrico não contribua para o efeito hipnótico de ambas substâncias.

Devemos considerar a participação do sistema do NO e o 3'5'-monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) no mecanismo sedativo da clonidina. Os agonistas α_2 -adrenérgicos reduzem a concentração de GMP-c no cerebelo, córtex cerebral, hipocampo e núcleo caudado de camundongos (Vulliemoz et al., 1996), e também no locus coeruleus (Vulliemoz et al., 1999). Em contraste com a clonidina o L-NAME não induz o efeito sedativo, apesar de reduzir o GMPc, levando a crer que o GMPc

não desempenhe um papel importante para o efeito sedativo da clonidina. Esta conclusão tem como suporte o fato do L-NAME ou o 7-NI nas doses utilizadas terem sido incapazes de induzir perda do reflexo de endireitamento embora, reconhecidamente reduzam o GMP-c no sistema nervoso central.

O efeito inibitório dos antagonistas da síntese de óxido nítrico no efeito sedativo da clonidina, não parece ser por efeito direto do L-NAME ou 7-NI, desde que esses compostos não alteraram o comportamento dos ratos em estudados. O L-NAME poderia agir inespecificamente no efeito sedativo da clonidina, entretanto, essa possibilidade se torna remota pois, o L-NAME não alterou o efeito potencializador do midazolam no tempo de sono induzido pelo tiopental. A possível participação do óxido nítrico se torna ainda mais evidente com o fato que a administração de L-arginina ter evitado a inibição do L-NAME no efeito potencializador da clonidina no tempo de sono induzido pelo tiopental.

Foi demonstrado que a rilmenidina produzia efeito sedativo em animais, no modelo da perda do reflexo de endireitamento, em doses superiores a necessária para obter o efeito hipotensor. ($\geq 5 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ s.c.}$) (Laubie et al., 1985). No mesmo estudo a clonidina ($\geq 60 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ s.c.}$), causou sedação sendo esta dose maior que a necessária para reduzir a pressão arterial. A duração do efeito sedativo foi mais prolongada com a clonidina. Foi estudado o efeito da rilmenidina na frequência de disparos nos neurônios do locus coeruleo por Laubie et al., 1985. Em nosso trabalho a rilmenidina na dose de 1.8 mg.kg^{-1} causou prolongamento do tempo de sono induzido pelo tiopental sódico de maneira significativa (* $p < 0.05$), embora tenha havido uma grande dispersão no grupo estudado.

Em um estudo multicêntrico realizado em 388 pacientes com a rilmenidina foi demonstrado que a dose anti-hipertensiva não causava sedação.

Da mesma forma que com a clonidina, o L-NAME reduziu o prolongamento do tempo de sono induzido pela rilmenidina.

Os resultados também sugerem que o prolongamento do tempo de sono induzido por barbitúricos causado pela clonidina, rilmenidina e a α -metildopa seja específico para ativadores dos receptores α_2 - adrenérgicos.

Este estudo demonstra que a administração sistêmica de clonidina reduz de maneira dose-dependente, as reações nociceptivas à injeção intraperitoneal de ácido acético ou à estimulação térmica da cauda de camundongos. Nossas observações confirmam resultados prévios, onde a administração sistêmica de clonidina induziu efeito antinociceptivo em animais (Sierralta et al.,1996). O mecanismo do efeito antinociceptivo da clonidina é complexo e envolve mecanismos centrais (Ossipov et al.,1985), espinhal (Yaksh & Reddy, 1981) e periférico (Nakamura & Ferreira, 1988). O efeito analgésico da clonidina provavelmente deve-se à ativação de receptores α_2 - adrenérgicos no sistema nervoso central, uma vez que pode ser inibido pela ioimbina (Howe et al., 1983). Entretanto o mecanismo exato ligando a ativação dos receptores α_2 - adrenérgicos e os efeitos antinociceptivos da clonidina, são desconhecidos.

A clonidina induz a liberação de óxido nítrico (Vanhoutte, 2001) que é um modulador muito importante nos mecanismos nociceptivos periférico (Duarte et al., 1990) e centrais (Tseng et al., 1992), através de mecanismos ainda não muito bem esclarecidos. Por exemplo, o NO pode interagir com mecanismos adrenérgicos e colinérgicos na inibição descendente do processamento nociceptivo. Poderia ativar a fosforilação da proteína quinase-C (via-GMP cíclico), importante para ativação do

receptor do ácido gamaaminobutírico, ou a partir do glutamato por ativação dos receptores do N-metil-D aspartato (Millan, 2002)

O NO de origem neuronal ou não pode desempenhar um papel complexo a diversos níveis na modulação do processo nociceptivo e dependendo das condições experimentais, o NO pode aumentar ou diminuir a dor (Meller & Gebhart, 1993).

Estamos demonstrando pela primeira vez que a modulação da atividade antinociceptiva da clonidina se processa através de uma via nitrérgica envolvendo a guanilato-ciclase em camundongos. Os resultados obtidos no teste das contorções abdominais e imersão da cauda, demonstram claramente que a atividade antinociceptiva da clonidina é significativamente diminuída pela inibição da síntese do óxido nítrico. Entretanto, existem trabalhos demonstrando que antagonistas da NO-sintase como o NMMA, não afetam a atividade antinociceptiva da clonidina intratecal (Xu et al., 1996). Talvez a divergência entre os resultados obtidos possa ser atribuída ao fato da clonidina ter sido aplicada diretamente na medula espinhal, e tal fato pode nos fazer supor haver diferenças na farmacocinética da via sistêmica ou espinhal do fármaco.

