

GUILHERME ABBUD FRANCO LAPIN

**LIDOCAÍNA, BUPIVACAÍNA E ROPIVACAÍNA
SOBRE A QUANTIDADE DO PEPTÍDEO
RELACIONADO COM GENE DE CALCITONINA
E SUBSTÂNCIA P NA PELE INCISADA DE
RATOS.**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.**

**SÃO PAULO
2013**

GUILHERME ABBUD FRANCO LAPIN

**LIDOCAÍNA, BUPIVACAÍNA E ROPIVACAÍNA
SOBRE A QUANTIDADE DO PEPTÍDEO
RELACIONADO COM GENE DE CALCITONINA
E SUBSTÂNCIA P NA PELE INCISADA DE
RATOS.**

**Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo, para obtenção do
Título de Mestre em Ciências.**

ORIENTADOR: Prof.^a Dr.^a LYDIA MASAHO FERREIRA

COORIENTADORES: Prof. Dr. BERNARDO HOCHMAN

Prof. Dr. GERSON CHADI

SÃO PAULO

2013

Lapin, Guilherme Abbud Franco

Lidocaína, bupivacaína e ropivacaína sobre a quantidade do peptídeo relacionado com gene de calcitonina e substância p na pele incisada de ratos / Guilherme Abbud Franco Lapin. – São Paulo, 2013.

xvii, 90p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: Lidocaine, bupivacaine and ropivacaine on the amount of neuropeptides CGRP and SP in incised rat skin.

1. Inflamação Neurogênica. 2. Neuropeptídeos. 3. Substância P. 4. Peptídeo Relacionado com Gene de Calcitonina. 5. Anestésicos Locais. 6. Lidocaína. 7. Bupivacaína. 8. Pele

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA TRANSLACIONAL**

COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

DEDICATÓRIA

À Força Divina que me apoia e me manteve firme e focado nos meus objetivos, não importasse o quão fortes fossem os reveses.

À minha mãe, **ADELE AUGUSTA ABBUD FRANCO LAPIN**, uma mulher admirada pela força dos ideais, senso de justiça e generosidade, por ser minha referência de caráter, honestidade, profissionalismo e, sobretudo, por ter sempre me dado amor e apoio sob quaisquer circunstâncias.

Ao meu pai, **FERNANDO ANTONIO PINHEIRO FRANCO LAPIN**, uma alma evoluída, com uma postura de grande pai e uma educação invejável, por sempre emanar paz, transmitir palavras de carinho, dedicar-me um amor puro e servir sempre uma boa taça de vinho.

Ao meu avô, **MARIO ABBUD**, referência de moral, força, disposição e integridade do alto dos seus 91 anos, por ter me dado o exemplo de trabalho, responsabilidade e senso de família, e também pela eterna alegria, orgulho e segurança que só um grande avô sabe passar para seu neto.

À minha avó, **ESPÉRIA PERISSINOTTI ABBUD**, mulher corajosa que soube enfrentar as dificuldades de uma época para criar seus filhos, por ser a minha segunda mãe, dedicando-me imenso carinho e afeto e por ter me dado um início de infância tão gostosa e saudosa.

À minha avó, **GUIOMAR PINHEIRO FRANCO LAPIN**, uma grande mulher dedicada a aliviar o sofrimento de enfermas de câncer, assim como exemplo de mãe e cidadã, que partiu cedo para apreciar essa dedicatória, mas que tem estado presente na minha vida e me enviado força e orientação de onde ela está hoje.

Ao meu irmão, meus tios, minhas tias e meus primos, por me apoiarem de formas tão diversas, sinceras e espontâneas ao longo da vida.

A todas as pessoas que me amam, que presenciaram as minhas dificuldades durante essa jornada e que foram privadas da minha companhia para que eu contribuísse com esse pequeno passo de ciência.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a **LYDIA MASAKO FERREIRA**, Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da UNIFESP, Coordenadora da Medicina III CAPES, por ter me orientado nesse trabalho como grande cientista, por ter me transmitido ensinamentos como professora exemplar e por ter me dado incentivo como uma mãe. Para a senhora, professora, o meu sincero obrigado.

Ao Prof. Dr. **BERNARDO HOCHMAN**, Professor Orientador do Programa de Cirurgia Translacional da UNIFESP e Professor Afiliado de Cirurgia Plástica da UNIFESP, pelas grandes ideias e capacidade de fazer ciência, por toda dedicação e apoio, pela persistência e bom coração. Ao final desse trabalho, posso chamá-lo de grande amigo.

Ao Prof. Dr. **GERSON CHADI**, Professor Titular do Departamento de Neurologia, Chefe do Laboratório de Fisiopatologia Neurocirúrgica-LIM45 da FMUSP, por ter dado amplo suporte científico e laboratorial para a realização desse trabalho, transpondo barreiras técnicas e financeiras.

À Prof.^a Dr.^a **JESSICA MAXIMINO**, Pesquisadora Científica do Laboratório de Fisiopatologia Neurocirúrgica (LIM-45) da FMUSP, pelo excelente trabalho laboratorial, apoio científico e grande contribuição na realização desse trabalho.

Aos colegas do Programa de Pós Graduação em Cirurgia Translacional da UNIFESP, **PAULO ROGÉRIO QUIEREGATTO, JOSÉ OCTÁVIO GONÇALVES DE FREITAS, ÉRICA CALCAGNO RAIMUNDO DA SILVA**, pelo incentivo, sugestões e críticas.

Aos alunos do Curso de Aperfeiçoamento de Pesquisa Científica em Cirurgia da UNIFESP, **MICHELE AKEMI NISHIOKA, PAOLA MONTEIRO, ARAINY SUÉLYN ANTUNES, SILVILENA BONATI, FELIPE FENELOW, JULIANA BORGES, CÁSSIA SORIANO PONTES**, pelo auxílio em laboratório, apoio e incentivo.

Às secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM, **MARTA REJANE REIS DA SILVA, SANDRA DA SILVA, SILVANA S. OLIVEIRA**, pela paciência, atenção e apoio.

Aos animais de experimentação que concederam as suas vidas para a realização desse estudo.

Os meus **SINCEROS AGRADECIMENTOS** a todos que, direta ou indiretamente, tornaram esse trabalho possível.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP**,
pelo fomento de auxílio à pesquisa concedido à responsável pela proposta,
Prof^a Dr^a Lydia Masako Ferreira, sob número 2012/19163-4.

“Quem só tem o espírito da história não compreendeu a lição da vida e tem sempre de retomá-la. É em ti mesmo que se coloca o enigma da existência: ninguém o pode resolver senão tu!”

Friedrich Nietzsche

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	vii
AGRADECIMENTO ESPECIAL.....	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiv
RESUMO	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	6
3. LITERATURA	8
4. MÉTODOS.....	21
5. RESULTADOS.....	32
6. DISCUSSÃO	36
7. CONCLUSÕES	58
8. REFERÊNCIAS	60
NORMAS ADOTADAS	68
ABSTRACT.....	70
APÊNDICES.....	73
ANEXOS	83
FONTES CONSULTADAS	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Marcação dos pontos originando o trajeto a ser injetado com as substâncias testadas.	24
Figura 2. Exposição do dorso do rato para retirada de fragmento de pele parcial contendo a incisão na pele.	26
Figura 3. Dermátomo elétrico utilizado para exérese de fragmento de pele em espessura parcial contendo a incisão.	27
Figura 4. Obtenção do fragmento de pele em espessura parcial nas dimensões necessárias ao estudo.	27
Figura 5. Sequência para obtenção da amostra de pele final para análise.	28
Figura 6. Quantificação de SP pelo método de <i>Western blotting</i> na pele incisada de ratos, submetidos à ANOVA e teste de Tukey.	78
Figura 7. Quantificação de pró-CGRP pelo método de <i>Western blotting</i> na pele incisada de ratos, submetidos à ANOVA e teste de Tukey.	80
Figura 8. Quantificação de CGRP pelo método de <i>Western blotting</i> na pele incisada de ratos, submetidos à ANOVA.	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores da quantificação de pró-CGRP, SP e CGRP para cada grupo, submetidos a teste de ANOVA.....	34
Tabela 2. Valores da quantificação de pró-CGRP e SP, submetidos a teste de Tukey.....	35
Tabela 3. Resultados dos testes de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade de distribuição dos valores medidos em cada grupo.....	76
Tabela 4. Descrição dos valores de SP na amostra de cada animal, obtidos por WB (valores arbitrários).....	77
Tabela 5. Descrição dos valores de pró-CGRP na amostra de cada animal, obtidos por WB (valores arbitrários).....	79
Tabela 6. Descrição dos valores de CGRP (forma ativa) na amostra de cada animal, obtidos por WB (valores arbitrários).....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AL	Anestésico Local
AL's	Anestésicos Locais
BVC	Bupivacaína
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CMBF	Campos Magnéticos de Baixa Frequência
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
HRP	Horseradish Peroxidase
IHQ	Imuno-Histoquímica
IN	Inflamação Neurogênica
LDC	Lidocaína
MD	Microdiálise
NEP	Neutral Endopeptidase
NK1	Neurokinin-1
NKA	Neurokinin A
NP	Neuropeptídeo
NP's	Neuropeptídeos
NPY	Neuropeptide Y
PAR-2	Protease-Activated Receptor-2
PBS	Phosphate-Buffered Saline

PGP	Protein Gene Product
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationships
RNP	Ratos Não-Produtores
RP	Ratos Produtores
RVC	Ropivacaína
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SP	Substance P
TBS-T	Tris-buffered Saline Containing 0.05% Tween-20
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-Alpha
TRP	Transient Receptor Potential
VIP	Vasoactive Intestinal Peptide
WB	Western Blot Analysis ou Western blotting

