

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

RAFAELA FIGUEIREDO RODRIGUES

**INFLUÊNCIA DA DULOXETINA E AMITRIPTILINA NA FARMACOCINÉTICA
E EFEITO BIOLÓGICO DA PREGABALINA PARA TRATAMENTO DA DOR
CRÔNICA EM ANIMAIS**

Alfenas/MG

2016

RAFAELA FIGUEIREDO RODRIGUES

**INFLUÊNCIA DA DULOXETINA E AMITRIPTILINA NA FARMACOCINÉTICA
E EFEITO BIOLÓGICO DA PREGABALINA PARA TRATAMENTO DA DOR
CRÔNICA EM ANIMAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Bergamin Boralli Marques
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Helena Miranda Cardoso Podestá

Alfenas/MG
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Rodrigues, Rafaela Figueiredo.

Influência da duloxetina e amitriptilina na farmacocinética e efeito biológico da pregabalina para tratamento da dor crônica em animais / Rafaela Figueiredo Rodrigues. – Alfenas - MG, 2016.
120 f.

Orientadora: Vanessa Bergamin Boralli Marques.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2016.
Bibliografia.

1. Dor Crônica. 2. Dor Crônica - terapia. 3. Pregabalina.
4. Amitriptilina. 5. Cloridrato de Duloxetina. 6. Ratos Wistar. I. Marques, Vanessa Bergamin Boralli. II. Título.

CDD-615.9

RAFAELA FIGUEIREDO RODRIGUES

“Influência da duloxetine e amitriptilina na farmacocinética e efeito biológico da pregabalina para tratamento da dor crônica em animais”

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 28, 7, 2016

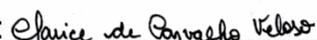
Profa. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

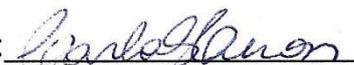
Profa. Dra. Clarice de Carvalho Veloso

Instituição: UFAM

Assinatura: 

Profa. Dra. Carla Speroni Ceron

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais essa oportunidade e por ter guiado meus passos.

Agradeço à minha orientadora Prof^a. Dr^a Vanessa Bergamin Boralli Marques, pelo apoio, dedicação, confiança e conhecimentos transmitidos para a realização deste trabalho.

Agradeço a Prof^a. Dr^a Márcia Helena Miranda Cardoso Podestá pelo apoio e colaboração.

Agradeço ao Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza e à doutoranda Rafaela Silva dos Santos, do Laboratório de Fisioterapia Experimental (LABFEX), pelo apoio, conhecimentos transmitidos e pela convivência agradável.

Agradeço ao Prof. Dr. Geraldo Fernandes pela atenção e disponibilidade de conhecimento.

Agradeço aos meus colegas de trabalho Rodrigo Plácido, Taila Kawano, Lellis Costa e Juliana Simões pelo apoio e pela convivência.

Agradeço às minhas alunas de iniciação científica Karina Treméa e Tainara Vendreschi pelo apoio.

Agradeço à Mayara Reis pelo apoio na parte inicial deste trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos (LATF) por me dar suporte.

Agradeço às Prof^{as}. Dr^{as} Olga Tavano e Hudissara de Almeida Paula por terem gentilmente disponibilizado o espaço do Laboratório de Nutrição Experimental para a execução de parte deste trabalho

Agradeço ao médico colaborador Carlos Marcelo de Barros por compartilhar suas observações clínicas.

Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida.

Agradeço aos meus pais (Mário Cândido Rodrigues Filho e Elisabete Rezende Figueiredo Rodrigues) e ao meu irmão (Fabio Figueiredo Rodrigues) pelo grande incentivo, companheirismo, amor incondicional e compreensão pela minha ausência.

Agradeço ao meu namorado Rafael Geraldo de Lima pelo amor, carinho, compreensão, paciência, apoio nos momentos difíceis e pela companhia tarde da noite nos laboratórios.

Agradeço à CAPES pelo apoio financeiro.

“ Dizem que a vida é para quem sabe viver, mas ninguém nasce pronto. A vida é para quem é corajoso o suficiente para se arriscar e o humilde o bastante para aprender”

Clarice Lispector

“ Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”

Marthin Luther King

RESUMO

Dor é uma experiência sensorial ou emocional desagradável que ocorre em diferentes graus de intensidade, podendo resultar da estimulação do nervo em decorrência de lesão, doença ou distúrbio emocional. A dor pode ser classificada temporalmente como aguda e crônica, que inclui a dor neuropática. A dor neuropática é mais complexa devido principalmente à sua resistência aos analgésicos comuns. Sendo assim, o Ministério da Saúde preconizou o tratamento para este tipo de dor, em humanos, tendo como medicamentos de primeira escolha pregabalina, amitriptilina e duloxetina. O objetivo do presente estudo é analisar a farmacocinética da pregabalina e efeito biológico das monoterapias e suas associações em animais e verificar qual perfil medicamentoso é mais eficaz. A avaliação do efeito biológico foi realizada em seis grupos: animais Wistar (220-250g, n=12 para cada grupo), que utilizaram pregabalina (PREG) (10mg/kg V.O); pregabalina (10mg/kg V.O) + amitriptilina (1 mg/kg V.O) (PREG+AMITRIP); pregabalina (10mg/kg V.O) + duloxetina (30 mg/kg V.O) (PREG+DULOX); amitriptilina (1mg/kg V.O) (AMITRIP); duloxetina (30 mg/kg V.O) (DULOX) e veículo (água ultrapura V.O) (VEH). O modelo para indução de dor neuropática crônica foi a constrição do nervo ciático por ligadura e a avaliação da nocicepção foi feita pelo teste de von Frey de filamentos. A farmacocinética da pregabalina foi avaliada em monoterapia ou associação nas mesmas doses descritas anteriormente (n=6 perfis por tratamento). O sangue foi coletado de 0-24h e o plasma utilizado para análise cromatográfica. Após preparo de amostra, a pregabalina foi analisada por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas. Para detecção e quantificação da pregabalina e do diazepam (padrão interno) foram utilizadas as transições massa/carga 158,00 > 140,80; 158,00 > 123,00; 158,00 > 95,20 e 285,00 > 154,05; 285,00 > 192,90; 285 > 222,10 respectivamente. O método desenvolvido foi validado de acordo com a RDC 27/2012 e se mostrou linear, preciso e exato. Para avaliação dos dados de efeito biológico e disposição cinética foram realizados testes estatísticos específicos. Os resultados mostraram que os grupos operados PREG, PREG+AMITRIP e PREG+DULOX apresentaram

melhor efeito antinociceptivo quando comparados com o grupo VEH. Quando comparada à PREG, apenas o grupo PREG+AMITRIP foi estatisticamente diferente do grupo PREG, apresentando efeito prolongado e mais eficaz. A monoterapia dos adjuvantes, AMITRIP e DULOX não mostrou efeito antinociceptivo ou hipoalgésico. A disposição cinética da PREG foi alterada na associação PREG+AMITRIP, com redução de *clearance* total aparente e consequente aumento de biodisponibilidade, podendo este achado estar associado ao prolongamento do efeito biológico da associação entre PREG+AMITRIP.

Palavras-chave: Dor Neuropática. Tratamento da dor neuropática. Pregabalina. Amitriptilina. Duloxetina. Ratos.

ABSTRACT

Pain is an unpleasant sensory and emotional experience that occurs in different degrees of intensity, which can result in nerve stimulation due to injury, illness or emotional disturbance. The pain can be classified temporally as acute and chronic pain, including neuropathic. Neuropathic pain is more complex due to its resistance to common analgesics. This way, the Ministry of Health advocated for treating this type of pain, in humans, as first choices: pregabalin, duloxetine and amitriptyline. The aim of this study is to analyze the pharmacokinetics of pregabalin and biological effect of monotherapies and their combinations in animals and find what medication profile is more effective. The evaluation of the biologic effect was carried out in six groups: Wistar (220-250g, n = 12 for each group), who used pregabalin (PREG) (10mg/kg P.O); pregabalin (10mg/kg P.O) + amitriptyline (1 mg/kg P.O) (AMITRIP+PREG); pregabalin (10mg/kg P.O) + duloxetine (30 mg/kg P.O) (PREG+DULOX); amitriptyline (1mg/kg P.O) (AMITRIP); duloxetine (30 mg/kg P.O) (DULOX) and vehicle (pure water V.O) (VEH). The model for chronic neuropathic pain was induced by chronic constriction of the sciatic nerve and assessment of nociception was realized by von Frey hair test. Pregabalin pharmacokinetics was evaluated as monotherapy or combination at the same doses described above (n = 6 profiles per treatment). Blood was collected from 0-24h and the plasma used for chromatographic analysis. After sample preparation, pregabalin was analyzed by ultra-efficiency liquid chromatography coupled to mass spectrometry. For detection and quantification of pregabalin and diazepam (internal standard) were used m/z transitions 158.00> 140.80; 158.00> 123.00; 158.00> 95.20 and 285.00> 154.05; 285.00> 192.90; 285> 222.10 respectively. The developed method was validated according to RDC 27/2012 and was linear, precise and accurate. To evaluate biological effect and kinetic disposition specific statistical tests were performed. The results showed that the groups operated PREG, PREG+AMITRIP and PREG+DULOX showed better analgesic effect compared to VEH group. When compared to PREG, only the PREG+AMITRIP group was statistically different from the PREG group, presenting prolonged and more effective results. Monotherapy adjuvants, AMITRIP and DULOX showed no antinociceptive or hypoalgesic effect. The kinetic disposition of PREG was changed in

PREG+AMITRIP association with reduction of apparent total clearance and consequently increase in bioavailability, this finding could be associated with prolongation of the biological effect of the association between PREG + AMITRIP.

Keywords: Neuropathic Pain. Treatment of neuropathic pain. Pregabalin. Amitriptyline. Duloxetine. Rats.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| 5-HT - | serotonina |
| AINE'S - | anti-inflamatórios não esteroidais |
| AMITRIP - | amitriptilina |
| AUC - | área sob a curva |
| CCDV - | canais para cálcio dependentes de voltagem |
| CCI - | lesão por constrição crônica |
| Cl_T/f - | <i>clearance total de formação</i> |
| COX-2 - | ciclo-oxigenase 2 |
| CQA - | controle de qualidade alto |
| CQB - | controle de qualidade baixo |
| CQM - | controle de qualidade médio |
| CV% - | coeficiente de variação em porcentagem |
| CYP - | isoenzimas do citocromo P450 |
| DPR - | desvio padrão relativo |
| DULOX - | duloxetina |
| EPR - | erro padrão relativo |
| GABA - | ácido gama aminobutírico |
| IASP - | associação internacional para estudos da dor |
| IC - | intervalo de confiança |
| K_{ATP} - | canais para potássio sensíveis ao ATP |
| LABFEX - | laboratório de fisioterapia experimental |
| LATF - | laboratório de análise de toxicantes e fármacos |
| LD - | limite de detecção |
| LIQ - | limite inferior de quantificação |
| LSQ - | limite superior de quantificação |
| MB - | medida basal (imediatamente antes da cirurgia ou da administração das substâncias) |
| MS - | espectrometria de massas |
| NA - | noradrenalina |
| NF-κβ - | fator nuclear kappa beta |

| | |
|----------------------------------|---------------------------------------------|
| NMDA - | receptor N-metil D- aspartato |
| OP - | operados |
| P-gP - | glicoproteína-P |
| PI - | padrão interno |
| PREG - | pregabalina |
| PREG+AMITRIP - | pregabalina+amitriptilina |
| PREG+DULOX - | pregabalina+duloxetina |
| PRGC - | peptídeo relacionado ao gene da calcitonina |
| SH - | <i>sham</i> ou falsa operação |
| t_{1/2} - | meia-vida de eliminação |
| TAAE - | transportadores de aminoácidos excitatórios |
| TNF-α - | fator de necrose tumoral alfa |
| UPLC - | cromatografia líquida de ultra eficiência |
| VEH - | veículo |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 1 - Representação esquemática da via ascendente da dor | 24 |
| Figura 2 - Representação esquemática da via descendente inibitória da dor | 26 |
| Figura 3 - Representação esquemática da teoria das comportas | 28 |
| Figura 4 - Estrutura química da pregabalina | 30 |
| Figura 5 - Mecanismo de ação da pregabalina | 32 |
| Figura 6 - Estrutura química da amitriptilina | 34 |
| Figura 7 - Estrutura química da duloxetina | 36 |
| Figura 8 - Diagrama esquemático ilustrando a posição das ligaduras no modelo CCI | 41 |
| Figura 9 - Imagens do procedimento cirúrgico (CCI) | 42 |
| Figura 10 Imagem do aparato de von Frey | 47 |
| - | |
| Figura 11 Imagem dos filamentos de von Frey | 47 |
| - | |
| Figura 12 Diagrama da área plantar da pata utilizada para avaliação mecânica da alodinia | 48 |
| - | |
| Figura 13 Imagem do equipamento Rota-Rod | 50 |
| - | |
| Figura 14 Representação esquemática da cânula | 51 |
| - | |
| Figura 15 Esquema da anatomia vascular do rato | 53 |
| - | |
| Figura 16 Imagens do procedimento cirúrgico (canulação) | 54 |
| - | |
| Figura 17 Análise cromatográfica da pregabalina e do diazepam (padrão interno) | 92 |
| - | |
| Figura 18 Curva analítica da pregabalina em plasma de rato | 94 |
| - | |
| Figura 19 Curvas de concentração plasmática em função do tempo pregabalina (azul), pregabalina + amitriptilina (vermelho), pregabalina + duloxetina (verde) (representadas pela média dos dados obtidos neste grupo) | 101 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | | |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Gráfico 1 - | Avaliação da evolução da nocicepção | 63 |
| Gráfico 2 - | Efeito biológico da pregabalina durante 22 dias | 65 |
| Gráfico 3 - | Efeito biológico da pregabalina até 24 horas após a administração do medicamento no 14º dia após a CCI | 67 |
| Gráfico 4 - | Efeito biológico da amitriptilina durante 22 dias | 69 |
| Gráfico 5 - | Efeito biológico da amitriptilina até 24 horas após a administração do medicamento no 14º dia após a CCI | 70 |
| Gráfico 6 - | Efeito biológico da duloxetina durante 22 dias | 72 |
| Gráfico 7 - | Efeito biológico da duloxetina até 24 horas após a administração do medicamento no 14º dia após a CCI | 73 |
| Gráfico 8 - | Efeito biológico da pregabalina associada à amitriptilina durante 22 dias | 75 |
| Gráfico 9 - | Efeito biológico da pregabalina associada à amitriptilina até 24 horas após a administração do medicamento no 14º dia após a CCI | 76 |
| Gráfico 10 - | Efeito biológico da pregabalina associada à duloxetina durante 22 dias | 78 |
| Gráfico 11 - | Efeito biológico da pregabalina associada à duloxetina até 24 horas após a administração do medicamento no 14º dia após a CCI | 80 |
| Gráfico 12 - | Comparação entre os tratamentos farmacológicos durante 22 dias – Grupos operados | 82 |
| Gráfico 13 - | Comparação entre os tratamentos farmacológicos até 24 horas após a administração dos medicamentos no 14º dia após a CCI – Grupos operados | 83 |
| Gráfico 14 - | Comparação entre os tratamentos farmacológicos durante 22 dias – Grupos <i>sham</i> | 87 |
| Gráfico 15 - | Comparação entre os tratamentos farmacológicos até 24 horas após a administração dos medicamentos no 14º dia após a CCI – Grupos <i>sham</i> | 88 |
| Gráfico 16 - | Avaliação do comportamento motor | 90 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 1 - | Tabela de randomização dos tempos de colheita | 55 |
| Tabela 2 - | Parâmetros relativos à curva analítica do método analítico para quantificação de pregabalina em plasma de rato por UFLC – MS/MS na faixa de concentração de 10 a 6250ng/mL de plasma | 93 |
| Tabela 3 - | Limite inferior de quantificação para pregabalina | 95 |
| Tabela 4 - | Precisão e exatidão intracorridas e intercorridas referente ao método analítico para a quantificação de pregabalina em plasma de rato | 96 |
| Tabela 5 - | Parâmetros farmacocinéticos estimados após administração oral de pregabalina (10mg/kg), pregabalina (10mg/kg)+amitriptilina (1mg/kg), pregabalina (10mg/kg)+duloxetina (30mg/kg) em ratos (n=6). Dados expressos como mediana, IC 95% | 100 |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 18 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 19 |
| 3 | OBJETIVOS | 20 |
| 3.1 | OBJETIVOS GERAIS | 20 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 20 |
| 4 | REVISÃO DA LITERATURA | 21 |
| 4.1 | DOR | 21 |
| 4.2 | MECANISMOS FISIOLÓGICOS DA DOR | 23 |
| 4.2.1 | Via ascendente da dor | 23 |
| 4.2.2 | Via descendente da dor | 24 |
| 4.2.3 | Teoria das comportas | 27 |
| 4.3 | TRATAMENTO DA DOR | 28 |
| 4.3.1 | Pregabalina | 29 |
| 4.3.2 | Amitriptilina | 34 |
| 4.3.3 | Duloxetina | 35 |
| 4.4 | AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA RESPOSTA NOCICEPTIVA | 37 |
| 5 | MATERIAIS E MÉTODOS | 39 |
| 5.1 | MEDICAMENTOS ADMINISTRADOS | 39 |
| 5.2 | AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOLÓGICO | 40 |
| 5.2.1 | Indução de dor neuropática crônica por CCI | 40 |
| 5.2.2 | Animais | 42 |
| 5.2.3 | Avaliação da alodinia mecânica | 45 |
| 5.2.4 | Avaliação do comportamento motor (Rota-Rod) | 49 |
| 5.3 | AVALIAÇÃO FARMACOCINÉTICA | 50 |
| 5.3.1 | Canulação da veia jugular | 51 |
| 5.3.2 | Administração medicamentosa | 54 |
| 5.3.3 | Análise cromatográfica de pregabalina em plasma de ratos | 56 |
| | | |
| 5.3.4 | Validação da metodologia analítica | 56 |

| | | |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.3.4.1 | Linearidade | 57 |
| 5.3.4.2 | Limite inferior de quantificação (LIQ) | 57 |
| 5.3.4.3 | Limite inferior de detecção (LD) | 57 |
| 5.3.4.4 | Efeito residual | 58 |
| 5.3.4.5 | Efeito matriz | 58 |
| 5.3.4.6 | Precisão e exatidão intra e intercorridas | 59 |
| 5.3.4.7 | Estabilidade | 60 |
| 5.3.4.7.1 | <i>Estabilidade de curta duração</i> | 60 |
| 5.3.4.7.2 | <i>Estabilidade pós-processamento</i> | 60 |
| 5.3.5 | Análise farmacocinética | 61 |
| 5.4 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 61 |
| 6 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 62 |
| 6.1 | DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 62 |
| 6.2 | AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOLÓGICO DA PREGABALINA | 64 |
| 6.3 | AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOLÓGICO DA AMITRIPTILINA | 68 |
| 6.4 | AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOLÓGICO DA DULOXETINA | 71 |
| 6.5 | AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOLÓGICO DA PREGABALINA ASSOCIADA À AMITRIPTILINA | 74 |
| 6.6 | AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOLÓGICO DA PREGABALINA ASSOCIADA À DULOXETINA | 77 |
| 6.7 | COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS | 81 |
| 6.8 | AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MOTOR | 89 |
| 6.9 | DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA ANÁLISE DA PREGABALINA | 91 |
| 6.9.1 | Linearidade | 92 |
| 6.9.2 | Limite inferior de quantificação (LIQ) | 94 |
| 6.9.3 | Limite de detecção (LD) | 95 |
| 6.9.4 | Efeito residual | 95 |
| 6.9.5 | Efeito matriz | 95 |

| | | |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.9.6 | Precisão e exatidão intra e intercorridas | 96 |
| 6.9.7 | Estabilidade | 96 |
| 6.9.7.1 | Estabilidade de curta duração | 97 |
| 6.9.7.2 | Estabilidade pós-processamento | 97 |
| 6.9.7.3 | Estabilidade após ciclos de congelamento e estabilidade de longa duração | 98 |
| 6.10 | CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O MÉTODO DESENVOLVIDO | 98 |
| 6.11 | ANÁLISE FARMACOCINÉTICA | 99 |
| 7 | CONCLUSÕES | 103 |
| | REFERÊNCIAS | 105 |
| | ANEXO – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA | 120 |

1 INTRODUÇÃO

Dor é um dos males que mais perturbam e incapacitam os indivíduos. Por isso sempre são realizados estudos para buscar o tratamento mais eficaz para aliviar esse sofrimento, de acordo com Brasil (2001). Além de apresentar impacto socioeconômico (SILVA et al., 2013).

Segundo Nathan (1977), Merskey e Bogduk (1994), a dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, e pode ser classificada temporalmente em aguda e crônica. A dor aguda gera uma rápida sensação desagradável, geralmente estimulando a via nociceptivas, conforme Besson (1999), Gold e Gebhart (2010) e Pimenta et al. (2001). Já a dor crônica refere-se a várias condições clínicas definidas por serem de longa duração, de acordo com Gereau et al. (2014), incluindo a dor neuropática (DAVIS; MOAYEDI, 2013; SMALLWOOD et al., 2013).

A dor neuropática ocorre devido à lesão periférica ou lesão no sistema nervoso central, ocasionando hipersensibilidade à dor (redução do limiar para estimulação de nociceptores periféricos), como observado por Rodríguez et al. (2013); é mais complexa devido à sua gravidade, cronicidade e resistência aos analgésicos comuns, além de interferir no bem-estar dos pacientes, pois gera alterações no sono e no comportamento, transtornos de ansiedade, entre outros, restringindo-os de atividades corriqueiras (DE SANCTIS-BRIGGS et al., 2011).

Para aliviar o sofrimento da dor nociceptiva, são usados anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's) e os opioides. Segundo Okada et al. (2001), para o tratamento da dor neuropática e crônica são usados adjuvantes sozinhos ou em associação, com enfoque à ação da pregabalina, amitriptilina, duloxetina, que é o tratamento farmacológico preconizado, conforme Brasil (2011). A pregabalina tem propriedades anticonvulsivantes, anti-hiperalgésicas e ansiolíticas, com estrutura análoga ao GABA, de acordo com Aydoğan (2014). A amitriptilina e a duloxetina são antidepressivos que atuam inibindo a recaptura de serotonina e noradrenalina no Sistema Nervoso Central (MARTÍNEZ et al., 2009; NASCIMENTO, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

Como a dor é uma das razões mais frequentes que ocasionam incapacidade e sofrimento aos pacientes, de acordo com Brasil (2001), além de causar impacto sobre as características socioeconômicas, conforme Silva et al. (2013), os profissionais sempre se esforçaram para auxiliar os pacientes compreendê-la e controlá-la (PAULO; RAMOS, 2006).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Estudos da Dor (SBED, 2014), a dor neuropática é uma condição que afeta uma proporção significativa (20-30%) da população e é problemática devido à sua gravidade e cronicidade, segundo Kreling, Cruz e Pimenta (2006) além de apresentarem resistência aos analgésicos comuns, conforme Schestatsky (2008). Este tipo de dor está frequentemente associada à perturbações do sono e do comportamento, principalmente ansiedade, que interferem no bem-estar físico e emocional do paciente, como observado por Kreling, Cruz e Pimenta (2006). Além disso, pode afetar o estado psicológico e a função cognitiva dos pacientes, desencadeando uma condição incapacitante e cara para a saúde pública (GEREAU et al., 2014; SILVA et al., 2013).

Brasil (2011) descreve a opção terapêutica preconizada para a dor neuropática incluindo amitriptilina, pregabalina e duloxetina. Porém, conforme Silva et al. (2013) muitas vezes a monoterapia não é eficaz, já que o mercado não dispõe de um fármaco analgésico e/ou anti-inflamatório que não apresente efeitos colaterais, sendo as associações utilizadas de forma rotineira, de acordo com Brasil (2011). Sendo assim, os resultados observados em estudos experimentais poderão contribuir para a mensuração da eficácia das associações medicamentosas, auxiliando também para tratamentos mais vantajosos e eficazes.

3 OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho são:

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho tem como objetivo analisar o efeito da associação dos adjuvantes duloxetina e amitriptilina à pregabalina, avaliando a farmacocinética da pregabalina e a nocicepção.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos são:

- a) Padronizar a metodologia de análise cromatográfica da pregabalina;
- b) Determinar a influência da amitriptilina e da duloxetina sobre a farmacocinética e efeito biológico da pregabalina em animais;
- c) Estabelecer o perfil medicamentoso mais adequado na situação analisada (pregabalina, pregabalina + amitriptilina ou pregabalina + duloxetina).

4 REVISÃO DA LITERATURA

Alguns conceitos são de fundamental importância para o entendimento do presente estudo e estão apresentados nos itens que seguem.

4.1 DOR

Segundo Chakr e Brenol (2011, p.13), a definição de dor mais comumente utilizada é a elaborada pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), na qual relata que “dor é a experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real, potencial, ou descrita nos termos da lesão. A dor é sempre subjetiva”.

A dor é uma das razões mais frequentes que ocasionam incapacidade e sofrimento aos pacientes, de acordo com Brasil (2001), mas não existem muitos dados epidemiológicos sobre a frequência e consequências desta patologia no Brasil, conforme observado por Cortez et al. (2014). A dor crônica afeta cerca de 20 a 30% da população brasileira (SBED, 2014).

Nenhum indivíduo responde da mesma forma à dor, pois existem fatores de ordem individual que interferem nesta resposta, tais como: gênero, idade, raça, etnia, entre outros (GEREAU et al., 2014).

A dor, de um modo geral, gera sintomas como alterações no sono, irritabilidade, apetite e libido, alterações de energia e diminuição na capacidade de concentração, que pode levar a restrições em atividades familiares, profissionais e sociais (KRELING; CRUZ; PIMENTA, 2006).

De acordo com Nathan (1977), Merskey e Bogduk (1994), a dor pode ser classificada temporalmente em aguda e crônica. A dor aguda é uma dor de curta duração e instalação recente, que gera uma rápida sensação desagradável, geralmente estimulando a via nociceptiva, com objetivo de alertar o organismo contra alguma ameaça a sua integridade, como dizem Besson (1999), Gold e Gebhart (2010) e Pimenta et al. (2001). Já a dor crônica, refere-se a várias

condições clínicas definidas por serem de longa duração e por afetarem negativamente a qualidade de vida, conforme Gereau et al. (2014). O Institute of Medicine (2011, p.7-8) relata que “a dor crônica pode ser uma doença por si só. Apresenta uma patologia distinta, provocando alterações em todo o Sistema Nervoso, que muitas vezes pode piorar com o tempo. Pode afetar o estado psicológico e a cognição, podendo constituir uma doença grave”. Há a capacidade de debilitação do indivíduo, pois frequentemente será gerado estresse físico, emocional, econômico e social, comprometendo a sua qualidade de vida, de acordo com Gusman et al. (1997). A dor crônica apresenta diversas condições, incluindo a neuropatia ou dor neuropática (DAVIS; MOAYEDI, 2013; SMALLWOOD et al., 2013).

Rodriguez et al. (2013) dizem que a dor neuropática ocorre devido à lesão periférica ou lesão no sistema nervoso central, ocasionando hipersensibilidade à dor (redução do limiar para estimulação de nociceptores periféricos), é uma patologia grave, geralmente crônica e não costuma responder ao tratamento com analgésicos comuns, gerando vários outros distúrbios e comorbidades que podem afetar as atividades corriqueiras dos pacientes, de acordo com De Sanctis-Briggs et al. (2011). Na maioria dos casos, pacientes que sofrem de dor crônica apresentam quadros de hipersensibilidade, como hiperalgesia (aumento da intensidade dolorosa frente a estímulos nocivos leves) ou alodinia (dor em resposta a estímulos normalmente não dolorosos) (BESSON, 1999; GOLD; GEBHART, 2010).

Segundo Chappman (1985), a percepção da dor é maior quando o indivíduo se encontra em situações de medo, tristeza, isolamento e insônia. Em contrapartida, a dor é menos acentuada e pode até desaparecer quando os sujeitos estão em ambiente agradável, despreocupados, esperançosos e com tempo de sono suficiente.

Apesar da dor apresentar componentes afetivos bastante significativos em humanos, a maioria dos modelos experimentais pré-clínicos de dor considera a intensidade da sensação dolorosa como sendo diretamente proporcional à amplitude da resposta comportamental do animal. Por desconsiderar os aspectos psicológicos e afetivo-emocionais que influenciam a intensidade da dor percebida, em animais, a dor é mais adequadamente definida como nocicepção, que constitui o processo pelo qual um animal responde a estímulos ditos

nociceptivos, que passam pelos processos de transdução, processamento e reconhecimento do sinal (LOESER; TREEDE, 2008).

4.2 MECANISMOS FISIOLÓGICOS DA DOR

Existem várias teorias que são utilizadas para tentar explicar os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da dor neuropática. Os mecanismos mais plausíveis para esta explicação são os descritos a seguir.