O envolvimento do óxido nítrico na antinocicepção sistêmica produzida pela clonidina é reforçado pela observação que o ODQ, um inibidor da guanilato-ciclase, reduziu significativamente o efeito antinociceptivo nos testes das contorções abdominais e imersão da cauda. Além disso, a administração do aminoácido precursor da síntese do NO, a L-arginina, produziu aumento da antinocicepção induzida pela clonidina no teste de imersão da cauda.

Trabalhos utilizando outros modelos experimentais mostram que tanto o mecanismo sedativo, quanto o anti-hipertensivo da clonidina podem ser bloqueados pelos antagonistas da NO-sintase (Soares de Moura et al., 2000 e 2001), sugerindo

um mecanismo comum a ambos efeitos, modulado por uma via óxido nítrico-GMPcíclico dependente.

O mecanismo da analgesia produzida por opióides, envolve a participação do sistema adrenérgico, uma vez que a administração sistêmica ou intracerebral de opioides produz aumento de noradrenalina no líquido cérebro-espinhal lombar (Tyce & Yaksh, 1981). Parece ser importante para o mecanismo antinociceptivo da clonidina a interação entre receptores α_2 -adrenérgicos e opioides. A administração da naloxona em baixas doses ($1 \mu\text{g.kg}^{-1}$) foi capaz de atenuar o efeito antinociceptivo da clonidina quando administrada pela via intra-cérebro-ventricular, no entanto, doses maiores aumentaram o efeito antinociceptivo da clonidina (Sierralta et al., 1996).

O trabalho mostrou que a naloxona na dose de ($100 \mu\text{g.kg}^{-1}$), dose capaz de praticamente abolir de maneira significativa o efeito da morfina (1mg.kg^{-1}), não modificou o efeito da clonidina aplicada sistemicamente nos testes das contorções abdominais e imersão da cauda. Tal resultado sugere que, possivelmente nos roedores, o efeito antinociceptivo da clonidina, nos modelos experimentais utilizados, independa da ativação dos receptores opioides.

Existem trabalhos mostram o envolvimento de mecanismos colinérgicos na antinocicepção induzida pela clonidina (Lothe et al., 1994). Talvez o sistema colinérgico seja o elo entre os efeitos dos agonistas α_2 -adrenérgicos e o sistema nitrérgico. Existem evidências que o efeito analgésico dos agonistas α_2 -adrenérgicos possa ser através de interneurônios inibitórios colinérgicos na medula espinhal, pois a administração de clonidina produz aumento da acetilcolina no líquido céfalo-raquidiano e o efeito analgésico da clonidina ser atenuado por

antagonistas muscarínicos ou potencializado pelos anticolinesterásicos (Hood et al., 1996). A administração intra-tecal de clonidina reduz a hipersensibilidade tátil decorrente da ligadura dos nervos espinhais L5 e L6 provavelmente através dos receptores muscarínicos M4 (Eisenach & Kang, 2003). Em modelos experimentais onde é produzida injúria do nervo somente a antinocicepção mecânica é bloqueada por antagonistas muscarínicos como a atropina, esta não afetou a antinocicepção térmica conforme demonstrado em trabalho recente (Paqueron, Conklin & Eisenach, 2003). Talvez tal fato se repita em modelos de dor aguda, pois no trabalho a administração do bloqueador colinérgico atropina (0.5 mg.kg^{-1}), não modificou a atividade antinociceptiva da clonidina no teste de imersão da cauda.

Já foi demonstrada a atividade antinociceptiva da moxonidina, anti-hipertensivo que também possui afinidade por receptores imidazolidínicos (Fairbanks & Wilcox, 1999; Shannon & Lutz, 2000). Posteriormente foi demonstrado, que a moxonidina pode agir sinergicamente com opioides provavelmente através de receptores α_{2C} -adrenérgicos (Fairbanks et al., 2002).

No cérebro de ovelhas havia uma substância, que deslocava a clonidina radiomarcada de seus sítios de ligação denominada agmantina. Esta substância foi identificada como ligante endógeno do receptor imidazolinico (Li et al., 1994).

De acordo com a hipótese do receptor imidazolidínico (Bousquet et al., 1984, 2000) o receptor I_1 da medula ventro-lateral seria importante para a ação simpático inibitória da clonidina, rilmenidina e moxonidina. Os efeitos colaterais, boca seca e sedação da clonidina poderiam ser atribuídos à ativação dos receptores α_2 -adrenérgicos. Se essa hipótese fosse verdadeira então, drogas seletivas para o receptor I_1 deveriam ser amplamente utilizadas como anti-hipertensivos (Head et al., 2003). A rilmenidina possui 50 vezes maior seletividade em reduzir a pressão arterial

e atividade neuronal no núcleo reticular lateral do que no locus coeruleo (Tibiriçá et al., 1991b). O fato da sequência de aminoácidos dos receptores adrenérgicos- α_{2A} de seres humanos e coelhos, possuírem cerca de 81 aminoácidos diferentes, talvez possa explicar a discrepância entre os efeitos farmacodinâmicos da rilmenidina como agonista do receptor adrenérgico e o antagonismo, respectivamente reportados na literatura (Bruss et al., 2003). Existem trabalhos como o de Mac Millan et al., 1996 que mostram que em camundongos geneticamente modificados destituídos de receptores α_{2A} - adrenérgicos funcionantes, a clonidina é incapaz de promover o efeito hipotensor.