RESUMO

A inflamação neurogênica (IN) é um dos primeiros eventos da cicatrização. Diante de um estímulo nociceptivo na pele, ocorre a liberação de neuropeptídeos (NP's) cutâneos pró-inflamatórios, que são substâncias produzidas pelos neurônios dos gânglios da raiz dorsal e secretadas de terminações nervosas na pele, deflagrando a fase inflamatória da cicatrização. Os anestésicos locais (AL's) tem amplo uso devido a sua efetividade e segurança, mas há evidências de que eles poderiam bloquear o início da inflamação neurogênica ao inibir a secreção de NP's, potencialmente retardando as fases iniciais da cicatrização. **OBJETIVO:** Avaliar o efeito dos AL's lidocaína, bupivacaína e ropivacaína na secreção de NP's CGRP (*Calcitonin Gene-Related Peptide*) e SP (*Substance P*) na pele incisada de ratos. **MÉTODOS:** Foram utilizados 28 ratos Wistar distribuídos igualmente em quatro grupos (n=7): grupo controle (C) com solução salina 0,9%, grupo (L) (lidocaína 2%), grupo (B) (bupivacaína 0,5%) e grupo (R) (ropivacaína 0,75%). Após anestesia geral, o fármaco de cada grupo foi injetado ao longo de uma linha reta com dois centímetros no tecido subcutâneo da linha mediana do dorso de cada rato e, após 30 minutos, foi realizada uma incisão (estímulo nociceptivo) da extensão desse segmento. A seguir, cada rato foi submetido à morte induzida indolor e uma amostra de pele de cada rato, com área e volume padronizados, foi retirada do centro da reta incisada com ajuda de dermatômetro elétrico e *punch* cutâneo de oito milímetros. Essa amostra foi enviada para quantificação de CGRP e SP por *Western blotting* e os resultados foram submetidos à análise estatística. **RESULTADOS:** em relação à presença de NP's na pele de ratos, no grupo L e no grupo R houve redução da quantidade de SP nas amostras, sem diferença entre si; no grupo B não

houve redução da quantidade de SP; em todos os grupos houve diminuição da quantidade de pró-CGRP, sem diferença entre si; e em nenhum grupo houve diminuição da quantidade de CGRP. **CONCLUSÃO:** a lidocaína e a ropivacaína diminuem os níveis de SP na pele incisada de ratos, enquanto a bupivacaína não tem influência sobre os NP's estudados. Nenhum AL demonstrou influência sobre a presença de CGRP na pele incisada de ratos no tempo avaliado.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os anestésicos locais (AL's) são substâncias que agem pelo bloqueio reversível dos canais de sódio, impedindo a deflagração dos potenciais de ação das fibras nervosas (GUPTA, 1991). Dessa maneira, os AL's inibem a sensação dolorosa provocada por estímulos nociceptivos locais conduzidos por meio das fibras tipo A- δ e C, além de possuírem propriedades antiarrítmicas (CHVAPIL *et al.*, 1979). Entretanto, efeitos referidos aos AL's não explicados unicamente pelo bloqueio de canais de sódio são descritos, como é o caso das ações anti-inflamatória, antitrombótica e neuroprotetora (DIAS *et al.*, 2008).

O sistema nervoso está presente na pele numa trama tridimensional complexa, principalmente na derme, e tem funções na imunidade, na regulação dos anexos cutâneos, na termorregulação, na homeostase e também na cicatrização e na modulação inflamatória (BESNE, DESCOMBES, BRETON, 2002; LIANG *et al.*, 2004; ESTEVES JUNIOR *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2009).

O conceito de inflamação neurogênica (IN) reside no fato de que o processo inflamatório periférico inicia-se quando há um estímulo exógeno (calor, lesões tóxicas, agentes irritantes, alérgenos, luz ultravioleta e agentes microbianos) ou endógeno (mudanças de pH, citoquinas, cininas, histamina, proteases, neurotransmissores, hormônios e estresse) (ROOSTERMAN *et al.*, 2006; CAVIEDES-BUCHELI *et al.*, 2008), que caminham para processamento medular em sentido drômico. Nesse mesmo processo também há um reflexo axonal, em sentido antidrômico, direcionado às terminações nervosas de fibras A- δ e C, com consequente liberação de neuropeptídeos cutâneos (NP's), como substância P (SP),

neurocinina A (NK-A), *Calcitonin Gene-Related Peptide* (CGRP), *Vasoactive Intestinal Peptide* (VIP), entre outros (SCHMELZ & PETERSEN, 2001; STEINHOFF *et al.*, 2003; ROOSTERMAN *et al.*, 2006), que agem por via parácrina, justácrina e endócrina gerando uma resposta inflamatória e imunológica na pele (PETERS *et al.*, 2006).

Transtornos da inflamação neurogênica estão associados a várias doenças cutâneas como psoríase (ZEGARSKA, LELINSKA, TYRAKOWSKI, 2006), dermatite atópica (FUJII, SENGOKU, TAKAKURA, 2010; MISERY, 2011), e dermatite de contato (PAVLOVIC *et al.*, 2011), além de um possível atraso no ritmo e na qualidade da própria cicatrização (SMITH & LIU, 2002; DELGADO, MCMANUS, CHAMBERS, 2005; ROOK & MCCARSON, 2007).

Os mecanismos de ação dos NP's na pele são diversos, mas pode-se dizer que, por um efeito cascata, há ativação inflamatória, vasodilatação, ativação de quimiorreceptores, quimiotaxia de células inflamatórias (MARTINSSON, HAEGERSTRAND, DALSGAARD, 1993; ROOSTERMAN *et al.*, 2006), prurido e um eritema característico no local do estímulo, promovendo um rápido início do processo de cicatrização (PETERS *et al.*, 2006).

A SP é uma taquicinina com 11 aminoácidos produzida no corpo do neurônio do gânglio da raiz dorsal, transportada por via axonal, estocada e liberada a partir de terminações nervosas cutâneas (STEINHOFF *et al.*, 2003; CAVIEDES-BUCHELI *et al.*, 2008). A SP é um NP que age por meio de receptores de membrana NK-1 (KAHLER *et al.*, 1993) causando degranulação de mastócitos, ativação de queratinócitos, fibroblastos, macrófagos, e linfócitos B e T. Essas células, por sua vez, liberam uma ou mais substâncias imunomoduladoras e pró-inflamatórias como histamina,

TNF- α , prostaglandina D₂, leucotrieno B₄, neurocinina 1, interleucinas IL-1 α , IL-1 β e IL-8, além de provocar quimiotaxia de neutrófilos e eosinófilos (MCGOVERN, JONES, SHARPE, 1995; FURUTANI *et al.*, 1999; QUINLAN *et al.*, 1999; SONG *et al.*, 2000; SCHMELZ & PETERSEN, 2001; STEINHOFF *et al.*, 2003; ROOSTERMAN *et al.*, 2006). Por essa diversidade de funções, a SP está relacionada a processos na pele como: vasodilatação, prurido, extravasamento plasmático (em pele murina e humana), ativação do sistema imunológico e cicatrização (THEOHARIDES *et al.*, 1998; ROOSTERMAN *et al.*, 2006; CAVIEDES-BUCHELI *et al.*, 2008).

O CGRP é um neuropeptídeo com 37 aminoácidos que, em humanos, apresenta duas isoformas, α e β , diferentes entre si por três aminoácidos (MOORE & SALVATORE, 2012). O α -CGRP é expresso, preferencialmente, pelas terminações nervosas da pele, enquanto o β -CGRP é encontrado, sobretudo, em terminações entéricas e na epiderme (ROOSTERMAN *et al.*, 2006). Na pele, o CGRP está localizado frequentemente nas mesmas fibras nervosas que o SP e, quando liberado, ativa receptores CGRP1 e CGRP2 localizados em mastócitos, macrófagos, fibroblastos, melanócitos, células dendríticas, queratinócitos e linfócitos B e T (BRAIN & CAMBRIDGE, 1996; SCHMELZ & PETERSEN, 2001; STEINHOFF *et al.*, 2003; ROOSTERMAN *et al.*, 2006). O pró-CGRP (15kda) é um precursor de ambas as isoformas do CGRP, mensurável, sobretudo, no gânglio da raiz dorsal. A partir desse local, o CGRP é levado à terminação nervosa por via axonal, em sentido antidrômico, e estocado na terminação nervosa (MISHIMA *et al.*, 2011). Da mesma forma que a SP, o CGRP está envolvido em processos complexos, ainda não completamente compreendidos, relacionados, sobretudo, às atividades pró-inflamatórias na

fase aguda da inflamação (ROOSTERMAN *et al.*, 2006). Entre seus efeitos locais ressalta-se como potente vasodilatador via óxido nítrico, supressão de linfócitos T, modulação do processo cicatricial, quimiotaxia de células inflamatórias, e consequente modulação da dor (BRAIN & GRANT, 2004; BIRKLEIN & SCHMELZ, 2008).

O bloqueio do potencial de ação das fibras A- δ e C da pele por AL's pode reduzir a liberação de NP's cutâneos diante de um estímulo nociceptivo, inibir a complexa cascata de mediadores inflamatórios (RODRIGUES *et al.*, 2011), assim como suprimir a deflagração da inflamação neurogênica (PETERS *et al.*, 2006) potencialmente atrasando o início do reparo cicatricial. Essa possibilidade foi averiguada por diversos estudos em animais (MORRIS & TRACEY, 1977; CHVAPIL *et al.*, 1979; MORRIS & APPLEBY, 1980; VASSEUR *et al.*, 1984; DAVIES, GUYURON, HUSAMI, 1991; MADHUCHANDRA, BHAT, RAMESH, 1991; POWELL *et al.*, 1991; DRUCKER *et al.*, 1998) e em humanos (HANSSON *et al.*, 1993; KALMAN *et al.*, 1998), utilizando procaína, prilocaína, mepivacaína, lidocaína, e bupivacaína.