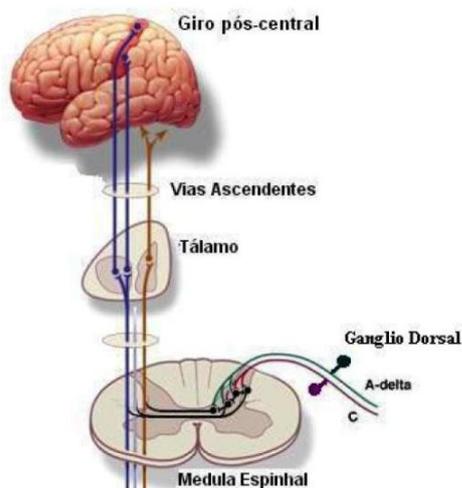
4.2.1 Via ascendente da dor

A propagação da dor é iniciada pela ativação de receptores fisiológicos, chamados de nociceptores, que são terminações nervosas livres, que estão localizados na pele, mucosas, membranas, fâscias profundas, tecido conjuntivo de órgãos viscerais, ligamentos, cápsulas articulares, periósteo, músculos, tendões e vasos arteriais. Esses nociceptores, geralmente, são despolarizados por estímulos químicos, mecânicos ou térmicos (LYNN, 1992; MENSE, 1983).

A informação nociceptiva gerada pela despolarização no nociceptor é conduzida pelas fibras aferentes primárias tipo C não-mielinizadas e por fibras tipo A δ mielinizadas (neurônios de primeira ordem), que chegam na medula em diferentes velocidades, retransmitidas para neurônios de segunda ordem (neurônios de projeção), localizados no corno dorsal da medula espinhal, principalmente pela liberação do neurotransmissor excitatório glutamato. Chegando à medula espinhal, as fibras aferentes são organizadas em vias ascendentes, espinotalâmica lateral (mais lateral – sensibilidade tipo sensorial – via clássica da dor) e espinotalâmica medial (mais central – componentes afetivos – via envolvida na transmissão de estímulos de dor profunda do tipo crônica), que se ascendem até o tálamo, onde fazem sinapses com neurônios aferentes de terceira ordem, chegando respectivamente, no córtex sensorial e

límbico (CASEY, 2000; MERSKEY; BOGDUK, 1994; MILLAN, 1999; WILLIS; WESTLUND, 1997). A representação da via ascendente da dor pode ser observada na Figura 1.

Figura 1- Representação esquemática da via ascendente da dor



Fonte: Vilela (2008).

Legenda: A figura mostra as vias ascendentes da dor passando pelo corno posterior da medula, pelo tálamo e chegando ao córtex para interpretação do estímulo doloroso. A via espinotalâmica lateral (azul) é a via clássica da dor e a via espinotalâmica medial (amarelo) é a via responsável pela transmissão da dor profunda do tipo crônica.

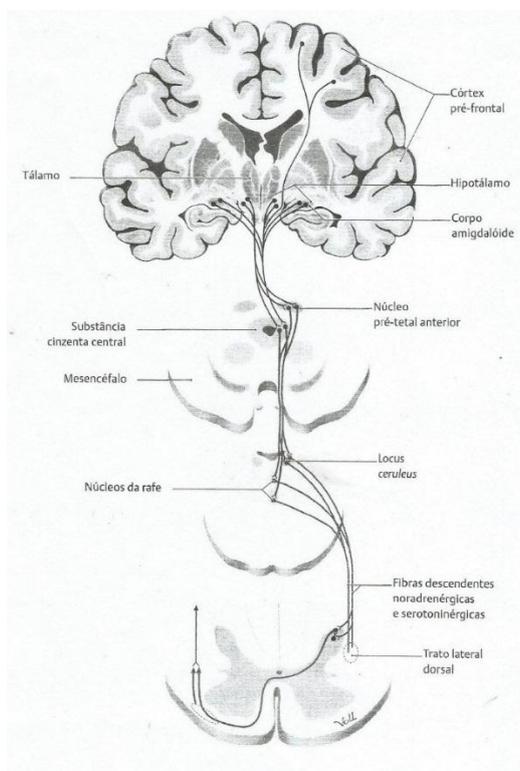
4.2.2 Via descendente da dor

O Sistema Nervoso Central possui circuitos neurais desenvolvidos para modular a transmissão da dor, controlando os disparos neuronais nociceptivos, bloqueando então os componentes afetivos dos impulsos dolorosos. As estruturas centrais envolvidas no controle descendente da transmissão nociceptivas são: os córtex somatossensorial (frontal e límbico), o núcleo paraventricular do hipotálamo, a substância cinzenta periaquedutal do

mesencéfalo e o núcleo magno da rafe (bulbo), que são ativadas por sinais de dor aferentes ascendentes (MILLAN, 2002; SCHÜNKE, 2007).

A substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo é ativada ao receber aferências provenientes da medula espinhal, do hipotálamo, do córtex pré-frontal e dos corpos amigdaloides. Ao ser ativada, estimula seus neurônios que descendem e fazem sinapses excitatórias com neurônios serotoninérgicos do núcleo magno da rafe (no bulbo) e com neurônios noradrenérgico do *locus coeruleus* (localizado na parte distal do tronco encefálico). As fibras descendentes desses neurônios se projetam para o corno dorsal da medula espinhal utilizando como neurotransmissores, respectivamente, serotonina e encefalina e noradrenalina, podendo inibir diretamente os neurônios de projeção nociceptivos ascendentes do corno posterior (esses neurônios de projeção são responsáveis por transmitirem o impulso doloroso para o encéfalo) ou ainda excitar os interneurônios inibitórios do corno posterior da medula, que utilizam como neurotransmissores glicina e GABA. Estes interneurônios podem inibir os neurônios de projeção nociceptivos, através de conexões pré e pós-sinápticas (MILLAN, 2002; SCHÜNKE, 2007). A Figura 2 mostra esquematicamente a via descendente da dor.

Figura 2- Representação esquemática da via descendente da dor



Fonte: Schünke (2007).

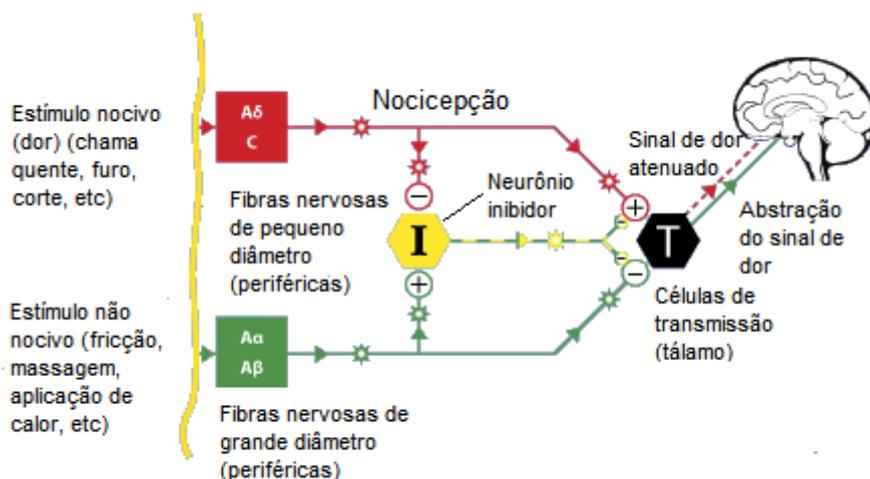
Nota: Os neurônios da substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo tem conexões sinápticas excitatórias com neurônios serotoninérgicos do núcleo magno da rafe, no bulbo, e com neurônios noradrenérgicos provenientes do *locus ceruleus*, no tronco encefálico. Os neurônios serotoninérgicos fazem sinapses inibitórias com os neurônios de projeção ascendente nociceptivos do corno posterior da medula, além de fazerem sinapses excitatórias com os interneurônios que liberam como neurotransmissores GABA e glicina, que por sua vez, fazem sinapses inibidoras com os neurônios de projeção ascendentes nociceptivos. Os neurônios noradrenérgico provenientes do *locus ceruleus*, também fazem sinapses excitatórias com esses interneurônios, que liberam GABA e glicina.

4.2.3 Teoria das comportas

O fenômeno doloroso sofre um mecanismo de modulação na substância gelatinosa da medula espinhal e no tálamo. Alguns mecanismos facilitam e outros inibem a transferência do impulso doloroso. Este fenômeno foi inicialmente explicado pela teoria das comportas proposta por Melzack e Wall (1965) (Figura 3), a qual explica como a dor pode ser modulada pelo equilíbrio entre as fibras C e A δ (nociceptivas), fibras aferentes A α e A β (proprioceptivas e táteis, respectivamente), interneurônios e neurônios de projeção ascendente do corno posterior da medula espinhal.

. No geral, as fibras nociceptivas C e A δ tendem a manter a comporta aberta, potencializando a sensação dolorosa, por inibirem o interneurônio inibitório e excitarem o neurônio de projeção, presente corno posterior da medula espinhal. Por outro lado, as fibras não-nociceptivas A α e A β tendem a manter a comporta fechada, por meio das projeções das vias descendentes, suprimindo a dor, por excitarem o interneurônio inibitório (MARTIN, 1998; NOBAK; STROMINGER; DEMAREST, 1999; SCHÜNKE, 2007).

Figura 3 – Representação esquemática da teoria das comportas



Fonte: Adaptado de Genesis Medical Clinic (2013).

Nota: Os impulsos provenientes das fibras de pequeno diâmetro ($A\delta$ e C), responsáveis pela nocicepção, inibem o interneurônio inibitório, facilitando assim a transmissão da informação nociceptiva, abrindo a comporta. Já os impulsos nervosos provenientes das fibras de grande diâmetro ($A\alpha$ e $A\beta$) estimulam o interneurônio inibitório, fazendo com que a comporta permaneça fechada, inibindo a continuidade da transmissão do impulso nervoso até o encéfalo.

4.3 TRATAMENTO DA DOR

Segundo Gereau et al. (2014), dores de longa duração impactam na qualidade de vida do paciente e podem se tornar incapacitantes, devendo-se fazer o possível para amenizar esta situação.

Gosling (2013) relata a importância do tratamento não farmacológico no tratamento da dor, principalmente fisioterápico, uma vez que existem diversos mecanismos neurofisiológicos propostos para explicar a modulação da dor por meio de abordagens físicas e cognitivas comportamentais.

Okada et al. (2001) descrevem sobre o tratamento farmacológico da dor: os medicamentos mais utilizados para o tratamento da dor aguda por nocicepção

são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE's) e os opioides. Já para o tratamento das dores crônica e neuropática, são recomendados adjuvantes como anticonvulsivantes, antidepressivos, antipsicóticos, anestésicos locais e gerais, ansiolíticos, miorrelaxantes, corticoesteróides, psicoestimulantes, anti-histamínicos e moduladores adrenérgicos.

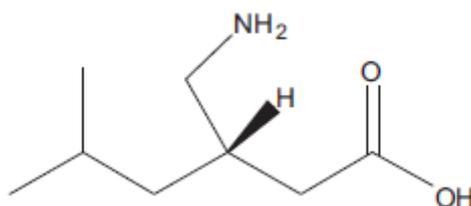
Segundo Schestatsky (2008), a dor neuropática, enfoque deste estudo, costuma responder pouco ao tratamento com analgésicos comuns, sendo que as escolhas no tratamento deste tipo de dor, seja de origem periférica ou central, são os antidepressivos tricíclicos e os anticonvulsivantes.

Sendo assim, de acordo com Brasil (2011) e Kiss (2015), a opção terapêutica preconizada para a dor neuropática são os fármacos pregabalina, amitriptilina e duloxetina. Em geral, quando são associados medicamentos com diferentes mecanismos de ação, a eficácia analgésica é conseguida utilizando doses menores e os efeitos secundários são reduzidos, conforme Hahm et al. (2012). Além disso, há relatos de que a terapia combinada tem maior eficácia na redução da dor do que terapias isoladas e que a primeira escolha para o tratamento da dor neuropática é a pregabalina (OKAZAKI et al., 2013).

4.3.1 Pregabalina

A pregabalina é um composto análogo estrutural do ácido gama-aminobutírico (GABA), sendo um S-enantiômero farmacologicamente ativo do ácido 3-aminometil-5-metilhexanóico (Figura 4), com propriedades anticonvulsivantes, anti-hiperalgésicas e ansiolíticas (AYDOĞAN, 2014).

Figura 4- Estrutura química da pregabalina



Fonte: Dahl, Olsen e Strand (2012).

A pregabalina é rápida e extensivamente absorvida após administração oral, segundo Ben-Menachem (2004), atingindo a concentração plasmática máxima em aproximadamente 1 hora após a administração oral, conforme Bellorio et al. (2014). Kugler et al. (2002) dizem que a biodisponibilidade oral deste fármaco é maior ou igual a 90%, independentemente da dose administrada. A administração de pregabalina com alimentos não tem efeito clinicamente relevante na quantidade de fármaco absorvida (KUGLER et al., 2002).

A pregabalina é um substrato do sistema L-transportador, o qual é responsável pelo transporte de aminoácidos de cadeia longa através do encéfalo e do intestino, podendo afirmar que a pregabalina penetra rapidamente a barreira hematoencefálica, de acordo com Bockbrader et al. (2010). Este fato é de grande importância, pois este fármaco atua no Sistema Nervoso Central, como observado por Field et al. (2006). Bockbrader et al. (2010) afirmam que esse sistema de absorção não é saturável. A pregabalina também é absorvida pela membrana intestinal apical via transportadores de sódio independentes de aminoácidos (PIYAPOLRUNGROJ et al. 2001; SU et al. 2005).

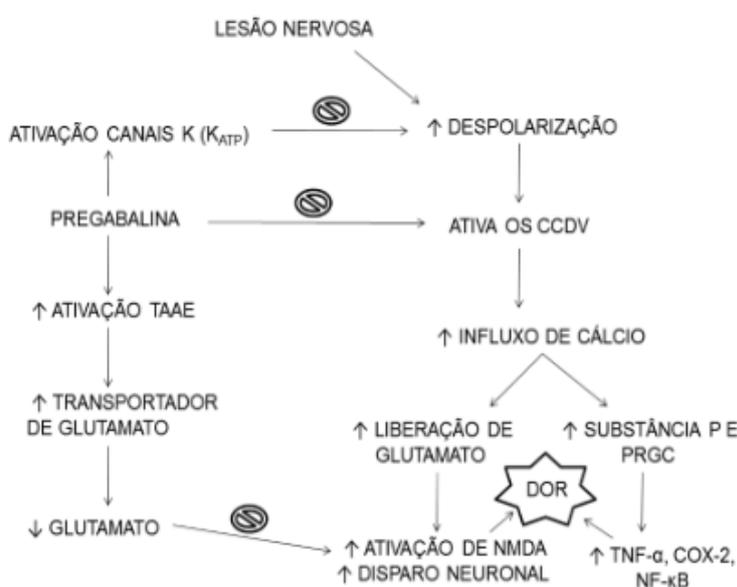
Kugler et al. (2002) e Einarsdottir e Bjornsson (2008) afirmam que este fármaco não se liga às proteínas plasmáticas e não sofre metabolização considerável (<2% de metabolização), uma vez que não sofre metabolização hepática, não induz ou inibe as enzimas do sistema citocromo P450. É excretado praticamente inalterado, principalmente pelos rins, segundo Randinitis et al. (2003). Sua constante de eliminação é de aproximadamente $0,108\text{h}^{-1}$, de acordo com Bellorio et al. (2014). Sua meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$) é de 6,5 horas, independente da dose administrada (BELLORIO et al., 2014).

Em animais, de acordo com Pegg et al. (2012), a pregabalina também não sofre metabolização significativa. Após administração por via oral, atinge sua concentração máxima em aproximadamente 1 hora, como afirmam Akamine et al. (2015). O modelo farmacocinético mais utilizado para avaliar as propriedades da pregabalina em animais é o bicompartimental, apresentando então dois volumes de distribuição: o volume de distribuição 1 (do compartimento central para o periférico) de 0,270L e o volume de distribuição 2 (do compartimento periférico para o central) de 6,75L, segundo Bender et al. (2009). Akamine et al. (2015) dizem que este apresenta *clearance* total aparente de aproximadamente 1,368 L/h/kg e meia-vida de aproximadamente 4,3h (DZYGIEL; FRAIER, 2011).

O fármaco se liga com grande afinidade e especificidade às proteínas alfa-2- delta-1 do canal para cálcio dependente de voltagem no Sistema Nervoso Central, inibindo sua expressão funcional com concomitante inibição do influxo de cálcio, não liberando então neurotransmissores excitatórios como glutamato, substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, noradrenalina, serotonina e dopamina na fenda sináptica, como observado por Davies et al. (2007), Field et al. (2001), Gajraj (2007), Perret e Luo (2009) e Vartanian et al. (2006). Outro mecanismo de ação da pregabalina é que esta aumenta a atividade do transportador da recaptura de glutamato neuronal tipo 3, diminuindo as respostas glutamatérgicas, de acordo com Ryu et al. (2012). Tem sido relatado que, a pregabalina abre os canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}), produzindo efeitos antinociceptivos, pela redução da excitabilidade neuronal, inibindo a liberação de diferentes neurotransmissores, incluindo substância P na medula espinhal, conforme Soares et al. (2000). Segundo Brawek et al. (2009) e Waszkielewicz et al. (2011), embora a pregabalina seja semelhante estruturalmente ao GABA, não foram encontrados relatos da pregabalina ser metabolizada em GABA e também não apresenta afinidade de ligação direta para os receptores GABA, como afirmam Lanneau et al. (2001). No entanto, doses mais elevadas de pregabalina podem aumentar o conteúdo neuronal de GABA, através do aumento da atividade da enzima ácido glutâmico descarboxilase, resultando em diminuição de excitabilidade neuronal, de acordo com Taylor, Angelotti e Fauman (2007) e Waszkielewicz et al. (2011). Além disso, a pregabalina exerce efeitos benéficos sobre o alívio da dor neuropática através da mediação de ações anti-inflamatórias, incluindo a diminuição de

citocinas pró-inflamatórias induzidas pela ativação de fator nuclear kappa beta (NF- κ), segundo Park et al. (2008), neuropeptídeos como substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (PRGC), de acordo com Fehrenbacher, Taylor e Vasko (2003), além de inibir a expressão de ciclo-oxigenase 2 (COX-2), conforme Park et al. (2008). Os mecanismos de ação da pregabalina podem ser observados na Figura 5.

Figura 5 – Mecanismo de ação da pregabalina



Fonte: adaptado de Verma, Singh e Jaggi (2014)

Nota: Quando ocorre a lesão nervosa, aumenta a despolarização do neurônio, ativa os canais para cálcio dependentes de voltagem (CCDV), fazendo com que o influxo de cálcio aumente, desencadeando a liberação de glutamato, substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (PRGC), aumentando então o disparo neuronal e a liberação de fatores inflamatórios, que darão origem à dor. Quando a pregabalina é administrada, os CCDV são bloqueados, inibindo o influxo de cálcio, inibindo então a continuidade do impulso doloroso. A pregabalina pode ainda ativar os canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}), impedindo então a despolarização neuronal e consequentemente a continuidade do impulso doloroso. Ou ainda, este medicamento pode atuar aumentando a ativação de transportadores de aminoácidos excitatórios (TAAE), diminuindo a quantidade de glutamato disponível, reduzindo então o disparo neuronal e consequentemente a dor.

A ação da pregabalina sobre a inibição dos canais para cálcio dependentes de voltagem e sobre a redução da liberação de glutamato (bloqueia a substância P e a proteína-quinase C e ao bloquear esta última, impede que os níveis aumentem e desencadeiem a liberação de glutamato) também pode ser observada em animais com dor neuropática induzida, como mostram Kumar et al. (2010).

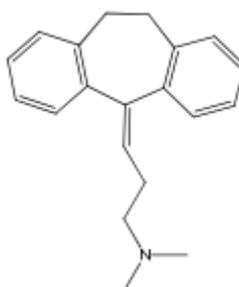
Hindmarch et al. (2005) dizem que a pregabalina apresenta alguns efeitos adversos, que são transitórios e dose-dependente, tais como tontura, sonolência (mais comuns), geralmente no início do tratamento, de acordo com Pfizer (2005). Pode apresentar também euforia, nervosismo, pensamento anormal, despersonalização e amnésia (incomuns), como relatam Schwan et al. (2010). Além disso, pode ocorrer visão turva, astenia, desequilíbrio da marcha, dificuldades cognitivas (concentração ou atenção) (LEE, 2012).

Vários métodos foram publicados sobre a análise da pregabalina em formas farmacêuticas ou matrizes biológicas, tais como: métodos fotométricos, propostos por Gujral, Haque e Shanker (2009), Önal e Sagirli (2009), métodos fluorimétricos, propostos por Önal e Sagirli (2009), Vovk, Martinc e Grabnar (2010) e Walsh et al. (2011) e métodos cromatográficos, propostos por Akamine et al. (2015), Vaidya (2007) e Vermeij e Edelbroek (2004). Os métodos fotométricos podem apresentar como desvantagem pouca sensibilidade, além de ser recomendado a mensuração da absorvância na região do UV-Vis, podendo causar interferências ou ainda baixa linearidade ao utilizar reagentes não específicos como iodeto de potássio/ iodato de potássio, de acordo com Gujral, Haque e Shanker (2009) e Önal e Sagirli (2009). A grande desvantagem dos métodos fluorimétricos é a não disponibilidade em vários laboratórios, como observado por Önal e Sagirli (2009), Vovk, Martinc e Grabnar (2010) e Walsh et al. (2011). Já os métodos cromatográficos acoplados a diferentes detectores, como espectrômetro de massas, conseguem uma melhor detectabilidade que os supracitados. Além disso, métodos cromatográficos de ultra eficiência demonstraram baixo consumo de solventes, além de serem rápidos, simples e seletivos (DAHL; OLSEN; STRAND, 2012; CHAHBOUNI, 2013).

4.3.2 Amitriptilina

A amitriptilina é um antidepressivo tricíclico, cuja estrutura apresenta três anéis interligados e, no anel central, liga-se uma cadeia lateral de três átomos de carbono com um grupo amina terminal (Figura 6) (NASCIMENTO, 2011).

Figura 6- Estrutura química da amitriptilina



Fonte: Nascimento (2011).

A amitriptilina, em humanos, é rapidamente absorvida pela via oral e também é rapidamente absorvida pelos tecidos (30 – 60%), como observado por Nascimento (2011), atingindo a concentração plasmática máxima em aproximadamente 3,4 horas após a administração oral, segundo Nam et al. (2015).

De acordo com Nascimento (2011), tanto a amitriptilina quanto a nortriptilina se ligam amplamente às proteínas, principalmente albumina (90-95%), mas distribuem-se largamente pelo organismo, como observado por Hucker (1977). A biodisponibilidade de amitriptilina por via oral varia de 33 a 62% em humanos (ABAUT; CHEVANNE; LE CORRE, 2007).

É extensivamente metabolizada pelo fígado, catalisada principalmente pelas enzimas do citocromo P450, sofrendo principalmente reações de oxidação (CYP2C19 catalisa a N-desmetilação, transformando amitriptilina em nortriptilina, seu principal metabólito ativo; CYP2D6 catalisa a hidroxilação do anel e posteriormente conjugada com ácido glicurônico numa série de compostos mais polares, para sua eliminação. (SHEN et al., 2010)

Segundo Muñoz e Alamo (2009), este fármaco é eliminado pela via renal (35%), pela urina principalmente na forma dos seus metabólitos ativos livres ou na forma conjugada, além de ser pouco excretado pelas fezes (8%). Sua meia-vida de eliminação é de aproximadamente 25 horas (NAM et al., 2015).

A amitriptilina atua inibindo a recaptção de serotonina (maior proporção) e noradrenalina (menor proporção), mas também pode inibir levemente a recaptção de dopamina, levando a um aumento dos níveis destes neurotransmissores nas fendas sinápticas e à estimulação dos sistemas serotoninérgico (5-HT) e noradrenérgico (NA), que atuam na via descendente inibitória da dor, de acordo com Micó et al. (2006) e Nascimento (2011). O seu metabólito ativo, nortriptilina, é uma amina secundária que inibe a recaptção de noradrenalina (NASCIMENTO, 2011).

Além de seus efeitos sobre a recaptção de aminas, este fármaco possui afinidade pelos sistemas muscarínicos, histamínicos, colinérgicos, adrenérgicos, de acordo com Dilsaver, Snider e Alessi (1987) e Nguyen et al. (2001) e, segundo Werling et al. (2007), pode ainda interagir com receptor σ -1, receptor de tropomiosina, receptor de quinase, conforme Jang et al. (2009), receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) e receptor de fenciclidina, como afirmam Sills e Loo (1989), podendo causar uma grande variedade de efeitos colaterais, incluindo visão turva, constipação, problemas urinários, boca seca, delírios, vertigem e sedação (LEUCH; HUH; LEUCHT, 2012).

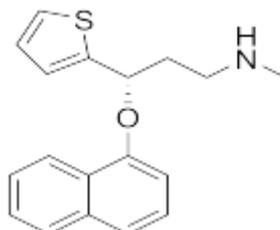
Outro mecanismo de ação da amitriptilina é bloquear canais para sódio, cálcio e potássio dependente de voltagem (Kv1.1), impedindo a continuidade do impulso nervoso (PANCRAZIO et al., 1998; PUNKE; FRIEDERICH, 2007).

4.3.3 Duloxetina

De acordo com Martínez et al. (2009), a duloxetina é um antidepressivo que atua como potente inibidor não seletivo da recaptção de serotonina e noradrenalina no Sistema Nervoso Central, principalmente na via inibitória descendente da dor, conforme Murai et al. (2014). Sua forma ativa e

comercializada é o enantiômero S, segundo Wong et al. (1993). É uma amina secundária, de forma molecular $C_{18}H_{19}NOS$ (Figura 7) (WINGERT et al., 2010).

Figura 7- Estrutura química da duloxetina



Fonte: WINGERT et al., 2010

A duloxetina é bem absorvida quando administrada por via oral, alcançando a concentração plasmática máxima após 2 horas da administração em ratos, de acordo com Bourdet et al. (2012) e após 6 horas da administração em humanos, como mostram Li et al. (2013). Sua biodisponibilidade oral varia de 32 a 80%, de acordo com Pérez-Cajaraville et al. (2006). A administração concomitante com alimentos diminui sua absorção em torno de 11%, segundo Pérez-Cajaraville et al. (2006). A concentração plasmática máxima ocorre 6 horas após a dose (ROERIG et al., 2012).

A taxa de ligação às proteínas plasmáticas é alta, aproximadamente 96% e liga-se principalmente à albumina e à alfa-1 glicoproteína ácida (PÉREZ-CAJARAVILLE et al., 2006).

A duloxetina é amplamente metabolizada pelo fígado, principalmente pelas isoenzimas CYP1A2 e CYP2D6, de acordo com Roerig et al. (2013), gerando metabólitos farmacologicamente inativos, principalmente o glicuronídeo conjugado com 4-hidroxiduloxetina, como observado por Chae et al. (2013), Lantz et al. (2003) e Satonin et al. (2007). Posteriormente sofre conjugação para ser eliminada (LANTZ et al., 2003; SATONIN et al., 2007; CHAE et al., 2013; ROERIG et al., 2013).

A maior parte da duloxetina é eliminada na urina na forma de metabólitos. A meia-vida média de eliminação é de 12 horas, podendo variar de 8 a 17 horas, segundo Roerig et al. (2013) e o *clearance* plasmático da duloxetina

é de 101L/hora, podendo variar entre 33 e 261L/hora (PÉREZ-CAJARAVILLE et al., 2006).

É importante ressaltar que, existe uma variabilidade interindividual de 50 a 60% na farmacocinética da duloxetina. Em parte, esta variabilidade ocorre devido ao gênero, idade, consumo de tabaco e ao metabolismo mediado pelo CYP2D6 (PÉREZ-CAJARAVILLE et al., 2006).

Segundo Martínez et al. (2009), a duloxetina é um duplo inibidor de recaptação de serotonina e noradrenalina, com efeitos preferenciais nos transportadores de 5-HT, resultando em um aumento na neurotransmissão destas substâncias no Sistema Nervoso Central. Além disso, de acordo com Morphy e Rankovic (2005), esta substância inibe fracamente a recaptação de dopamina e não possui afinidade significativa para os receptores muscarínicos, receptores de histamina, beta-adrenérgicos, dopaminérgico, serotoninérgico ou receptores de opioides, conforme Goldstein et al. (2004). Sendo assim, por não apresentar afinidade significativa por estes receptores, os efeitos adversos são reduzidos. Quando aparecem, podem ser, de acordo com Gahimer et al. (2007), náuseas, boca seca, tontura, sonolência, fadiga, insônia, constipação, diminuição do apetite, sudorese e rinite.