O trabalho demonstra pela primeira vez a atividade antinociceptiva da rilmenidina em camundongos no teste das contorções abdominais e imersão da cauda. Da mesma forma que a clonidina, a inibição da síntese de óxido nítrico pelo 7-NI causou significativa redução do efeito antinociceptivo da rilmenidina. Trabalhos recentes mostram que a ação anti-hipertensiva da rilmenidina pode ser atenuada tanto pela inibição da síntese de óxido nítrico, quanto da guanilato ciclase (Soares de Moura et al., 2001).

7 CONCLUSÕES

1 O efeito sedativo da clonidina, alfametildopa e rilmenidina pode ser reduzido de maneira significativa quando a NO-sintase é inibida. Possivelmente o óxido nítrico participa no mecanismo sedativo dos agonistas α_2 - adrenérgicos.

2 O efeito antinociceptivo da clonidina e rilmenidina envolvem uma via NO-guanilato ciclase GMP cíclico dependente.

3 A rilmenidina possui efeito antinociceptivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Abbot FV, Melzack R, Samuel C. Morphine analgesic in the tail-flick and formalin test is mediated by different neural systems. *Exp Neurol* 1982; 72:423-430.

Amaral D G, Sinnamon, H M. The locus coeruleus neurobiology of a central nucleus. *Prog on neurobiology* 1977;147.

Andrade R, Aghajanian GK. Opiate and alfa-2 adrenoceptor -induced hyperpolarization of locus coeruleus neurones in brain slices:reversal by cyclic adenosine 3'5'- monophosphate analogues. *Journal of Neuroscience* 1985; 5:2359-2364.

Aunac S, Carlier M, Singelyn F, De Kock M. The analgesic efficacy of bilateral combined superficial and deep cervical plexus block administered before thyroid surgery under general anesthesia. *Anesthesia & Analgesia* 2002; 95:746-50.

Aveline C, El Metaoua S, Masmoudi A, Boelle PY, Bonnet F. The effect of clonidine on the minimum local analgesic concentration of epidural ropivacaine during labor. *Anesthesia & Analgesia* 2002; 95:735-40.

Ben-Bassat J, Peretz E, Sulman, FG. Analgesimetry and Ranking of analgesic drugs by receptacle method. *Arch Int pharmacodyn* 1959; CXX11(3-4) :434-447.

Bentley GA, Newton SH, Starr J. Evidence for action of morphine and the enkephalins on sensory nerve endings in the mouse peritoneum. *British Journal of Pharmacology* 1981; 73:

Bouaziz H, Hewitt C, Eisenach JC. Subarachnoid neostigmine potentiation (-2 Adrenergic agonist analgesia: desmeditomidine versus clonidine. *Regional Anesthesia* 1995; 20(2):121-7.

Bousquet P, Feldman J, Schwartz J. Central Cardiovascular effects of alpha-adrenergic drugs difference between catecholamines and imidazolines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic* 1984; 230-232.

Bousquet P. Identification and characterization of I1 imidazoline receptors: their role in blood pressure regulation. *American Journal of Hypertension* 2000; (13):84S-88S.

Bricca G, Dotenwill M, Molines A, Feldman J, Tibirica E, Belcourt A, Bousquet P. Rilmenidine selectively for imidazoline receptors in human Brain. *European Journal of Pharmacology* 1989; 163: 373-7.

Brignola,G.; Calignano,A.; Di Rosa,M.; Modulation of morphine antinociception in the mouse mouse by endogenous Nitric Oxide. *British Journal of Pharmacology* 1994; 113:1372-6.

Bruss M, Bonisch H, Gothert M, Molderings. Molecular structure of rabbit alpha (2A)-adrenoceptor: a contribution to alpha (2A)-adrenoceptor versus I(1) imidazoline

receptor controversy. *Naaunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 2003; 367(3):328-31.

Camarata PJ & Yaksh TL. Characterization of the spinal Adrenergic receptors mediating the Spinal effects Periaqueductal Gray. *Brain Research* 1985; 336:133-142.

Carabine UA, Mulligan KR, Moore JA. Adrenergic Modulation of preoperative anxiety: A comparison of temazepam, clonidine, and timolol. *Anesthesia Analgesia* 1991; 73:633-7.

Carrol MN & Lim RKS. The mechanism of phenyquinone writhing. *Fed Proc* 1958; 17: 357

Cespuglio R, Gomes ME, Farady H, Jouvet M. Alterations in the sleep waking cycle induced by coding of the locus coeruleus area. *Electroencephal clin neurophysical*,1982; 54: 570.

Chen HI & Chiang IP. Chronic exercise decreases adrenergic agonist-induced vasoconstriction in spontaneous hypertensive rats. *American Journal Physiology* 1996; 271: 997-83.

Cobb JP, Natanson C, Hoffman WD et al.. Omega-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, raises vascular resistance but increases mortality rates in awake canines challenged with endotoxin. *Experimental Medicine* 1992; 176(4):1175-1182.

Coombs DW & Saunders RL. Intrathecal morphine tolerance:Use of intrathecal clonidine, DADLE and intraventricular morphine. *Anesthesiology* 1985; 62:358-63.

Correa-Sales C, Rabin BC & Maze M. A hypnotic response to dexmedetomidine, and agonist, is mediated in locus coeruleus in rats. *Anesthesiology* 1992; 76:948-52.