Não foram encontrados estudos que relacionassem a influência dos diversos tipos de AL's com a secreção de NP's pelas terminações nervosas cutâneas, inclusive SP e CGRP, após um estímulo nociceptivo. Ressalta daí a importância de averiguar, comparativamente, se os AL's mais utilizados na prática clínica podem inibir a liberação desses NP's na pele.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

Investigar o efeito dos anestésicos locais lidocaína, bupivacaína e ropivacaína sobre a quantidade de neuropeptídeos SP e CGRP na pele incisada de ratos.

3. LITERATURA

3. LITERATURA

3.1 Cicatrização e Neuropeptídeos

BRAIN & CAMBRIDGE (1996) estudaram a farmacologia do CGRP. O CGRP ou *calcitonin gene-related peptide* é composto por 37 aminoácidos, produzido, sobretudo, em neurônios sensitivos periféricos, de fibras A- δ e C, e centrais, do corno posterior da espinha nervosa. É produzido como duas isoformas, α e β , liberado por terminações nervosas por uma série de estímulos e degradado pelas enzimas triptase e quimase. É um potente vasodilatador por relaxamento arteriolar, independente do óxido nítrico, e tem diversas atividades no processo inflamatório causando edema, ativação de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, células dendríticas, entre outras, através de receptores CGRP1 e CGRP2. Os autores observaram que o CGRP tem perspectivas no tratamento de pacientes com migrânea, pois a inflamação neurogênica da *dura mater* tem sido relacionada ao aumento dos níveis de CGRP no líquido durante as crises, o que causaria vasodilatação e cefaleia.

WALLENGREN, CHEN, SUNDLER (1999) estudaram a cicatrização de lesões padronizadas em ratos, após a secção do nervo ciático e a depleção de neuropeptídeos pela capsaicina. Os autores usaram 115 ratos com lesões cutâneas padronizadas com *punch* de três milímetros até o subcutâneo nas patas traseiras e os distribuíram em quatro grupos: (1) grupo controle; (2) grupo tratado previamente com capsaicina; (3) grupo com secção do nervo ciático; e (4) grupo tratado com capsaicina somado à secção do nervo ciático. As lesões foram acompanhadas por biópsias com *punch* de seis milímetros nos dias 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14 e 21, utilizando

inspeção macroscópica, histológica e imuno-histoquímica para SP, CGRP, VIP, NPY e PGP 9.5. Uma redução parcial dos NP's no local da lesão foi devidamente constatada nos grupos experimentais. Os autores não observaram atraso no fechamento da lesão entre os grupos e, constatando que uma denervação total não foi obtida, os mesmos concluíram que as fibras nervosas residuais, seus respectivos estoques de NP's e ramos nervosos colaterais são suficientes para prover uma cicatrização normal.

WEIDNER *et al.* (2000) investigaram a SP e o CGRP na pele de humanos quanto à capacidade de vasodilatação, extravasamento proteico, liberação de histamina e efeitos sensitivos por meio de microdiálise (MD) com ELISA. A MD com ELISA permitiu determinar o extravasamento proteico na pele de humanos *in vivo* de maneira atraumática em 53 voluntários saudáveis. Assim, cinco fibras ocas de plasmaferese foram introduzidas na face volar do terço médio do antebraço esquerdo, perpendiculares ao eixo ósseo, a uma profundidade média de 0,6 milímetros, distando quatro centímetros um do outro. As fibras foram perfundidas com solução de Ringer por 60 minutos e depois foi realizado estímulo com SP e CGRP e comparadas com a prostaglandina E2 (substância vasodilatadora) e codeína (substância degranuladora de mastócitos) por 30 minutos. O produto da diálise foi colhido a cada 15 minutos e enviado para análise fotométrica. Os autores observaram que: (1) tanto SP como CGRP não provocaram sintomas locais como dor e coceira; (2) a SP produziu vasodilatação dose-dependente e extravasamento proteico provavelmente por dilatação de vênulas pós-capilares; (3) o CGRP produziu vasodilatação mais duradoura e potente que a SP agindo sobre as arteríolas pré-capilares, portanto, sem extravasamento proteico; e (4) SP causa liberação de histamina, mas apenas em concentrações mais elevadas.

BESNE, DESCOMBES, BRETON (2002) estudaram a inervação na epiderme em relação à idade e local anatômico em humanos (mulheres brancas). Foram realizadas 82 biópsias em pacientes entre 20 e 93 anos, distribuídos em grupos a cada década de vida, retiradas de quatro locais anatômicos submetidos a cirurgias plásticas estéticas: pálpebra superior, área pré-auricular, abdome (infraumbilical) e mama (polo inferior). Foi realizada imuno-histoquímica nas peças com marcador de células nervosas PGP 9.5 e calculada a área epidérmica ocupada por terminações nervosas. A densidade de inervação epidérmica em função da idade diminuiu nas pálpebras, não se alterou no abdome e aumentou nas mamas.

SMITH & LIU (2002) estudaram a cicatrização de lesões padronizadas em ratos recém-nascidos após a depleção de neuropeptídeos pela capsaicina. Os autores usaram 65 ratos recém-nascidos com lesões cutâneas padronizadas com *punch* cutâneo de quatro milímetros na região periescapular no 12º dia pós-natal (DPN) e os dividiram em dois grupos: (1) grupo controle; (2) grupo tratado previamente com capsaicina em injeções subcutâneas no 2º e no 9º DPN. Após o uso de um marcador de divisão celular (BRDU), as cicatrizes foram biopsiadas nos dias 3, 5, 7, 11 e 21 do experimento. Foram medidos a área e o volume do ferimento e as peças foram para IHQ. Uma redução parcial dos NP's no sítio da lesão foi devidamente constatada nos grupos experimentais. Os autores observaram que a redução de CGRP na lesão estava associada à cicatrização retardada, que se traduziu em maior área e volume de cicatrização, retenção de crostas prolongada e reepitelização atrasada.

LIANG *et al.* (2004) compararam a quantidade de nervos no modelo de cicatriz hipertrófica de fêmeas de porco Red Duroc (FPRD) em relação à

cicatriz hipertrófica humana. Os autores fizeram lesões no dorso de duas FPRD e biopsiaram as lesões com dez dias, um mês e cinco meses. As amostras humanas foram obtidas durante o tratamento de seis pacientes queimados. Foi realizado IHQ e as imagens foram analisadas em computador para avaliação de densidade de nervos e fração da área com nervos. Os resultados mostraram que o tecido nervoso estava aumentado na cicatriz de FPRD, assim como em cicatrizes hipertróficas humanas, como descrito na literatura, porém sem diferença estatística. Os autores concluíram que esses resultados corroboraram com a validação do modelo animal da FPRD para estudo de cicatrizes hipertróficas.

DELGADO, MCMANUS, CHAMBERS (2005) estudaram a influência da SP na cicatrização na pele de ratos (n=32) após um ferimento padronizado com laser de CO₂ até 50% da derme. Dessa forma, foi injetado de maneira exógena no ferimento a SP e o *Spantide II*, um antagonista de SP, e a pele foi coletada em espessura total até panículo carnoso nos dias 0, 3, 7, 14 e 21 pós-ferimento, congelada e enviada para imuno-histoquímica (IHQ). Foi estabelecido um *score* histológico considerando vários aspectos microscópicos do processo cicatricial. Como resultado, a cicatrização apresentou-se com menor *score* histológico diante de baixas concentrações de SP, como no grupo controle e no grupo *Spantide II* e, inversamente, a cicatrização teve melhor qualidade histológica diante de concentrações mais altas de SP.

ESTEVES JUNIOR *et al.* (2009) investigaram o efeito da administração tópica de CGRP por iontoforese na viabilidade de retalho cutâneo randômico em ratos. Foram utilizados 60 ratos submetidos à realização de retalho cutâneo randômico e distribuídos igualmente em

quatro grupos: (1) grupo controle, simulação; (2) grupo iontoforese placebo; (3) grupo controle de absorção, com simulação de estímulo elétrico e uso de CGRP; e (4) grupo tratado com iontoforese de CGRP. Analisando as áreas de necrose dos retalhos, os autores concluíram que a administração tópica de CGRP por iontoforese é eficaz em aumentar a viabilidade de retalhos randômicos em ratos.

MISHIMA *et al.* (2011) estudaram os efeitos do CGRP sobre membros isquêmicos de ratos. Para elucidar o papel do CGRP na angiogênese durante a isquemia, os autores utilizaram seis ratos não produtores de CGRP (RNP) e os compararam a seis ratos produtores de CGRP (RP) após provocarem isquemia unilateral em membro posterior por ligadura de artéria e veia femorais. Os autores mensuraram os níveis de CGRP na pele e em nervos periféricos, assim como o pró-CGRP no corpo celular do neurônio do gânglio da raiz dorsal. Eles observaram aumento nos níveis de CGRP na pele e nos nervos periféricos, assim como aumento nos níveis de pró-CGRP no corpo neuronal durante a isquemia em RP. Nesses mesmos ratos, os autores observaram melhor recuperação do fluxo sanguíneo em relação aos RNP, demonstrando um importante papel do CGRP na angiogênese, além de suas já conhecidas propriedades vasodilatadoras.