. Além disso, a duloxetina pode bloquear canais para sódio dependentes de voltagem, no Sistema Nervoso Central e no Sistema Nervoso Periférico (WANG; CALDERON; KUO WANG, 2010).

4.4 AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA RESPOSTA NOCICEPTIVA

Segundo Chakr; Brenol (2011), a dor envolve características sensoriais e emocionais e de acordo com Silva et al. (2013), podem ser incluídas influências pessoais e ambientais. Já a nocicepção refere-se ao estímulo doloroso propriamente dito, sem levar em consideração a percepção emocional, conforme Silva et al. (2013). Sendo assim, estuda-se a dor e a analgesia nos seres humanos e a nocicepção nos animais, já que esses últimos não são capazes de se expressarem verbalmente (SILVA et al., 2013).

De acordo com Grava et al. (2010) e Silva et al. (2013), existem vários testes que podem ser realizados para a avaliação da resposta nociceptiva, tais como testes químicos (teste de contorções induzidas por ácido acético, teste da formalina) e testes mecânicos (teste da placa quente, teste de retirada da cauda, testes de von Frey, teste de Randall-Selitto e teste de Hargraves).

O teste de von Frey é utilizado para avaliar a influência de fármacos ou outros compostos sobre a sensibilidade nociceptiva frente a um estímulo mecânico, conforme Silva et al. (2013), na forma de pressão crescente na pata dos ratos, sem a administração de outras substâncias químicas (GRAVA et al., 2010).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais utilizados para o desenvolvimento da metodologia são apresentados nos itens abaixo.

5.1 MEDICAMENTOS ADMINISTRADOS

A pregabalina (Lyrica™ 75mg) foi obtida do laboratório Pfizer®, lote J63383. A solução de pregabalina (4mg/mL) foi preparada no dia da administração, utilizando água ultrapura, com dose de 10mg/kg (OKAZAKI et al., 2013).

A amitriptilina foi obtida da Farmácia de Manipulação Musgo (Alfenas - MG), lote 346688. A solução de amitriptilina (0,4 mg/mL) foi preparada no dia da administração, utilizando água ultrapura, com dose de 1mg/kg (YAMAMOTO et al., 2009).

A duloxetina (Veliija™ 30mg) foi obtida do laboratório LIBBS®, lote 14G0GGC. A suspensão de duloxetina (12 mg/mL) foi preparada no dia da administração, utilizando água ultrapura, com dose de 30 mg/kg (IYENGAR et al., 2004).

A amitriptilina foi pesada e a solução preparada na concentração necessária. Os outros dois, que apresentavam a forma farmacêutica cápsula, foram abertos, a duloxetina foi triturada e solubilizada no veículo e a pregabalina apenas solubilizada, em seguida foram administrados na forma de suspensão, na concentração acima descrita, fazendo correção para o peso do animal, sendo que nestas concentrações animais com 200g receberiam 500µL.

A água ultrapura, utilizada como solvente e como veículo, foi obtida no Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos (LATF) da Universidade Federal de Alfenas, utilizando o equipamento (Milli-Q, Academic Millipore, modelo JBRQ10006).

5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOLÓGICO

As metodologias para a avaliação do efeito biológico estão apresentadas nos itens abaixo.

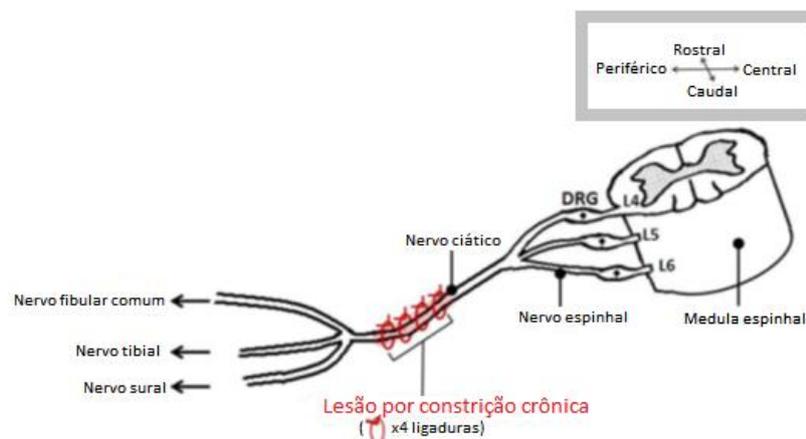
5.2.1 Indução de dor neuropática crônica por CCI

O modelo de lesão por constrição crônica do nervo (CCI) (Figura 8) envolveu a colocação de quatro ligaduras (nós) ao redor do nervo ciático, no nível médio do músculo bíceps femoral, resultando em lesão de parte das fibras aferentes que vão para a pata, e, conseqüentemente, causando hipersensibilidade à dor na pata traseira (AUSTIN; WU; MOALEM-TAYLOR, 2012).

Os animais do grupo para avaliação de efeito biológico passaram por procedimento de indução de dor crônica através de ligadura do nervo ciático, como foi descrito por Benet; Xie (1988). Os mesmos foram anestesiados, baseados em informações da UFSCAR (não publicadas, 2015), com ketamina (95 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg). Após a anestesia, foi feita a tricotomia dos pelos da pata traseira direita. Em seguida, as patas traseiras do animal foram presas à mesa com fita adesiva, apenas para imobilização. Foi feita então uma incisão paralela na pele do animal, utilizando tesoura de ponta fina e aço inoxidável, distante de 4-5 mm abaixo da crista ilíaca; em seguida foi feita uma abertura no tecido conjuntivo e no músculo bíceps femoral, até que fosse visualizado o nervo ciático. O nervo ciático foi exposto, com auxílio de uma ponteira de polipropileno, cerca de 10 mm antes da sua trifurcação. Quatro ligaduras foram feitas ao redor do nervo, próximo à sua trifurcação, utilizando fio de sutura de seda 4-0. Cada ligadura foi feita com um nó duplo, ligeiramente apertado até que o nó não deslizesse pelo nervo e, de forma que o fluxo sanguíneo epineural não fosse interrompido, afastada em 1mm da próxima ligadura (Figura 8). O nervo ciático

foi então recolocado na sua posição anatômica, com o auxílio de uma ponteira de polipropileno. A incisão foi fechada por suturas (6 pontos simples). O procedimento cirúrgico pode ser observado na Figura 9. O local suturado foi limpo com salina estéril. Após o procedimento, os animais ficaram em caixas separadas, em sala com temperatura controlada ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e foram observados até que retornassem da anestesia, por precaução. Os animais ficaram em recuperação por cerca de vinte horas, até que os testes fossem retomados. Os animais do grupo *sham* (ou falso-operado) passaram pelo mesmo procedimento, porém o nervo ciático foi apenas exposto e as constrições não foram realizadas; pós exposição foram recolocados em seu lugar anatômico.

Figura 8 – Diagrama esquemático ilustrando a posição das ligaduras no modelo CCI



Fonte: Adaptado de Austin, Wu e Moalem-Taylor (2012)

Nota: Representação esquemática do local onde as ligaduras foram colocadas no nervo ciático, aproximadamente 10 mm antes da trifurcação deste nervo. Cada ligadura foi feita com fio de seda, amarradas com nó duplo, distantes entre si cerca de 1mm. A ligadura foi apertada sem que o fluxo epineural fosse interrompido.

Figura 9 – Imagens do procedimento cirúrgico (CCI)



Fonte: Da autora

Legenda: 1 – Animal com a pata traseira direita com pelos retirados, imobilizado na mesa; 2- Incisão na pele do animal; 3 – Visualização do nervo ciático do animal; 4- Exposição do nervo ciático; 5- Ligaduras no nervo ciático; 6 – Sutura da incisão.

5.2.2 Animais

Foram utilizados ratos machos, raça Wistar, pesando entre 220-250g, obtidos no biotério da Universidade Federal de Alfenas. Todos os animais foram submetidos às mesmas condições ficando em caixas de polipropileno, com o máximo cinco animais por caixa, em sala com temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade controladas e ciclo claro-escuro a cada 12 horas. Os animais tiveram livre acesso à ração e água (como observado anteriormente por Kugler et al. (2002), a alimentação não interfere na absorção de pregabalina e além disso, o acesso ilimitado foi permitido como forma de reduzir o estresse causado aos animais). O protocolo experimental foi aprovado sob o número 670/2015, pelo Comitê de Ética local em Experimentação Animal da UNIFAL-MG (ANEXO).

a) Grupo Piloto: dez animais foram utilizados para a determinação do pico máximo de nocicepção. Cinco animais foram submetidos ao procedimento de CCI (operados – OP) e os outros foram submetidos ao procedimento de falsa operação (*sham* - SH). A alodinia mecânica foi avaliada diariamente, começando imediatamente antes dos procedimentos, até o 21° dia pós-operatório. A este grupo não foi administrada nenhuma substância.

b) Grupo Pregabalina (PREG): doze animais foram utilizados para a determinação do efeito biológico da pregabalina. Seis animais passaram pela CCI (OP) e os outros foram submetidos ao procedimento de falsa operação (SH). A pregabalina (10mg/kg, dose única), segundo Okazaki et al. (2013), foi administrada por via oral (gavagem) no dia pós-cirurgia em que os animais apresentassem o menor limiar nociceptivo (14° dia pós-operatório, determinado pelo grupo piloto), para os dois grupos (operados e *sham*). A avaliação da alodinia mecânica foi realizada imediatamente antes dos procedimentos, 1h, 2:15h, 4h e 8h após a administração da substância e no 3°, 6°, 9°, 10° ao 21° dia pós-cirúrgico. (BENDER et al., 2009).

c) Grupo Amitriptilina (AMITRIP): doze animais foram utilizados para a determinação do efeito biológico da amitriptilina. Seis animais passaram pela CCI (OP) e os outros foram submetidos ao procedimento de falsa operação (SH). A amitriptilina (1mg/kg, dose única), segundo Yamamoto et al. (2009), foi administrada por via oral (gavagem) no dia pós-cirurgia em que os animais apresentassem o menor limiar nociceptivo (14° dia pós-operatório, determinado pelo grupo piloto), para os dois grupos (operados e *sham*). A avaliação da alodinia mecânica foi realizada imediatamente antes dos procedimentos, 1h, 2:15h, 4h e 8h após a administração da substância e no 3°, 6°, 9°, 10° ao 21° dia pós-cirúrgico. (BENDER et al., 2009).

d) Grupo Duloxetina (DULOX): doze animais foram utilizados para a determinação do efeito biológico da duloxetina. Seis animais passaram pela CCI (OP) e os outros foram submetidos ao procedimento de falsa operação (SH). A duloxetina (30mg/kg, dose única), segundo Iyengar et al. (2004), foi administrada por via oral (gavagem) no dia pós-cirurgia que os animais apresentassem o menor limiar nociceptivo (14° dia pós-operatório, determinado pelo grupo piloto), para os dois grupos (operados e *sham*). A avaliação da alodinia mecânica foi realizada imediatamente antes dos procedimentos, 1h, 2:15h, 4h e 8h após a

administração da substância e no 3°, 6°, 9°, 10° ao 21° dia pós-cirúrgico. (BENDER et al.,2009).

e) Grupo Pregabalina + Amitriptilina (PREG+AMITRIP): doze animais foram utilizados para a determinação do efeito biológico da pregabalina associada à amitriptilina. Seis animais passaram pela CCI (OP) e os outros foram submetidos ao procedimento de falsa operação (SH). A pregabalina (10mg/kg, dose única), segundo Okazaki et al. (2013), e a amitriptilina (1mg/kg, dose única), segundo Yamamoto et al. (2009), foram administradas por via oral (gavagem) no dia pós-cirurgia que os animais apresentassem o menor limiar nociceptivo (14° dia pós-operatório, determinado pelo grupo piloto), para os dois grupos (operados e *sham*). A avaliação da alodinia mecânica foi realizada imediatamente antes dos procedimentos, 1h, 2:15h, 4h e 8h após a administração das substâncias e no 3°, 6°, 9°, 10° ao 21° dia pós-cirúrgico. (BENDER et al.,2009).

f) Grupo Pregabalina + Duloxetina (PREG+DULOX): doze animais foram utilizados para a determinação do efeito biológico da pregabalina associada à duloxetina. Seis animais passaram pela CCI (OP) e os outros foram submetidos ao procedimento de falsa operação (SH). A pregabalina (10mg/kg, dose única), segundo Okazaki et al. (2013), e a duloxetina (30mg/kg, dose única), segundo Iyengar et al. (2004), foram administradas por via oral (gavagem) no dia pós-cirurgia que os animais apresentassem o menor limiar nociceptivo (14° dia pós-operatório, determinado pelo grupo piloto), para os dois grupos (operados e *sham*). A avaliação da alodinia mecânica foi realizada imediatamente antes dos procedimentos, 1h, 2:15h, 4h e 8h após a administração das substâncias e no 3°, 6°, 9°, 10° ao 21° dia pós-cirúrgico. (BENDER et al.,2009).

g) Grupo Veículo (VEH): doze animais foram utilizados como controle. Seis animais passaram pela CCI (OP) e os outros foram submetidos ao procedimento de falsa operação (SH). O veículo (água ultrapura) foi administrado por via oral (gavagem) no dia pós-cirurgia que os animais apresentassem o menor limiar nociceptivo (14° dia pós-operatório, determinado pelo grupo piloto), para os dois grupos (operados e *sham*). A avaliação da alodinia mecânica foi realizada imediatamente antes dos procedimentos, no 3°, 6°, 9°, 10° ao 21° dia pós-cirúrgico. No dia da administração da substância, a alodinia mecânica foi

avaliada 1h, 2:15h, 4h e 8h após a administração do veículo (BENDER et al.,2009).

h) Grupo para avaliação de coordenação motora: vinte e quatro animais foram submetidos ao teste Rota-Rod para avaliar se os medicamentos interfeririam na coordenação motora. O teste foi realizado de acordo com Veloso (2014) imediatamente antes, 30 minutos, 60 minutos e 120 minutos após a administração dos medicamentos, seguindo o esquema posológico (n=6, para cada esquema posológico): veículo (água ultrapura); pregabalina (10 mg/kg, dose única); pregabalina (10 mg/kg, dose única) + amitriptilina (1 mg/kg, dose única); pregabalina (10 mg/kg, dose única) + duloxetina (30 mg/kg, dose única). Foram administradas as mesmas doses que foram administradas aos animais que participaram da avaliação do efeito nociceptivo e apresentaram sonolência.

Não foi necessário executar o teste com os animais que receberam amitriptilina e duloxetina sem associação à pregabalina, pois ambos não apresentaram sonolência aos animais após a sua administração.

5.2.3 Avaliação da alodinia mecânica

O teste realizado foi o teste de von Frey de filamentos, pela capacidade em avaliar a resposta frente estímulos mecânicos, sem administração de outras substâncias químicas, que poderiam afetar a farmacocinética dos perfis farmacológicos utilizados.

A avaliação foi realizada empregando o teste de von Frey de filamentos (Aesthesio™ - Precision Tactile Sensory Evaluator – DanMic Global, LCC, USA), conforme descrito por Detloff et al. (2010), da seguinte forma: os ratos foram colocados em caixas de acrílico com o piso em rede de arame para ambientação por 30 minutos antes do início do teste (Figura 10). Antes da estimulação na pata, por estarem a 30 minutos no aparato, eles já se encontravam em repouso, não mais explorando o local. Foi utilizado sistema de von Frey de filamentos (Figura 11), que consiste em uma série de filamentos de diâmetros crescentes, calibrados para induzir força específica (g) quando aplicado à pele, de acordo

com Austin, Wu e Moalem-Taylor (2012). A ponta do filamento foi colocada perpendicularmente contra a porção medial da pata traseira do animal (Figura 12), evitando-se as malhas de arame. Esta área foi escolhida pois é inervada principalmente por ramos terminais do nervo ciático. O calcanhar e as almofadas plantares foram evitados por diferenças de sensibilidade no local (AUSTIN; WU: MOALEM-TAYLOR, 2012).

Figura 10 – Imagem do aparato de von Frey



Fonte: Da autora

Legenda: 1- Imagem frontal do aparato de von Frey;
2- Imagem inferior do aparato de von Frey

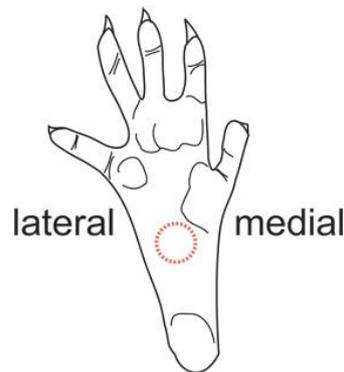
Figura 11 – Imagem dos filamentos de von Frey



Fonte: Da autora

Legenda: imagem dos filamentos de von Frey em ordem crescente de espessura (consequentemente de pressão), da esquerda para a direita.

Figura 12–Diagrama da área plantar da pata utilizada para avaliação mecânica da alodinia



Fonte: Austin, Wu e Moalem-Taylor (2012)

Nota: esta figura mostra o local onde a pressão exercida pelo filamento de von Frey deve ser realizada, entre a região lateral e a região medial da região plantar da pata. Todos os demais locais devem ser evitados, por proporcionarem diferentes sensibilidades frente ao estímulo.

Foram aplicados os filamentos em ordem crescente de diâmetro. Cada filamento foi pressionado sobre a região medial da pata traseira por 6 segundos e repetido por até três vezes, com um intervalo de pelo menos três minutos. Atitudes como vocalização, agitação, saltos, evasão, lambida na pata, retirada da pata e chacoalhada da pata foram considerados como indicativos do limiar de retirada. Não foram considerados como respostas movimentos involuntários associados com a locomoção. A força necessária para induzir resposta de retirada foi registrada e, calculou-se a média das forças dos seis animais participantes. Os valores foram plotados em um gráfico de linhas e passaram por tratamento estatístico.

Tanto os animais operados quanto os animais *sham* (falso-operados) passaram por testes de avaliação da alodinia mecânica.

Os animais que participaram do grupo piloto passaram por estes testes durante 22 dias consecutivos (medida basal (MB), ou seja, antes da cirurgia e 21 dias após a cirurgia, até atingirem novamente o limiar nociceptivo basal), com medidas sempre no mesmo horário (no período da manhã – entre 8h e 12h), a fim de determinar o pico máximo da nocicepção.

Os animais que participaram dos grupos de estudo, com administração de medicamentos ou de água ultrapura (veículo), passaram por estes testes antes da cirurgia (MB), no 3º, 6º, 9º e do 10º ao 21º dia após a cirurgia (estes períodos foram escolhidos a partir do teste piloto, verificando-se que até o 9º dia após a CCI, não havia grande variação no limiar nociceptivo, podendo-se realizar os testes de alodinia de três em três dias, reduzindo então o estresse provocado aos animais. A partir do 10º dia após o procedimento, observou-se que os limiares nociceptivos variavam significativamente, então os testes de alodinia foram realizados diariamente). No 14º dia após a cirurgia, como determinado pelo teste piloto como sendo o dia que os animais apresentaram maior nocicepção, foram realizados testes antes da administração dos medicamentos ou da água, 1h após a administração, 2:15h após a administração, 4h após a administração e 8h após a administração. Estes tempos de avaliação após a administração dos medicamentos ou da água foram baseados em dados farmacocinéticos obtidos da literatura (BENDER et al., 2009).

5.2.4 Avaliação do comportamento motor (Rota Rod)

A coordenação motora foi avaliada como o tempo em que o animal passou caminhando no Rota-Rod (Figura 13) durante no máximo 2 minutos. O aparelho (Insight, modelo EFF 411) utilizado consta de uma barra giratória horizontal, revestida de plástico antideslizante, suspensa a uma altura de 25-30 cm, conforme descrito por Dunham e Miya (1957) e com rotação constante fixada a 16 rpm, com a função acelerar ativada, após vários testes nas diferentes velocidades, de forma que os animais conseguissem caminhar normalmente pela barra, sem se desequilibrarem. Ratos Wistar machos, 220-250g (n = 6 por grupo) foram submetidos a três sessões de treinamento por dia, durante dois dias antecedentes ao experimento. No dia do experimento, a coordenação motora foi avaliada imediatamente antes (MB) da administração dos medicamentos ou do veículo, 30, 60 e 120 minutos após o tratamento oral por gavagem, conforme Veloso (2014), com veículo (água ultrapura, dose única),

pregabalina (10 mg/kg, dose única), pregabalina (10 mg/kg, dose única) + amitriptilina (1 mg/kg, dose única) e pregabalina (10 mg/kg, dose única) + duloxetina (30 mg/kg, dose única) e, se necessário, testes posteriores a estes tempos seriam realizados (caso os animais apresentassem queda com um tempo inferior ao proposto).

Figura 13 – Equipamento Rota- Rod



Fonte: Da autora

Legenda: 1- Equipamento Rota-Rod; 2,3 e 4 – Animais executando o teste.

5.3 ANÁLISE FARMACOCINÉTICA

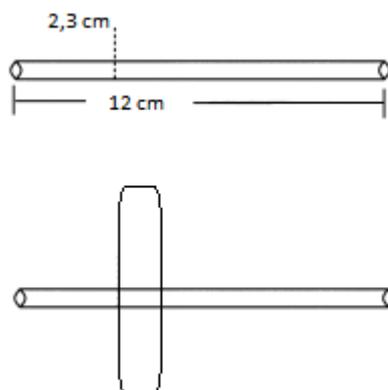
As metodologias para a avaliação da análise farmacocinética estão apresentadas nos itens abaixo.

5.3.1 Canulação da veia jugular

O procedimento de canulação foi adaptado de Burvin, Zloczower e Karnieli (1998), para que várias coletas sanguíneas (no máximo 8 por animal) fossem realizadas para a avaliação dos perfis farmacocinéticos da pregabalina e pregabalina e suas associações.

As cânulas foram preparadas anteriormente ao procedimento, cortando-se um tubo de silicone (Silastic Select Silicone 0,50x0,93x0,20 mm, Gold Lab[®]) com 12 cm de comprimento. Distante cerca de 2,3 cm de uma das extremidades, foi fixado parafilme (2 cm de largura), utilizando cola de silicone neutra (selante de silicone 768, Dow Corning[®]) (Figura 14). As cânulas secaram por 48 horas em temperatura ambiente e foram armazenadas em local fresco e seco até o momento de uso.

Figura 14 – Representação esquemática da cânula



Fonte: Da autora.

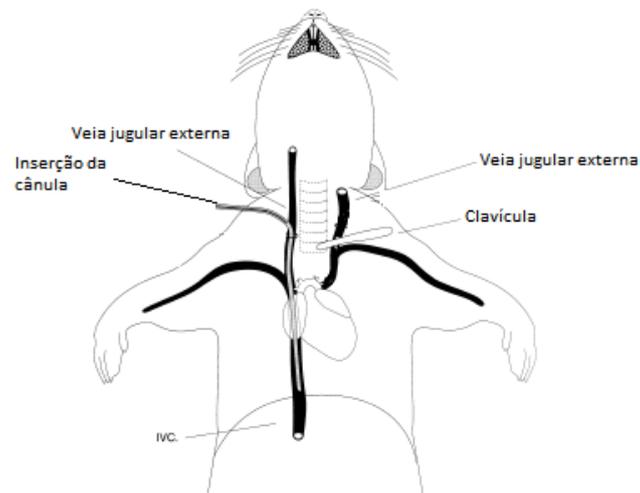
Legenda: Representação esquemática da cânula – silicone P-10, 12 cm de comprimento, com parafilme fixado com silicone neutro a 2,3 cm de uma das extremidades.

Os animais foram anestesiados, segundo informações não publicadas da UFSCAR (2015), com ketamina (95 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg), em seguida

tiveram as patas dianteiras presas à bancada, em decúbito dorsal, com a cabeça virada para o realizador do procedimento. Foi realizada tricotomia da região da clavícula até a região da última costela do animal, do lado direito. Usando a clavícula como guia, próximo à região do esterno (Figura 15), foi realizada uma incisão longitudinal na pele do animal, com cerca de 3 cm. Foi feita uma dissecação na região, para que a veia jugular se tornasse visível, da sua aparição no pescoço até o seu ponto de inserção no músculo peitoral. A cânula, conectada com solução fisiológica heparinizada, foi colocada na região de inserção no músculo peitoral, com auxílio de uma agulha, passando pela veia e saindo no meio do músculo peitoral. A agulha foi retirada e a cânula colocada na luz da veia jugular externa, até que o parafilme estivesse rente ao músculo. Em seguida, a alça de parafilme foi fixada no músculo peitoral com um ponto simples, para evitar que a cânula fosse removida do local. A cânula foi passada subcutaneamente até o topo da cabeça do animal, com auxílio de um trocáter. A incisão na região peitoral foi fechada com 6 suturas simples e a ponta externa da cânula foi fechada com um nó simples, até o momento da coleta (Figura 16). O animal ficou em caixa separada, sob fonte de luz, para evitar hipotermia, para recuperação do procedimento anestésico.

Após a canulação, 12 horas se passaram até que a administração do (s) medicamento (s) e as colheitas de sangue fossem realizadas.

Figura 15 – Esquema da anatomia vascular do rato



Fonte: Adaptado de Burvin, Zloczower e Karnieli (1998)

Nota: estão descritas as veias profundas do pescoço e grandes vasos do tórax. A cânula é colocada no interior da veia jugular direita.

Figura 16 – Imagens do procedimento cirúrgico (canulação)



Fonte: Da autora.

Legenda: 1- Animal anestesiado, em decúbito dorsal, com as patas dianteiras presas à bancada, com a região peitoral tricotomizada; 2 – Incisão longitudinal na pele do animal; 3 – Dissecção para visualização da veia jugular; 4 – Inserção da cânula na veia, saindo no meio do músculo peitoral; 5 e 6- Colocação da cânula na luz da veia; 7 – Sutura da incisão na região peitoral; 8- Ponta externa da cânula, no topo da cabeça do animal, fechada por um nó simples.

5.3.2 Administração medicamentosa

Doze horas após a canulação, os animais foram divididos em 3 grupos (n=11 por grupo) (pregabalina; pregabalina + amitriptilina; pregabalina + duloxetina) e receberam as suspensões das substâncias por via oral (gavagem), nas seguintes concentrações: pregabalina (10mg/kg, dose única), segundo Okazaki et al. (2013), amitriptilina (1mg/kg, dose única), segundo Yamamoto et al. (2009), e duloxetina (30mg/kg, dose única) (IYENGAR et al., 2004).

Após cada esquema de medicação, foram realizadas colheitas de sangue, em intervalos propostos para cada animal (Tabela 1), com até 8 coletas em cada animal (500 µL), realizadas pela cânula. Foi feita reposição de volume com solução fisiológica heparinizada. Durante todo esse tempo, os animais tiveram livre acesso à água e ficaram de jejum do momento do procedimento até 2 horas após a administração medicamentosa, para evitar interferência na absorção dos mesmos. Os animais ficaram em caixas plásticas unitárias em sala com temperatura e umidade controladas e sobre ciclo de claro-escuro. Após o último tempo de coleta, os animais foram eutanasiados por decapitação.

Após a colheita, em tubos heparinizados, o plasma foi separado por centrifugação a 2500g por 10 minutos. O plasma coletado foi armazenado a – 80°C até o momento da análise para determinação da concentração plasmática.

Tabela 1 – Tabela de randomização dos tempos de colheita

| Tempo (h) | 0,083 | 0,16 | 0,25 | 0,5 | 0,75 | 1 | 1,5 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 16 | 24 |
|----------------------|--------------|-------------|-------------|------------|-------------|----------|------------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| animais | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | X | | X | | X | X | | | X | | X | X | X | |
| 2 | | X | | X | | | X | X | X | X | X | X | | |
| 3 | X | | X | | X | X | X | X | | X | | | X | X |
| 4 | X | X | | X | | X | X | | X | | X | X | | |
| 5 | | | X | | X | | X | X | | X | | X | X | X |
| 6 | X | X | | X | X | | | | X | | X | | X | |
| 7 | | X | | X | | X | | X | | X | X | X | | X |
| 8 | X | | X | | X | | X | | X | X | | X | | |
| 9 | | X | | X | | X | | X | | X | X | | | X |
| 10 | X | | X | X | | X | | | X | | | | X | X |
| 11 | | X | X | | X | | X | X | | | | | X | X |

Fonte: Da autora

5.3.3 Análise cromatográfica de pregabalina em plasma de ratos

Para a construção das curvas analíticas, adicionou-se 25µL da solução de diazepam (cedido pela União Química[®]) na concentração de 1µg/mL em metanol (grau HPLC, Sigma-Aldrich[®]) e 25µL de padrão de pregabalina (rac 4,5-dehidro pregabalina, Toronto Research Chemicals Inc[®]), em seis concentrações crescentes entre 0,08-50µg/mL de metanol que quando adicionadas a 200µL de plasma branco (animais que não receberam a pregabalina) correspondiam a 10-6250ng/mL de plasma.