D'Amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic* 1941; 72:74-79.

Dahlstron A & Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system Experimentaly induced changes in the intraneuronal amine levels of bulbospinal neuron systems. *Acta Physiologica Scandinava* 1965; 64 :1-36.

De Sarro G, Ascoti C, Froio F, Libri V, Nistico G. Evidence that locus coeruleus is the site where clonidine and drugs acting at alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors affect sleep and arousal mechanisms. *British Journal of Pharmacology* 1987; 90:675-85.

Delbarre B and Schmitt H. Sedative effects of alpha-sympathomimetic drugs and their antagonism by adrenergic and cholinergic blocking drugs. *European Journal of Pharmacology* 1971; 13:356-63

Dennis SG & Melzack R. Pain Modulation by 5-hydroxytryptaminergic agents and

morphine measured by three pain tests. *Experimental Neurology* 1980; 69:260-270.
Detweiler DJ, Eisenach JC, Tong C, Jackson. A cholinergic interaction in alpha-2 adrenoceptor-mediated antinociception in sheep. *Journal of Pharmacol Exp Ther* 1993; 265(2):536-542.

Dollery CT. Advantage and disadvantages of alpha-2 adrenoceptor agonists for systemic Hypertension. *American Journal Cardiology* 1988; 61(suppl):1D-5D.

Drew GM, Dowler AJ & Marriott AS. Pharmacological characterization of alpha-Adrenoceptors which mediate clonidine-induced sedation. *British Journal of Pharmacology* 1977; 648.

Drew GM, Gower AJ & Marriott AS. Alpha 2-adrenoceptors mediate clonidine-induced sedation in the rat. *British Journal of Pharmacology* 1979; 67:133-41.

Duarte IDG & Lorenzetti BB, Ferreira SH. Peripheral analgesia and activation of nitric oxide- GMP pathway. *European Journal of Pharmacology* 1990; 186:289-293.

Eckhardt RT, Cheplovitz F, Lipo M & Govier WM. Etiology of chemically induced writhing in mouse and rat. *Proc. Soc. Exp. Biol (N.Y)* 1958; 98:186-188.

Edwards G & Weston AH. The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. *Annual Review Pharmacology Toxicology* 1993; 33:597-637.

Eisenach JC, Detweiller D & Hood D. Hemodynamic and analgesic actions of epidurally administered clonidine. *Anesthesiology* 1993; 78:277-87.

Eisenach JC, Lysak SZ & Gisconi CM. Epidural clonidine analgesia following surgery:Phase 1. *Anesthesiology* 1989; 71:640-6.

Eisenach JC & Kang YJ. Intrathecal clonidine reduces hypersensitivity after nerve injury by a mechanism involving spinal m4 muscarinic receptor. *Anesthesia and Analgesia* 2003; 96(5):1403-8

Fairbanks CA & Wilcox GL. Moxonidine, a selective receptor agonist, produces spinal antinociception in mice. *Journal of Pharmacol Exp Ther* 1999; 290:403-12

Fairbanks CA, Stone LS, Kitto KF, Nguyen HO, Possthumuss IJ, Wilcox GL. Alpha (2C)-adrenergic receptors mediate spinal analgesia and adrenergic-opioid synergy. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 282-90

Feldman JE, Tibiriçá E, Bricca G, Dotenvill M, Belcourt A, Bousquet P. Evidence for involvement of imidazoline receptor in the central hypotensive effect of rilmenidine in the rabbit. *British Journal of Pharmacology* 1990; 100:600.

Ferreira SH, Nakamura M. Prostaglandin hyperalgesia A cAMP/ Ca²⁺ dependent process. *Prostaglandins* 1979;18:179.

Fillastre J, Letac B, Galinier F, Le Bihan G, Schwartz J. A multicentre double blind comparative study of rilmenidine for mild to moderate systemic hypertension.

American Journal of Cardiology 1988; 61(suppl 7):81D-85D.

Flacke J W, Bloor B C, Flacke WE, Wong D, Dazza S, Stead S W, Laks H. Reduced narcotic requirement by clonidine improved hemodynamics and adrenergic stability in patients undergoing coronary bypass surgery. *Anesthesiology* 1987; 67:11-19.

Fleetwood-Walker S M, Mitchel R, Hope PS, Molony V, Iggo A. An alpha α_2 receptor mediates the selective inhibition by noradrenaline of nociceptive responses on dorsal horn neurones. *Brain Research* 1985; 334:243-254.

Galleotti N, Ghelardini, Vinci M, Bartolini A. Role of potassium channels in the antinociception induced by agonists of alfa2-adrenoceptors. *British Journal of Pharmacology* 1999; 126:1214-1220.

Garthwaite J, Boulton CL. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annual Review Physiology* 1995; 57: 683-706.

Ghignone M, Calvilo O, Quintin L. Anesthesia and Hypertension: The effect of clonidine on Perioperative hemodynamics and isoflurane requirements. *Anesthesiology* 1987; 67:3-10.

Gold MS, Redmond DE & Kleber HD. Clonidine blocks acute opiate withdrawal symptoms. *Lancet* 1978; ii:599-602.

Goldfarb G, Ang ET & Debaene B. Effect of clonidine on postoperative shivering in men: A double blind study. *Anesthesiology* 1989; 71:649.

Gordh T, Sharma H S, Alm P & Westman J. Spinal nerve lesion induces up regulation of neuronal nitric oxide synthase in the spinal cord: an immunohistochemical investigation in the rat. *Aminoacids* 1998;14:105-12.