MISERY (2011) revisou a influência das interações entre sistema nervoso periférico e a pele, com enfoque sobre as dermatites atópicas e o estresse. A relação anatômica que as terminações nervosas da pele têm com certas células podem guardar distância de menos de 300 nanômetros entre si e há grande liberação de substâncias neuromoduladoras nesse espaço, o que, segundo os autores, tem comportamento de sinapses. A maior parte

das substâncias liberadas nesses espaços são NP's, sendo que a SP pode inibir a apresentação de antígenos a linfócitos e o CGRP inibe o contato e atrasa reações de hipersensibilidade, o que pode justificar o efeito imunossupressor da radiação ultravioleta. Devido a isso, há significativa influência do sistema nervoso central em desordens inflamatórias, autoimunes e atópicas. Na dermatite atópica há aumento de SP, CGRP e VIP, assim como da própria inervação local. E o estresse psicológico do indivíduo participa ativamente disso, agravando a reação inflamatória através da inflamação neurogênica e degranulação de mastócitos. Os autores preconizaram como perspectivas que drogas que inibem a inflamação neurogênica e NP's poderiam oferecer maior controle sobre as atopias cutâneas, assim como terapias que alterem o estado psicológico do paciente.

3.2 Anestésicos Locais *versus* Cicatrização e Inflamação Neurogênica

GUPTA (1991) estudou os anestésicos locais (AL's) do ponto de vista estrutural da química orgânica utilizando abordagem matemática de QSAR (*quantitative structure-activity relationships*). Através desses cálculos, que consideram as características físicas da droga (pK, pH, força iônica, etc), ele corrobora com o fato de que a potência do anestésico está relacionada com seu grau de lipossolubilidade.

DRUCKER *et al.* (1998) estudaram o efeito da lidocaína no processo cicatricial em cobaias. Foram utilizados 40 animais em dois grupos: (1) grupo controle (n=20); e (2) grupo experimental (n=20), que foram submetidos a uma incisão na linha mediana dorsal de quatro centímetros após a infiltração de solução salina ou lidocaína 1%. As incisões foram

suturadas e, após oito dias, uma área de 6 x 2 cm contendo a cicatriz foi retirada para testes de força tênsil e análise microscópica de morfometria, presença de colágeno, vascularização, edema e quantidade de células inflamatórias. Os autores observaram que o grupo injetado com lidocaína 1% teve menor vascularização ($p=0,003$) e menor quantidade de fibras de colágeno ($p<0,001$). A força tênsil e as outras variáveis não tiveram diferença significativa, concluindo-se que a lidocaína a 1% não afeta significativamente as propriedades físicas da pele em cicatrização, apesar das diferenças histológicas observadas.

FREDMAN *et al.* (2000) estudaram a eficácia da instilação direta de ropivacaína na cicatriz cirúrgica de cesarianas no pós-operatório imediato. Foram incluídas 50 parturientes submetidas à cesariana que no pós-operatório tiveram um cateter epidural posicionado acima da fáscia no centro da cicatriz cirúrgica. Foram avaliados dois grupos pelas primeiras seis horas pós-operatórias: (1) grupo controle, com água estéril; e (2) grupo experimental com ropivacaína 0,2% (RVC). As pacientes podiam pedir morfina de "resgate", caso quisessem. O grupo experimental pediu menor quantidade de morfina de "resgate" e teve melhor *score* de dor do que o grupo controle, demonstrando que a instilação de RVC no pós-parto é eficiente na profilaxia da dor.

DAHL & RAEDER (2000) fizeram estudo sobre as possibilidades de analgesia pós-operatória sem opioides. Entre as opções avaliadas, os autores ressaltam que o uso de anestésicos locais, na forma de bloqueio regional ou injeção no ferimento, tem mostrado importância, sobretudo, devido ao baixo custo e boa eficiência que levam o paciente a uma recuperação mais rápida, causando menores custos hospitalares.

BROWER & JOHNSON (2003) elaboraram um artigo relacionando os efeitos adversos da injeção de AL's sobre a cicatrização de feridas segundo a literatura. Os autores ressaltaram as dificuldades em se mensurar os efeitos deletérios dos AL's sobre o resultado final da cicatriz, já que a maioria dos trabalhos não relata alterações cicatriciais. No entanto, criticaram os trabalhos de literatura que avaliam a cicatriz apenas com parâmetros macroscópicos tardios e não avaliam as alterações morfológicas mais iniciais. Por isso, os autores avaliaram trabalhos que demonstram que os AL's sobre a cicatrização causam, em animais, uma redução da força tênsil da cicatriz, redução da síntese de colágeno, aumento do tempo de cicatrização, aumento das taxas de infecção, diminuição da quantidade de fibras de colágeno e redução da vascularização da cicatriz. Sendo assim, os autores sugeriram que os AL's podem inibir as primeiras duas fases da cicatrização, a inflamatória e a proliferativa, mas não há dados suficientes que demonstrem um atraso ou prejuízo morfológico no resultado final da cicatriz.

DIAS *et al.* (2008) estudaram o efeito da lidocaína (0,5% e 2%), levobupivacaína (0,125% e 0,75%) e ropivacaína (0,2% e 0,75%) sobre a vasodilatação cutânea (*flare*) após a injeção de SP e bradicinina na pele de humanos. Apoiados nas premissas de que os anestésicos locais tem efeito anti-inflamatório potente e inibem a sinalização dos receptores desses neuropeptídeos, os autores fizeram um estudo duplo-cego com dez voluntários masculinos entre 19 e 24 anos, que se submeteram a injeções de substâncias na face volar média do antebraço e à medição do eritema por *laser* Doppler. As substâncias se baseavam em bradicinina e SP, tanto sozinhas como em combinação com AL's dos três tipos citados, em concentrações analgésicas e anestésicas. Foi observada redução

significativa do *flare* com o uso de AL's. Não houve diferença entre os tipos de anestésicos mas houve diferença em relação às doses analgésicas e anestésicas, pois quanto maior a dose (nível anestésico), menor o eritema observado. Os autores especularam que os principais motivos desse resultado sejam que: (1) os AL's inibem a sinalização desses neuropeptídeos com seus receptores, inibindo a liberação de substâncias vasodilatadoras; e que (2) os AL's inibem a liberação de histamina dos mastócitos, o que poderia suprimir a inflamação e prevenir hiperalgesia pós-operatória.

LEFFLER *et al.* (2008) estudaram a influência dos AL's sobre receptores da família de canais TRP (*transient receptor potential*), chamados TRPV1 e TRPA1, em neurônios sensitivos de ratos. Os autores prepararam as patas traseiras de ratos para a realização e obtenção de retalhos cutâneos e nervos ciáticos, clampeados com anéis de acrílico, e incubaram esses tecidos por cinco minutos em solução controle e soluções contendo os AL's lidocaína, procaína, tetracaína e mepivacaína. Eles demonstraram que a lidocaína foi capaz de ativar os receptores TRPV1 e TRPA1 em neurônios do gânglio da raiz dorsal e provocar a liberação de CGRP por ativação do TRPV1. Os autores demonstraram que esses dois receptores seriam como elementos-chave na atuação de AL's sobre a IN e também sobre sua neurotoxicidade.

CAVIEDES-BUCHELI *et al.* (2009) quantificaram o efeito da infiltração de diferentes vasoconstritores e anestésicos locais sobre a expressão de SP em polpas dentárias humanas saudáveis. Foram escolhidas 30 polpas dentárias saudáveis, de pacientes entre 18 e 30 anos, divididos em três grupos: (1) o grupo lidocaína 2% com epinefrina 1:80.000; (2) o

grupo prilocaína 3% com felipressina 1:200.000 e (3) o grupo prilocaína 4% sem vasoconstritor. Os dentes foram extraídos (estímulo nociceptivo) dez minutos após a injeção das drogas, congelados e enviados para radioimunoensaio (RIE). A quantidade de SP foi menor no grupo lidocaína em relação à prilocaína sem vasoconstritor ($p < 0,01$). Os autores discutiram que a redução dos níveis de SP no grupo lidocaína poderia ser devido ao vasoconstritor ou ao tipo de anestésico local, e futuros trabalhos seriam necessários para elucidar isso.

BEAUSSIER *et al.* (2012) estudaram o grau de adesão à injeção da cicatriz cirúrgica com AL no território francês. Os autores enviaram questionário validado para as 375 maiores instituições daquele país com 36 itens questionando a maneira de administração, tipos de anestésicos utilizados, limitações observadas e prática de injeção em dose única ou contínua. Apenas 32% das instituições responderam, sendo que 85% destas incluíam o uso de injeção local na cicatriz cirúrgica no pós-operatório imediato em mais de 50% das cirurgias. Os autores observaram que a injeção em dose única logo após o término da cirurgia foi de 58% enquanto a injeção contínua, com cateter multiperfurado e bomba injetora, foi de 18%. Os autores concluíram que a analgesia pós-operatória com AL's é uma prática cuja aceitação pelo meio médico francês é bem estabelecida atualmente.

3.3 Outros fármacos e meios físicos *versus* Inflamação Neurogênica

RAJKOVIC, MATAVULJ, JOHANSSON (2005) investigaram os efeitos de campos magnéticos de baixa frequência (CMBF) sobre células da pele e da tireoide, inclusive fibras nervosas cutâneas, quanto à secreção

de SP e CGRP, entre outras substâncias. Foram formados dois grupos com 12 ratos cada, sendo um grupo experimental, exposto ao CMBF por um mês, e um grupo controle. Ao final do experimento, amostras de pele total da região dorsal interescapular foram retiradas e enviadas para imunohistoquímica com estereologia (método histológico de quantificação do todo por amostragem). As fibras nervosas de SP e CGRP se concentravam na epiderme e na metade superior da derme. Quanto à presença de SP, o grupo experimental apresentou menor secreção de SP, no entanto sem significância estatística ($p=0,95$). Quanto ao CGRP, o grupo experimental apresentou tendência de maior secreção de CGRP ($p=0,64$).