As amostras reais foram descongeladas, homogeneizadas e foi realizada precipitação de proteínas com metanol. A 200µL de plasma foi adicionado 275µL de metanol; agitados por 1 minuto em vórtex (Maxi Mix II tipo 37600 mixer, Thermolyne[®]), e centrifugados a 8327g em centrífuga (Eppendorf[®], F-45-12-11). Pós-centrifugação foram colocados em *inserts* próprios do equipamento e 50µL foram submetidos a análise cromatográfica (adaptado de DAHL; OLSEN; STRAND, 2012).

A cromatografia líquida de ultra eficiência associada à espectrometria de massas foi realizada em espectrômetro de massas (UFLC-MS/MS-8030, Shimadzu[®]), utilizando como fase móvel metanol: solução de acetato de amônio pH 7,0 (90:10 % v/v) [A solução foi preparada utilizando água ultrapura e 0,01% de hidróxido de amônio P.A (Isofar[®]). O pH foi ajustado utilizando-se solução de ácido 0,01N (acético glacial P.A, Proquimios[®]), como fase estacionária coluna de C18 (Shim-pack XR-ODS 3 mm X 100 mm X 2,2 µm, Shimadzu[®]); tempo de análise cromatográfica de 8 minutos. A análise foi realizada com fonte ESI, em ionização no modo positivo, com monitorização das seguintes transições de massa: 158,00 > 140,80; 158,00 > 123,00 e 158,00 > 95,20 para pregabalina e 285,00 > 154,05; 285,00 > 192,90 e 285 > 222,10 para o diazepam.

5.3.4 Validação da metodologia analítica

Os parâmetros linearidade, limite inferior de quantificação, limite de detecção, precisão intra e interensaios, exatidão intra e interensaios, efeito matriz, efeito residual e estabilidade foram avaliados segundo a legislação vigente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Resolução RDC nº 27, de 17 de maio de 2012, para garantir a qualidade e confiabilidade dos resultados produzidos.

5.3.4.1 Linearidade

Na confecção da curva analítica, adicionou-se 25µL de padrão de pregabalina a 0,2 mL de plasma branco em seis concentrações distintas (10, 50, 250, 500, 2500 e 6250 ng/mL de plasma) e 25 µL de padrão interno (PI) na concentração de 1µg/mL de metanol. Processou-se a amostra como descrito no item 5.10

Na análise da curva analítica, também foram incluídas amostras de plasma branco e plasma branco adicionadas de PI (amostra zero) (BRASIL, 2012).

5.3.4.2 Limite Inferior de Quantificação (LIQ)

O limite de quantificação foi determinado através da aplicação do método de preparo de amostra, desenvolvido de tal forma que o analito fosse quantificado na menor concentração possível com coeficiente de variação (CV) $\leq 20\%$. Sua determinação foi realizada por meio de 6 replicatas (BRASIL, 2012).

5.3.4.3 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2012).

Este parâmetro pode ser calculado segundo a fórmula:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}$$

Onde,

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y da curva analítica

IC = inclinação da curva analítica

5.3.4.4 Efeito residual

O efeito residual (*carryover*) é o efeito causado por contaminação proveniente de análises anteriores às quais podem levar ao aparecimento ou aumento do sinal do fármaco ou PI. Para essa análise, realizou-se três injeções de amostra branco, sendo uma antes e duas após a injeção do limite superior de quantificação (LSQ) do analito (BRASIL, 2012).

5.3.4.5 Efeito matriz

O efeito matriz foi feito utilizando-se oito matrizes biológicas distintas, sendo quatro normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas. As matrizes foram processadas e em seguida adicionou-se solução de padrão interno e analito nas mesmas concentrações de controle de qualidade baixo (CQB= 25ng/mL em plasma) e controle de qualidade alto (CQA= 5000ng/mL em plasma), com n=4 para cada controle de qualidade. O cálculo do efeito dos componentes sobre o analito foi realizado de acordo com a fórmula descrita abaixo. São aceitos valores

de coeficiente de variação (CV) para o fator de matriz normalizado (FMN) menor que 15% (BRASIL, 2012).

$$\text{FMN} = \frac{\text{Resposta do analito em matriz/resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/resposta do PI em solução}}$$

5.3.4.6 Precisão e exatidão intra e intercorridas

A precisão avalia, em idênticas condições de ensaio, o grau de repetibilidade entre os resultados individuais de análises quando um processo é aplicado diversas vezes numa mesma amostra homogênea. A precisão intracorrida foi avaliada em um mesmo dia e a intercorridas em três dias diferentes. Este parâmetro é expresso como coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR) (BRASIL, 2012).

$$\text{CV (\%)} = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Média}}$$

A exatidão representa a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor nominal, da mesma forma que a precisão, estabelecendo condições idênticas de ensaio, em uma amostra homogênea. A exatidão intracorridas e a exatidão intercorridas foi avaliada por meio do cálculo do Erro Padrão Relativo (EPR) conforme fórmula abaixo. A exatidão intracorrida foi avaliada em um mesmo dia (n=6 para cada replicata) e a intercorridas em três dias diferentes (n=3). Não se admite valores acima de 15 % do valor nominal, com exceção do LIQ para o qual o valor estabelecido é de 20 % (BRASIL, 2012).

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{(\text{concentração média determinada} - \text{concentração teórica}) \times 100}{\text{Concentração teórica}}$$

Para avaliação dos parâmetros precisão e exatidão, foram analisadas amostras fortificadas com pregabalina em concentrações de 25, 1250, 5000 ng/mL plasma.

5.3.4.7 Estabilidade

Para assegurar que a estabilidade do analito foi mantida nas condições de preparo, análise e estocagem das amostras, foram realizados os testes de estabilidade de curta duração e estabilidade das amostras processadas.

A estabilidade é demonstrada quando não se observar desvio superior a 15% da média das concentrações obtidas com relação ao valor nominal (BRASIL, 2012).

5.3.4.7.1 Estabilidade de curta duração

Amostras fortificadas com padrões (n=4, para cada concentração) nas concentrações de 25 e 5000ng/mL de plasma foram deixadas em repouso nas condições normais do laboratório (temperatura, umidade e luminosidade) e durante o processo de preparo das amostras (4h). Em seguida, foram submetidas ao preparo de amostra e análise conforme descrito no item 5.10. Os resultados obtidos foram comparados com amostras recém-preparadas (BRASIL, 2012).

5.3.4.7.2 Estabilidade pós-processamento

Alíquotas de plasma branco foram fortificadas com padrões (n=4, para cada concentração) nas concentrações de 25 e 5000ng/mL de plasma, foram processadas e mantidas sob as mesmas condições de análise das amostras em estudo. O período foi superior ao intervalo de tempo compreendido entre o término de preparo das amostras e o final da corrida analítica mais longa daquele

mesmo dia. Na sequência, ocorreu a análise em UFLC-MS/MS. Os resultados obtidos foram comparados com amostras recém-preparadas (BRASIL, 2012).

5.3.5 Análise farmacocinética

Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados com base nas concentrações plasmáticas obtidas experimentalmente. Para avaliar as diferenças entre os grupos pregabalina, pregabalina + amitriptilina e pregabalina + duloxetine, foram utilizados os parâmetros *clearance* total de formação (Cl_T/f) e área sob a curva (AUC). A área sob a curva foi construída através da concentração plasmática *versus* tempo ($AUC^{0-\infty}$) e foi calculada através do método dos trapezoides, como observado por Boroujerdi (2002). O *clearance* foi calculado através da fórmula dose/AUC. Estes dois parâmetros foram utilizados para avaliar a diferença entre os grupos de estudo. A análise farmacocinética foi realizada utilizando-se o software WinNonlin® 4.0 (PharsightCorp, EUA).

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do software Graph Pad InStat® utilizando intervalo de confiança de 95%. Em todos os testes estatísticos o nível de significância foi fixado em 5%.

Para avaliação de efeito biológico, quando se comparou os dados entre os grupos de animais, foi utilizado o teste Mann-Whitney e para comparar os dados entre os diferentes tratamentos utilizou-se ANOVA de medidas repetidas. Os dados farmacocinéticos tiveram o teste de Mann-Whitney bicaudado aplicado.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

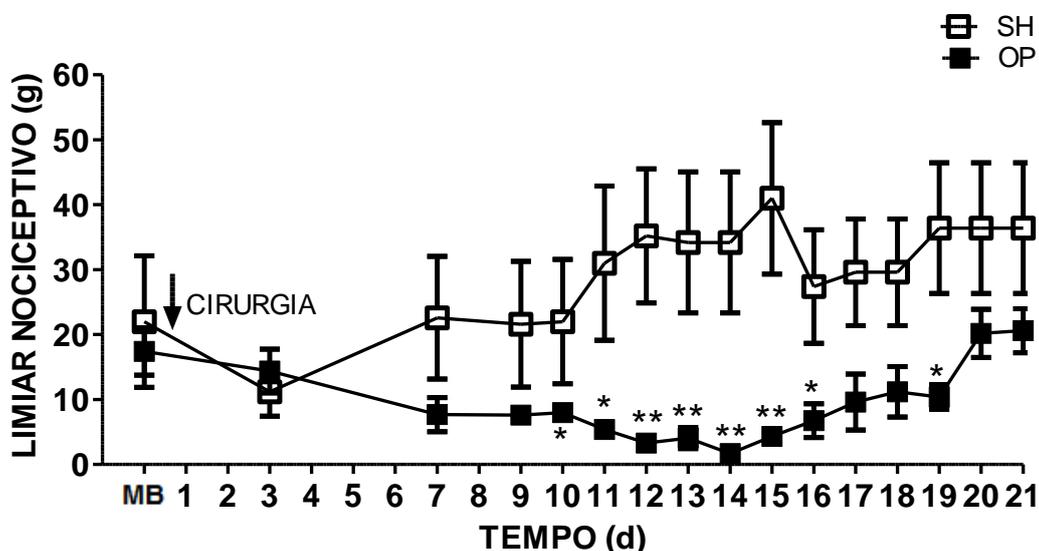
Os resultados obtidos neste estudo estão descritos nos itens abaixo.

6.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL PARA A AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOLÓGICO

Para induzir o processo de nocicepção nos animais, foi escolhido o modelo de CCI (lesão crônica por constrição no nervo ciático), pois desde a sua descrição por Benet e Xie (1988), mostrou-se adequado por representar a dor neuropática crônica, apresentando desordens de sensações dolorosas da mesma maneira que são vistas em neuropatias periféricas em humanos.

Sendo assim, para a avaliação do efeito biológico dos perfis medicamentosos propostos, os animais foram submetidos à CCI no nervo ciático e a avaliação da evolução da nocicepção foi realizada utilizando o teste de von Frey de filamentos. Para a determinação do pico máximo de nocicepção, foi realizado um experimento piloto (GRÁFICO 1).

Gráfico 1 – Avaliação da evolução da nocicepção.



Fonte: Da autora

Legenda: SH – *sham*; OP – operados; MB- medida basal (imediatamente antes do procedimento cirúrgico); tempo experimental: 22 dias.

Nota: Teste de Mann-Whitney, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparando o grupo operado (OP) com o grupo *sham* (SH). O gráfico 1 mostra o comportamento do limiar nociceptivo: o grupo *sham* apresentou pequena redução no limiar nociceptivo após o procedimento, até o 4º dia pós-cirúrgico, devido ao próprio procedimento. Após esse período, o limiar nociceptivo não apresentou diferença estatística significativa até o 21º dia pós-cirúrgico, mostrando que o grupo *sham* não apresentou nocicepção. Já o grupo operado mostra uma redução do limiar nociceptivo até o 14º dia (maior nocicepção) pós-operatório e depois desse período o limiar nociceptivo começa a retornar para os níveis basais.

Os animais que participaram deste teste piloto ($n=10$) foram submetidos à CCI ($n = 5$) e ao procedimento *sham* ($n= 5$) após a medida basal. Nos dias subsequentes ao procedimento, os animais foram submetidos a testes para a avaliação da nocicepção (teste de von Frey de filamento), até que a média dos valores fosse igual ou maior à média obtida na medida basal, observada no 21º dia após os procedimentos. Vale ressaltar que, para este experimento inicial não houve administração de medicamentos ou de veículo aos animais. Dessa maneira, foi possível observar que o modelo de CCI é eficaz para a indução de nocicepção em animais e o pico máximo, ou seja, o dia em que os animais apresentaram o menor limiar nociceptivo, foi no 14º dia após a CCI, com média de 1,664g.

A pregabalina sozinha ou coadministrada com amitriptilina ou duloxetina, amitriptilina ou duloxetina em monoterapias foram administradas aos animais

teste somente no 14º dia após o procedimento (CCI ou falsa operação), onde o limiar nociceptivo apresentou seus valores mínimos. Uma vez que, no 21º dia, houve retorno no limiar nociceptivo às medidas basais, os grupos tratados com medicamentos foram avaliados até este dia. Para os animais teste, foram feitas as seguintes medidas: medida basal, 3º, 6º e 9º dia, pois pelo piloto foi possível observar que até o 9º dia após o procedimento cirúrgico não ocorria mudanças acentuadas nos limiares nociceptivos, então determinou-se esses dias de avaliação (3º, 6º e 9º) para acompanhar a evolução da nocicepção e não gerar grande estresse aos animais; e do 10º ao 21º dia pós-cirúrgico, pois pelo teste piloto, a partir do 10º dia, as variações dos limiares nociceptivos forma mais pronunciadas.

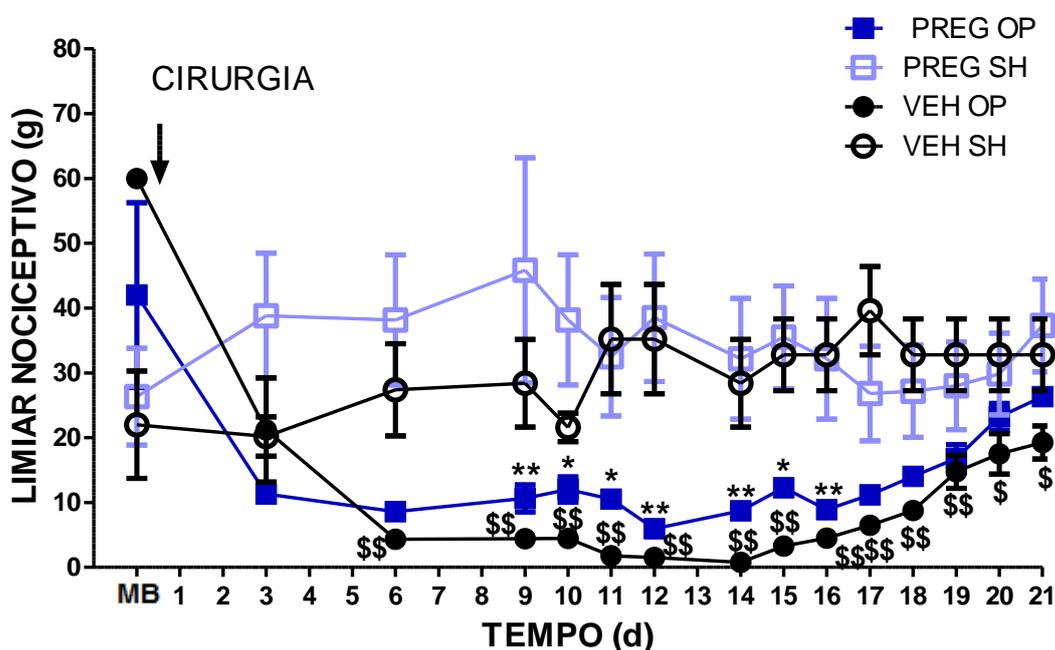
O procedimento de falsa operação (*sham*) foi realizado para demonstrar que a nocicepção observada nos animais operados é decorrente do próprio procedimento de colocação das ligaduras no nervo ciático e, que os animais *sham* não apresentou nocicepção pois não tinha ligaduras no nervo ciático, como pode ser observado no Gráfico 1 do 7º ao 21º dia após o procedimento, já que não houve uma variação significativa das médias do limiar nociceptivo nesse período. A leve diminuição no limiar nociceptivo do 1º ao 4º dia após o procedimento pode ser explicada por processos inflamatórios causados pelo próprio procedimento.

O perfil observado neste estudo para o grupo piloto, tanto para os animais operados, quanto para os animais *sham*, foi observado anteriormente por Li et al. (2014). A diferença é que na literatura o pico máximo de alodinia ocorre no 7º dia pós cirúrgico e aqui ocorre no 14º dia. Essa diferença pode ser explicada pelo modo e força em que a ligadura foi colocada no nervo do animal.

6.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOLÓGICO DA PREGABALINA

Pelos Gráficos 2 e 3 foi possível observar a evolução da nocicepção quando se administrou pregabalina aos animais no 14º dia após a CCI.

Gráfico 2 – Efeito biológico da pregabalina durante 22 dias



Fonte: Da autora

Legenda: PREG: pregabalina (10mg/kg, V.O.); VEH: veículo (água ultrapura, V.O.); SH: sham; OP: operado; tempo experimental: 22 dias

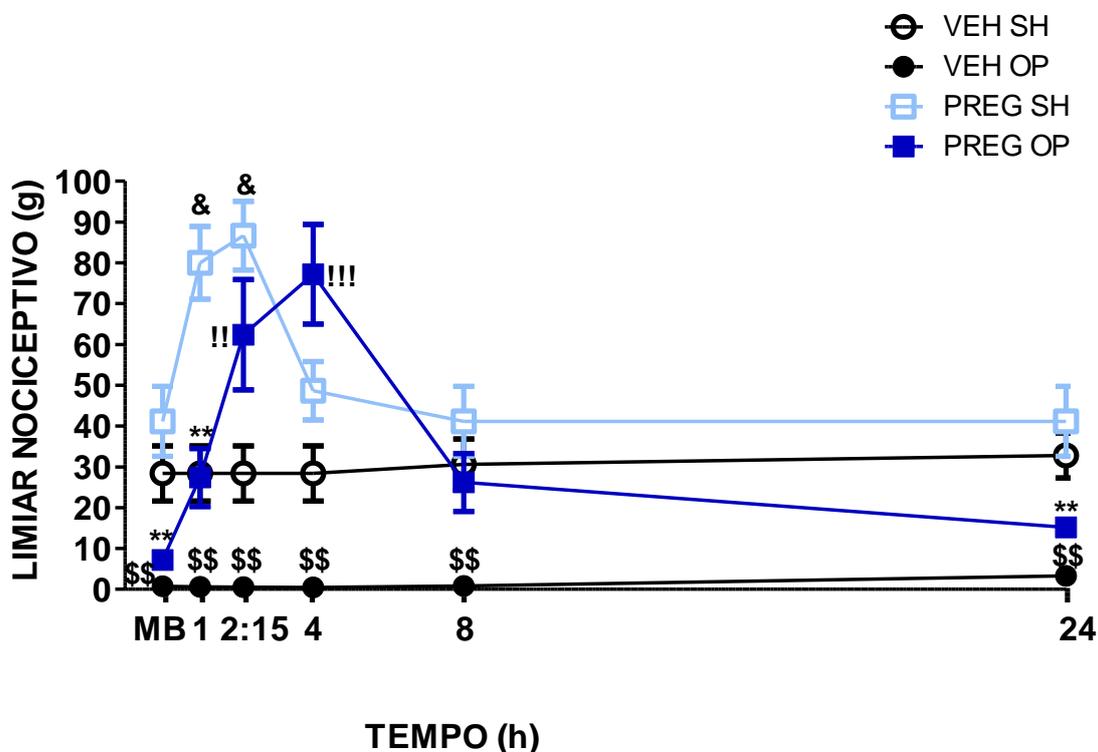
Nota: Teste de Mann-Whitney para comparar os animais do mesmo grupo, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparando o grupo pregabalina operado (PREG OP) com o grupo pregabalina sham (PREG SH); \$ $p < 0,05$ e \$\$ $p < 0,01$ comparando o grupo veículo operado (VEH OP) com o grupo veículo sham (VEH SH). Para o grupo PREG houve diferença estatística significativa do 9º ao 16º pós-operatório, mostrando que nesses dias os animais OP estavam com um limiar nociceptivo menor do que o grupo SH, ou seja, maior nocicepção. Para o grupo VEH, houve diferença estatística significativa do 6º ao 21º dia pós-operatório, mostrando também que nestes dias os animais OP estavam com um limiar nociceptivo menor do que o grupo SH, ou seja, maior nocicepção. Teste ANOVA medidas repetidas para comparar os grupos diferentes. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos VEH OP e PREG OP e nem entre os grupos VEH SH e PREG SH.

O Gráfico 2 mostra que tanto para o grupo VEH SH quanto para PREG SH, o procedimento de falsa- operação não induz nocicepção ou alodinia, uma vez que não há ligaduras colocadas no nervo ciático, não causando então a lesão. Este fato pode ser observado no Gráfico 2, pois não houve diferença estatística significativa durante os 21 dias após o procedimento para os animais sham. Já os grupos VEH OP e PREG OP apresentaram nocicepção significativa

a partir do 6º dia após o procedimento e do 9º ao 16º dia pós-operatório, respectivamente.

Ao se comparar o grupo PREG OP com o grupo VEH OP, não houve diferença estatística significativa em nenhum momento. O mesmo o corre quando se compara o grupo PREG SH e VEH SH.

Gráfico 3 – Efeito biológico da pregabalina até 24 horas após a administração do medicamento no 14º dia após a CCI



Fonte: Da autora

Legenda: PREG: pregabalina (10mg/kg, V.O.); VEH: veículo (água ultrapura, V.O.); SH: sham; OP: operado; tempo experimental: 24 horas após a administração das substâncias

Nota: Teste de Mann-Whitney para comparar os animais do mesmo grupo, ** $p < 0,01$ comparando o grupo PREG OP com o grupo PREG SH; \$\$ $p < 0,01$ comparando o grupo VEH OP com o grupo VEH SH. Teste de ANOVA medidas repetidas para comparar os diferentes grupos, !! $p < 0,01$; !!! $p < 0,001$ comparando o grupo PREG OP e VEH OP; & $p < 0,05$ comparando os grupos PREG SH e VEH SH. Para o grupo VEH foi possível observar que tanto para os operados quanto para os sham, o limiar nociceptivo se manteve praticamente constante do nível basal (14º dia pós-cirúrgico), indicando que os animais operados apresentaram a mesma nocicepção durante as 24 horas seguintes à administração do veículo. Já os animais do grupo PREG OP apresentaram efeito antinociceptivo significativo 2:15 h e 4h após a administração do medicamento, quando comparado com o grupo VEH OP e os animais do grupo PREG SH apresentaram efeito hipalgésico significativo 1h e 2:15h após a administração do medicamento, quando comparado com o grupo VEH SH.

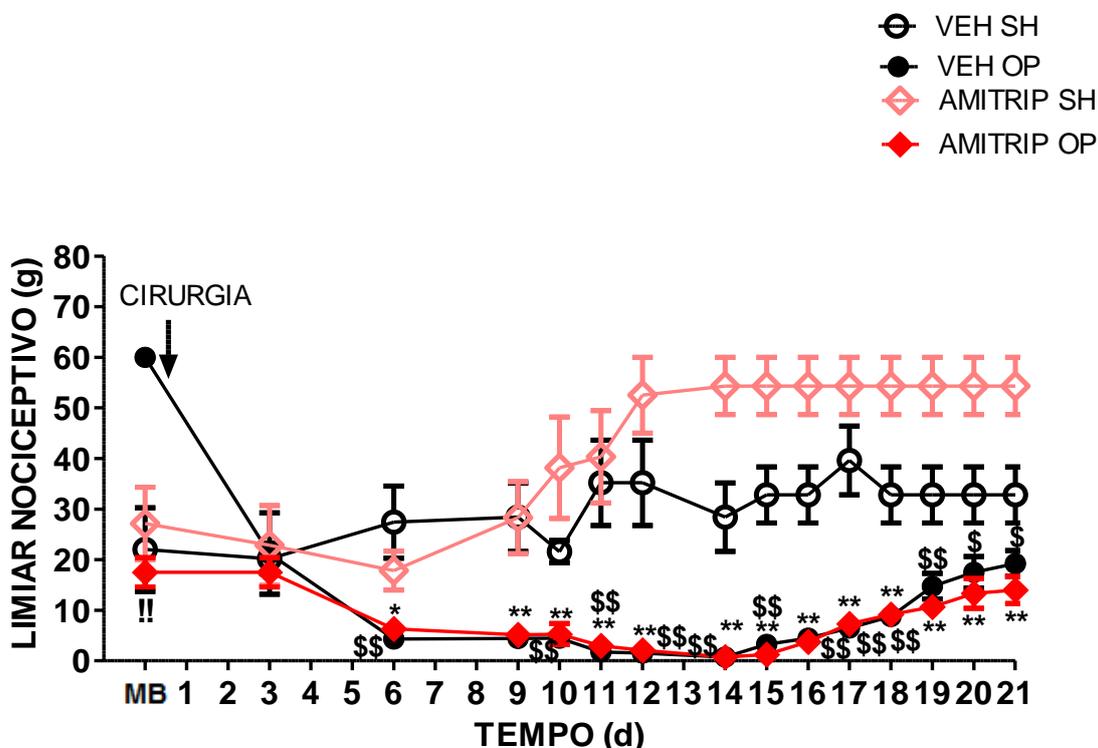
O Gráfico 3 mostra a evolução do limiar nociceptivo durante as 24 horas seguintes à administração das substâncias, no 14º dia após a CCI. Quando se compara os animais do grupo PREG OP com o grupo VEH OP, ocorreu diferença significativa em 2:15h e 4h após a administração do medicamento, mostrando que a pregabalina apresenta efeito antinociceptivo. O mesmo efeito pode ser

observado por Achar et al. (2012), que mostra efeito antinociceptivo contra neuralgia pós-herpética. O grupo PREG OP teve o limiar nociceptivo aumentado de 7,2g (antes da administração) para 77,2g (4h após a administração), o que representa um aumento de 10,7 vezes no limiar nociceptivo. Mas também, quando se compara o grupo PREG SH com o grupo VEH SH, ocorre diferença estatística significativa 1h e 2:15h após a administração das substâncias, mostrando que a pregabalina exerce também efeito hipoalgésico, mesmo em falsos operados.

6.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOLÓGICO DA AMITRIPTILINA

Pelos Gráficos 4 e 5 é possível observar a evolução da nocicepção quando se administrou amitriptilina aos animais no 14º dia após a CCI

Gráfico 4 – Perfil do efeito biológico da amitriptilina durante 22 dias



Fonte: Da autora.

Legenda: AMITRIP: amitriptilina (1mg/kg V.O.); VEH: veículo (água ultrapura, V.O.); SH: *sham*; OP: operado; tempo experimental: 22 dias

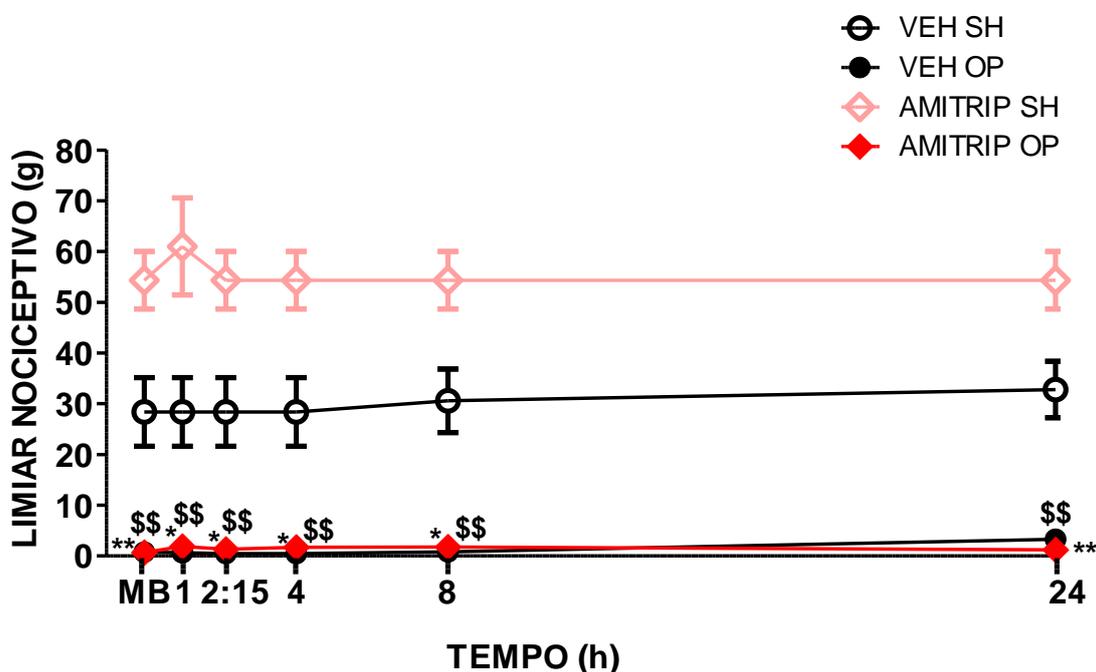
Nota: Teste de Mann-Whitney para comparar os animais do mesmo grupo, ** $p < 0,01$ comparando o grupo amitriptilina operado (AMITRIP OP) com o grupo amitriptilina *sham* (AMITRIP SH); \$ $p < 0,05$ e \$\$ $p < 0,01$ comparando o grupo VEH OP com o grupo VEH SH. Para o grupo AMITRIP houve diferença estatística significativa no 6° e do 9° ao 21° pós-operatório, mostrando que nesses dias os animais OP estavam com um limiar nociceptivo menor do que o grupo SH, ou seja, maior nocicepção. Para o grupo VEH, houve diferença estatística significativa do 6° ao 21° dia pós-operatório, mostrando também que nesses dias os animais OP estavam com um limiar nociceptivo menor do que o grupo SH, ou seja, maior nocicepção. Teste ANOVA medidas repetidas para comparar os grupos diferentes. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos VEH OP e AMITRIP OP, com exceção da medida basal (!! $P < 0,01$) e nem entre os grupos VEH SH e AMITRIP SH.