Hager H, Marhofer P, Sitzwohl C, Adler L, Kettner S, Semsroth M. Caudal clonidine prolongs analgesia from caudal S(+)-ketamine in children. *Anesthesia Analgesia* 2002; 94:1169-72.

Hammond DL, Tyce G M & Yaksh TL. Efflux of 5-Hydroxytryptamine and noradrenaline into spinal cord superfusates during stimulation of the rat medulla. *J. Physiol. Lond* 1985; 359:151-162.

Hayashi Y & Maze M. Alpha adrenoceptor agonists and anesthesia. *British Journal of Anaesthesia* 1993; 71:108-18.

Head GA, Parkin ML, Gowin SJ. Importance of imidazoline-preferring receptors in the cardiovascular actions of chronically administered moxonidine, rilmenidine and clonidine in conscious rabbits. *Journal of Hypertension* 2003; 21(1):167-178.

Headley PM, Duggan AW, Griersmith BT. Selective reduction by noradrenaline and 5 - Hydroxytryptamine of nociceptive responses of cat dorsal horn neurons. *Brain Research* 1978; 145:185-189.

Headley SL & Spencer PSJ. Analgesic effect of intracerebral injection in the Mouse.

British Journal of Pharmacology 1969; 35: 361.

Hendershot LC, Forsaith J. Antagonism of the frequency of phenylquinone-induced writhing in the mouse by weak analgesics and non analgesics. *J Pharmacol Exp Ther* 1959; 125:237-240.

Hille B. Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neuroscience* 1994; 17:531-536.

Hoefke W & Kobinger W. Pharmacological effects of 2-(2,6-dichlorophenylamino)-2-imidazoline hydrochloride, a new antihypertensive substance. *Arzneimittelforschung* 1966; 16 (8):1038-58.

Hood DD, Mallank KA, Eisenach JC, Tong C. Interaction between intrathecal neostigmine and epidural clonidine in human volunteers. *Anesthesiology* 1996; Aug 85 (2):315-25.

Hossman V, Mailing TJB, Hamilton CA, Reid JL, Dollery CT. Sedative and cardiovascular effects of clonidine and nitrazepam. *Clin Pharmacol Ther* 1980; 28:167-176.

Howe JR, Wang JY, Yaksh TL. Selective antagonism of the antinociceptive effect of intrathecally applied alpha adrenergic agonists by intrathecal prazosin and intrathecal yohimbine. *J Pharmacol Exp Ther* 1983; 224:552-558.

International Association for Study of Pain (IASP) subcommittee on Taxonomy, Classification of Chronic Pain descriptions of Chronic Pain syndromes and definitions of Pain terms. *Pain* 1986 Suppl (3): 5-5225

Jensen TS & Yaksh, TL. Examination of the spinal monoamine receptors through which brainstem opiate sensitive systems act in the rat. *Brain Res*, 1986; 363:114-127.

Jones SL & Gebhart GF. Characterization of Coeruleospinal inhibition of nociceptive tail-flick reflex in the rat: mediation by spinal alpha-2 adrenoceptors. *Brain Res*, 1985; 364:315-330.

Jouvet M. Role of catecholamines in the control of sleep-wakening cycle in: *Frontiers in Catecholamines Research*. Eds, E. Usdin and S.M. Snyder (Pergamon Press, Grand Britain 1973) p.751.

Kamei, J.; Iwamoto, Y.; Misawa, M.; Nagase, H.; Kasuya, Y. Antinociceptive effect of L-Arginine in diabetic mice. *European Journal of Pharmacology*, 1994; 254:113-7.

Keele C.A., Armstrong D. *Substances producing Pain and itch*. Edward Arnold London, 46, 1964.

Kitto, K.F.; Halleey, J.E. & Wilcox, G.L. Involvement of nitric oxide in spinally-mediated hyperalgesia in the mouse. *Neurosci Lett*, 1992; 148:1-5.

Kobinger W. Central alpha-adrenergic systems as targets for hypotensive drugs. *Ver*

Physiol Biochem Pharmacol 1978; 81:39-100.

Koenig-Bernard E, Tierney C, Beau B, Delbarre G, Lhoste F, Labrid C. Cardiovascular and central nervous system effects of ril (S3441) in rats. American Journal of Cardiology 1988; 61:22D-31D.

Koleniskov, Y.A.; Pan, Y.X.; Babey, A.M.; Jani, S.; Wilson, R.; Pasternak, G.W. Functionally differentiating two neuronal nitric oxide synthase isoforms through antisense mapping Evidence for opposing NO actions on morphine analgesia and tolerance. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:8220-5.

Komori, Y, Wallace, G.C. & Kukuto, J.M. Inhibition of purified nitric oxide synthase from rat cerebellum and macrophage by L-arginine analogs. Arch Biochem Biophys, 1994; 315:213-218.

Koster R, Anderson, M. & De Beer, E.J. Acetic Acid for analgesic screening Fed Proc. 1959; 18:412.

Kwabata A, Nishimura Y, Takagi H. L-leucyl-L-Arginine, naltrindole and D-Arginine block antinociception elicited by L-Arginine in mice with carrageenin-induced hyperalgesia. British Journal of Pharmacology 1992; 107:1096-101.

Larsen JJ & Arnt J. Spinal 5-HT or NA uptake inhibition potentiates supraspinal morphine antinociception in rats. Acta Pharmacol Toxicol 1984; 54:72-75.