ROOK & MCCARSON (2007) observaram a influência da morfina tópica sobre a cicatrização em ratos. Foram utilizados 90 ratos em 15 grupos, que foram submetidos a uma lesão cutânea em região periescapular de dorso com *punch* de quatro milímetros e depois foram tratados com uma combinação de substâncias, onde só as relevantes a esse estudo serão descritas a seguir. As lesões foram registradas, diariamente, com fotos digitais por até 14 dias para averiguar sua contração. Comparado ao grupo controle, o grupo tratado com morfina apresentou um atraso geral na contração cicatricial de forma dose-dependente. A aplicação tópica de antagonistas dos receptores NK-1 e NK-2 tiveram efeitos similares ao uso da morfina, sugerindo que opioides impedem o fechamento da lesão ao inibirem a secreção de SP e neurocinina-A (NKA). Nenhum atraso na contração cicatricial foi observada nos grupos tratados com morfina combinada a SP ou NKA, demonstrando a habilidade de cada NP em atenuar os efeitos da morfina. O grupo tratado apenas com SP mostrou aceleração da contração cicatricial. Os autores afirmaram que a morfina promove analgesia tópica inibindo o potencial de ação dos nervos locais, o

que bloquearia a secreção retrógrada de importantes neuropeptídeos pró-inflamatórios, como SP e NKA. A ausência desses últimos promoveria um atraso no processo cicatricial, sobretudo devido ao atraso na contração da cicatriz nos primeiros dias.

FUJII, SENGOKU, TAKAKURA (2010) estudaram a ação de corticoides tópicos sobre a liberação de SP e NGF. Corticoides tópicos podem causar dermatite atópica com sintomas de coceira local. Os autores aplicaram sobre as orelhas de ratos três combinações de drogas: (1) um corticoide tópico (n=8), (2) um irritante químico (2,4-dinitrofluorobenzene ou DNFB) (n=8) e (3) um irritante químico (DNFB) depois de uma semana de tratamento local com corticoide tópico (n=8). Houve também um quarto grupo onde foi feita a administração oral de betametasona 1mg/kg/dia por sete dias. Assim, foi detectado um aumento significativo da quantidade de excursões do membro pélvico com intuito de coçar no grupo (3) em relação aos grupos (1) e (2) ($p < 0,01$), por 120 minutos após o experimento. A orelha dos ratos foi submetida à análise com ELISA para quantificação de SP e NGF, mostrando aumento significativo dessas substâncias no grupo (3) em relação ao grupo (2). A administração oral de corticoides não foi associada a um aumento de SP e NGF. Os autores sugeriram que a aplicação tópica repetida de corticoides pode aumentar a coceira causada por irritantes químicos através de um aumento dos níveis de SP e NGF, o que explicaria a exacerbação de dermatite atópica após uso inapropriado de corticoides tópicos.

4. MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 Desenho de pesquisa

Esta pesquisa é um estudo primário, experimental, analítico, prospectivo, controlado e unicego. Foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) sob número 1537/09 (Apêndice 1).

4.2 Amostra

A amostra contou com 28 ratos Wistar-EPM (*Rattus norvegicus*) adultos, machos, com peso entre 250 e 350g, oriundos do Biotério Central do Centro de Desenvolvimento de Medicina Experimental (CEDEME) da escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo (EPM/UNIFESP). Os procedimentos cirúrgicos experimentais foram realizados no laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia pela Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP (Prof.^a Titular Lydia Masako Ferreira). Os animais foram confinados em biotério, em gaiolas individuais de plástico, com tampa metálica própria para dispor o recipiente com água e ração comercial, consumidas *ad libitum*. O ambiente foi mantido, por meio de dispositivos eletrônicos, a uma temperatura constante de 22 graus Celsius com variação de 1 grau para mais ou para menos ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$), manutenção do grau de umidade e de um período controlado de 12 horas de luz. Os animais tiveram um período de uma semana para ambientação antes da manipulação experimental.

4.3 Delineamento Experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente (www.randomization.com) em quatro grupos de sete ratos cada um (Apêndice 2). Foi realizada uma injeção no dorso de cada animal com a substância ativa a ser analisada, como segue:

- Grupo C: solução de NaCL a 0,9%.
- Grupo L: lidocaína (LDC) 2%.
- Grupo B: bupivacaína (BVC) 0,5%.
- Grupo R: ropivacaína (RVC) 0,75%.

4.4 Preparo dos animais

Os animais foram submetidos à anestesia geral por via intramuscular no membro pélvico esquerdo, utilizando-se cloridrato de xilazina e quetamina (uso veterinário), misturados na proporção de 1:2, respectivamente, e injetados 1ml/kg. Após a indução anestésica, os animais foram dispostos em decúbito ventral e foi realizada epilação do dorso com tricótomo elétrico (**WAHL**[®])(Anexo 1).

Foram demarcados dois pontos localizados na linha mediana dorsal do rato. O ponto P1 foi localizado na intersecção de uma linha transversa tangente aos ângulos inferiores das escápulas e a linha mediana dorsal. O ponto P2 foi localizado 2,0 cm mais caudal. Foi definida a projeção de um segmento de reta com 2,0 cm entre os dois pontos (P1 e P2) sobre a linha mediana dorsal, tratada, daqui por diante, simplesmente como reta "A". Apenas os dois pontos foram marcados com caneta dermográfica, de modo que a reta "A" não contenha a tinta da caneta (Figura 1).

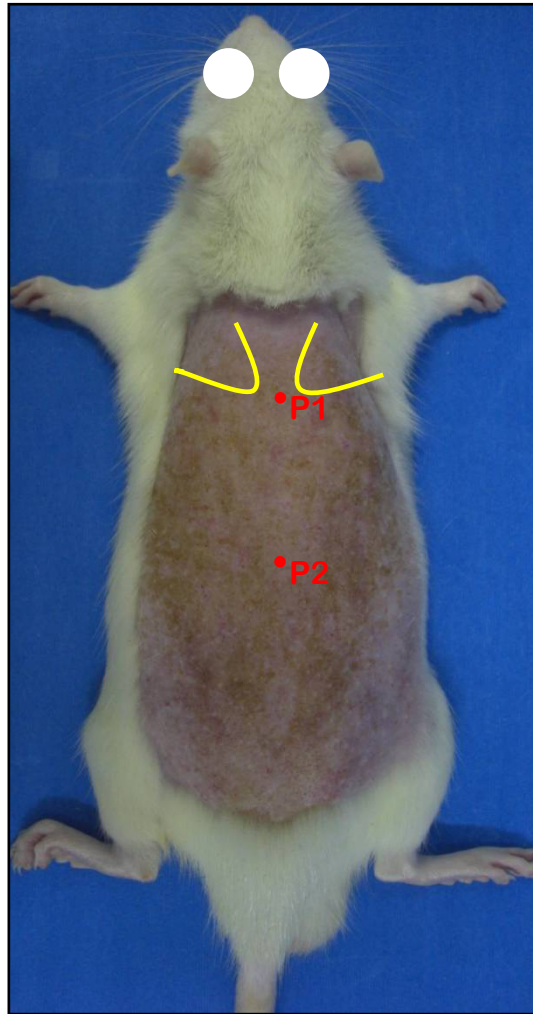


Figura 1. Marcação dos pontos originando o trajeto a ser injetado com as substâncias testadas.

Dorso de rato epilado (escápulas em amarelo). Marcação de P1 na intersecção da linha mediana do dorso do rato com uma linha transversa aos ângulos das escápulas. Marcação de P2 sobre a linha mediana do dorso do rato, 2,0 cm mais caudal a P1. Reta “A” definida como a projeção de um segmento de reta entre os pontos marcados, mas sem pigmentação com a tinta da caneta dermográfica.

4.5 Aplicação dos anestésicos locais

Em cada grupo, utilizando-se uma agulha 20G (30 mm x 0,8 mm, BD® *Precision Glide*), foi injetada a solução em análise no tecido subdérmico, tangente ao *Panniculus carnosus* (panículo carnososo), da reta “A”, por meio de uma punção na extremidade caudal da mesma (P2) e dispendo a agulha até a extremidade cranial (P1). A injeção foi realizada num movimento de retirada crânio-caudal progressivo, injetando 0,5 ml a cada 0,5 cm. No grupo (C) foram utilizados 2,0 ml de solução salina a 0,9%; no grupo (L) foram utilizados 2,0 ml de LDC 2%; no grupo (B) foram utilizados 2,0 ml de BVC 0,5%; e no grupo (R) foram utilizados 2,0 ml de RVC 0,75%.

4.6 Técnica operatória

Foi realizada uma incisão ao longo da reta “A” em cada animal por meio de bisturi com lâmina nº 15 em sentido crânio-caudal. A incisão incluiu a pele e o *Panniculus carnosus* até acima da fáscia muscular.

Os ratos foram imediatamente submetidos à morte assistida indolor por meio de uma hiperdosagem da mistura anestésica (cinco vezes a dose posológica), seguida de secção dos grandes vasos cervicais.

4.7 Obtenção e preparo das amostras de pele

O rato, já sem vida, foi firmemente seguro nas suas extremidades caudal e cranial do tronco, arqueando-o de modo a manter a pele do dorso esticada e expor a região onde a incisão foi realizada.

Utilizando-se um dermatômo elétrico **Padgett®** (Anexo 2), foi retirado um fragmento “B” de pele parcial do dorso do rato, com espessura de 500 μ m, contendo a reta “A” no centro de uma área com no mínimo 2,0 cm de largura (Figuras 2, 3, 4A e 4B).