O Gráfico 4 mostra que tanto para o grupo VEH SH quanto para AMITRIP SH, o procedimento de falsa- operação não induz nocicepção ou alodinia, uma vez que não há ligaduras colocadas no nervo ciático, não causando então a lesão. Este fato pode ser observado no Gráfico 4, pois não houve diferença estatística significativa durante os 21 dias após o procedimento para os animais

sham. Já o grupo VEH OP e AMITRIP OP apresentaram nocicepção significativa a partir do 6º dia após o procedimento e no 6º e do 9º ao 16º dia pós-operatório, respectivamente.

Ao se comparar o grupo AMITRIP OP com o grupo VEH OP, não houve diferença estatística significativa (exceto na medida basal). O mesmo ocorre quando se compara o grupo AMITRIP SH e VEH SH.

Gráfico 5 – Perfil do efeito biológico da amitriptilina até 24 horas após a administração do medicamento no 14º dia após a CCI



Fonte: Da autora

Legenda: AMITRIP: amitriptilina (1mg/kg, V.O.); VEH: veículo (água ultrapura, V.O.); SH: *sham*; OP: operado; tempo experimental: 24 horas após a administração das substâncias

Nota: Teste de Mann-Whitney para comparar os animais do mesmo grupo, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparando o grupo AMITRIP OP com o grupo AMITRIP SH; \$\$ $p < 0,01$ comparando o grupo VEH OP com o grupo VEH SH. Teste de ANOVA medidas repetidas para comparar os diferentes grupos, não houveram diferenças estatísticas significativas. Para o grupo VEH e para o grupo AMITRIP foi possível observar que tanto para os operados quanto para os *sham*, o limiar nociceptivo não apresentou diferença estatística significativa durante todo o período avaliado, indicando que os animais operados apresentaram a mesma nocicepção durante as 24 horas seguintes à administração do veículo. Os animais do grupo AMITRIP não apresentaram efeito antinociceptivo significativo e nem efeito hipoalgésico significativo, quando comparado com o grupo VEH.

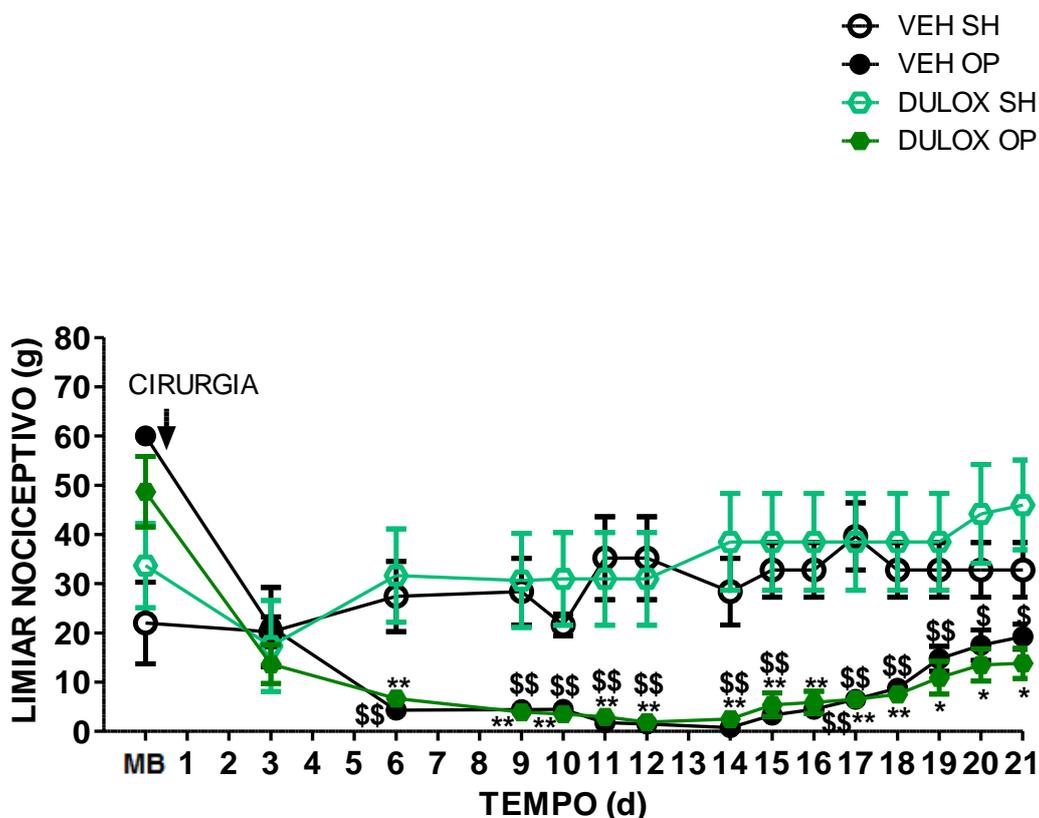
O Gráfico 5 mostra a evolução do limiar nociceptivo durante as 24 horas seguintes à administração das substâncias. Quando se compara os animais do

grupo AMITRIP OP com o grupo VEH OP, não ocorreu diferença na administração do medicamento, mostrando que a amitriptilina não apresenta efeito antinociceptivo. Este fato também foi observado por Moore et al. (2015), que relatam que a amitriptilina foi o medicamento de escolha para o tratamento da dor neuropática por muito tempo, mas não há evidências diretas suficientes que este medicamento consegue tratar a dor neuropática. Kautio et al. (2008) também observaram que a amitriptilina tem efeito similar ao controle em indivíduos com dor neuropática associada à quimioterapia. No entanto, esta substância deve continuar a ser utilizada como adjuvante do tratamento para esse tipo de dor, de acordo com Moore et al. (2015). Da mesma forma ocorre quando se compara o grupo AMITRIP SH com o grupo VEH SH, não apresentando também efeito hipoalgésico significativo.

6.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOLÓGICO DA DULOXETINA

Pelos Gráficos 6 e 7 é possível observar a evolução da nocicepção quando se administrou duloxetina aos animais no 14º dia após a CCI.

Gráfico 6 – Perfil do efeito biológico da duloxetina durante 22 dias



Fonte: Da autora

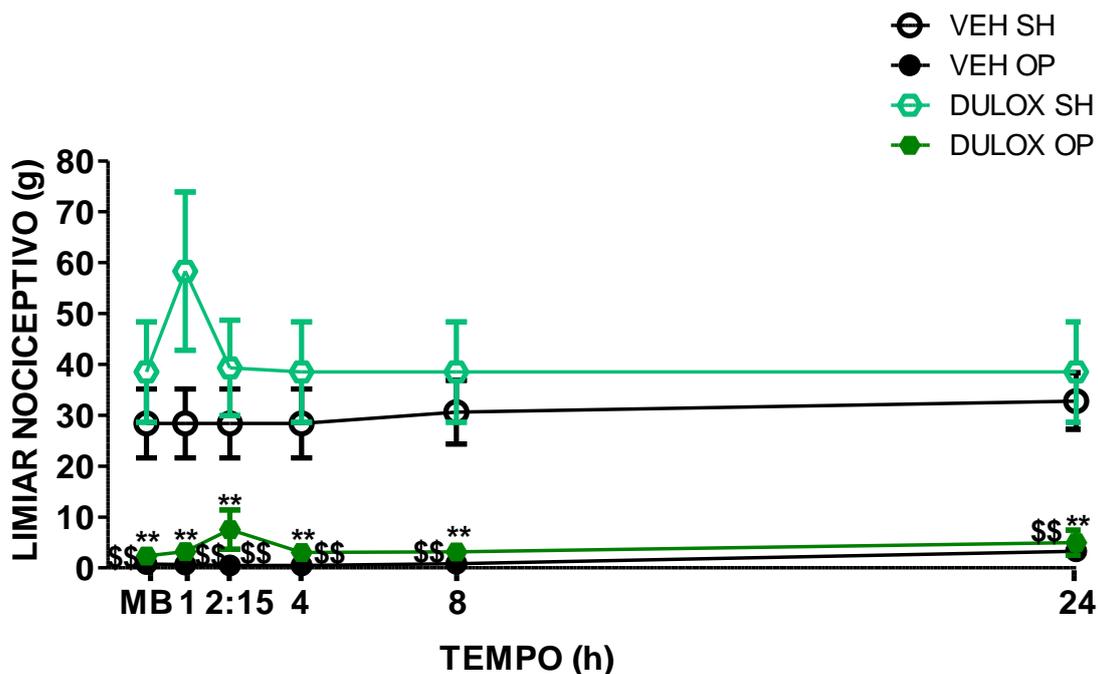
Legenda: DULOX: duloxetina (30mg/kg, V.O.); VEH: veículo (água ultrapura, V.O.); SH: *sham*; OP: operado; tempo experimental: 22 dias

Nota: Teste de Mann-Whitney para comparar os animais do mesmo grupo, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparando o grupo duloxetina operado (DULOX OP) com o grupo duloxetina *sham* (DULOX SH); \$ $p < 0,05$ e \$\$ $p < 0,01$ comparando o grupo VEH OP com o grupo VEH SH. Para o grupo DULOX e para o grupo VEH houveram diferenças estatísticas significativas do 6° e ao 21° pós-operatório, mostrando que nesses dias os animais OP estavam com um limiar nociceptivo menor do que o grupo SH, ou seja, maior nocicepção. Teste ANOVA medidas repetidas para comparar os grupos diferentes. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos VEH OP e DULOX OP e nem entre os grupos VEH SH e DULOX SH.

O Gráfico 6 mostra que tanto para o grupo VEH SH quanto para DULOX SH, o procedimento de falsa- operação não induz nocicepção ou alodinia, uma vez que não há ligaduras colocadas no nervo ciático, não causando então a lesão. Este fato pode ser observado no Gráfico 6, pois não houve diferença estatística significativa durante os 21 dias após o procedimento para os animais *sham*. Já o grupo VEH OP e DULOX OP apresentaram nocicepção significativa a partir do 6° dia após o procedimento.

Ao se comparar o grupo DULOX OP com o grupo VEH OP, não houve diferença estatística significativa. O mesmo ocorre quando se compara os grupos DULOX SH e VEH SH.

Gráfico 7 – Perfil do efeito biológico da duloxetina até 24 horas após a administração do medicamento no 14º dia após a CCI



Fonte: Da autora

Legenda: DULOX: duloxetina (30mg/kg, V.O.); VEH: veículo (água ultrapura, V.O.); SH: *sham*; OP: operado; tempo experimental: 24 horas após a administração das substâncias.

Nota: Teste de Mann-Whitney para comparar os animais do mesmo grupo, ** $p < 0,01$ comparando o grupo DULOX OP com o grupo DULOX SH; \$\$ $p < 0,01$ comparando o grupo VEH OP com o grupo VEH SH. Teste de ANOVA medidas repetidas para comparar os diferentes grupos, não houveram diferenças estatísticas significativas. Para o grupo VEH e para o grupo DULOX foi possível observar que tanto para os operados quanto para os *sham*, o limiar nociceptivo não apresentou diferença estatística significativa, indicando que os animais operados apresentaram a mesma nocicepção durante as 24 horas seguintes à administração do veículo. Os animais do grupo AMITRIP não apresentaram efeito antinociceptivo significativo e nem efeito hipalgésico significativo, quando comparado com o grupo VEH.

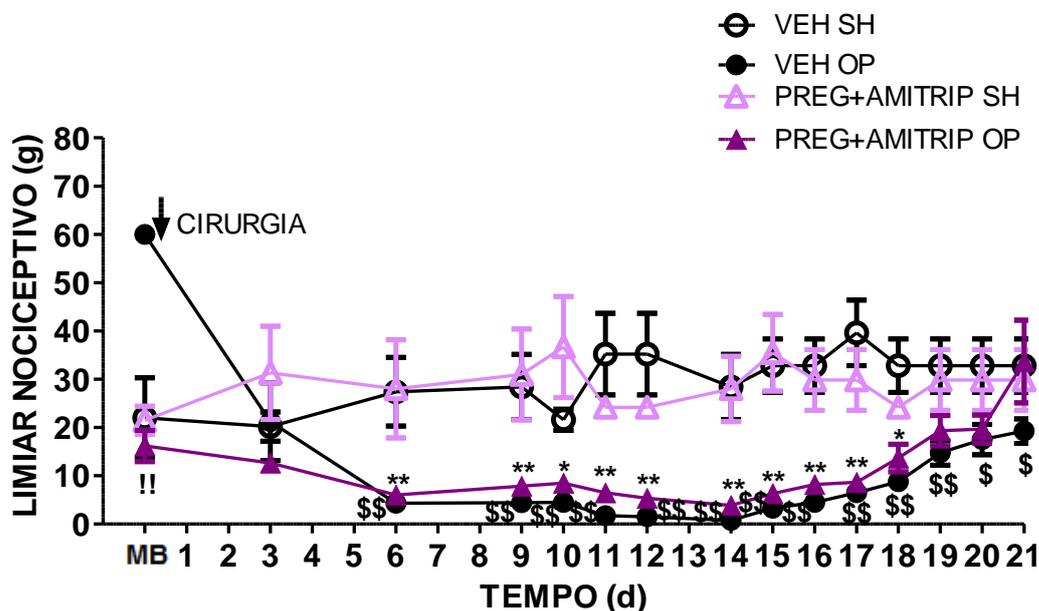
O Gráfico 7 mostra a evolução do limiar nociceptivo durante as 24 horas seguintes à administração das substâncias. Quando se comparam os animais do grupo DULOX OP com o grupo VEH OP, não ocorreu diferença na administração do fármaco, mostrando que a duloxetina não apresenta efeito

antinociceptivo. Lunn; Hughes; Wiffen (2014), relatam que a duloxetina não apresenta efeito para a dor neuropática de origem central. Estes autores relatam que a duloxetina pode ser eficaz contra dores neuropáticas de origem diabética, que não é o modelo do nosso estudo. Da mesma forma ocorre quando se compara o grupo DULOX SH com o grupo VEH SH, não apresentando também efeito hipoalgésico significativo.

6.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOLÓGICO DA PREGABALINA ASSOCIADA À AMITRIPTILINA

Pelos Gráficos 8 e 9 é possível observar a evolução da nocicepção quando se administrou pregabalina associada à amitriptilina aos animais no 14º dia após a CCI.

Gráfico 8 – Perfil do efeito biológico da pregabalina associada à amitriptilina durante 22 dias



Fonte: Da autora

Legenda: PREG+AMITRIP: pregabalina (10mg/kg, V.O.) + amitriptilina (1mg/kg, V.O.); VEH: veículo (água ultrapura, V.O.); SH: *sham*; OP: operado; tempo experimental: 22 dias

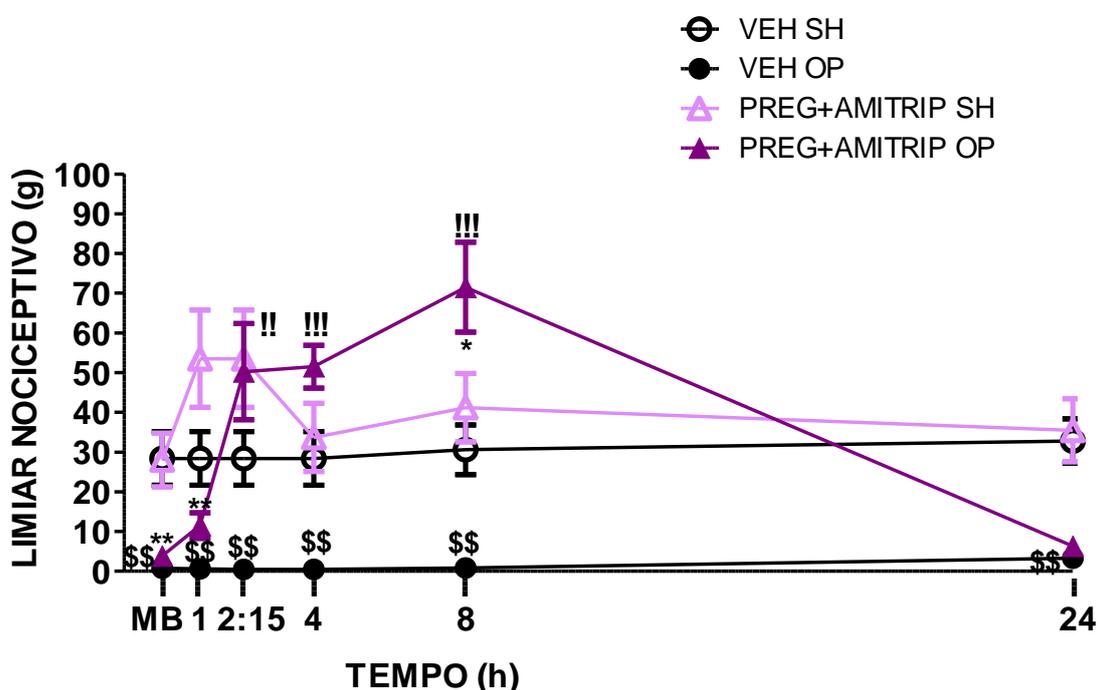
Nota: Teste de Mann-Whitney para comparar os animais do mesmo grupo, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparando o grupo pregabalina + amitriptilina operado (PREG+AMITRIP OP) com o grupo pregabalina + amitriptilina *sham* (PREG+AMITRIP SH); \$ $p < 0,05$ e \$\$ $p < 0,01$ comparando o grupo VEH OP com o grupo VEH SH. Para o grupo PREG+AMITRIP houve diferença estatística significativa do 6° ao 18° pós-operatório, mostrando que nesses dias os animais OP estavam com um limiar nociceptivo menor do que o grupo SH, ou seja, maior nocicepção. Para o grupo VEH, houve diferença estatística significativa do 6° ao 21° dia pós-operatório, mostrando também que nesses dias os animais OP estavam com um limiar nociceptivo menor do que o grupo SH, ou seja, maior nocicepção. Teste ANOVA medidas repetidas para comparar os grupos diferentes. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos VEH OP e PREG+AMITRIP OP, com exceção da medida antes do procedimento cirúrgico (!! $P < 0,01$) e nem entre os grupos VEH SH e PREG+AMITRIP SH.

O Gráfico 8 mostra que tanto para o veículo quanto para o grupo tratado (PREG+AMITRIP SH e VEH SH), o procedimento de falsa- operação não induz nocicepção ou alodinia, uma vez que não há ligaduras colocadas no nervo ciático, não causando então a lesão. Este fato pode ser observado no Gráfico 8, pois não houve diferença estatística significativa durante os 21 dias após o procedimento para os animais *sham*. Além disso, os grupos PREG+AMITRIP OP

e VEH OP apresentaram nocicepção significativa do 6° ao 18° dia e do 6° ao 21° dia, respectivamente.

Quando comparamos PREG+AMITRIP OP com o grupo VEH OP, ocorreu uma diferença significativa apenas na medida basal (antes do procedimento cirúrgico). Por outro lado, quando se compara os grupos PREG+AMITRIP SH e VEH SH, não existe diferença estatística significativa.

Gráfico 9 – Perfil do efeito biológico da pregabalina associada à amitriptilina até 24 horas após a administração dos medicamentos, no 14° dia após a CCI



Fonte: Da autora

Legenda: PREG+AMITRIP: pregabalina (10mg/kg, V.O.) + amitriptilina (1mg/kg, V.O.); VEH: veículo (água ultrapura, V.O.); SH: *sham*; OP: operado; tempo experimental: 24 horas após a administração das substâncias.

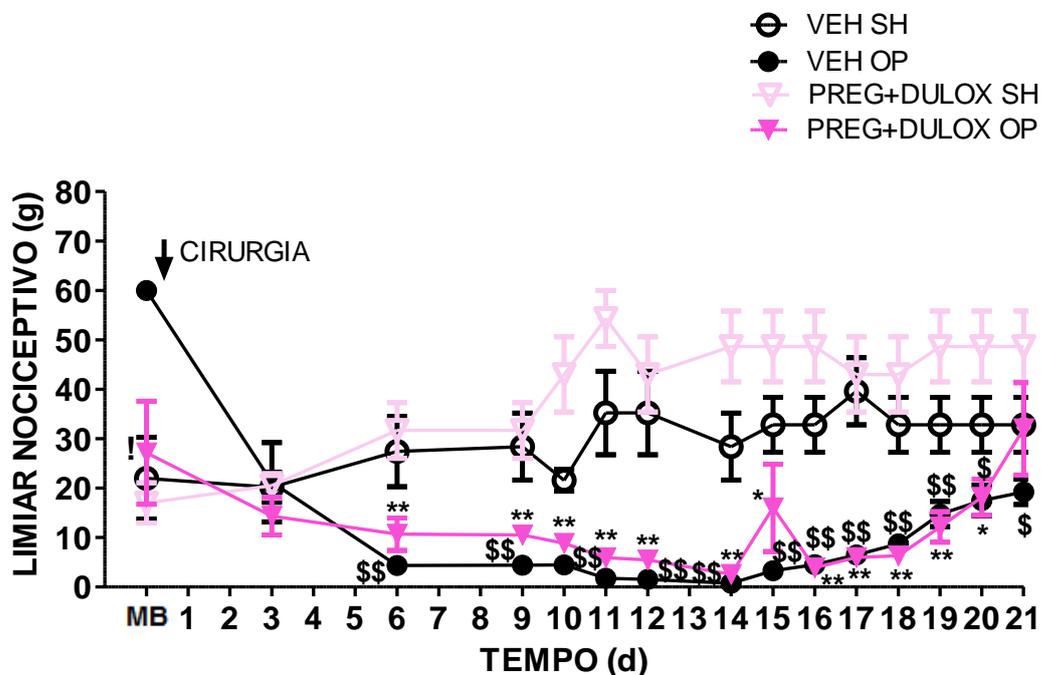
Nota: Teste de Mann-Whitney para comparar os animais do mesmo grupo, ** $p < 0,01$ comparando o grupo PREG+AMITRIP OP com o grupo PREG+AMITRIP SH; \$\$ $p < 0,01$ comparando o grupo VEH OP com o grupo VEH SH. Teste de ANOVA medidas repetidas para comparar os diferentes grupos, !! $p < 0,01$; !!! $p < 0,001$ comparando o grupo PREG+AMITRIP OP e VEH OP. Para o grupo VEH foi possível observar que tanto para os operados quanto para os *sham*, o limiar nociceptivo não apresentou diferença estatística significativa, indicando que os animais operados apresentaram a mesma nocicepção durante as 24 horas seguintes à administração do veículo. Já os animais do grupo PREG+AMITRIP OP apresentaram efeito antinociceptivo significativo 2:15 h, 4h e 8h após a administração do medicamento, quando comparado com o grupo VEH OP e os animais do grupo PREG+AMITRIP SH não apresentaram efeito hipoalésgico significativo, quando comparado com o grupo VEH SH.

O Gráfico 9 mostra a evolução do limiar nociceptivo durante as 24 horas seguintes à administração das substâncias. Quando se compara os animais do grupo PREG+AMITRIP OP com o grupo VEH OP, ocorreu diferença significativa em 2:15h, 4h e 8h após a administração do medicamento, mostrando que a pregabalina associada à amitriptilina apresenta efeito antinociceptivo. O grupo PREG + AMITRIP OP teve o limiar nociceptivo aumentado de 3,8g (antes da administração) para 71,5g (8h após a administração), o que representa um aumento de 18,8 vezes no limiar nociceptivo. Este fato também foi observado por Tripathi; Mehta; Yadav (2016), que relatam que a associação de pregabalina e amitriptilina apresentam efeito antinociceptivo em modelo de neuropatia diabética. No entanto, quando se compara o grupo PREG+AMITRIP SH com o grupo VEH SH, não ocorre diferença estatística significativa após a administração das substâncias, mostrando que a pregabalina associada à amitriptilina não exerce efeito hipoalgésico.

6.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO BIOLÓGICO DA PREGABALINA ASSOCIADA À DULOXETINA

Nos gráficos abaixo (GRÁFICO 10 e 11) é possível observar a evolução da nocicepção quando se administrou pregabalina associada à duloxetina aos animais no 14º dia após a CCI.

Gráfico 10 – Perfil do efeito biológico da pregabalina associada à duloxetina durante 22 dias



Fonte: Da autora

Legenda: PREG+DULOX: pregabalina (10mg/kg, V.O.) + duloxetina (30mg/kg, V.O.); VEH: veículo (água ultrapura, V.O.); SH: *sham*; OP: operado; tempo experimental: 22 dias

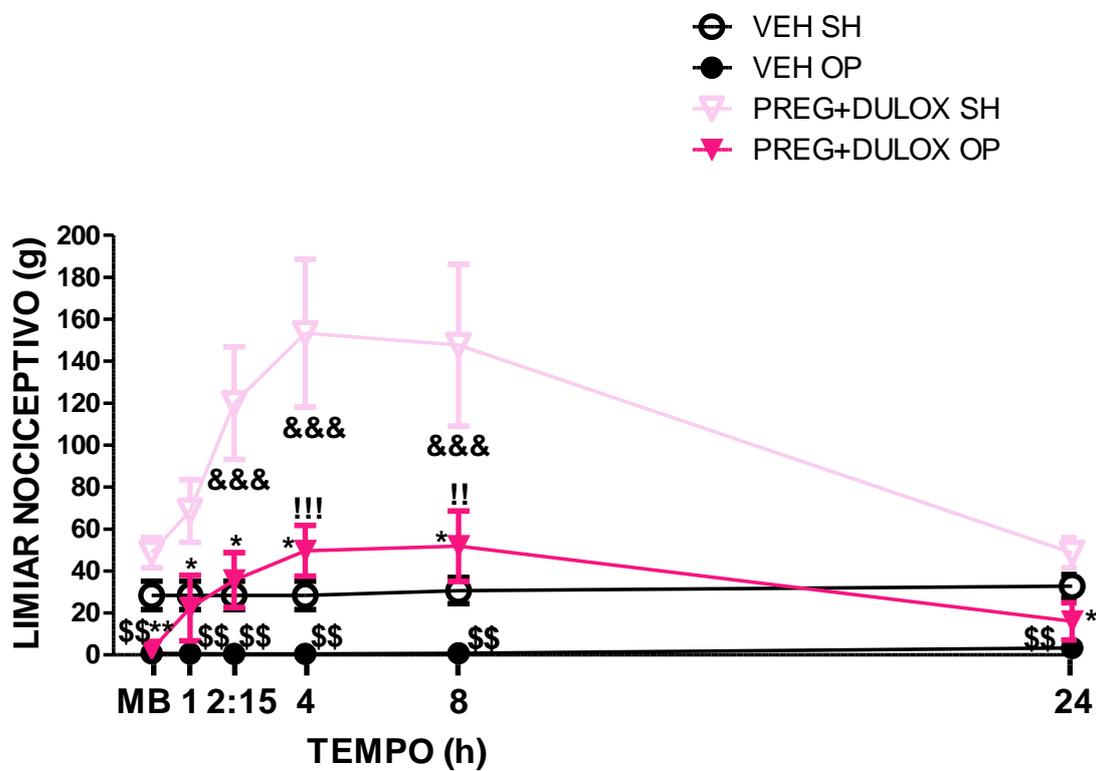
Nota: Teste de Mann-Whitney para comparar os animais do mesmo grupo, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparando o grupo pregabalina + duloxetina operado (PREG+DULOX OP) com o grupo pregabalina + duloxetina *sham* (PREG+DULOX SH); \$ $p < 0,05$ e \$\$ $p < 0,01$ comparando o grupo VEH OP com o grupo VEH SH. Para o grupo PREG+DULOX houve diferença estatística significativa do 6° ao 20° pós-operatório, mostrando que nesses dias os animais OP estavam com um limiar nociceptivo menor do que o grupo SH, ou seja, maior nocicepção. Para o grupo VEH, houve diferença estatística significativa do 6° ao 21° dia pós-operatório, mostrando também que nesses dias os animais OP estavam com um limiar nociceptivo menor do que o grupo SH, ou seja, maior nocicepção. Teste ANOVA medidas repetidas para comparar os grupos diferentes. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos VEH OP e PREG+DULOX OP, com exceção da medida antes do procedimento cirúrgico (! $P < 0,05$) e nem entre os grupos VEH SH e PREG+DULOX SH.