Laubie M, Poignant JC, Scuvée-Moreau J, Dabire H, Dresse A, Schmitt H. Pharmacological properties of (N-dicyclopropylmethyl)-amino-2-oxazoline: (S3341), an alpha 2-adrenoceptor agonist. Journal of Pharmacology Paris 1985; 16:259-278

Laverty R & Taylor KM. Behavioural and biochemical effects of 2- [2,6-dichlorophenylamino] - 2-imidazoline hydrochloride (5T 155) on the central nervous system. British Journal of Pharmacology 1969; 35:253.

Li G, Regunathan S, Barroe CJ, Eschraghi J, Cooper R, Reis DJ. Agmatine: an endogenous clonidine displacing substance in the brain. Science 1994; 263:966-9.

Llewelyn MB, Azami J, Roberts M.H.T. Effects of 5-Hydroxytryptamine applied into nucleus raphe magnus on nociceptive thresholds and neuronal firing rate. Brain Research 1983; 258:59-68.

Lothe A, Li P, Tong C, Yoon Y, Bouaziz H, Detweiler DJ., Eisenach JC. Spinal cholinergic alpha-2 adrenergic interactions in analgesia and hemodynamic control: role of muscarinic receptor subtypes and nitric oxide. The Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics, 1994; 270(3):1301-6.

MacMillan LB, Hein L, Smith MS, Piascik MT, Limbird LE. Central hypotensive effects of alpha_{2A} adrenergic receptor subtype. Science 1996; 273:801-803.

Malmberg A B & Yaksh TL. Spinal Nitric oxide inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. Pain, 1993b; 54:291-300.

Mason ST & Angel A. Anaesthesia: the role of adrenergic mechanisms. *European Journal of Pharmacology* 1983; 91:29-39.

Maze M & Tranquilli W. Alpha-2 adrenoceptor agonists: Defining the role of clinical Anesthesia. *Anesthesiology*, 1991;74: 581-605.

Meller ST & Gebhart GF. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* 1993; 52:127-136

Meller ST, Cummings CP, Traub RJ, Gebhart GF. The role of nitric oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenan in the rat. *Neuroscience*1994; 60:367-74.

Melzack DE,Wall PD. Pain mechanisms a new theory. *Science* 1965; 150:971-9.

Metys J, Wagner N, Metysova J, Herz A. Studies on the central antinociceptive actions of cholinergic agents. *Int J Neuropharmacol* 1969; 8:413.

Millan MJ. Descending control of pain. *Progress Neurobiology*, 2002; 66(6):355-474.

Miller RD, Way WL, Eger EI. The effects of alpha-methyldopa, reserpine, guanethidine, and iproniazid on minimum alveolar anesthetic requirement (MAC). *Anesthesiology* 1975; 42:132-52.

Miller VM, Vanhoutte PM. Endothelial α_2 -adrenoceptor in canine pulmonary systemic blood vessels. *European Journal of Pharmacology* 1985; 118:123-9

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-42.

Moore PK, Oluyomi AO, Babbedge RC, Wallace P, Hart SL. L-N-Nitro Arginine methyl Ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *British Journal of Pharmacology* 1991; 102:198-202.

Moore PK, Wallance P, Gaffen Z, et al. Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitro indazole and related indazoles: antinociceptive and cardiovascular effects. *British Journal of Pharmacology* 1993; 110:219-24.

Morita K & North RA. Clonidine activates membrane potassium conductance in myoenteric Neurons. *British Journal of Pharmacology* 1981; 74:419-428.

Mueller RA, Smith RD, Spruill WA, Breese G R. Central monoaminergic neuronal effects on minimum alveolar concentrations (MAC) of halothane e cyclopropane in rats. *Anesthesiology* 1975; 42:143-52.

Naguib M & Yaksh TL. Antinociceptive effects of spinal cholinesterase inhibition and isobolographic analysis of the interaction with mu and alpha 2 receptor systems. *Anesthesiology* 1994; 80:1338-1348

Nakamura M, Ferreira SH. Peripheral analgesic action of clonidine: mediation by

release of endogenous enkephalin-like substances. *European Journal of Pharmacology* 1988; 146:223-228

Nakane M, Pollock JS, Kinghoffer V, Basha F, Marsden PA, Hokari A, Ogura T, Esumi H, Carter GW. Functional expression of three isoforms of nitric oxide synthase in baculovirus-infected insect cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 206(2): 7.831-7834.

Nassif S, Kempf E, Cardo B, Velley L. Neurochemical lesion of the locus coeruleus of the rat does not suppress the sedative effect of clonidine. *European Journal of Pharmacology* 1983; 91(1):69 -76.

Ocaña M & Baeyens JM. Cromakalim differentially enhances antinociception induced By agonists of alpha-2 adrenoceptors,gama-aminobutyric acid b,mu and kappa opioid receptors. *Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics* 1996; 276:1136-1142.

Okun R, Lindon SC, Lasagna L. The effects of aggregation, electric shock, and adrenergic blocking drugs on inhibition of the "writhing syndrome". *Exp Ther* 1963; 139:107-109.

Ossipov MH, Chatterjee TK, Gebhart GF. Locus coeruleus lesions in the rat enhance the antinociceptive potency of centrally administered clonidine but not morphine. *Brain Research* 1985; 341:320-330

Oliveira LFO. Master dor Organizado por Sérgio Oliveira. São Paulo 1998.