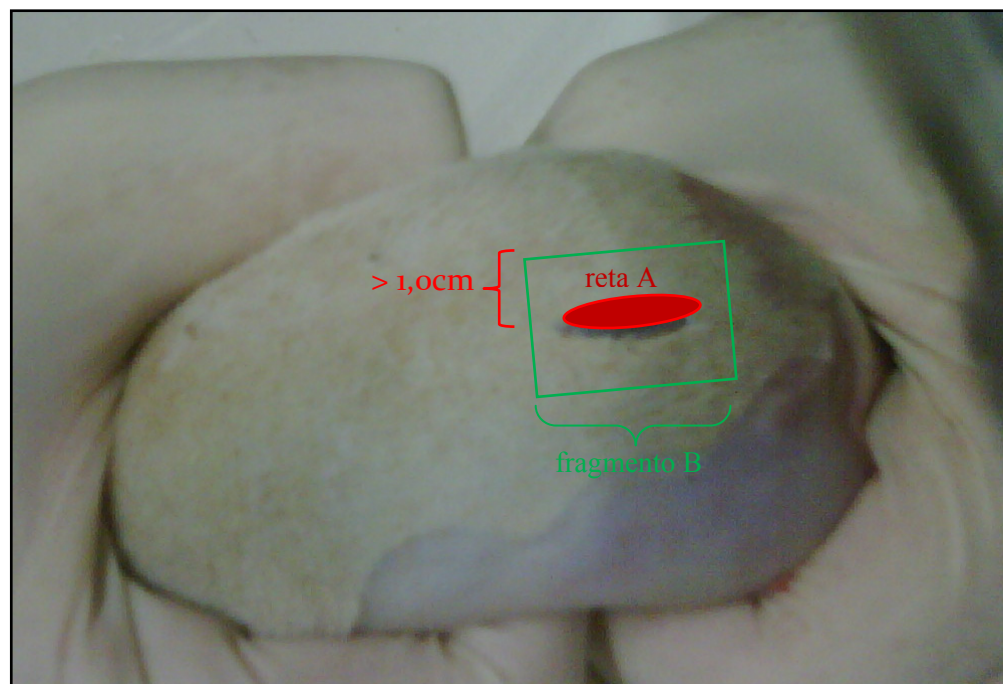


Figura 2. Exposição do dorso do rato para retirada de fragmento de pele parcial contendo a incisão na pele.

Pesquisador segurando firmemente o tronco do rato já morto, arqueando-o levemente, com suas mãos apoiadas sobre uma superfície estável e mantendo a pele do dorso esticada com os dedos. O fragmento de pele "B" (verde) deve ter lados com uma extensão mínima de 2,0 cm e distância mínima de 1,0 cm da reta "A" incisada (vermelho).

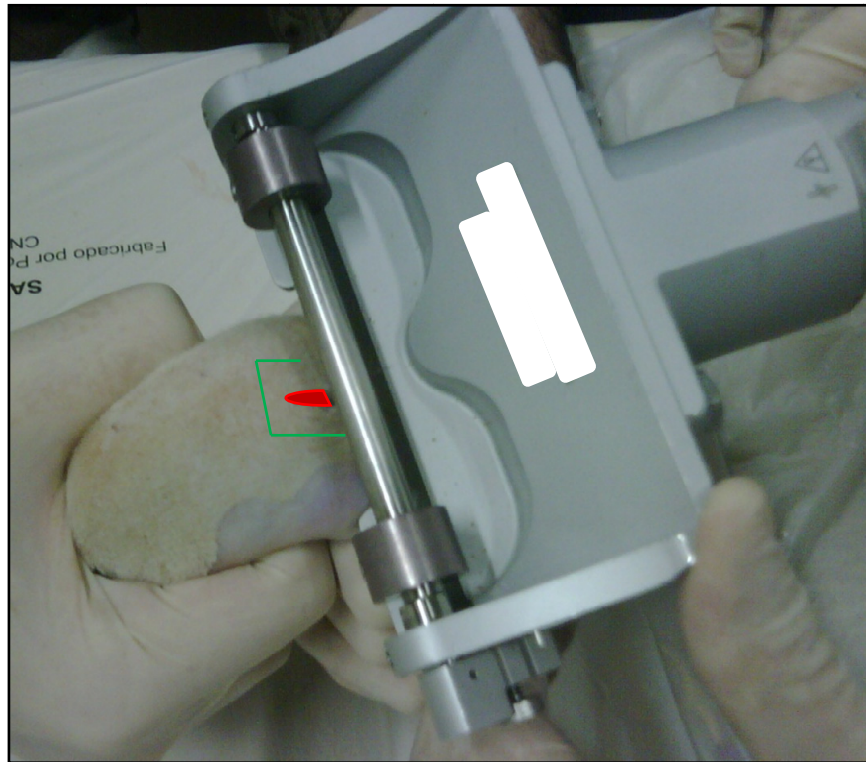


Figura 3. Dermátomo elétrico utilizado para exérese de fragmento de pele em espessura parcial contendo a incisão.

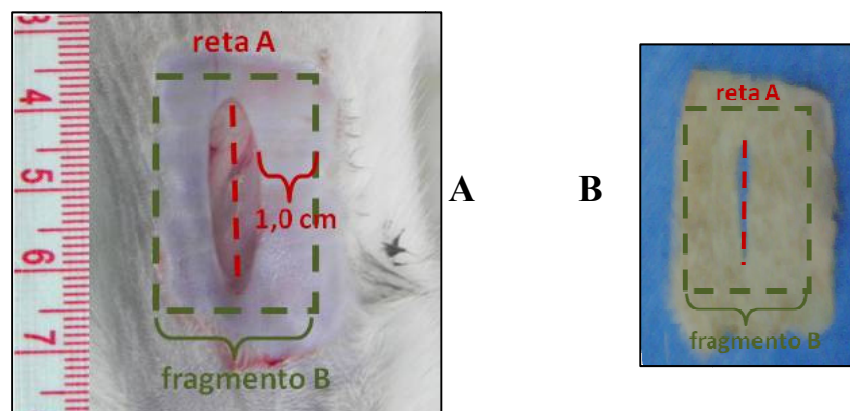


Figura 4. Obtenção do fragmento de pele em espessura parcial nas dimensões necessárias ao estudo.

A: vista aproximada da área doadora no dorso do rato após exérese de fragmento “B” de pele parcial. B: fragmento “B” contendo a reta “A” em seu centro, dentro de uma área com lados de pelo menos 2,0 cm.

Foi utilizado um *punch* cutâneo de oito milímetros (Anexo 3) no centro da reta “A”, que originou dois fragmentos de pele em “semicírculo”, com espessura constante e formato idêntico, que foram enviados como amostra para análise (Figuras 5A, 5B, 5C).

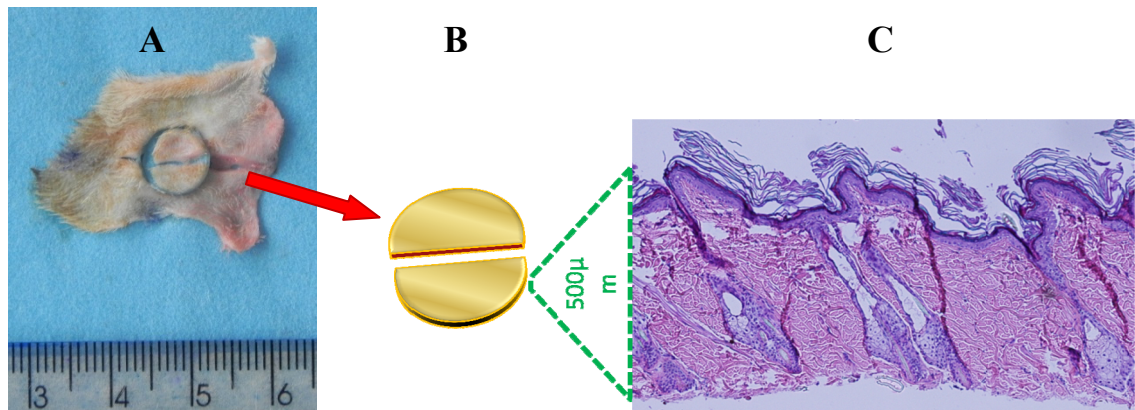


Figura 5. Sequência para obtenção da amostra de pele final para análise.

A: fragmento “B” de pele parcial, contendo a reta “A”, em cujo centro foi retirada a amostra de pele com auxílio de um punch de 8,0 mm, resultando em dois fragmentos de pele parcial iguais, cada um com forma de semicírculo e com espessura de 500 μ m. B: esquema ampliado das amostras de pele finais, produzidas com o processo descrito. C: Fotomicrografia das amostras corada em HE (10x), mostrando espessura constante.

As amostras retiradas com o *punch* foram imediatamente colocadas em tubos de Eppendorff 2,0 ml, secos, previamente catalogados em numeração aleatória. Esses tubos foram congelados em gelo seco e mantidos em freezer a -20°C até a realização do *Western blotting*.

4.8 Extração de Proteínas e *Western blotting* (WB)

O WB foi usado para quantificação de SP e CGRP nas amostras retiradas. O *kit* para avaliação de CGRP provê anticorpos para pró-CGRP e CGRP (forma ativa) e ambos serão testados.

As amostras retiradas de cada animal foram homogeneizadas em solução tampão para extração da proteína total. Primeiramente, as amostras foram lisadas e homogeneizadas, com auxílio de um homogeneizador, utilizando-se 350µL de tampão de lise constituído de NP40 (1%), deoxicolato de sódio (0,5%), SDS (1%), EDTA (1mmol/L), EGTA (1mmol/L) e coquetel inibidor de proteases (Sigma, 1%) em PBS (Ph 7,4). Após a homogeneização, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi obtido e a quantidade de proteína foi determinada usando o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

As amostras foram diluídas em tampão de lise a fim de se obter quantidade de 60µg em 25µL, que foram desnaturadas à 100°C durante 3 minutos e aplicadas às canaletas do gel de poliacrilamida a 12% para fracionamento. Em um dos poços da placa, foram aplicados 5µL de marcador de peso molecular (Kaleidoscope, pré-corado, Bio-Rad, EUA). O tampão de corrida foi preparado com Trizma® (25mmol/L), glicina (0,2mol/L) e SDS (0,1%), as proteínas foram separadas através de aplicação de 100 volts durante 1 hora e 30 minutos.