O Gráfico 10 mostra que tanto para o grupo VEH SH quanto para o grupo PREG+DULOX SH, o procedimento de falsa- operação não induz nocicepção ou alodinia, uma vez que não há ligaduras colocadas no nervo ciático, não causando então a lesão. Este fato pode ser observado no Gráfico 10, pois não houve diferença estatística significativa durante os 21 dias após o procedimento

para os animais *sham*. Além disso, os grupos PREG+DULOX OP e VEH OP apresentaram nocicepção significativa do 6º ao 20º dia pós-operatório e do 6º ao 21º dia pós-operatório, respectivamente.

Quando comparamos PREG+DULOX OP com o grupo VEH OP, ocorreu uma diferença significativa apenas na medida basal (antes do procedimento cirúrgico). Além disso, não houve diferença estatística significativa quando se compara os grupos *sham*.

Gráfico 11 – Perfil do efeito biológico da pregabalina associada à duloxetina até 24 horas após a administração dos medicamentos, no 14º dia após a CCI



Fonte: Da autora

Legenda: PREG+DULOX: pregabalina (10mg/kg, V.O.) + duloxetina (30mg/kg, V.O.); VEH: veículo (água ultrapura, V.O.); SH: *sham*; OP: operado; tempo experimental: 24 horas após a administração das substâncias

Nota: Teste de Mann-Whitney para comparar os animais do mesmo grupo. * $P < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparando o grupo PREG+DULOX OP com o grupo PREG+DULOX SH; \$\$ $p < 0,01$ comparando o grupo VEH OP com o grupo VEH SH. Teste de ANOVA medidas repetidas para comparar os diferentes grupos, !! $p < 0,01$ e !!! $p < 0,001$ comparando o grupo PREG+DULOX OP e VEH OP. &&& $p < 0,01$ comparando PREG+DULOX SH com VEH SH. Para o grupo VEH foi possível observar que tanto para os operados quanto para os *sham*, o limiar nociceptivo não apresentou diferença estatística significativa, indicando que os animais operados apresentaram a mesma nocicepção durante as 24 horas seguintes à administração do veículo. Já os animais do grupo PREG+DULOX OP apresentaram efeito antinociceptivo significante 4h e 8h após a administração do medicamento, quando comparado com o grupo VEH OP e os animais do grupo PREG+DULOX SH apresentaram diferença significativa 2:15h, 4h e 8h após a administração das substâncias, apresentando então efeito hipalgésico significante, quando comparado com o grupo VEH SH.

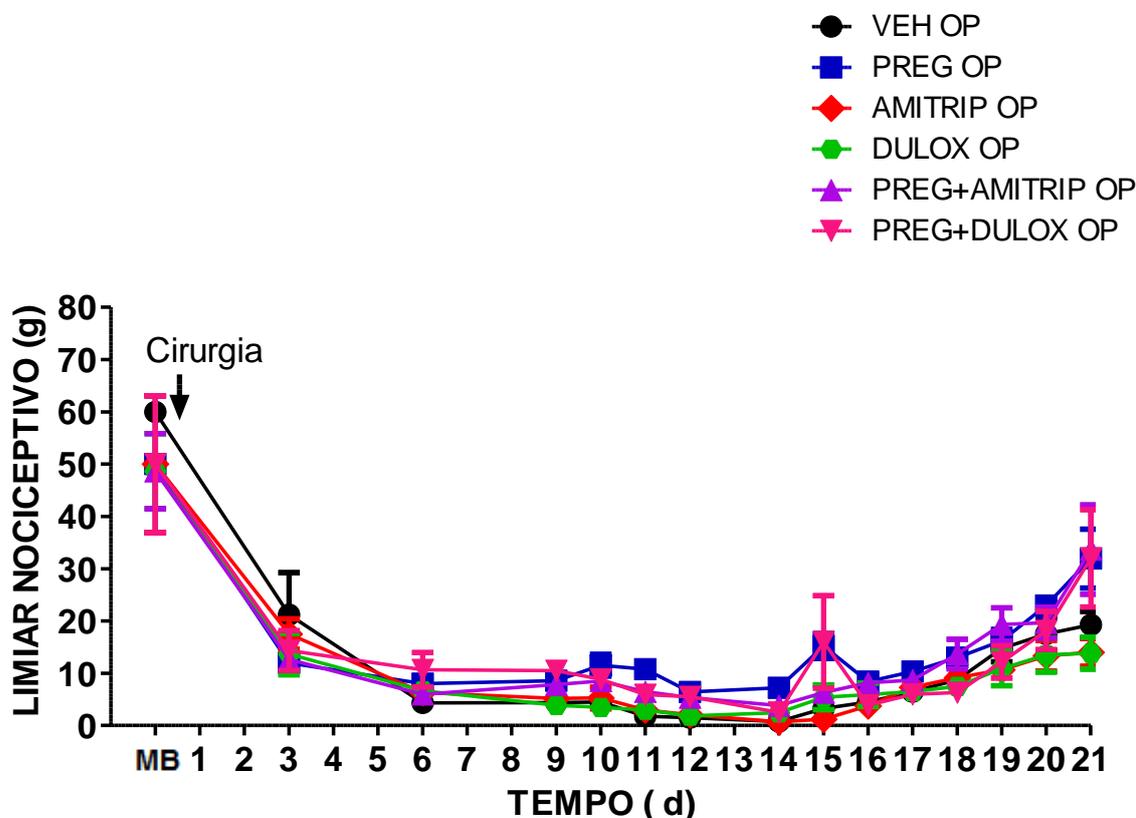
O Gráfico 11 mostra a evolução do limiar nociceptivo durante as 24 horas seguintes à administração das substâncias. Quando se compara os animais do grupo PREG+DULOX OP com o grupo VEH OP, ocorreu diferença significativa em 4h e 8h após a administração do medicamento, mostrando que a pregabalina associada à duloxetina apresenta efeito antinociceptivo. O grupo PREG +

DULOX OP teve o limiar nociceptivo aumentado de 2,5g (antes da administração) para 51,8g (8h após a administração), o que representa um aumento de 19,4 vezes no limiar nociceptivo. Este fato também foi observado por Tesfaye et al. (2013) em humanos com neuropatia diabética. Tripathi; Mehta; Yadav (2016), que relatam que a pregabalina associada à duloxetina apresenta efeito antinociceptivo significativo quando comparado com o grupo controle, em animais com dor neuropática de origem diabética. Além disso, quando se compara o grupo PREG+DULOX SH com o grupo VEH SH, ocorre diferença estatística significativa 2:15h, 4h e 8h após a administração das substâncias, mostrando que a pregabalina associada à duloxetina exerce efeito hipalgésico.

6.7 COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS

Foi realizada a comparação dos grupos que passaram por CCI e receberam o tratamento no 14º dia os resultados podem ser observados nos Gráficos 12 e 13.

Gráfico 12 – Comparação entre os tratamentos farmacológicos durante 22 dias – Grupos operados



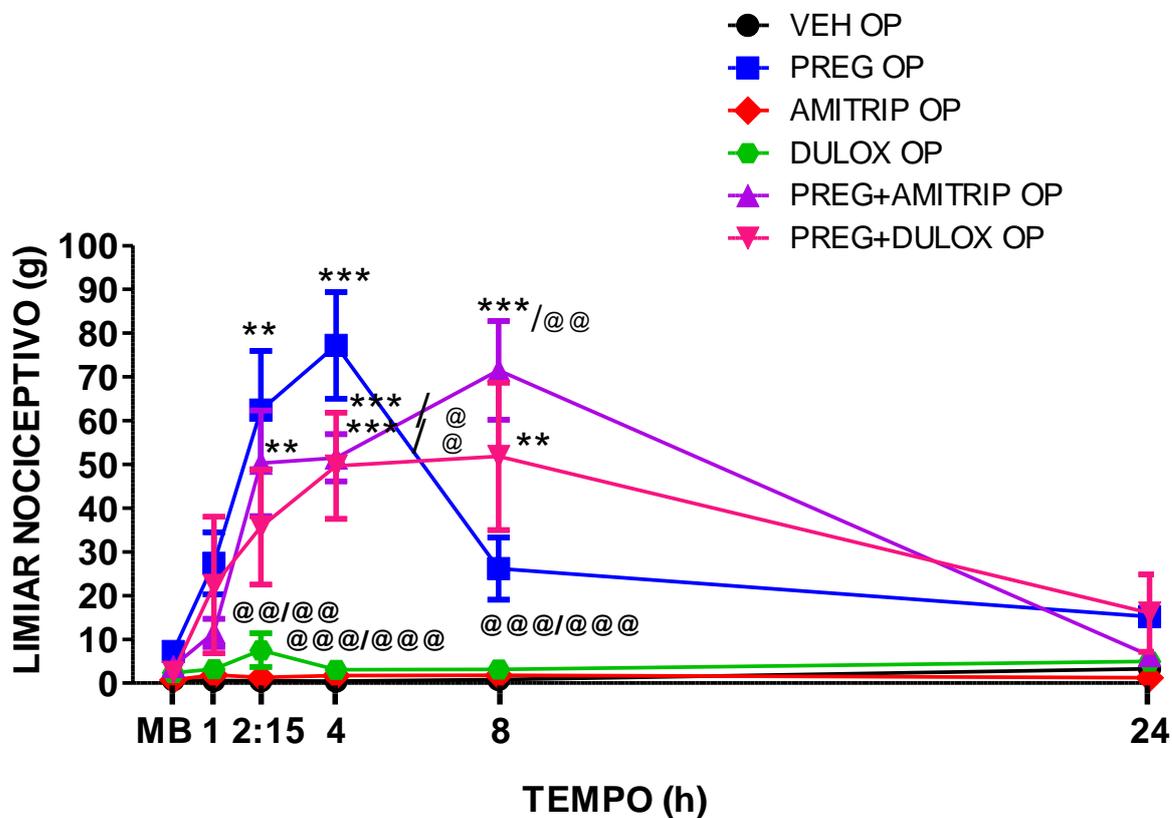
Fonte: Da autora

Legenda: PREG: pregabalina (10mg/kg, V.O.); AMITRIP: amitriptilina (1mg/kg, V.O.); DULOX: duloxetina (30mg/kg, V.O.); PREG+AMITRIP: pregabalina (10mg/kg, V.O.) + amitriptilina (1mg/kg, V.O.); PREG+DULOX: pregabalina (10mg/kg, V.O.) + duloxetina (30mg/kg, V.O.); VEH: veículo (água ultrapura, V.O.); OP: operado; tempo experimental: 22 dias

Nota: Teste ANOVA medidas repetidas para comparar os diferentes grupos. Não houve diferença estatística significativa durante os 21 dias. Durante esse período, todos os grupos apresentaram comportamento semelhante ao reduzir o limiar nociceptivo até o 14º dia após o procedimento cirúrgico (maior nocicepção). Após este dia, os limiares nociceptivos começam a retornar para os níveis basais (antes da cirurgia).

Pelo Gráfico 12 é possível observar que todos os grupos operados se comportam de maneira semelhante, reduzindo o limiar nociceptivo até o 14º dia pós-cirúrgico e depois desse período, os limiares começam a retornar para os níveis basais. Não houve nenhuma diferença estatística significativa entre os grupos da medida basal até o 21º dia após o procedimento.

Gráfico 13 – Comparação entre os tratamentos farmacológicos até 24 horas após a administração dos medicamentos, no 14º dia após a CCI – Grupos operados



Fonte: Da autora

Legenda: PREG: pregabalina (10mg/kg, V.O.); AMITRIP: amitriptilina (1mg/kg, V.O.); DULOX: duloxetina (30mg/kg, V.O.); PREG+AMITRIP: pregabalina (10mg/kg, V.O.) + amitriptilina (1mg/kg, V.O.); PREG+DULOX: pregabalina (10mg/kg, V.O.) + duloxetina (30mg/kg, V.O.); VEH: veículo (água ultrapura, V.O.); OP: operado; tempo experimental: 24 horas após a administração das substâncias.

Nota: Teste ANOVA de medidas repetidas para comparar os diferentes grupos – Grupos operados. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado com o grupo VEH; @@ $p < 0,01$ e @@@ $p < 0,001$ comparado com o grupo PREG. Ao comparar os grupos AMITRIP e DULOX com o grupo VEH, nenhum dos dois grupos apresentou efeito antinociceptivo, por outro lado, os grupos PREG, PREG+AMITRIP e PREG+DULOX apresentaram melhor efeito antinociceptivo, que foi estatisticamente significativo 2:15 e 4h para o grupo PREG; 2:15, 4 e 8h para o grupo PREG+AMITRIP e 4 e 8h para o grupo PREG+DULOX. Comparado com o grupo PREG, os grupos AMITRIP e DULOX apresentaram o pior efeito antinociceptivo. A associação de pregabalina com amitriptilina ou com duloxetina mostraram um efeito antinociceptivo menos eficaz do que pregabalina sozinha 4h após a administração. Além disso, a associação com amitriptilina foi a única que apresentou efeito antinociceptivo 8h após a administração, quando comparada com o grupo PREG, ou seja, prolongou o efeito da pregabalina em monoterapia.

Pelo Gráfico 13 é possível observar que o tratamento com pregabalina apresentou um aumento do limiar nociceptivo mais rápido (efeito máximo em 4h)

quando comparado com os demais tratamentos (efeito máximo em 8h para PREG+AMITRIP e PREG+DULOX), então percebe-se que a associação prolonga o aumento no limiar nociceptivo, sendo um benefício importante da coadministração.

A maior duração do efeito da associação PREG+AMITRIP e PREG+DULOX quando comparada a pregabalina além da maior eficácia na redução da dor (18,8 e 19,4 vezes, respectivamente), apresentaram prolongamento do efeito da pregabalina em monoterapia, mostrando benefícios para a combinação no tratamento de dor neuropática induzida por lesão no nervo ciático.

Segundo Tanenberg et al. (2011), a duloxetina em monoterapia apresentou resultados semelhantes à pregabalina em monoterapia, para o tratamento de neuropatia diabética. Já para Tesfaye et al. (2013), a duloxetina sozinha demonstrou melhor efeito do que a pregabalina em monoterapia para neuropatia de origem diabética. Esses estudos contradizem o resultado obtido no presente trabalho, no qual a pregabalina sozinha foi a única monoterapia a apresentar efeito antinociceptivo considerável para o tratamento de dor neuropática induzida por lesão no nervo ciático.

De acordo com Achar et al. (2012), a amitriptilina sozinha pode ser utilizada para o tratamento de neuropatia pós-herpética, porém revela resultados inferiores ao da pregabalina em monoterapia. Este trabalho corrobora com o presente estudo, indicando que apenas o tratamento com pregabalina em monoterapia é eficaz contra dor neuropática induzida por lesão no nervo ciático.

Para Tesfaye et al. (2013), a combinação de pregabalina com duloxetina (60mg de duloxetina e 300mg de pregabalina) apresentou favorecimento do efeito analgésico, mas sem diferença estatística significativa, quando comparada com as monoterapias em altas doses de duloxetina (60mg 2x ao dia) ou pregabalina (300 mg 2x ao dia), para o tratamento de dor neuropática de origem diabética. Por outro lado, o efeito antinociceptivo observado com a associação pregabalina e duloxetina no presente trabalho foi eficaz e prolongado quando comparado à pregabalina em monoterapia (Gráfico 13).

De maneira complementar, Gilron et al. (2009) afirmam que a combinação de gabapentina com nortriptilina apresentam melhores efeitos do que cada uma em monoterapia, para o tratamento de dor neuropática. Como a gabapentina

atua no mesmo sítio que a pregabalina (canais para cálcio dependentes de voltagem) e a nortriptilina é o principal metabólito ativo da amitriptilina (atuam na recaptação não seletiva de serotonina e noradrenalina), pode-se inferir que a associação pregabalina e amitriptilina também apresenta efeitos antinociceptivos melhores do que cada uma em monoterapia, que pode ser corroborado pelo observado no presente trabalho e pelo trabalho de Mishra et al. (2012).

Tripathi, Mehta e Yadav (2016) mostram que a pregabalina (200mg/kg), a amitriptilina (20mg/kg) e a duloxetina (40mg/kg) em monoterapia apresentam efeito antinociceptivo em animais com neuropatia diabética induzida, enquanto que no presente trabalho apenas a monoterapia de pregabalina (10mg/kg) foi eficaz contra dor neuropática induzida por lesão no nervo ciático, como pode ser observado no Gráfico 13.

Além disso, o grupo supracitado relata que a associação de pregabalina (100mg/kg) com amitriptilina (10mg/kg) ou com duloxetina (20mg/kg) apresentaram efeito antinociceptivo quando comparados ao veículo. Este fato também foi observado no presente estudo, (Gráfico 13) onde as associações (pregabalina [10mg/kg] + amitriptilina [1mg/kg] ou duloxetina [30mg/kg]) quando comparadas ao VEH, mostraram redução da nocicepção, com maior eficácia e duração do que em situação de monoterapia de PREG.

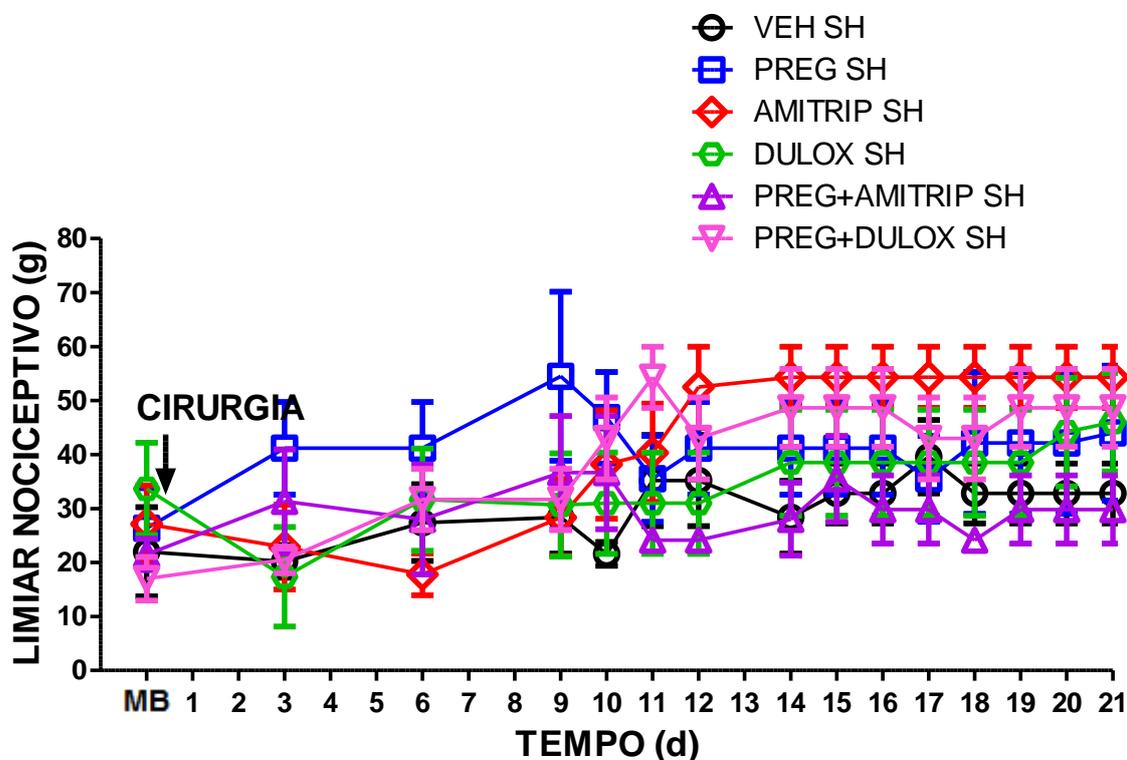
Um fato interessante observado por Tripathi, Mehta e Yadav (2016), que não foi observado em nosso estudo foi que as associações apresentaram quase o mesmo efeito quando comparado à monoterapia de duloxetina ou amitriptilina. Ressalta-se que isto poderia ser explicado pelos diferentes modelos de nocicepção utilizados no estudo da literatura e em nosso modelo. Neste estudo, as associações apresentaram efeito antinociceptivo superior aos adjuvantes (amitriptilina e duloxetina) em monoterapia.

Foi possível observar no Gráfico 13 que a associação de pregabalina com amitriptilina foi mais eficaz do que a associação com duloxetina no tempo 2:15 h, pregabalina e amitriptilina e pregabalina e duloxetina apresentaram efeitos semelhantes nos tempos 4 e 8 horas após a administração dos fármacos, diferente do observado por Tripathi, Mehta e Yadav (2016), que relatam efeitos similares em 2h após a administração. Para os autores Tripathi, Mehta e Yadav (2016), a associação de pregabalina e duloxetina foi mais eficaz para o tratamento da dor neuropática de origem diabética, já para o presente estudo, o

tratamento mais eficaz foi a associação de pregabalina e amitriptilina, pois apresentou um efeito prolongado quando comparado com a pregabalina sozinha.

Com base nestas observações, é possível concordar com alguns autores que afirmam que o tratamento da dor neuropática ainda é difícil e não há nenhum tratamento único que funcione para todas as condições de neuropatia, principalmente pelos mecanismos secundários envolvidos na manutenção deste tipo de dor. (CHEN; MAO, 2013; FINNERUP et al., 2005; HURLEY; ADAMS; BENZON, 2013; MENDLIK; URITSKY, 2015).

Gráfico 14 – Comparação entre os tratamentos farmacológicos durante 22 dias – Grupos *sham*



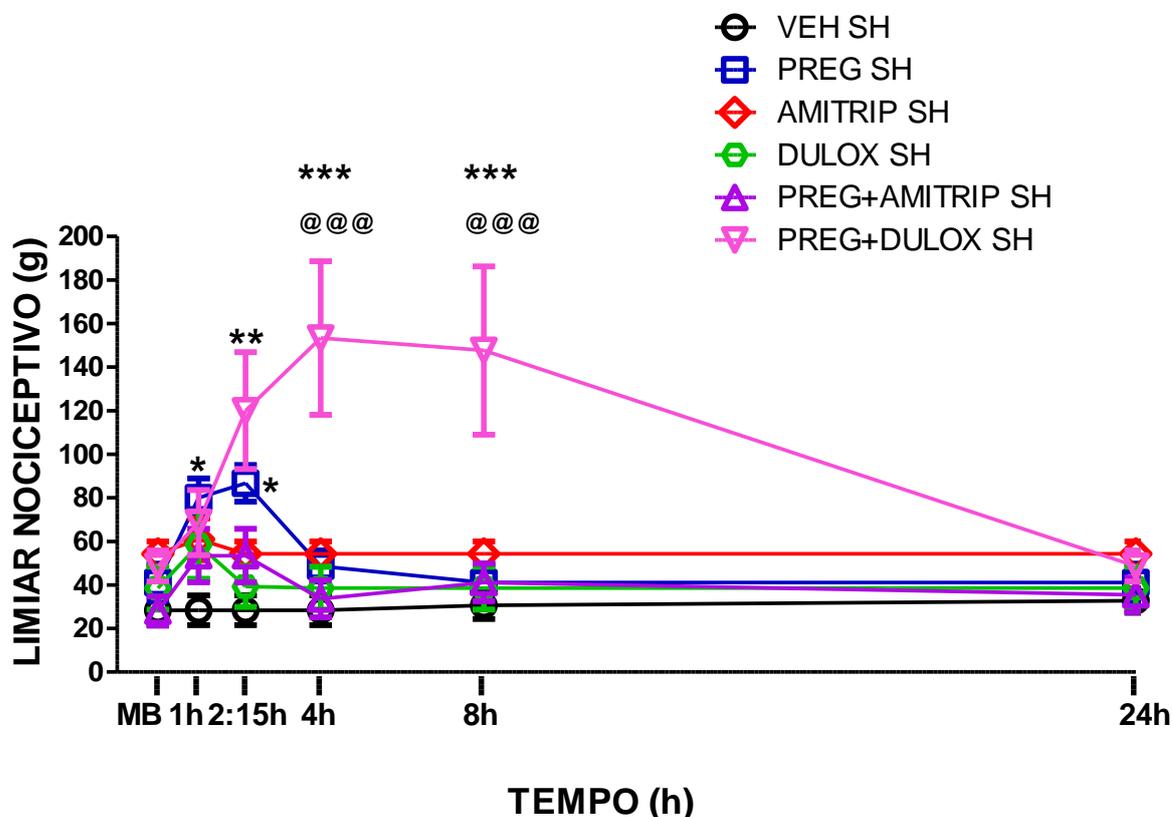
Fonte: Da autora

Legenda: PREG: pregabalina (10mg/kg, V.O.); AMITRIP: amitriptilina (1mg/kg, V.O.); DULOX: duloxetina (30mg/kg, V.O.); PREG+AMITRIP: pregabalina (10mg/kg, V.O.) + amitriptilina (1mg/kg, V.O.); PREG+DULOX: pregabalina (10mg/kg, V.O.) + duloxetina (30mg/kg, V.O.); VEH: veículo (água ultrapura, V.O.); SH: *sham*; tempo experimental: 22 dias.

Nota: Teste ANOVA de medidas repetidas para comparar os diferentes grupos. Não houve diferença estatística significativa durante os 21 dias. Durante esse período, todos os grupos se comportaram de maneira semelhante, mantendo o seu limiar nociceptivo praticamente constante.

Nota-se no Gráfico 14 que todos os grupos *sham* se comportam de maneira semelhante entre si, mantendo seus limiares nociceptivos praticamente constantes durante todo o período de avaliação.

Gráfico 15 – Comparação entre os tratamentos farmacológicos até 24 horas após a administração dos medicamentos, no 14º dia após a CCI – Grupos *sham*



Fonte: Da autora

Legenda: PREG: pregabalina (10mg/kg, V.O.); AMITRIP: amitriptilina (1mg/kg, V.O.); DULOX: duloxetina (30mg/kg, V.O.); PREG+AMITRIP: pregabalina (10mg/kg, V.O.) + amitriptilina (1mg/kg, V.O.); PREG+DULOX: pregabalina (10mg/kg, V.O.) + duloxetina (30mg/kg, V.O.); VEH: veículo (água ultrapura, V.O.); OP: operado; tempo experimental: 24 horas após a administração das substâncias.

Nota: Teste ANOVA medidas repetidas para comparar os diferentes grupos – Grupos *sham*. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado com o grupo VEH; @@@ $p < 0,001$ comparado com o grupo PREG. Comparado com o grupo VEH, apenas grupos PREG e PREG+DULOX apresentaram hipotalgesia, que foi estatisticamente significativo em 1h e 2:15h após a administração de substâncias para o grupo PREG e 2:15h, 4h e 8h para o grupo PREG+DULOX. O grupo PREG+DULOX apresentou hipotalgesia prolongada e potencializada em relação com o grupo PREG, estatisticamente significativo em 4h e 8h após a administração substâncias.

Já o Gráfico 15 mostra a avaliação do limiar nociceptivo nos animais *sham* após a administração das substâncias. Quando comparados com o grupo VEH, apenas os grupos PREG (com diferença estatística em 1h e 2:15h) e PREG+DULOX (diferença estatística em 2:15h, 4h e 8h) apresentaram efeito hipotalgésico, sendo o da associação mais prolongado. Quando comparado com

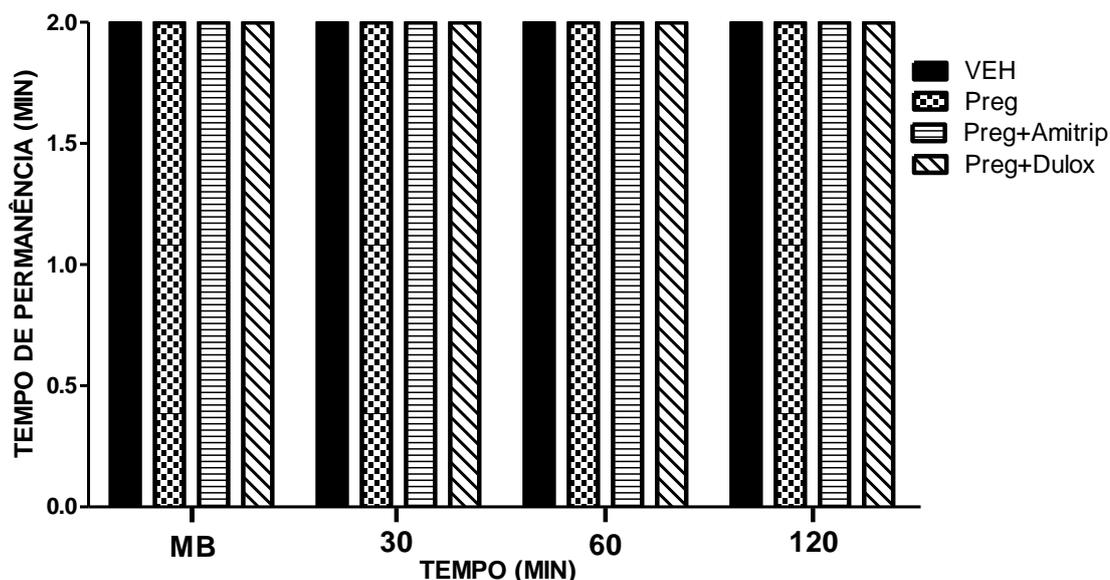
o grupo PREG, apenas o grupo PREG+DULOX apresentou efeito hipoalgésico significativo (4h e 8h após a administração das substâncias), ou seja, prolongou e potencializou o efeito da pregabalina em monoterapia.

6.8 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MOTOR

Durante o período de avaliação após a administração do medicamento (1h, 2:15h, 4h e 8h) foi observado que os animais do grupo tratado PREG, PREG+AMITRIP e PREG+DULOX (*sham* e operados) apresentaram sonolência como efeito colateral. Este efeito foi demonstrado como um dos mais comuns, principalmente no início do tratamento com pregabalina, como observado por Pfizer (2005) e Lee (2012), também pelo tratamento com amitriptilina, como observado por Leucht, Huhn e Leucht (2012), ou ainda com o tratamento de duloxetina, observado por Gahimer et al. (2007).

O teste Rota-Rod foi realizado com intuito de verificar se a sonolência/sedação dos animais afetou a resposta de retirada da pata frente ao estímulo mecânico de von Frey de filamento, por possível diminuição da atividade dos componentes motores. Os testes foram realizados em animais *sham*, uma vez que se os animais estivessem operados não conseguiriam caminhar sobre o equipamento. Os resultados estão apresentados no Gráfico 16.

Gráfico 16 – Avaliação do comportamento motor



Fonte: Da autora

Legenda: PREG: pregabalina (10mg/kg, V.O.); PREG+AMITRIP: pregabalina (10mg/kg, V.O.) + amitriptilina (1mg/kg, V.O.); PREG+DULOX: pregabalina (10mg/kg, V.O.) + duloxetina (30mg/kg, V.O.); VEH: veículo (água ultrapura, V.O.). Tempo de treino: 2 dias. Tempo de execução do teste: 2 minutos. Períodos de avaliação: 30, 60 e 120 min após a administração das substâncias.

Nota: Todos os grupos testados (PREG, PREG+AMITRIP, PREG+DULOX e VEH – SH) conseguiram executar o teste corretamente, ou seja, conseguiram caminhar sobre o equipamento pelo tempo mínimo proposto (2 min), concluindo-se então que os animais não apresentaram comprometimento da função motora.

Como pode ser observado no Gráfico 16, todos os animais conseguiram executar o teste durante o tempo mínimo de permanência proposto (dois minutos), caminhando sobre o equipamento, sem quedas, antes da administração dos medicamentos, 30 minutos, 60 minutos e 120 minutos após a administração dos medicamentos, não sendo necessário continuar os testes após os tempos de avaliação propostos. Pode-se concluir que, a demora para a retirada da pata quando estimulados mecanicamente pelo filamento de von Frey estava associada aos efeitos antinociceptivos dos medicamentos e não ao prejuízo da função motora.

Tesfaye et al. (2013) também observaram que a combinação (pregabalina + duloxetina) e nortriptilina + gabapentina, observada por Gilron et al. (2009), também apresentaram sonolência. Ressalta-se que os dois estudos citados anteriormente, observaram este efeito também em situação de monoterapia, que

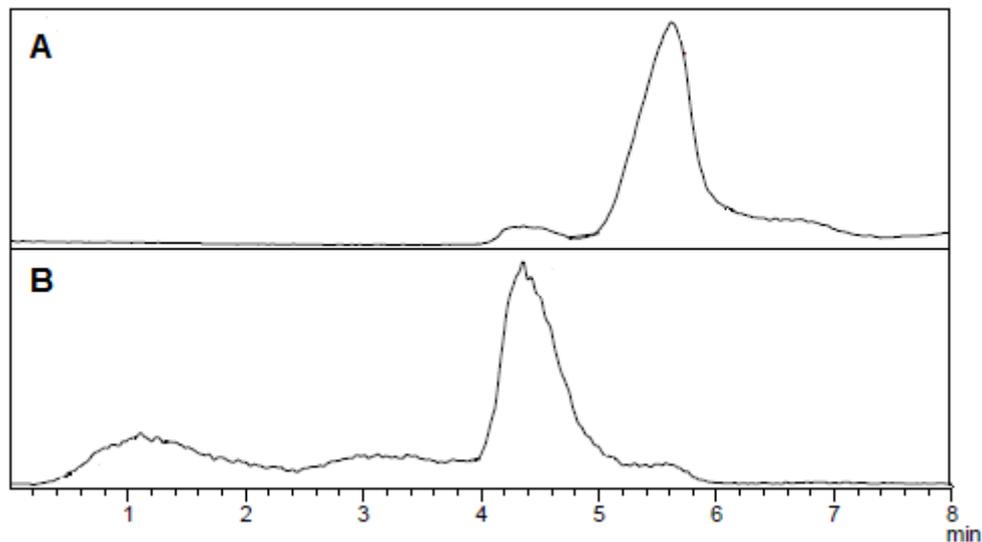
só se repetiu no presente estudo para a monoterapia de pregabalina. Esta inclusive é a razão de o teste de Rota-Rod não ter sido realizado para grupos de monoterapia de amitriptilina ou duloxetina.

6.9 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE PREGABALINA

Os ensaios de validação foram realizados segundo a RDC 27/2012, proposta por Brasil (2012). Os resultados são apresentados a seguir.

A análise da pregabalina em plasma de ratos foi realizada após precipitação proteica. A identificação e quantificação da pregabalina foi obtida utilizando coluna C18 (Shim-pack XR-ODS 3 mm X 100 mm X 2,2 µm, Shimadzu®), protegida por pré-coluna C18 (Supelguard™ LC-18, Supelco®) com fase móvel constituída por metanol: solução de acetato de amônio pH 7,0 (90:10 v/v). Os cromatogramas apresentados na Figura 17 mostram os picos obtidos para as substâncias analisadas.

Figura 17 – Análise cromatográfica da pregabalina e do diazepam (padrão interno)



Fonte: Da autora

Legenda: A – representa o cromatograma da análise de pregabalina e B- representa o cromatograma da análise do diazepam. Apesar de dois cromatogramas serem apresentados, a análise acontecia de maneira simultânea, sendo cada analito monitorado em suas respectivas transições de massa, e estes dois cromatogramas representam, portanto, uma única análise cromatográfica.

6.9.1 Linearidade

De acordo com a RDC 27/2012, alguns critérios devem ser considerados para análise e aceitação dos pontos da curva analítica, a menor concentração nominal deve ter desvio menor ou igual a 20%, as demais concentrações não devem ter desvio superior a 15% em relação ao valor nominal. Além disso, é necessário que no mínimo 75% dos padrões de calibração estejam adequados ao acima disposto, e, que no mínimo seis padrões de concentrações distintas sejam utilizados. O limite inferior de detecção (LIQ) e o limite superior de quantificação (LSQ) também devem atender às exigências anteriores, de acordo com Brasil (2012). A relação entre concentração e resposta foi definida por meio de uma curva analítica, representada por uma equação de primeiro grau, no intervalo de 10 a 6250 ng/mL de pregabalina em plasma.

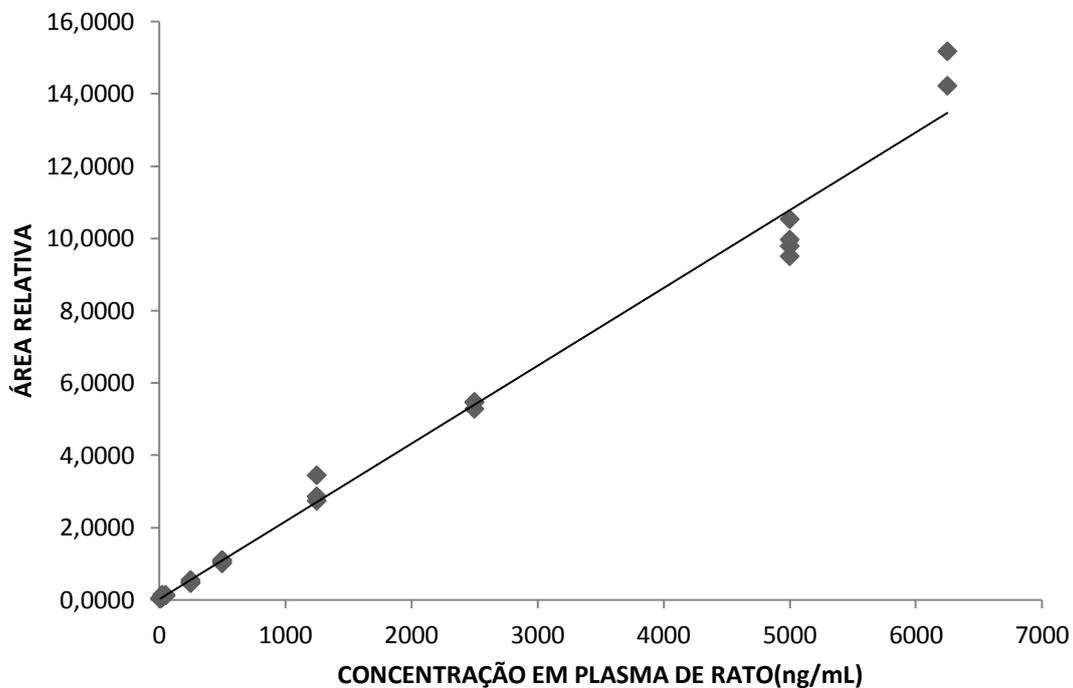
Os parâmetros relativos à curva analítica do método para quantificação de pregabalina em plasma de rato por cromatografia de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas, no intervalo de 10 a 6250 ng/mL em plasma esta demonstrada na Tabela 2. A Figura 18 representa a curva analítica, na qual foram feitas seis réplicas para cada ponto. O valor do coeficiente de correlação linear foi superior a 0,99, sendo que o critério de aceitação para o coeficiente é de que ele seja maior que 0,98; indicando adequada linearidade na faixa de concentração de trabalho.

Tabela 2 – Parâmetros relativos à curva analítica do método analítico para quantificação de pregabalina em plasma de rato por UFLC-MS/MS na faixa de concentração de 10 a 6250 ng/mL de plasma

| Parâmetro | Valor |
|--------------------------------------|--------------|
| Coeficiente angular (a) | 0,0022 |
| Coeficiente linear (b) | 0,0186 |
| Coeficiente de correlação linear (r) | 0,9944 |

Fonte: Da autora

Figura 18 – Curva analítica da pregabalina em plasma de rato



Fonte: Da autora

Nota: A curva analítica da pregabalina em plasma de rato foi plotada em concentração em plasma versus área relativa, que é o sinal obtido pelo cromatograma.

6.9.2 Limite inferior de quantificação (LIQ)

O limite de quantificação obtido na metodologia desenvolvida foi de 10 ng/mL de plasma (foi o primeiro ponto incluído na curva), com coeficiente de variação inferior a 20% para precisão e exatidão, que é o critério para aceitação do valor estabelecido pela ANVISA, conforme Tabela 3.

Tabela 3 – Limite inferior de quantificação para a pregabalina

| PREGABALINA | | | |
|--------------|---------------------|---------------------------|-------|
| LIQ(10ng/mL) | Intracorrída n=6 | Precisão (CV%) | 19,69 |
| | | Exatidão (Inexatidão%) | 3,75 |
| | Intercorrída n=3 | Precisão (CV%) | 15,65 |
| | | Exatidão (Inexatidão%) | -5,81 |

Fonte: Da autora

Legenda: CV = coeficiente de variação $[(SD/média) \times 100]$
 $\% \text{ Inexatidão} = [(C_{\text{obs}} - C_{\text{adicionada}}) / C_{\text{adicionada}}] \times 100$

6.9.3 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção estimado foi de 0,29ng/mL e foi calculado de acordo com o descrito em 5.3.4.3, sendo o valor adequado ao intervalo terapêutico.

6.9.4 Efeito residual

O efeito residual foi testado fazendo-se uma injeção da amostra branco, duas injeções do limite superior de quantificação e em seguida uma injeção da amostra branco (BRASIL, 2012).

Por este teste foi possível observar que a pregabalina não apresentou *carryover* significativo

6.9.5 Efeito matriz

Foi avaliado o efeito matriz para o controle de qualidade baixo (CQB) e para o controle de qualidade alto (CQA). Por este teste foi possível observar que a pregabalina não sofre efeito matriz, já que os coeficientes de variação (para CQB foi de 14,78% e para CQA foi de 9,14%) estão dentro dos limites aceitáveis pela RDC 27/2012.

6.9.6 Precisão e exatidão intra e intercorridas

Foi determinada a precisão e exatidão intra e intercorridas (Tabela 4) para os controles (baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA)) e para o LIQ. Os resultados de precisão e exatidão estão de acordo com os valores aceitos pela RDC 27/2012, (até 15% de variação) mostrando que o método é preciso e exato.

Tabela 4- Precisão e exatidão intracorridas e intercorridas referente ao método analítico para quantificação de pregabalina em plasma de rato

| | | CQB | CQM | CQA |
|-----------------------|------------------------------------|------------|------------|------------|
| Intracorrida (n=6) | Precisão (CV%) | 9,67 | 10,96 | 10,33 |
| | Exatidão (Inexatidão %) | 10,35 | -8,94 | 14,53 |
| Intercorrida (n=3) | Precisão (CV%) | 13,48 | 11,72 | 12,96 |
| | Exatidão (Inexatidão %) | 3,42 | -1,71 | -0,46 |

Fonte: Da autora

Legenda: CV = coeficiente de variação $[(SD/média) \times 100]$

% Inexatidão = $[(C_{obs} - C_{adicionada}) / C_{adicionada}] \times 100$

6.9.7 Estabilidade

A estabilidade é o parâmetro que visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado numa dada matriz sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo (BRASIL, 2012).

A estabilidade do fármaco em líquidos biológicos depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica e do material de acondicionamento utilizado. Deve ser avaliada a estabilidade do analito durante o manuseio da amostra, após armazenagem de longa duração (congelamento) e curta duração (à temperatura ambiente), após ciclos de congelamento e descongelamento e nas condições de análise (BRASIL, 2012).

6.9.7.1 Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração foi determinada em duas concentrações, CQA e CQB, em triplicata para a pregabalina. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente (24°C) por 4 horas. Após este período, as amostras foram processadas e analisadas. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos de amostras recém-preparadas (RP) e analisadas imediatamente.

As amostras mostraram-se estáveis em ambas as concentrações, baixa e alta, com desvios de 5,46% e 1,84%, respectivamente, sendo que variação de até 15% seria permitida.

6.9.7.2 Estabilidade pós-processamento

As amostras avaliadas no teste de estabilidade pós-processamento foram preparadas e extraídas, ficando acondicionadas em temperatura ambiente (24°C) por 4 horas. As amostras mostraram-se estáveis, com desvios abaixo de 15%, em ambas as concentrações, baixa e alta, com desvios de 11,54% e 3,97%, respectivamente, sendo que variação de até 15% era permitida.

6.9.7.3 Estabilidade após ciclos de congelamento e estabilidade de longa duração

Uma vez que Dzygiel e Fraier (2011) afirmam que a pregabalina é estável em três concentrações (150, 2000 e 9000ng/mL de plasma) após três ciclos de congelamento e descongelamento, este estudo não foi realizado, pois contempla a faixa que utilizamos.

Os estudos de estabilidade de longa duração não tiveram a necessidade de realização, pois as amostras foram obtidas e quase imediatamente analisadas não ficando armazenadas por tempo superior ao realizado em ciclos de congelamento e descongelamento.

6.10 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O MÉTODO DESENVOLVIDO

O método desenvolvido para análise de pregabalina em plasma de rato demonstrou linearidade com r^2 maior que 0,99 (Tabela 2 e Figura 18); o intervalo linear abrange as concentrações experimentais encontradas em plasma de rato. Os CV obtidos nos estudos de precisão e exatidão inter e intracorridas (Tabela 4) estão de acordo com os parâmetros de aceitação recomendados pela ANVISA assegurando a repetibilidade e acurácia dos resultados.

O limite inferior de quantificação do fármaco é um parâmetro de importância significativa, uma vez que foi administrada dose única de pregabalina ou suas associações e se mostrou adequado ao método. Para estudos de farmacocinética, é necessário que o método seja preciso e exato, e com valores de LIQ (10ng/mL de plasma), adequados e suficientes para tal estudo, como o apresentado pelo método desenvolvido e validado.

Os estudos de estabilidade (item 6.8.6) asseguraram que as amostras são estáveis à curta duração e pós-processamento e ainda, de acordo com dados da

literatura, apresentam-se estáveis após ciclos de congelamento/descongelamento (DZYGIEL; FRAIER, 2011).

Os resultados de efeito matriz (item 6.8.4) demonstram que a matriz biológica não exerce efeito na resposta do analito e PI. O item 6.8.3 demonstra a ausência do efeito *carryover* significativo na metodologia desenvolvida.

Na análise cromatográfica da pregabalina (Figura 17) o analito apresenta tempo de retenção distinto e com resolução adequada do PI. Mesmo que não houvesse boa resolução, na cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas entre o analito e o PI, isto não interferiria na quantificação e identificação, pois as áreas são mensuradas de acordo com a relação massa/carga (m/z) de cada analito.

O preparo de amostra em matriz biológica é etapa crítica para uma adequada quantificação do analito e para eliminar interferentes da matriz diminuindo assim os efeitos da mesma na análise cromatográfica. O método de precipitação de proteínas (1:1,5 parte de plasma/parte de metanol) associado à centrifugação de maior intensidade, se apresentou eficiente em eliminar as proteínas, que seriam incompatíveis com sistema cromatográfico e coluna. Outras vantagens deste método de preparo de amostra são: simplicidade, rapidez necessária para utilização em estudos com grande volume de amostras e baixo consumo de solventes orgânicos.

O método cromatográfico desenvolvido, apesar de ter tempo de análise por amostra ($t=8\text{min}$) maior que outros publicados na literatura, como Dahl, Olsen e Stand (2012) e Karinen et al. (2014) tem limite de detecção e quantificação mais baixos, que foram necessários em nossa metodologia, de administração oral me dose única a ratos.

6.11 ANÁLISE FARMACOCINÉTICA

As amostras de plasma obtidas experimentalmente foram tratadas conforme metodologia analítica desenvolvida e validada para a pregabalina.

Na Tabela 5 estão expressos os valores calculados dos parâmetros mostra os parâmetros farmacocinéticos avaliados para pregabalina e pregabalina e suas associações com amitriptilina e duloxetina.

Tabela 5 – Parâmetros farmacocinéticos estimados após administração oral de pregabalina (10mg/kg), pregabalina (10mg/kg) + amitriptilina (1mg/kg), pregabalina (10mg/kg) + duloxetina (30mg/kg) em ratos (n=6). Dados expressos como mediana, IC 95%

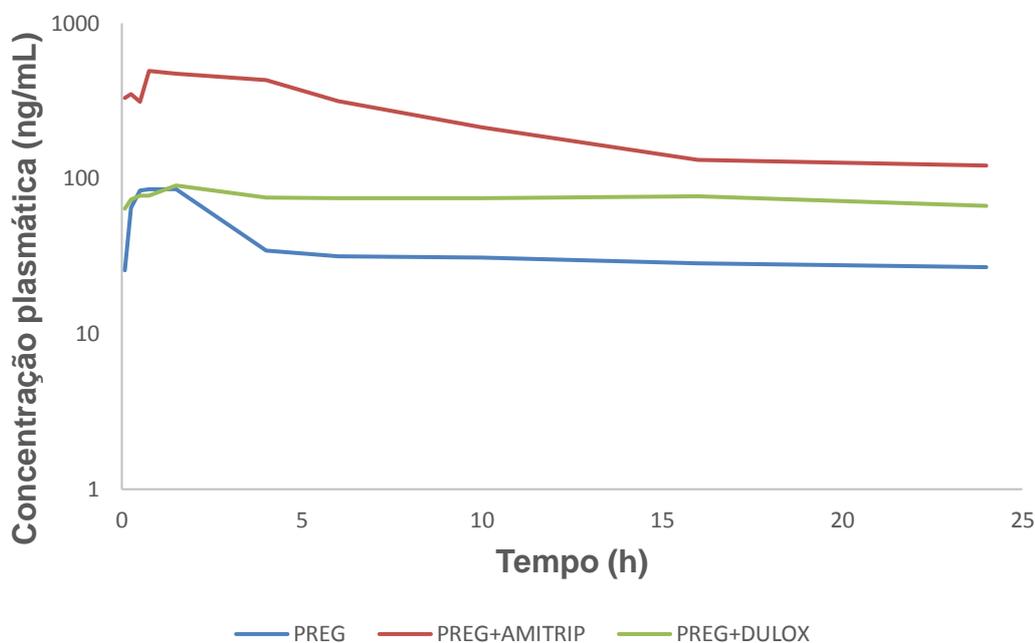
| Parâmetro | Pregabalina | Pregabalina + Amitriptilina | Pregabalina + Duloxetina |
|--------------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| AUC (h.ng/mL) | 1717,0 (1049,5-2926,3) | 8190,0* (3654,9-12348,0) | 3550,8 (897,3-7800,1) |
| Cl _T /f (L/h/kg) | 5854,0 (3882,7-7395,5) | 1304,0* (353,24-4664,4) | 3145,0 (1067,9-6070,6) |

Fonte: Da autora

Legenda: *Teste de Mann-Whitney, bicaudal, p<0,05

Os perfis de concentração plasmática em função do tempo estão representados nas Figura 19. Para o estudo farmacocinético da pregabalina e das suas associações, o modelo que melhor se adequou foi o monocompartimental.

Figura 19 - Curvas de concentração plasmática em função do tempo pregabalina (azul), pregabalina + amitriptilina (vermelho), pregabalina + duloxetina (verde) (representadas pela média dos dados obtidos neste grupo)



Fonte: Da autora

Conforme pode ser verificado na Tabela 5, houve diferença estatística significativa quando pregabalina foi associada com a amitriptilina e não houve quando associada a duloxetina. Isto também pode ser observado no perfil farmacocinético médio (FIGURA 19). O perfil de associação PREG+AMITRIP teve aumento de $AUC^{0-\infty}$ de 4,8 vezes em relação ao grupo PREG. Este dado pode auxiliar no entendimento do resultado observado no Gráfico 13, onde somente o grupo PREG+AMITRIP apresentou o efeito antinociceptivo no tempo de 8h pós-administração de PREG.

Uma vez que a PREG não é metabolizada *in vivo*, de acordo com Einarsdottir e Bjorsson (2008) por enzimas do CYP, a maior parte da dose é excretada inalterada na urina, segundo Ranitdis et al. (2003), sua absorção se dá pelo sistema L- transportador, conforme Bockbrader et al. (2010) e ainda pelos canais para sódio presentes na membrana apical do intestino, em conformidade com Piyapolrunroj et al. (2001) e Su et al. (2005), não é transportada pela glicoproteína-P (P-gP), como observado por Chan et al. (2014), não há muitas possibilidades de interação farmacocinética entre PREG

e AMITRIP, pois a AMITRIP é metabolizada por diversas isoformas do CYP, majoritariamente CYP2C19 e CYP2D6, segundo Shen et al. (2010), substrato da P-gP, como observado por De Klerk et al. (2013) e é excretada como metabólitos inativos na urina (MUÑOZ; ALAMO, 2009).

Os dados da literatura mostram que ambas substâncias PREG e AMITRIP tem sua excreção renal reduzida com o avanço da idade, como pode ser observado por Murphy (2005) e Italiano e Peruca (2013), sendo que para ambas, portanto é recomendada a redução de dose a idosos. Sendo este então o ponto convergente dos fármacos, a competição por reabsorção/excreção renal pode ser o motivo de acúmulo de PREG.

Estes achados (efeito biológico duradouro e aumento de AUC da pregabalina) de nosso estudo, mostraram vantagem na associação de PREG+AMITRIP e estão em acordo com dados da literatura que mostram que indivíduos com dor neuropática associada ao câncer mostraram redução significativa da dor quando pregabalina foi associada a amitriptilina (MISHRA et al, 2012).

Uma vez que as substâncias não atuam nos mesmo locais para redução de nocicepção, os benefícios podem ser atribuídos à alteração da disposição cinética da pregabalina quando coadministrada com adjuvante no tratamento da dor.

7 CONCLUSÕES

Através dos testes de von Frey de filamentos, foi possível avaliar o efeito biológico dos perfis medicamentosos pregabalina, amitriptilina, duloxetina, pregabalina + amitriptilina e pregabalina + duloxetina. Das monoterapias, apenas a pregabalina apresentou efeito antinociceptivo significativo quando comparado com o veículo. Além disso, as duas associações também apresentaram efeitos antinociceptivos significativos quando comparados com o grupo veículo. As associações PREG+AMITRIP e PREG+DULOX se mostraram significativamente menos eficaz que PREG 4 horas após a administração dos fármacos. No entanto, a associação de pregabalina e amitriptilina apresentou um efeito antinociceptivo prolongado, estendido até 8 horas após a administração, com relação à pregabalina em monoterapia.

Apenas os animais falso-operados do grupo PREG e PREG+DULOX apresentaram efeito hipalgésico, ou seja, aumento do limiar nociceptivo, quando comparados com o grupo veículo. Além disso, o grupo PREG+DULOX apresentou efeito hipalgésico prolongado quando comparado ao grupo PREG.

Apesar dos animais dos grupos PREG, PREG+AMITRIP e PREG+DULOX (operados e *sham*) terem apresentado sonolência como efeito colateral das substâncias, pela interação com diferentes receptores, discutidos anteriormente, o comportamento motor (avaliado pelo teste Rota-Rod) não foi afetado, pois os animais submetidos ao teste conseguiram caminhar sobre o equipamento pelo tempo proposto (2 minutos), sendo possível concluir que o retardo na retirada da pata frente ao estímulo mecânico ocorreu decorrente dos efeitos das substâncias antinociceptivas testadas, em animais *sham*, uma vez que se os animais estivessem operados não conseguiriam executar o teste. Além disso, foi possível observar que os efeitos colaterais se mantiveram para as monoterapia e para a associação.

Sendo assim, por este estudo foi possível observar que o tratamento mais eficaz para a dor neuropática induzida por lesão no nervo ciático foi a associação de pregabalina com amitriptilina, por maior eficácia e prolongamento do efeito. Além disso, apesar da amitriptilina possuir diversos efeitos colaterais, por ter afinidade por uma grande variedade de receptores, a associação tem custo reduzido, em relação a associação PREG+DULOX, mesmo a duloxetina

apresentando uma menor quantidade de efeitos colaterais, o que pode apresentar uma grande vantagem para o paciente em condição de dor neuropática.

O método desenvolvido para análise da pregabalina em plasma de ratos foi sensível, linear, preciso e exato, de acordo com a legislação brasileira vigente, Brasil (2012) e tem limites aplicáveis a estudo farmacocinéticos de dose única por via oral.

Há uma possível ligação entre o prolongamento do efeito biológico da associação entre PREG+AMITRIP e a disposição cinética observada da pregabalina em monoterapia e associação. Houve redução do *clearance* total aparente e consequente aumento de biodisponibilidade de pregabalina quando em associação. Uma vez que não há possível mecanismo descrito para esta alteração, este dado deverá ser melhor avaliado para elucidação do mecanismo de modificação da disposição cinética.

REFERÊNCIAS ¹

ABAUT, A.Y.; CHEVANNE, F.; LE CORRE, P. Oral bioavailability and intestinal secretion of amitriptyline: role of P-glycoprotein? **International Journal of Pharmaceutics**, India, v. 330, p. 121-128, 2007.

ACHAR, A. et al. Comparative study of clinical efficacy of amitriptyline and pregabalin in postherpetic neuralgia. **Acta Dermatovenerologica Croatica**, Croatia, v. 20, n. 2, 2012.

AKAMINE, T. et al. Dosing time-dependent changes in the analgesic effect of pregabalin on diabetic neuropathy in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, Maryland, v. 354, p. 65-72, 2015.

AUSTIN, P.J.; WU, A.; MOALEM-TAYLOR, G. Chronic Constriction of the sciatic nerve and pain hypersensitivity testing in rats. **Journal of Visualized Experiments**, Cambridge, Massachusetts, v. 61, 2012.

AYDOĞAN, H. et al. Adição de 75 mg de pregabalina ao regime analgésico reduz escores de dor e consumo de opiáceos em adultos após nefrolitotomia percutânea. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Rio de Janeiro 2014.

BRAWEK, B. et al. Effects of gabapentin and pregabalin on K⁺-evoked 3H-GABA and 3H-glutamate release from human neocortical synaptosomes. **Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, Germany, v. 379, p. 361–369, 2009.

BELLORIO, K.B. et al. Estudo de bioequivalência entre duas formulações de pregabalina 150mg cápsulas em voluntários saudáveis. **Revista Brasileira de Medicina**, Goiania, Goiás, v. 71, n. 6/7, p. 188-192, 2014.

BENDER, G. et al. Population pharmacokinetic model of the pregabalin-sildenafil interaction in rats: application of simulation to preclinical PK-PD study design. **Pharmaceutical Research**, Leiden, Netherlands, v. 20, n. 10, 2009.

¹ Este trabalho foi escrito conforme o Manual de normalização para elaboração de trabalhos acadêmicos, dissertações e teses da UNIFAL – MG (2006).
Disponível em < http://www.unifal-mg.edu.br/bibliotecas/system/files/imce/Gerais/manual_para_normalizacao_da_Unifal-MG-nov-2006.pdf>.

BENNET, G.J.; XIE, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, Bethesda, v. 33, p. 87-107, 1988.

BEN-MENACHEM, E. Pregabalin pharmacology and its relevance to clinical practice. **Epilepsia**, Göteborg, Sweden, n. 45, suppl. 6, p. 13-18, 2004.

BESSION, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet**, Paris, France, v. 353, p. 1610-1615, 1999.

BOCKBRADER, H. et al. A comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of pregabalin and gabapentin. **Clinical Pharmacokinetics**, Michigan, USA, v. 49, p. 661-669, 2010.

BOROUJERDI, M. Noncompartmental approach in pharmacokinetics based on statistical moments. **Pharmacokinetics: Principles and applications**. New York: Mc Graw-Hill, cap. 17, p. 331-341, 2002.

BOURDET, D.L. et al. Prediction of human serotonin and norepinephrine transporter occupancy of duloxetine by pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in the rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, South San Francisco, USA, v. 341, n. 1, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 27, de 17 de maio de 2012**. Brasília, DF. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html>. Acesso em: 02 set.2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Cuidados paliativos oncológicos: controle da dor**. Rio de Janeiro: INCA, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Norma da direção-geral da saúde – terapêutica da dor neuropática: Norma nº 043/2011**. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0432011-de-23122011-jpg.aspx>>. Acesso em: 24 set.2014.

BURVIN, R.; ZLOCZOWER, M.; KARNIELLI, E. Double-vein jugular/inferior vena cava clamp technique for long-term in vivo studies in rats. **Physiology & Behavior**, Haifa, Israel, v. 3, n. 4, p. 511-515, 1998.

CASEY, K.L. The imaging of pain: background and rationale, em: CASEY, K.L.; BUSHNELL, M.C. (Eds.), **Pain Imaging**, USA, p. 1 –29, 2000.

CHAHBOUNI, A. et al. Rapid quantification of gabapentin, pregabalin, and vigabatrin in human serum by ultraperformance liquid chromatography with mass-spectrometric detection. **Therapeutic Drug Monitoring**, Amsterdam, Netherlands, v. 35, n. 1, 2013.

CHAE, J.W. et al. Quantitative determination of duloxetine and its metabolite in rat plasma by HPLC-MS/MS. **Biomedical Chromatography**, Daejeon, Korea, v. 27, p. 953–5, 2013.

CHAKR, R. M. S; BRENOL, J. C. T. **Efeitos da terapia cognitivo-comportamental na responsividade nociceptiva de mulheres com fibromialgia**. 2011. 79f. Dissertação (mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2011.

CHAN, P.S. et al. *In vitro* transport assays of rufinamide, pregabalin, and zonisamide by human P-glycoprotein. **Epilepsy Research**, Hong Kong, China, v. 108, n. 3, p. 359-366, 2014.

CHAPPMAN, CR. Psychological factors in postoperative pain and their treatment. Em: Smith G, Covino BG (eds.) **Acute Pain**, Butterworths, London, 1985.

CHEN, L.; MAO, J. Update on neuropathic pain treatment: ion channel blockers and gabapentinoids. **Current Pain Headache Report**, Boston, MA, USA, v. 17, n. 359, 2013.

CORTEZ, J. et al. Prevalência da dor neuropática e fatores associados em portadores de diabetes mellitus tipo 2 atendidos em ambulatório médico. **Revista Dor**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 256-259, 2014.

DAHL, S.R.; OLSEN, K.M.; STRAND, D.H. Determination of gamma-hydroxybutyrate (GHB), beta-hydroxybutyrate (BHB), pregabalin, 1,4-butane-diol (1,4BD) and gamma-butyrolactone (GBL) in whole blood and urine samples by UPLC-MSMS. **Journal of Chromatography B**, Oslo, Norway, v. 885-886, p. 37-42, 2012.

DAVIES, A. et al. Functional biology of the alpha(2)delta subunits of voltage-gated calcium channels. **Trends Pharmacological Science**, London, UK, v. 28, 2007.

DAVIS, K.D.; MOAYEDI, M. Central mechanisms of pain revealed through functional and structural MRI. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, Toronto, Canada, v. 8, p. 518-534, 2013.

DE KLERK, O.L. et al. ABCB1 gene variants influence tolerance to selective serotonin reuptake inhibitors in a large sample of dutch casa with major depressive disorder. **Pharmacogenomics Journal**, New York, USA, v. 13, n. 4, p. 349-353, 2013.

DE SANCTIS-BRIGGS, V. et al. Eficacia y tolerancia de la pregabalina em eltratamientodeldolor neuropático. Estudio multicéntrico. **Revista de la Sociedad Española del Dolor**, Madrid, España, v. 18, n. 5, p. 267-275, 2011.

DETLOFF, M.R. et al. Validity of acute and chronic tactile sensory testing after spinal cord injury in rats. **Experimental Neurology**, Ohio, USA, v. 225, n. 2, p. 366-376, 2010.

DILSAVER, S.C.; SNIDER, R.M.; ALESSI, N.E. Amitriptyline supersensitizes a central cholinergic mechanism. **Biological Psychiatry**, Washington, DC, USA, v. 22, p. 495-507, 1987.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note of a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of American Pharmaceutical Association**, Washington, DC, USA, v. 46, n. 3, p. 208-209, 1957.

DZYGIEL, P.; FRAIER, D. Simultaneous determination of pregabalin, sildenafil and its active metabolite in rat plasma utilizing SPE followed by LC-MS-MS. **Chromatographia**, USA, n. 73, p. 1177-1182, 2011.

EINARSDOTTIR, S.; BJORNSSON, E. Pregabalin as a probable cause of acute liver injury. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, Gothenburg, Sweden, v. 20, p. 1049, 2008.

FEHRENBACHER, J.C.; TAYLOR, C.P.; VASKO, M.R. Pregabalin and gabapentin reduce release of substance P and CGRP from rat spinal tissues

only after inflammation or activation of protein kinase C. **Pain**, Indianapolis, IN, USA, v. 105, p. 133-41, 2003.

FIELD, M. et al. Identification of the alpha2- delta-1 subunit of voltage-dependent calcium channels as a molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Seattle, WA, USA, v. 103, p. 17537–17542, 2006.

FIELD, M. et al. Pregabalin may represent a novel class of anxiolytic agents with a broad spectrum of activity. **British Journal of Pharmacology**, Cambridge, England, v. 132, p. 1–4, 2001.

FINNERUP, N.B. et al. Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. **Pain**, Denmark, v. 118, p. 289-305, 2005.

GAHIMER, J. et al. A retrospective pooled analysis of duloxetine safety in 23,983 subjects. **Current Medical Research Opinion**, Indianapolis, USA, v. 23, n. 1, p. 175-184, 2007.

GAJRAJ, N. Pregabalin: its pharmacology and use in pain management. **Anesthesia & Analgesia Journal**, Texas, USA, v. 105, p. 1805–1815, 2007.

GENESIS MEDICAL CLINIC. **Pain management**, 2013. Disponível em: <<http://mygenesismedical.com/the-gate-control-theory-of-chronic-pain/>>. Acesso em: 05/07/2016.

GEREAU, R.W. et al. A pain research agenda for the 21st century. **The Journal of Pain**, USA, v. 15, n. 12, p. 1203-1214, 2014.

GILRON, I. et al. Nortriptyline and gabapentin, alone and in combination for neuropathic pain: a double-blind, randomised controlled crossover trial. **Lancet**, Kingston, ON, Canada, v. 374, p. 1252-1261, 2009.

GOLD, M.S.; GEBHART, G.F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. Focus in pain. **Nature Medicine**, Pennsylvania, USA, v. 16, p. 1248-1257, 2010.

GOLDSTEIN, D.J. et al. Duloxetine in the treatment of depression: A double-blind placebo-controlled comparison with paroxetine. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, Indianapolis, USA, v. 24, n. 4, p. 389–399, 2004.

GOSLING, A.P. Mecanismos de ação e efeitos da fisioterapia no tratamento da dor. **Revista Dor**, v.13, n.1, p.65-70, São Paulo, jan-mar. /2013.

GRAVA, A.L.S. et al. Tratamento farmacológico da hiperalgesia experimentalmente induzida pelo núcleo pulposo. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, Brasil, v. 45, n. 6, p. 569-576, 2010.

GUSMAN, A.C. et al. A dor e o controle do sofrimento. **Revista de Psicofisiologia**, Belo Horizonte, Brasil, v. 1, n. 1, 1997.

GUJRAL, R.S.; HAQUE, S.M.; SHANKER, P. Development and validation of pregabalin in bulk, pharmaceutical formulations and in human urine samples by UV spectrophotometry. **International Journal of Biomedical Science**, India, v. 5, n. 2, p. 175-180, 2009.

HAHM, T.S. et al. Combined carbamazepine and pregabalin therapy in a rat model of neuropathic pain. **British Journal of Anaesthesia**, Oxford, England, v. 109, n. 6, p. 968-974, 2012.

HINDMARCH, I. et al. A double-blind, placebo- and positive-internal controlled (alprazolam) investigation of the cognitive and psychomotor profile of pregabalin in healthy volunteers. **Psychopharmacology (Berl)**, Surrey, v. 183, p. 133–143, 2005.

HUCKER, H.B. et al. Urinary metabolites of amitriptyline in the dog. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, USA, v. 5, p. 132-142, 1977.

HURLEY, R.W.; ADAMS, M.C.B.; BENZON, H.T. Neuropathic pain: treatment guidelines and updates. **Current Opinion Anesthesiology**, Florida, USA, v. 26, n. 5, 2013.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Relieving Pain in America: A Blueprint for Transforming Prevention, Care, Education, and Research**. Washington (DC):The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health; 2011.

ITALIANO, D.; PERUCCA, E. Clinical pharmacokinetics of new-generation antiepileptic drugs at the extremes of age: an update. **Clinical Pharmacokinetics**, Switzerland, v. 52, n. 8, p. 627-645, 2013.

IYENGAR, S. et al. Efficacy of duloxetine, a potent and balanced serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor in persistent pain models in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, USA, v. 311, n. 2, p. 576-584, 2004.

JANG, S.W. et al. Amitriptyline is a TrkA and TrkB receptor agonist that promotes TrkA/TrkB heterodimerization and has potent neurotrophic activity. **Chemistry & Biology**, Atlanta, v. 16, p. 644–656, 2009.

KARINEN, R. et al. Determination of a selection of anti-epileptic drugs and two active metabolites in whole blood by reversed phase UPLC-MS/MS and some examples of application of the method in forensic toxicology cases. **Drug Testing and Analysis**, Oslo, Norway, v. 7, n. 7, p. 634-644, 2015.

KAUTIO, A. L. et al. Amitriptyline in the treatment of chemotherapy-induced neuropathic symptoms. **Journal of Pain Symptom Management**, Helsinki, Finland, v. 35, p. 31-39, 2008.

KISS, G. Drug therapy of neuropathic pain based on the latest recommendations. **Ideggyogy Sz**, Hungary, v. 68, n. 3-4, p. 93-98, 2015.

KRELING, M.C.G.D.; CRUZ, D.A.L.M.; PIMENTA, C.A.M. Prevalência de dor crônica em adultos. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, DF, Brasil, v. 59, n. 4, p. 509-13, jul-ago /2006.

KUGLER, A.R. et al. Pregabalin overview: a novel CNS-active compound with anticonvulsant activity. Poster presented at the **Annual Meeting of the American Epilepsy Society**, Seattle, Washington, December 6–11, 2002.

KUMAR, N. et al. Evidence that pregabalin reduces neuropathic pain by inhibiting the spinal release of glutamate. **Journal of Neurochemistry**, Montreal, Canada, v. 113, p. 552-561, 2010.

LANNEAU, C. et al. Gabapentin is not a GABAB receptor agonist. **Neuropharmacology**, Harlow, UK, v. 41, p. 965-75, 2001.

LANTZ, R.J. et al. Metabolism, excretion and pharmacokinetics of duloxetine in healthy human subjects. **Drug Metabolism and Disposition**, Indianapolis, USA, v. 31, p. 1142–50, 2003.

LEE, S. Pregabalin intoxication-induced encephalopathy with triphasic waves. **Epilepsy & Behavior**, Bethesda, USA, v. 25, p. 170–173, 2012.

LEUCHT, C.; HUHN, M.; LEUCHT, S. Amitriptyline versus placebo for major depressive disorder. **Cochrane Database Systematic Review**, Germany, v. 12, 2012.

LI, H. et al. Pharmacokinetics and safety of duloxetine enteric-coated tablets in Chinese healthy volunteers: a randomized, open-label, single- and multiple-dose study. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, Korea, v. 11, p. 28–33, 2013.

LI, S.S. et al. Involvement of spinal microglia and interleukin-18 in the anti-nociceptive effect of dexmedetomidine in rats subjected to CCI. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, Netherlands, v. 560, p. 21-25, 2014.

LOESER, J.D.; TREEDE, R-D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, Durham, USA, v. 137, p. 473-477, 2008.

LUNN, M.P.T.; HUGHES, R.A.C.; WIFFEN, P.J. Duloxetine for treating painful neuropathy, chronic pain or fibromyalgia (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Germany, v. 1, 2014.

LYNN, R.B. Mechanisms of esophageal pain. **American Journal of Medicine**, Amsterdam, Netherlands, v. 92, p. 11s-19s, 1992.

MARTIN, J.H. **Neuroanatomia: texto e atlas**. 2. ed. Tradução Antônio Carlos Huf Marrone; Felipe Luís Schneider; Mauro Guidotti Aquini. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998, p. 148.

MARTÍNEZ, L.C. et al. Eficacia analgésica de La asociación duloxetina más pregabalina em el dolor neuropático: experiência em 60 casos. **Revista de la Sociedad Española del Dolor**, Madrid, España, v. 16, n. 7, p. 381-385, 2009.

MELZACK, R.; WALL, P.D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, Philadelphia, USA, 1965.

MENDLIK, M.T.; URITSKY, T.J. Treatment of neuropathic pain. **Current Treatment Options in Neurology**, Bethesda, USA, v. 17, n. 50, 2015.

MENSE, S. Basic neurobiologic mechanisms of pain and analgesia. **American Journal of Medicine**, Amsterdam, Netherlands, v. 75, p. 4-14, 1983.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **IASP Press**, Seattle, 2.ed., 1994.

MICÓ, J.A. et al. Antidepressants and pain. **Trends in Pharmacological Science**, Riverport Lane, USA, v. 27, p. 348–354, 2006.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, Pittsburgh, Pennsylvania, U.S.A, v. 66, p. 355-374, 2002.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review, **Progress in Neurobiology**, Pittsburgh, Pennsylvania, U.S.A, v. 57, p. 1-164, 1999.

MISHRA, S. et al. A comparative efficacy of amitriptyline, gabapentin, and pregabalin in neuropathic cancer pain: a prospective randomized double-blind placebo-controlled study. **American Journal of Hospice Palliative Care**, USA, v. 29, p. 177-182, 2012.

MOORE, R.A. et al. Amitriptyline for neuropathic pain in adults. **Cochrane Database of Reviews**, Germany, v. 7, 2015.

MORPHY, R.; RANKOVIC, Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, DC, USA, v. 48, p. 6523–43, 2005.

MUÑOZ, F.L.; ALAMO, C. Monoaminergic Neurotransmission: The History of the Discovery of Antidepressants from 1950s Until Today. **Current Pharmaceutical Design**, Madrid, Spain, v. 15, p. 1563-1586, 2009.

MURAI, N. et al. AS1069562, the (+)-isomer of indeloxazine, but not duloxetine has a curative-like analgesic effect in a rat model of streptozocin-induced diabetic neuropathy. **Neuropharmacology**, Amsterdam, Netherlands, v. 79, p. 10-16, 2014.

MURPHY, E.J. Acute pain management pharmacology for the patient with concurrent renal or hepatic disease. **Anaesthesiology Intensive Care**, Perth, Australia, v. 33, n. 3, p. 311-322, 2005.

NAM, Y. et al. Single-dose, randomized, open-label, 2-way crossover study of the pharmacokinetics of amitriptyline hydrochloride 10- and 25-mg tablet in healthy male Korean volunteers. **Clinical Therapeutics**, Amsterdam, Netherlands, v. 37, n. 2, 2015.

NASCIMENTO, F.E. **Determinação da amitriptilina e do seu metabólito nortriptilina em sangue por CG/MS**. 2011.116f. Dissertação (mestrado em química com área de especialização em química forense) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2011.

NATHAN, P.W. Pain. **British Medical Bulletin**, Oxford, UK, v. 33, p. 149-156, 1977.

NGUYEN, T. et al. Discovery of a novel member of the histamine receptor family. **Molecular Pharmacology**, Bethesda, USA, v. 59, p. 427–433, 2001.

NOBAK, C.R.; STROMINGER, N.L.; DEMAREST, R.J. **Neuroanatomia: estrutura e função do Sistema Nervoso humano**. 5.ed. Tradução: Ivone Castilho Benedetti; Terezinha Oppido. São Paulo: Editorial Premier, 1999.

OKADA, M. et al. Tratamento da dor em pediatria. **Revista Médica**, v.80 (ed. esp. pt.1), p.157-69, São Paulo, 2001.

OKAZAKI, R. et al. Combined antiallodynic effect of Neutropin® and pregabalin in rats with L5-spinal nerve ligation. **Life Science**, Ohio, USA, v. 92, p. 259-265, 2013.

ÖNALL, A.; SAGIRLI, O. Spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for the determination of pregabalin in bulk and pharmaceutical preparation. **Spectrochimica Acta A**, Amsterdam, Netherlands, v. 72, p. 68-71, 2009.

PANCRAZIO, J.J. et al. Inhibition of neuronal Na⁽⁺⁾ channels by antidepressant drugs. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, USA, v. 284, p. 208-214, 1998.

PARK, S. et al. Pregabalin and gabapentin inhibit substance P-induced NF-kappa β activation in neuroblastoma and glioma cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, New Jersey, USA, v. 105, p. 414-23, 2008.

PAULO, J.M.R.; RAMOS, M.N. **As vivências da dor e do sofrimento na pessoa com doença oncológica em tratamento paliativo**. 2006.183f. Dissertação (mestrado em comunicação em saúde) – Universidade Aberta, Lisboa, 2006.

PEGG, D. et al. Hemangiosarcoma in mice administered pregabalin: analysis of genotoxicity, tumor incidence, and tumor genetics. **Toxicological Science**, Oxford, UK, v. 128, n. 1, p. 9-21, 2012.

PÉREZ-CAJARAVILLE, J. et al. Nuevas perspectivas em el tratamiento del dolor neuropático:duloxetina. **Revista de la Sociedad Española del Dolor**, Madrid, España, v. 6, p. 421-427, 2006.

PERRET, D.; LUO, Z. Targeting voltage-gated calcium channels for neuropathic pain management. **Neurotherapeutics**, Cambridge, UK, v. 6, p. 679–69, 2009.

PFIZER . **Lyrica® (pregabalin)** [packageinsert].New York: Pfizer Inc., 2005.

PIMENTA, C.A.M. et al. Controle da dor no pós-operatório. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, Brasil, v. 35, n. 2, p. 180-3, jun. 2001.

PIYAPOLRUNGROJ, N. et al. Mucosal uptake of gabapentin (neurontin) vs. pregabalin in the small intestine. **Pharmaceutical Research**, Bethesda, USA, v. 18, p. 1126–1130, 2001.

PUNKE, M.A.; FRIEDERICH, P. Amitriptyline is a potent blocker of human Kv1.1 and Kv7.2/7.3channels. **Anesthesia & Analgesia Journal**, California, USA, v. 104, p. 1256–1264, 2007.

RANDINITIS, E.J. et al. Pharmacokinetics of pregabalin in subjects with various degrees of renal function. **Journal of Clinical Pharmacology**, New York, USA, v. 43, p. 277-83, 2003.

RODRÍGUEZ, C.G. et al. The prevalence and nature of cancer-related neuropathic pain in out-patient services in Spain. **The Open Pain Journal**, Sharjah, UAE, v. 6, p. 199-207, 2013.

ROERIG, J.L. et al. A comparison of duloxetine plasma levels in post bariatric surgery patients versus matched nonsurgical control subjects. **Journal of Clinical Pharmacology**, New York, USA, v. 33, n. 4, p. 479-484, 2013.

ROERIG, J.L. et al. Preliminary comparison of sertraline levels in postbariatric surgery patients versus matched nonsurgical cohort. **Surgery for Obesity and Related Diseases**, New York, USA, v. 8, p. 62Y66, 2012.

RYU, J. et al. Effects of pregabalin on the activity of glutamate transporter type 3. **British Journal of Anaesthesia**, Oxford, UK, v. 109, p. 234–239, 2012.

SATONIN, D.K. et al. Development and validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the determination of the major metabolites of duloxetine in human plasma. **Journal of Chromatography B**, Bethesda, USA, v. 852, p. 582–9, 2007.

SCHESTATSKY, P. Definição, diagnóstico e tratamento da dor neuropática. **Revista HCPA**, Porto Alegre, RS, Brasil v. 28, n. 3, p. 177-187, 2008.

SCHÜNKE, M. **Prometheus, atlas de anatomia: cabeça e neuroanatomia**. Tradução Walter Martin Roland Oelemann. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

SCHWAN, S. et al. A signal for an abuse liability for pregabalin – results from the swedish spontaneous adverse drug reaction reporting system. **European Journal of Clinical Pharmacology**, Berlin, Germany, v. 66, p. 947–953, 2010.

SHEN, Y. et al. Validated LC-MS (ESI) assay for the simultaneous determination of amitriptyline and its metabolite nortriptyline in rat plasma: application to a pharmacokinetic comparison. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Münster, Germany, v. 53, p. 735–739, 2010.

SILLS, M.A.; LOO, P. S. Tricyclic antidepressants and dextromethorphan bind with higher affinity to the phencyclidine receptor in the absence of magnesium and L-glutamate. **Molecular Pharmacology**, Bethesda, USA, v. 36, p. 160–165, 1989.

- SILVA, J.C. et al. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, Brasil, v. 94, n. 1, p. 18-23, 2013.
- SMALLWOOD, R.F. et al. Structural brain anomalies and chronic pain: a quantitative meta-analysis of gray matter volume. **Journal of Pain**, Illinois, USA, v. 14, p. 663-675, 2013.
- SOARES, A.C. et al. Activation of ATP-sensitive K⁺ channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. **European Journal of Pharmacology**, Berlin, Germany, v. 400, p. 67-71, 2000.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE ESTUDOS DA DOR (SBED). Sentir dor não é normal. **Guia da Farmácia**, 2014. Disponível em: <http://dor.org.br/pdf/estudo_sbed_dor.pdf>. Acesso em: 06/10/2014.
- SU, T. et al. Mediation of highly concentrative uptake of pregabalin by L-type amino acid transport in Chinese hamster ovary and Caco-2 cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Bethesda, USA, v. 313, p. 1406–1415, 2005.
- TANENBERG, R.J. et al. Duloxetine, pregabalin, and duloxetine plus gabapentin for diabetic peripheral neuropathic pain management in patients with inadequate pain response to gabapentin: an open-label, randomized, non-inferiority comparison. **Mayo Clinic Proceedings**, Bethesda, USA, v. 86, p. 615-624, 2011.
- TAYLOR, C.P.; ANGELOTTI, T.; FAUMAN, E. Pharmacology and mechanism of action of pregabalin: the calcium channel alpha2- delta (alpha2-delta) subunit as a target for antiepileptic drug discovery. **Epilepsy Research**, Phoenix, USA, v. 73, p. 137-150, 2007.
- TESFAYE, S. et al. Duloxetine and pregabalin: high-dose monotherapy or their combination? The “COMBO-DN study” – a multinational, randomized, double-blind, parallel-group study in patients with diabetic peripheral neuropathic pain. **Pain**, Philadelphia, USA, v. 154, p. 2616-2625, 2013.
- UFSCAR. Laboratório de fisioterapia. **Padronização das doses de ketamina e xilazina como anestésicos em animais**, São Carlos, Brasil, 2015 (não publicado).

VAIDYA, V. V. et al. LC-MS-MS determination of pregabalin in human plasma. **Chromatographia**, Germany, v. 66, p. 925-928, 2007.

VARTANIAN, M. et al. Activity profile of pregabalin in rodent models of epilepsy and ataxia. **Epilepsy Research**, Phoenix, USA, v. 68, p. 189–205, 2006.

VELOSO, C.C. **Avaliação farmacológica de extratos de *Maytenus imbricata* Mart. Ex. Reissek em modelos de inflamação, dor e obesidade**. Belo Horizonte, 2014. Tese (doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, com área de concentração em farmacologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

VERMA, V.; SINGH, N.; JAGGI, A.S. Pregabalin in neuropathic pain: evidences and possible mechanisms. **Current Neuropharmacology**, London, UK, v. 12, p. 44-56, 2014.

VERMEIJ, T.A.C.; EDELBROEK, P.M. Simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of pregabalin, gabapentin and vigabatrin in human serum by precolumn derivatization with o-phthalaldehyde and fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v.810, p.297-303, 2004.

VILELA, F.C. **Efeito antinociceptivo, ansiolítico e antidepressivo dos extratos das partes aéreas de *Sonchus oleraceus***. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, 2008.

VOVK, T.; MARTINC, B.; GRABNAR, I. Simple high-throughput method for determination of pregabalin in pharmaceutical dosage forms using a microplate fluorescence reader. **Scientia Pharmaceutica**, Austria, v. 78, p. 704, 2010.

WALASH, M.I. et al. Simple and sensitive spectrofluorimetric method for the determination of pregabalin in capsules through derivatization with fluoescamine. **Luminescence**, New Jersey, USA, v. 26, p. 342-348, 2011.

WANG, S.Y.; CALDERON, J.; KUO WANG, G. Block of neuronal Na⁺ channels by antidepressant duloxetine in a state-dependent manner. **Anesthesiology**, Washington, DC, USA, v. 113, p. 655–65, 2010.

WASZKIELEWICZ, A.M. et al. Evaluation of anticonvulsants for possible use in neuropathic pain. **Current Medicinal Chemistry**, Sharjah, UAE, v. 18, p. 4344-4358, 2011.

WERLING, L.L. et al. A comparison of the binding profiles of dextromethorphan, memantine, fluoxetine and amitriptyline: treatment of involuntary emotional expression disorder. **Experimental Neurology**, Amsterdam, Netherlands, v. 207, p. 248–257, 2007.

WILLIS, W.D.; WESTLUND, K.N. Neuroanatomy of the pain system that modulate pain, **Journal of Clinical Neurophysiology**, Philadelphia, USA, v. 14, p. 2-31, 1997.

WINGERT, N. R. et al. **Análise quantitativa de duloxetina e 1-naftol por cromatografia eletrocínética micelar**. Trabalho de conclusão da disciplina de estágio curricular em farmácia – departamento de produção e controle de medicamentos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

WONG, D.T. et al. LY248686, a new inhibitor of serotonin and norepinephrine uptake. **Neuropsychopharmacology**, London, UK, v. 8, p. 23-33, 1993.

YAMAMOTO, H. et al. Pharmacological characterization of standard analgesics on mechanic allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats. **Neuropharmacology**, Amsterdam, Netherlands, v. 57, p. 403-408, 2009.

ANEXO - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 670/2015, sob responsabilidade de Vanessa Boralli Marques, referente ao projeto “Influência da duloxetina e amitriptilina na farmacocinética e farmacodinâmica da pregabalina para tratamento da dor crônica em animais”, está em conformidade com o disposto na Lei nº 11.794/08 e nas resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido apreciado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UNIFAL).

Alfenas, 28 de outubro de 2015.

Estela Regina de Oliveira

Prof.^a Dr.^a Estela Regina de Oliveira
Presidente CEUA/UNIFAL