Paalzow L. Analgesia produced by clonidine in mice and rats. *J Pharm Pharmacol* 1974; 26:361-3.

Palmer RMS, Rees DD, Moncada SL. Arginine is the physiological presursor for formation of nitric oxide the endothelium-dependent relaxation. *Bioch. Biophs Res commun* 1988b; 153: 1251.

Pan HL, Chen S R, Eisenach JC. Role of spinal N.O. in antiallodynic effect of intrathecal clonidine on neuropathic rats. *Anesthesiology* 1998; 89(6):1518-23.

Paqueron X, Conklin D, Eisenach JC. Plasticity in action of intrathecal clonidine to mechanical but no thermal nociception after peripheral nerve injury. *Anesthesiology* 2003 99(1):199-204

Payen D, Quintin L, Plaisance P, Chiron B, Lhoste F. Head injury: clonidine decreases plasma catecholamines. *Crit Care Med* 1990; 18:392-5.

Quintin L, Viale JP, Anat G, Hoen JP, Butin E, Cottet-Emard JM, Levron JC, Busserv D, Motin J. Oxigen uptake after major abdominal surgery: Effect of clonidine. *Anesthesiology* 1991; 74:236-241.

Racle JT, Benkhaedra A, Poy JY. Prolongation of isobaric bupivacaine spinal anesthesia with epinefrine and clonidine for hip surgery in the elderly. *Anesthesia &*

Analgesia 1987; 66:442-6.

Raffa RB, Martinez RP. The glibenclamide shift of centrally-acting antinociceptive agents in mice. *Brain Research* 1995; 677:277-282.

Redmond JR, Huang DE, Snyder DR, Maas JW. Behavioral effects of stimulation of the nucleus coeruleus in the stump tailed macaca arctoides. *Brain Research* 1976; 159:149.

Sanchez-Basquez P & Garzon P. Cholera toxin and pertussis toxin on opioid-and-alpha-2 Mediated supraspinal analgesia in mice. *Life Sci*,1991; 48:1721-1727.

Scheinin H, Kallio A, Koulu M, Scheinin M. Pharmacological effects of medetomidine in Humans. *Acta Vet Scand*1989; Suppl 85:145-7.

Schmitt H. The pharmacology of clonidine and related products, in: *Antihypertensive Agents*, ed. F. Gross (Springer-Verlag, Berlin) 1977; pp.299.

Schoedon G, Blau N, Schneemann M, Fleury G & Schaffne A. *Biochem Biophys. Res Commun*1994; 199: 504-510.

Segal IS, Jarvis D J, Duncan SR, White PF & Maze M. Clinical efficacy of oral transdermal clonidine combinations during perioperative patients. *Anesthesiology* 1989; 74:220-5.

Sewell RDE & Spencer PSJ. Antinociceptive activity of narcotic agonist and partial agonist analgesics and other agents in the tail immersion test in mice and rats. *Neuropharmacology* 1976; 15:683-688.

Shannon H & Lutz EA. Effects of I1b imidazoline/ alpha 2- adrenergic receptor agonist moxonidine in comparison with clonidine in the formaline test in rats. *Pain* 2000; 85:1161-67

Siegmund EA, Cadmus R & Lu G. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic Analgesics. *Proc Soc Exp Biol (NY)*1957; 95:729-731.

Sierralta F, Naquira D, Pinardi G, Miranda HF. (-Adrenoceptor and opioid receptor modulation of clonidine-induced antinociception. *British Journal of Pharmacology* 1996; 119:551-554.

Soares de Moura R & Cardoso Leão M. Involvement of endothelium on the antihypertensive effect of clonidine. *J Vasc Research* 1997; (S1):34-8791-95

Soares de Moura R, Leão CM, Castro Resende A, et al. Actions of L-NAME and methylene blue on the hypotensive effects of clonidine and rilmenidine in the anesthetized rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35:791-95.

Soares de Moura R, Rios AAS, de Oliveira LF, Resende AC, Lemos Neto M, Santos EJA, Correia MLG; Tano T. The effect of nitric oxide synthase inhibitors on the sedative effect of clonidine. *Anesth Analg* 2001; 93:1217-21.

Song HK, Pan HL, Eisenach JC. Spinal nitric oxide mediates antinociception from IV morphine. *Anesthesiology* 1998; 89:215-21.

Sorkin LS, Hughes MG, Willis WD, Mc-Adoo DJ. Midbrain stimulation induced serotonin (5 HT) release in discrete regions of primate spinal cord recovered with dialysis. *Pain* 1987; Suppl 4:5-29.

Sukuki Y & Taguchi K. In vitro voltammetric studies of the effect of morphine on the serotonergic system in the cat spinal cord. *Brain Research* 1986; 398:413-418.

Talke PO, Mangano DT, Li J, Hollenberg M, Jain U. Effect of dexmedetomidine on myocardial ischemia in vascular surgery patients. *Anesthesiology* 1993; 79:A60.

Tatsumi H, Costa M, Shimerlik M, North R A. Potassium conductance increased by Noradrenaline, opioids, somatostatin, and G-proteins: whole cell recording from Guinea-pig submucous neurons. *Journal of Neuroscience* 1990; 10:1675-1682.

Tibirica E, Feldman J, Mermet C, Monasseiers L, Gonon F and Bousquet P. Selectivity of Rilmenidene for the nucleus reticularis, a ventrolateral medullary structure containing imidazoline-preferring receptors. *European Journal of Pharmacology* 1991; 209: 312.