Após a “corrida”, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (Bio-Rad) utilizando tampão de transferência gelado contendo Trizma® (25mmol/L), glicina (0,2mol/L) e metanol (10%) durante 1 hora a 100V.

A membrana foi então incubada com solução de bloqueio dos sítios não ocupados durante 15 minutos à temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi constituída à base de leite (10%) em TBS-T (tampão Trizma®-salina com *Tween-20* a 0,05%). Após este bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários: anticorpo policlonal anti-SP feito em cabra (1/100, Santa Cruz) e anticorpo policlonal anti-CGRP feito em coelho (1/300, Sigma) diluídos todos em leite (3%) em TBS-T, durante 24 horas à 4°C sob agitação constante. Após esta incubação, as membranas foram lavadas por duas vezes em TBS-T por dez minutos e incubadas com o anticorpo secundário anticabra (1/2000, GE) e anticoelho (1/10.000, GE) conjugados a uma peroxidase (HRP-conjugado), diluídos em leite (3%) em TBS-T e incubados durante 1 hora em temperatura ambiente.

Após a incubação com os anticorpos secundários, as membranas foram lavadas por duas vezes com TBS-T e uma vez com TBS durante dez minutos cada. A reação aconteceu através de incubação com reagente quimioluminescente (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, ECL kit, Perkinelmer, EUA) durante exatamente um minuto. As membranas foram expostas a filme sensível a quimioluminescência (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) durante o período de 30 segundos a cinco minutos, segundo orientação do fabricante para cada anticorpo, e revelados.

Após revelação dos filmes, as membranas foram lavadas e submetidas à nova marcação com anticorpo contra a beta-actina, uma proteína, a fim de normalizar os valores proteicos. Para isso, as membranas foram incubadas com anticorpo primário contra β III-tubulin diluído a 1:30.000 (Sigma, EUA) em TBS-T contendo BSA a 1% durante uma hora

em temperatura ambiente seguida de duas lavagens com TBS-T por dez minutos cada e de incubação, por 45 minutos à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário (anticoelho, HRP conjugado, Amersham) diluído a 1/10.000 em TBS-T com BSA 1%. Após estas incubações, as membranas foram lavadas como descrito anteriormente, seguidas da reação e revelação do filme. Os filmes foram quantificados através de densitometria óptica usando um sistema de análise de imagens (CHADI *et al.*, 2008; ALVES *et al.*, 2011).

4.9 Análise estatística

As quantidades de SP e CGRP nas amostras de pele foram obtidas em unidades de valores arbitrários, apresentadas como média, erro-padrão e valores máximos e mínimos. Os dados foram testados quanto à sua distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (Apêndice 3). Todos os dados foram avaliados em seu conjunto por análise de variância (ANOVA) para se detectar diferenças estatisticamente significantes. Os grupos também foram avaliados aos pares utilizando-se o teste de Tukey para estabelecer diferenças entre cada grupo. Fixou-se $p < 0,05$, ou 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade, para a comprovação dos objetivos levantados neste trabalho.

Visando encontrar diferença de pelo menos dois desvios-padrão (DP) entre os grupos com poder de 80% e confiança de 95%, a amostra necessária para realização do estudo é de 7 ratos em cada grupo.

O cálculo da amostra foi realizado com base na comparação dos grupos com uso de ANOVA.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

A lidocaína e a ropivacaína reduziram a quantidade de SP na pele de ratos em relação ao grupo de animais controle e que receberam a bupivacaína. O teste de ANOVA resultou em $p=0,0021$. A comparação pareada pelo teste de Tukey mostrou diferença estatística ($p<0,05$) entre os grupos (C) e (L); grupos (C) e (R); grupos (B) e (L); e grupos (B) e (R). A quantificação de SP na pele incisada de ratos é mostrada nas Tabelas 1 e 2 e nos Apêndices 4 e 5.

Todos os grupos foram capazes de inibir a presença de pró-CGRP na pele de ratos em relação ao grupo controle, e não houve diferença entre os grupos. O teste de ANOVA mostrou $p=0,0073$. A comparação pareada pelo teste de Tukey mostrou diferença estatística ($p<0,05$) entre os grupos (C) e (L); grupos (C) e (B); e grupos (C) e (R). A quantificação de pró-CGRP na pele incisada de ratos é mostrada nas Tabelas 1 e 2 e nos Apêndices 6 e 7.

Nenhum grupo foi capaz de inibir a presença de CGRP na pele de ratos em relação ao grupo controle e não houve diferença entre os grupos. O teste de ANOVA mostrou $p=0,8123$, portanto não foi realizado o teste de Tukey. A quantificação de CGRP na pele incisada de ratos é mostrada na Tabela 1 e nos Apêndices 8 e 9.

Tabela 1. Valores da quantificação de pró-CGRP, SP e CGRP para cada grupo, submetidos a teste de ANOVA.

Variável	Grupo	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	P
pró-CGRP-15kda	C	2,668	0,544	2,685	2,010	3,507	7	0,009
	L	1,932	0,201	1,860	1,723	2,290	7	
	B	1,983	0,523	1,904	1,343	2,619	7	
	R	1,940	0,362	2,048	1,433	2,291	7	
SP	C	0,450	0,133	0,450	0,295	0,659	7	0,002
	L	0,216	0,099	0,247	0,103	0,376	7	
	B	0,427	0,190	0,444	0,182	0,665	6	
	R	0,231	0,057	0,238	0,147	0,312	7	
CGRP-forma ativa-5kda	C	1,611	0,768	1,423	0,841	2,897	7	0,812
	L	1,323	0,766	1,122	0,641	2,900	7	
	B	1,556	0,696	1,138	0,968	2,617	7	
	R	1,326	0,595	1,233	0,733	2,551	7	

Descrição da quantificação de neuropeptídeos cutâneos para cada grupo, seguido de significância estatística segundo teste de ANOVA. A SP e o pró-CGRP apresentaram diferença estatisticamente significativa entre seus grupos.

Tabela 2. Valores da quantificação de pró-CGRP e SP, submetidos a teste de Tukey.

Variável	Comparação	Diferença média	Erro padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
pró-CGRP- 15kda	C L	0,736	0,230	0,019	0,101	1,370
	C B	0,685	0,230	0,031	0,051	1,320
	C R	0,728	0,230	0,020	0,094	1,363
	L B	-0,051	0,230	0,996	-0,685	0,584
	L R	-0,007	0,230	>0,999	-0,642	0,627
	B R	0,043	0,230	0,998	-0,591	0,678
	SP	C L	0,234	0,067	0,010	0,048
	C B	0,023	0,070	0,987	-0,171	0,217
	C R	0,219	0,067	0,017	0,033	0,405
	L B	-0,211	0,070	0,029	-0,405	-0,017
	L R	-0,015	0,067	0,996	-0,202	0,171
	B R	0,196	0,070	0,047	0,002	0,390

Resultado das comparações múltiplas pareadas de Tukey para SP e pró-CGRP. Quanto à SP, o grupo L e o grupo R apresentaram redução desse NP nas amostras em relação ao grupo C e ao grupo B, sem diferença entre si, enquanto o grupo B não apresentou redução da quantidade de SP em relação ao grupo C. Quanto ao pró-CGRP, todos os grupos apresentaram diminuição da quantidade dessa substância em relação ao grupo C, sem diferença entre si.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A anestesia local tem sido empregada amplamente na prática médica e odontológica devido ao seu baixo custo, eficiência farmacológica, segurança posológica e praticidade clínica. Com isso em vista, o uso dos anestésicos locais (AL's) disseminou-se pelo mundo como método eficaz de anestesia e analgesia pós-operatória, visando menos efeitos colaterais em relação a bloqueios centrais e regionais e buscando alta hospitalar mais precoce, com redução dos custos hospitalares tão onerosos aos sistemas de saúde de todo o mundo.

DAHL & RAEDER, em 2000, fizeram um levantamento de opções de analgesia pós-operatória sem opioides, já que esses últimos exigem administração mais cuidadosa e tem efeitos colaterais importantes, e acharam que os AL's tem uma das melhores relações de custo-benefício. Em 2000, FREDMAN *et al.* já haviam demonstrado que a injeção pós-operatória no local da incisão é de grande eficiência e garantiu menor *score* de dor entre os pacientes, além de poupar o uso de maiores quantidades de opioides. No entanto, havia dúvidas quanto à aceitação generalizada dessa prática pelos estabelecimentos hospitalares, sobretudo devido a certa resistência no uso de bombas de instilação de anestésicos através de cateteres dentro da incisão cirúrgica. Mas BEAUSSIER *et al.*, em 2012, fizeram um levantamento entre 375 instituições de saúde de toda a França e constataram que 85% delas faziam infiltração local na cicatriz cirúrgica para reduzir o tempo de internação hospitalar e que, apesar de certa resistência nessa prática, ela estava se tornando gradualmente mais disseminada.

Desde CHVAPIL *et al.*, em 1979, a literatura é farta de trabalhos demonstrando que os AL's influenciam no processo cicatricial (CHVAPIL *et al.*, 1979; MORRIS & APPLEBY, 1980; VASSEUR *et al.*, 1984; DAVIES, GUYURON, HUSAMI, 1991; MADHUCHANDRA, BHAT, RAMESH, 1991; POWELL *et al.*, 1991; DRUCKER *et al.*, 1998), sobretudo nas fases mais iniciais da cicatrização. Em 2003, BROWER & JOHNSON avaliaram importantes estudos *in vivo* e *in vitro* que demonstravam alterações morfológicas importantes nas fases inflamatória e proliferativa da cicatrização, como redução da força de quebra da cicatriz, redução da síntese de colágeno, aumento do tempo de cicatrização, aumento das taxas de infecção, diminuição da quantidade de fibras de colágeno e redução da vascularização da cicatriz. Não ficaram demonstradas alterações significantes no aspecto final da cicatriz, o que pode significar: (1) que os anestésicos não prejudicam a fase de remodelagem e qualquer atraso nas fases iniciais é compensado nesta última; ou então (2) que a metodologia dos estudos até o presente não foi capaz de detectar as sequelas morfológicas e funcionais que um retardo inicial pode causar.

A cicatrização cutânea consiste em um processo complexo envolvendo inflamação, epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de matriz intersticial realizados por diferentes tipos de células, como queratinócitos, fibroblastos, células inflamatórias e endoteliais (BROWER & JOHNSON, 2003). A inflamação neurogênica (IN) é o primeiro conjunto de eventos na fase inflamatória e, portanto, no processo cicatricial.

CAVIEDES-BUCHELI *et al.*, em 2008, apontaram diversos estímulos que disparam a IN como: calor, lesões tóxicas, agentes irritantes,

alérgenos, luz ultravioleta e agentes microbianos. Segundo ZEGARSKA, LELINSKA, TYRAKOWSKI, em 2006, o estresse mecânico também estimula as fibras sensitivas da pele, que levam um impulso para processamento medular mas também desencadeia um reflexo axonal com estimulação antidrômica dos nervos sensitivos ao redor do estímulo inicial, levando à liberação de neuropeptídeos (NP's) pelas terminações nervosas livres da pele, incluindo a substância P (SP) e o CGRP (*calcitonin gene-related peptide*), ambos essencialmente pró-inflamatórios, apesar do CGRP ter também algumas atividades anti-inflamatórias e imunossupressoras (ROOSTERMAN *et al.*, 2006). Os NP's iniciam uma cadeia de eventos em cascata, iniciando processos inflamatórios, imunológicos e sensoriais (dor, prurido e vasodilatação ou *flare*). A partir daí, diversas células com receptores específicos aos NP's são ativadas, como mastócitos, queratinócitos, fibroblastos, melanócitos, neutrófilos, linfócitos, entre outros e uma diversidade de fatores são liberados como histamina, TNF- α , prostaglandinas, leucotrienos, interleucinas, além de iniciar a quimiotaxia de células imunomoduladoras (CAVIEDES-BUCHELI *et al.*, 2008).

Os eventos da IN têm influência direta na cicatrização normal (ESTEVES JUNIOR *et al.*, 2009), mas há fortes indícios de que estejam envolvidas também nas cicatrizes hipertróficas (LIANG *et al.*, 2004; AKAISHI, OGAWA, HYAKUSOKU, 2008; HOCHMAN *et al.*, 2008) e em várias doenças cutâneas como psoríase (ZEGARSKA, LELINSKA, TYRAKOWSKI, 2006), dermatite atópica (FUJII, SENGOKU, TAKAKURA, 2010; MISERY, 2011), e dermatite de contato (PAVLOVIC *et al.*, 2011). Outros autores também apontam que falhas nas vias iniciais da IN podem levar a um atraso no ritmo e na qualidade da própria

cicatrização (SMITH & LIU, 2002; DELGADO, MCMANUS, CHAMBERS, 2005; ROOK & MCCARSON, 2007).

Essas indagações nortearam o presente estudo, que buscou averiguar, de maneira direta, se os AL's seriam capazes de inibir a liberação de NP's na pele na sua fase mais incipiente do processo cicatricial (na inflamação neurogênica), e se haveria alguma diferença no grau de inibição entre os mesmos, visto que cada AL tem potência e durabilidade diferentes.

O modelo adotado foi com ratos Wistar, para que o trabalho seja comparável com outros trabalhos da literatura que adotam o mesmo modelo (WALLENGREN, CHEN, SUNDLER, 1999; SMITH & LIU, 2002; DELGADO, MCMANUS, CHAMBERS, 2005; ESTEVES JUNIOR *et al.*, 2009; MISHIMA *et al.*, 2011). Outros animais de pequeno porte, como cobaia, coelho e hamster, também podem ser adotados, mas todos enfrentam o mesmo problema: a cicatrização rápida e eficiente não é igual à de humanos (DRUCKER *et al.*, 1998). Como mencionam BROWER & JOHNSON em 2003, há dificuldade em se estudar cicatrização em humanos pelos obstáculos éticos em se remover amostras da cicatriz para análise, sobretudo em pacientes sem doenças cicatriciais.

DRUCKER *et al.*, em 1998, utilizaram modelo animal com cobaias e incisões na linha mediana do dorso após injeção de solução salina a 0,9%, assim como no presente estudo. No entanto, os autores efetuaram a sutura da incisão para realizar testes mecânicos sobre a cicatriz além da análise morfológica. Suturas na incisão são um viés por si só, já que há liberação de substâncias inflamatórias no local da passagem do fio (estímulo nociceptivo) que poderiam alterar a avaliação ao microscópio e a quantificação ao *Western blotting* (WB). Além disso, a amostra de pele do

trabalho desses autores foi retirada em pele total, por dissecação manual, o que acaba gerando amostras com volumes diferentes de tecido subcutâneo.

No presente estudo, optou-se pelo uso de um dermatômetro elétrico para que a espessura de pele fosse sempre constante e não gerasse amostras de maior volume do que outras, e, tampouco, viesse inadvertidamente acompanhada de tecido subcutâneo ou panículo carnoso. Não foram encontrados na literatura estudos que utilizassem a mesma forma padronizada de retirada de pele, o que poderia gerar quantidades diferentes de substâncias inflamatórias.

O WB utilizado neste trabalho é um método que quantifica as proteínas marcadas de toda a amostra retirada, portanto, tais amostras têm que ter volumes homogêneos e padronizados. A espessura total da pele do rato no dorso fica entre 900 e 1000 μ m e os folículos pilosos são abundantes em profundidade maior que 500 μ m, como mostraram RAJKOVIC, MATAVULJ, JOHANSSON, em 2005. Os mesmos autores já apontaram que as terminações nervosas se concentravam na epiderme e na metade superior da derme e que os folículos pilosos, por serem ricamente inervados e abundantes em NP's, poderiam mascarar a análise de eventos mais sutis na superfície da pele. Por isso, optou-se pela espessura parcial constante de 500 μ m. DELGADO, MCMANUS, CHAMBERS, em 2005, enfatizaram um modelo animal, onde eles utilizam um laser de CO₂ para realizar uma lesão na pele eliminando aproximadamente 50% da camada mais superficial para avaliar os efeitos de SP na cicatrização. Apesar de obter uma profundidade padronizada para estudo, a metade mais profunda da pele não é o melhor local para avaliar a resposta cicatricial ou as alterações provocadas pela SP, já que contém diferentes quantidades de terminações nervosas relacionadas a glândulas e folículos pilosos. Todos

esses apêndices cutâneos liberando NP's "inundariam" as amostras de pele com SP e CGRP, mascarando as quantidades de NP's realmente oriundas das terminações nervosas livres, que são objeto desse estudo.

Para que as dimensões das amostras fossem semelhantes, um punch cutâneo foi usado compreendendo as duas margens da reta "A". Considerando que todo o fenômeno analisado acontecia num pequeno espaço, um diâmetro de oito milímetros de área com a reta "A" atravessando seu centro foi suficiente, já que essa era a origem do estímulo para liberação de NP's.

Outras peculiaridades tiveram que ser suplantadas para a perfeita adequação do método. Os neuropeptídeos têm estrutura molecular frágil, são facilmente liberados pelas terminações nervosas e têm padrão de disponibilidade na pele e internalização celular pouco estudadas (BRAIN & CAMBRIDGE, 1996; WEIDNER *et al.*, 2000).

A epilação poderia liberar NP's cutâneos, já que a retirada de pelos, seja qual for o método, também implica em microtraumas na pele do rato. Não há na literatura estudos que determinem o tempo de degradação dos neuropeptídeos no interstício da pele e foi necessário determinar em quanto tempo essas substâncias voltam às concentrações fisiológicas na pele após uma epilação. Em estudo piloto, detectou-se que a SP e o CGRP voltam aos valores basais em um mínimo de 30 minutos após estímulo único. Sendo assim, estabeleceu-se um tempo de 30 minutos como padrão para se iniciar o experimento após a epilação, quando as concentrações de ambos os neuropeptídeos já estivessem comprovadamente em níveis fisiológicos. Nem DRUCKER *et al.*, em 1998, nem RAJKOVIC, MATAVULJ, JOHANSSON, em 2005, aguardaram algum período após a epilação, o que poderia representar viés na quantificação de NP's na pele.

A potência dos AL's está relacionada, primariamente, a seu grau de lipossolubilidade (GUPTA, 1991). A lidocaína (LDC) é um anestésico de potência moderada, duração de uma a três horas e início do bloqueio nervoso de um a três minutos (THOMSON *et al.*, 1987). A bupivacaína (BVC) é um anestésico de alta potência, duração de três a nove horas e início do bloqueio nervoso de um a dez minutos (GUPTA, 1991). A ropivacaína (RVC) tem estrutura semelhante à BVC, alta potência, duração de cinco a oito horas e início do bloqueio nervoso de 15 a 30 minutos, além de baixa toxicidade e ação discretamente vasoconstritora (MCCLURE, 1996; ARLANDER *et al.*, 1998; FREDMAN *et al.*, 2000). Os tempos de início de ação e duração dos três AL's seriam outro importante argumento a favor de se esperar 30 minutos após a epilação, pois, nesse momento, há maior garantia de que todos os AL's testados estariam com bloqueio nervoso ativo e interferindo potencialmente na liberação dos NP's.

As concentrações dos AL's foram estabelecidas em 2% para a lidocaína, 0,5% para a bupivacaína e 0,75% para a ropivacaína. