

Efeito analgésico de antagonistas do receptor da histamina H₂ em modelo de dor provocada por formalina em ratos*

Analgesic effect of histamine H₂ receptor antagonists in formalin-induced pain model in rats

Fernanda Deutsch¹, Hazem Adel Ashmawi², Cláudia Carneiro de Araújo Palmeira³, Irimar de Paula Posso⁴

* Recebido do LIM-08, Laboratório Anestesiologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP). São Paulo, SP.

RESUMO

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: Antagonistas de receptor de histamina apresentam efeitos sobre a dor. Antagonistas de receptor H₁ apresentam efeito analgésico local, o papel de antagonistas de receptor H₂ sobre a dor no sistema nervoso periférico ainda não está claro. Esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes antagonistas H₂ sobre a dor induzida pela administração de formalina na pata de ratos.

MÉTODO: Foram estudados ratos machos divididos em grupos que receberam formalina na pata e diferentes antagonistas de receptor H₂ - ranitidina, cimetidina e loxotidina, injetados na pata em diferentes concentrações (0,05 µmol, 0,25 µmol ou 1 µmol). Foi avaliado o número de elevações da pata pelo período de 45 minutos.

RESULTADOS: A loxotidina inibiu o número de elevações da pata nas duas fases do teste a partir das três

concentrações utilizadas, a ranitidina diminuiu o número de elevações da pata a partir da concentração de 0,25 µmol na fase II, a cimetidina não inibiu esse comportamento doloroso.

CONCLUSÃO: De acordo com os resultados deste estudo, alguns antagonistas do receptor H₂ apresentaram efeito analgésico local fármaco específico e não classe farmacológica específica.

Descritores: Cimetidina, Dor, Formalina, Loxotidina, Ranitidina, Ratos.

SUMMARY

BACKGROUND AND OBJECTIVES: Histamine receptor antagonists affect pain perception. H₁ receptor antagonists present local analgesic effect, but the role of H₂ receptor antagonists on pain in the peripheral nervous system is not clear yet. This study aimed at evaluating the effects of different H₂ receptor antagonists on pain induced by formalin paw injection in rats.

METHOD: Male rats were studied and divided into groups that received formalin and different H₂ receptor antagonists - ranitidine, cimetidine and loxotidine, injected in the paw at different concentrations (0.05 mol, 0.25 mol or 1 mol). The number of flinches was evaluated during 45 minutes.

RESULTS: Loxotidine inhibited the number of flinches in both phases of the test with the three different concentrations. Ranitidine decreased the number of flinches in phase II as from 0.25 mol. Cimetidine did not affect pain behavior.

CONCLUSION: According to the results of this study, some H₂ receptor antagonists presented local analgesic effects, which seem to be drug-related and not pharmacological class-specific.

Keywords: Cimetidine, Formalin, Loxotidine, Pain, Ranitidine, Rats.

1. Médica Colaboradora da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP). São Paulo, SP, Brasil.

2. Professor Colaborador da Disciplina de Anestesiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP); Médico da Equipe de Controle de Dor da Divisão de Anestesia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. São Paulo, SP, Brasil.

3. Médica Anestesiologista do Hospital Pérola Byington, Centro de Referência da Saúde da Mulher. São Paulo, SP, Brasil.

4. Professor Associado do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; Responsável pela Equipe de Controle de Dor da Divisão de Anestesia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP). São Paulo, SP, Brasil.

Endereço para correspondência:

Dr. Hazem Adel Ashmawi

LIM-08 Anestesiologia Experimental da FMUSP

Av. Dr. Arnaldo, 455, 2º andar

01246-000, São Paulo, SP, Brasil

Fone: 11-3061-7293

Email: hazem@hcnnet.usp.br

INTRODUÇÃO

A histamina, presente na maior parte das células, é um mediador de dor conhecido desde o início do século passado. Essa substância ativa nociceptores polimodais e produz dor quando injetada na pele em seres humanos. Na lesão tecidual, a histamina é liberada e ocorrem dor, vasodilatação e edema locais¹. A ação da histamina é mediada por pelo menos quatro receptores farmacologicamente distintos acoplados à proteína G. O receptor H₁ é expresso no cérebro, células endoteliais e células da musculatura lisa. Suas principais ações são a contração da musculatura lisa e aumento da permeabilidade vascular². O receptor H₂ apresenta importante papel na modulação da secreção gástrica ácida e antagonistas de receptor H₂ são amplamente utilizados no tratamento de úlceras gastrintestinais³. Os receptores H₃ estão localizados nas terminações nervosas e corpos celulares de neurônios histaminérgicos presentes no núcleo tuberomamilar no hipotálamo⁴. O receptor H₄ age inibindo a condutância ao Ca²⁺, diminuindo a despolarização neuronal e liberação de histamina. O receptor H₄ apresenta grande similaridade ao receptor H₃, mas é expresso em células da linhagem hematopoiética, em particular eosinófilos, mastócitos e basófilos⁵. Seu papel biológico é pouco conhecido, sendo postulado papel na inflamação, visto que o receptor H₄ está limitado às células hematopoiéticas⁶.

A histamina age de maneira diferente no sistema nervoso central e periférico. No sistema nervoso central (SNC), a histamina apresenta ações tanto pró-nociceptivas quanto antinociceptivas. A histamina aumenta o limiar para dor^{7,8}. O receptor H₂ parece estar envolvido na antinocicepção⁹, enquanto o receptor H₁ está relacionado à ação pró-nociceptiva^{8,10}. Antagonistas de receptor H₁ apresentam ação supraespinhal, localizada no núcleo dorsal da rafe ou ao redor da substância cinzenta periaquedutal¹¹ e atuam em receptores pré-sinápticos⁸. Antagonistas do receptor H₂ como a famotidina e lupitidina apresentaram ações antinociceptivas quando usadas por via sistêmica¹². Apesar de amplamente expresso no SNC, o receptor H₃ não parece estar envolvido na modulação da dor¹³. A histamina presente na periferia está envolvida na estimulação de fibras nociceptivas e seus antagonistas apresentam efeito antinociceptivo, cujo estudo tem sido negligenciado. A pirilamina e a cimetidina, antagonistas de receptor H₁, apresentaram efeito analgésico após a injeção de formalina na pata de rato^{14,15}. Estudo anterior demonstrou efeito analgésico periférico para diferentes antagonistas de receptor H₁, com prováveis efeitos anti-

-inflamatórios e anestésico local¹⁶. Os efeitos analgésicos periféricos de antagonistas de receptor H₂ não foram, até o momento, pesquisados com mais profundidade.

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito analgésico de três antagonistas do receptor H₂, ranitidina, loxotidina e cimetidina, injetados na pata, sobre o número de elevações da pata induzido por formalina em pata de ratos.

MÉTODO

Após aprovação pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (processo 938/01) e realizados de acordo com as diretrizes para investigação de dor experimental em animais acordados da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP)¹⁷.

Foram utilizados 50 animais, ratos machos de linhagem Wistar, pesando entre 280 e 350 g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram divididos em grupos de cinco animais: controle (50 µL de formalina a 1% injetados na região dorsal da pata posterior direita), para cada fármaco foram utilizadas três doses diferentes, sempre administradas juntamente com formalina a 1%, em volume final de 50 µL na pata do animal. As doses utilizadas foram: 0,05 µmol (ran-0,05, lox-0,05, cim-0,05), 0,25 µmol (ran-0,25, lox-0,25, cim-0,25) e 1 µmol (ran-1, lox-1, cim-1).

O cloridrato de ranitidina foi obtido de GlaxoSmithKline do Brasil, São Paulo, SP, Brasil, o cloridrato de loxotidina, doado por Solvay Pharmaceuticals, São Paulo, SP, Brasil e cloridrato de cimetidina obtido de Teuto Brasileiro, Anápolis, GO, Brasil.

Os animais tiveram acesso livre a água e alimento e estavam submetidos a ciclo claro/escuro de 12 horas cada. Todos os experimentos foram realizados entre 9 e 15 horas. A dor foi induzida pela injeção de formalina a 1% (50 µL) na região dorsal da pata posterior direita do animal. Antes da injeção, o animal era colocado em câmara de observação de vidro transparente para aclimação ao ambiente durante 20 minutos. O rato era, então, removido para a administração do fármaco e devolvido à câmara de observação. Espelhos eram colocados atrás da câmara para facilitar as observações das elevações da pata quando o animal estava com a pata fora do campo visual do observador. O rato era observado logo após a administração da formalina pelo período de 45 minutos. O número de elevações da pata era quantificado a cada cinco minutos. Considerou-se como comportamento de elevação da pata todo movimento não associado à loco-

moção, variando desde elevação discreta ou contração da musculatura da coxa do animal até movimento mais vigoroso da pata. As elevações eram de fácil observação e quantificação^{14,15,18-20}.

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se Análise de Variância (ANOVA) comparando-se os números de elevações da pata dos grupos experimentais com o grupo controle. As comparações foram realizadas nas duas fases do teste. Quando houve diferença significativa, aplicou-se procedimento de comparações múltiplas de Bonferroni. As comparações foram realizadas entre os grupos de mesmas doses utilizadas. A significância utilizada foi de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

A evolução do número de elevações da pata após a administração de formalina nos diferentes grupos está indicada nos gráficos 1, 2 e 3. A formalina produziu resposta bifásica, na fase I (primeiros 10 minutos), na fase intermediária e na fase II (a partir dos 15-20 minutos até o final do teste).

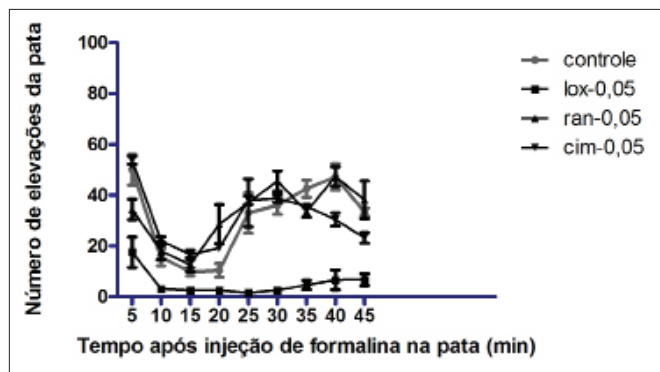


Gráfico 1 – Efeitos dos antagonistas de receptor H₂ sobre o número de elevações da pata na dose de 0,05 µmol. Dados apresentados na forma de média ± erro padrão.

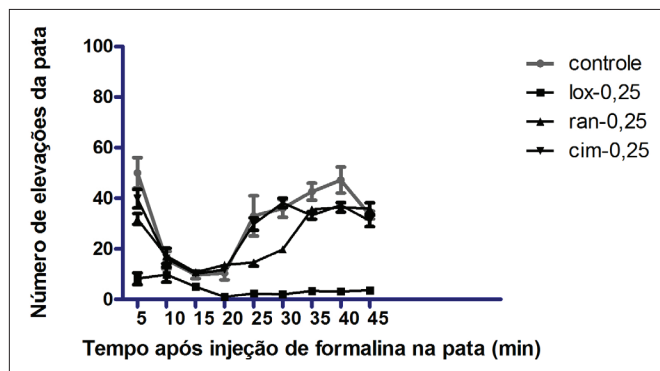


Gráfico 2 - Efeitos dos antagonistas de receptor H₂ sobre o número de elevações da pata na dose de 0,25 µmol. Dados apresentados na forma de média ± erro padrão.

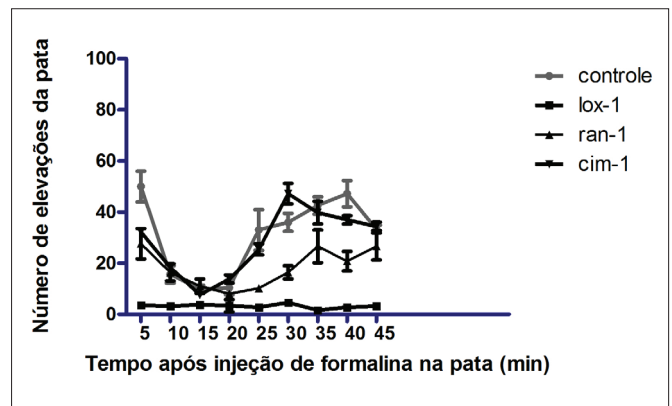


Gráfico 3 - Efeitos dos antagonistas de receptor H₂ sobre o número de elevações da pata na dose de 1 µmol. Dados apresentados na forma de média ± erro padrão.

Na fase I, a loxetidina inibiu o comportamento de elevação da pata nas três doses utilizadas, a ranitidina e cimetidina não modificaram o teste nas doses utilizadas. (Gráfico 4). Na fase II, a loxetidina apresentou o mesmo padrão de inibição, diminuindo o número de elevações da pata nas três doses (0,05 µmol, 0,25 µmol e 1 µmol), a ranitidina diminuiu o número de elevações da pata na maior dose (1 µmol) e a cimetidina não alterou o comportamento doloroso na fase II (Gráfico 5).

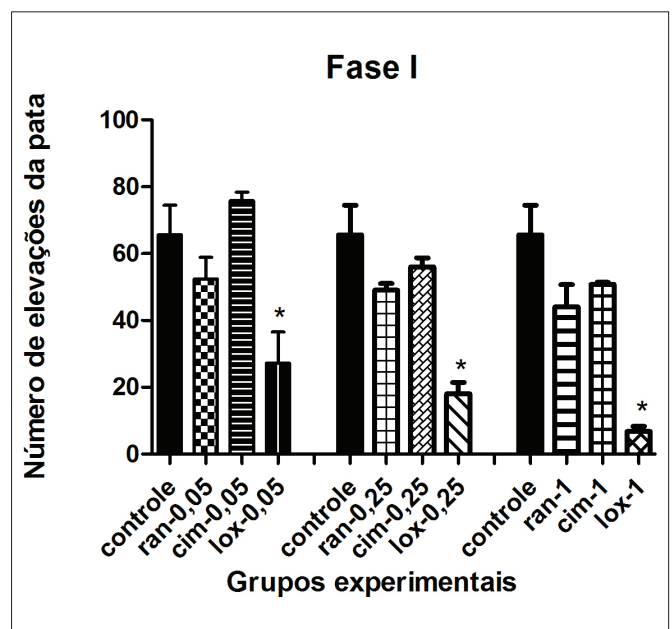


Gráfico 4 – Efeitos dos antagonistas de receptor H₂ sobre o número de elevações da pata na fase I. A loxetidina inibiu o comportamento de elevação da pata nas três doses utilizadas, ranitidina e cimetidina não modificaram o teste na fase I. Os dados estão apresentados na forma de média ± erro padrão, * $p < 0,05$.

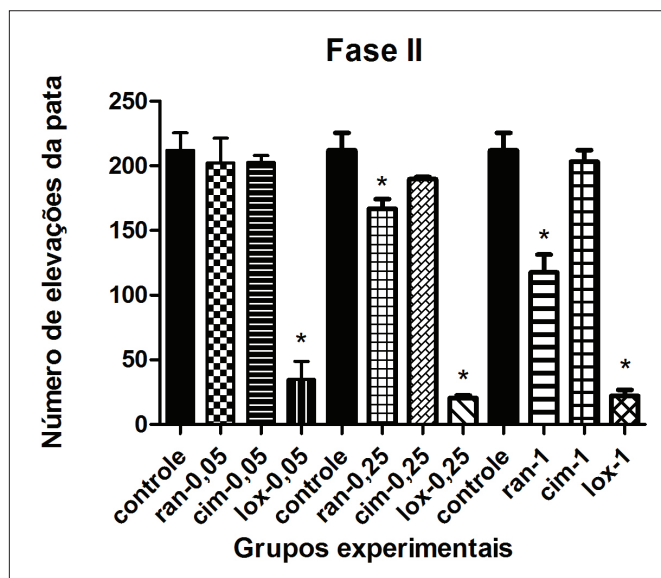


Gráfico 5 – Efeitos dos antagonistas de receptor H₂ sobre o número de elevações da pata na fase II. A loxtidina diminuiu o número de elevações na pata fase II nas três doses, a ranitidina diminuiu o número de elevações da pata na dose de 1 μmol, a cimetidina não alterou o comportamento doloroso na fase II. Os dados estão apresentados na forma de média ± erro padrão, * p < 0,05.

DISCUSSÃO

Na presente investigação foram avaliados os efeitos analgésicos de três antagonistas do receptor H₂ no modelo de dor provocada por formalina em ratos. A formalina induz comportamento doloroso bifásico, a fase I, fásica e rápida, ocorre estimulação direta dos nociceptores e a fase II, fase tônica e prolongada, em que o estímulo doloroso é inflamatório^{14,22}. Foi utilizada uma variante do teste da formalina, o número de elevações da pata. O número de elevações da pata foi utilizado para a quantificação do comportamento doloroso induzido pela formalina por apresentar correlação importante com o teste da formalina clássico e com as alterações cardiovasculares em resposta à dor causada pela formalina na pata. Esse tipo de investigação traz correlação confiável sobre o comportamento doloroso em animais conscientes e não submetidos à restrição física. Entre os vários comportamentos estereotipados provocados pela formalina, a frequência de elevação da pata tem sido amplamente utilizada^{14,15,18-20,23-25}.

A maior parte dos estudos sobre os efeitos analgésicos de antagonistas de receptores da histamina tem focalizado os efeitos centrais produzidos^{8,12,26-28}. Estudando o efeito sistêmico de diferentes antagonistas de receptor H₂, a lupitidina e famotidina apresentaram efeito analgésico, enquanto que a ranitidina não apresentou efeito

analgésico em modelo de dor somática ou visceral¹². Os dados mostraram que, após administração local, a loxtidina teve importante efeito analgésico, enquanto que a ranitidina promoveu analgesia apenas em doses maiores. Estudos mais focalizados em efeitos analgésicos periféricos dos anti-histamínicos foram realizados e encontraram ação analgésica local importante dos antagonistas de receptor H₁ e menos importantes para H₂¹⁴⁻¹⁶. Loxtidina e, em menor grau, a ranitidina, apresentaram efeito antinociceptivo. O efeito observado na segunda fase do teste era esperado, visto o mecanismo gerador de dor ocorrer pela ação inflamatória local da formalina^{18,22,29}. A histamina é um dos mediadores liberados no local durante a inflamação, apresentando ação pró-nociceptiva. A ação anti-inflamatória de substâncias anti-histamínicas é, portanto, esperada nessa fase. Já o bloqueio da fase I observado após a administração de loxtidina, e, em doses maiores, para a ranitidina, não seriam esperados, por ação direta do receptor H₂, visto que se acredita que a fase I seja resultado de ativação direta dos nociceptores pela formalina^{30,31}. Entretanto, alguns autores acreditam que essa fase também seja inflamatória, da mesma maneira que a fase II, o que poderia dar respaldo à ação direta no receptor H₂¹⁴. Todavia, não se acredita que a fase I seja inflamatória, o bloqueio proporcionado pela loxtidina foi bastante precoce, e decorrente de outro mecanismo. Alguns antagonistas de receptor H₁ apresentam efeito anestésico local^{16,32}, não sendo, entretanto, efeito classe específico, mas fármaco específico¹⁶.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo permitiram evidenciar os efeitos analgésicos locais para a loxtidina, e em menor grau para a ranitidina, sendo fármaco específico e não classe específica.

REFERÊNCIAS

1. Raffa RB. Antihistamines as analgesics. *J Clin Pharm Ther* 2001;26(1):81-5.
2. Ash AS, Schild HO. Receptors mediating some actions of histamine. *Br J Pharmacol Chemother* 1966;27(2):427-39.
3. Soll AH, Walsh JH. Regulation of gastric acid secretion. *Annu Rev Physiol* 1979;41(1):35-53.
4. Schwartz JC, Arrang JM, Garbarg M, et al. Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol Rev* 1991;71(1)1-51.
5. Oda T, Morikawa N, Saito Y, et al. Molecular cloning

- and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J Biol Chem* 2000;275(47):36781-6.
6. Hofstra CL, Desai PJ, Thurmond RL, et al. Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;305(3):1212-21.
 7. Chung YH, Miyake H, Kamei C, et al. Analgesic effect of histamine induced by intracerebral injection into mice. *Agents Actions* 1984;15(3-4):137-42.
 8. Malmberg-Aiello P, Lamberti C, Ghelardini C, et al. Role of histamine in rodent antinociception. *Br J Pharmacol* 1994;111(4):1269-79.
 9. Brown RE, Stevens DR, Haas HL. The physiology of brain histamine. *Progr Neurobiol* 2001;63(6):637-72.
 10. Galeotti N, Malmberg-Aiello P, Bartolini A, et al. H1-receptor stimulation induces hyperalgesia through activation of the phospholipase C-PKC pathway. *Neuropharmacology* 2004;47(2):295-303.
 11. Thoburn KK, Hough LB, Nalwalk JW, et al. Histamine-induced modulation of nociceptive responses. *Pain* 1994;58(1):29-37.
 12. Abacioglu N, Bediz A, Çakici I, et al. Antinociceptive effects of H1- and H2- antihistaminics in mice. *Gen Pharmacol* 1993;24(5):1173-6.
 13. Passani MB, Lin JS, Hancock A, et al. The histamine H3 receptor as a novel therapeutic target for cognitive and sleep disorders. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25(12):618-25.
 14. Parada CA, Tambeli CH, Cunha FQ, et al. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience* 2001;102(4):937-44.
 15. Ashmawi HA, Chambergo FS, Araújo Palmeira CC, et al. Effects of pyrilamine and cimetidine on mRNA c-fos expression and nociceptive flinching behavior in rats. *Anesth Analg* 2003;97(2):541-6.
 16. Ashmawi HA, Braun LM, Sousa AM, et al. Analgesic effects of H1 receptor antagonists in the rat model of formalin-induced pain. *Rev Bras Anesthesiol* 2009;59(4):461-70.
 17. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16(2):109-10.
 18. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, et al. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989;38(3):347-52.
 19. Wheeler-Aceto H, Cowan A. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology* 1991;104(1):35-44.
 20. Doak GJ, Sawynok J. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. *Neuroscience* 1997;80(3):939-49.
 21. Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977;4(2):161-74.
 22. Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, et al. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992;51(1):5-17.
 23. Sousa AM, Franco PA, Ashmawi HA, et al. Local effect of tramadol on formalin evoked flinching behavior in rats. *Rev Bras Anesthesiol* 2008;58(4):371-9.
 24. Taylor BK, Peterson MA, Basbaum AI. Persistent cardiovascular and behavioral nociceptive responses to subcutaneous formalin require peripheral nerve input. *J Neurosci* 1995;15(11):7575-84.
 25. Teng CJ, Abbott FV. The formalin test: a dose-response analysis at three developmental stages. *Pain* 1998;76(3):337-47.
 26. Malmberg-Aiello P, Lamberti C, Ipponi A, et al. Evidence of hypernociception induction following histamine H1 receptor activation in rodents. *Life Sci* 1998;63(6):463-76.
 27. Thurmond RL, Desai PJ, Dunford PJ, et al. A potent and selective histamine H4 receptor antagonists with anti-inflammatory properties. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;309(1):404-13.
 28. Sakurada S, Watanabe H, Mizoguchi H, et al. Involvement of the histaminergic system in the nociceptin-induced pain-related behaviors in the mouse spinal cord. *Pain* 2004;112(1-2):171-82.
 - 29.Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain Res* 1990;535(1):155-8.
 30. Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 1987;30(1):103-14.
 31. Puig S, Sorkin LS. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain* 1996;64(2):345-55.
 32. Rumore MM, Schlichting DA. Analgesic effects of antihistaminics. *Life Sci* 1985;36(5):403-16.
- Apresentado em 17 de junho de 2011.
Aceito para publicação em 15 de agosto de 2011.