Tierney G, Carmody J, Jamieson D. Stress analgesia: The opioide analgesia of long swims suppresses the non-opiod analgesia induced by short swims in mice MICE. *Pain* 1991; 46(1)89-95.

Timmermans PBMWM, Schoop AMC, Kwa HY, Van Zwieten PA. Characterization of alpha- 2 adrenoceptors participating in the central hypotensive and sedative effects of clonidine using yohimbine, rauwolscine and corynantine. *European Journal of Pharmacology* 1981; 70:7-15.

Tobin JR, Martin LD, Breslow MJ, Traystmans RJ. Selective anesthetic inhibition of brain nitric oxide synthase. *Anesthesiology* 1994; 81:1264-69.

Toon S, Hopkins KJ, Aaron L. Rate and extent of absorption of clonidine from transdermal therapeutic system. *Ther Pharmacol* 1989; 1:17-21.

Tseng LF & Xu JY, Pieper GM. Increase of nitric oxide production by L-arginine potentiates i.c.v. administered beta-endorphin-induced antinociception in the mouse. *European Journal of Pharmacology* 1992; 212:301-303

Tyce GM & Yaksh TL. Monoamino release from cat spinal cord by somatic stimuli: an intrinsic modulatory system. *J Physiol (London)* 1981; 314:513-529.

Van Zwieten P A, Thoolen MJMC, Jonkman FAM, Willfert B, Jong A, Timmermans PBMWM. Central and peripheral effect of S 334 (N-dicyclopropylamino -2-oxazoline) in animals models. *Arch Int Pharmacodyn ther* 1986; 279:130.

Vander Wende C, Margolin S. *Fed Proc* 1956;15:494.

Vanhoutte PM. Endothelial adrenoceptors. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2001; 38(5) 796-806

Vasko MR, Pang IH, Voght M. Involvement of 5 – Hydroxytryptamine – containing neurons in antinociception produced by injection of morphine into nucleus Raphe magnus or onto spinal cord. *Brain Research* 1984; 433:306-348.

Verbeuren TJ, Koenig-Berard E, Jordaens FH, Van Hoydonck AE, Verrelot J, Zonnekeyn LL, Herman AG. Interaction of rilmenidine and clonidine with pre-and post-junctional alpha adrenoceptors in rat and rabbit blood vessels and rat kidneys. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1989; 300:114-39

Vocci RFI, Petty SK, Dewey WL. Antinociceptive action of the butyryl derivatives of cyclic guanosine 3'-5' monophosphate. *Pharmacology Experimental Therapeutics* 1978; 207:892-8

Vulliemoz Y, Shen H, Virag L. Alpha-2 adrenoceptor agonists decreased cyclic guanosine 3'5' – monophosphate in the mouse brain. *Anesthesiology* 1996; 85 (3):544-50.

Vulliemoz Y, Whittington RA, Virag L. The nitric oxide-cGMP system of the locus coeruleus and the hypnotic action of alpha-2 adrenergic agonists. *Brain Res* 1999; 849:169-74

Weerasuriya K, Shaw E, Turner P. Preliminary clinical pharmacological studies of S3341, a new hypotensive agent and comparison with clonidine in normal males. *Eur J Clin Pharmacol* 1984; 276:281-6

Westlund K N, Bowker R M, Tiegler MG, Coulter J D. Noradrenergic projections to the spinal cord of the rat. *Brain Research* 1983; 263:15-31.

Whittle BA. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. *Br J Pharmacol* 1964; 22:246-253.

Wolf CJ & Thompson SWN. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D aspartic acid receptor activation: implications for post-injury pain hypersensitivity states. *Pain* 1991; 44:293-299.

Xu ZBS, Li P, Tong C, Figueiroa J, Tobin JR, Eisenach JC. Location and characteristics of nitric oxide synthase in sheep spinal cord and its interaction with alpha-2 adrenergic and cholinergic antinociception. *Anesthesiology* 1996; 890-9

Xu Z, Tong C, Pan HL, Cerda SE, Eisenach JC. Intravenous morphine increases release of nitric oxide from spinal cord by an alpha-adrenergic and cholinergic mechanism. *J Neurophysiol* 1997; 78 (04): 2072-8.

Xu Z, Chen SR, Eisenach C, et al. Role of spinal muscarinic and nicotinic receptors in clonidine-induced nitric oxide release in a rat model of neuropathic pain. *Brain Res* 2000; 861:390-8

Yaksh TL & Tyce GM. Microinjection of morphine into the periaqueductal gray evokes the release of serotonin from spinal cord. *Brain Research* 1979; 171:176-181

Yaksh TL & Wilson PR. Spinal serotonin terminal system mediates antinociception. *J Pharmacol Exp Ther* 1979; 208:446-452

Yaksh TL & Reddy SV. Studies in the primate on the analgesic effects associated with intrathecal actions of opiates, alpha-adrenergic agonists and baclofen. *Anesthesiology* 1981; 54:451-467

Yamamoto T, Shimoyama N. Role of nitric oxide in the development of thermal hyperesthesia induced by sciatic nerve constriction injury in the rat. *Anesthesiology* 1995; 82: 266-73.

Zebrowska-Lupina I, Przegalinski E, Sloniec M, Kleinrok Z. Clonidine –induced locomotor hyperactivity in rats. The role of central postsynaptic alpha-adrenoceptors. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1977; 297(3):227-31.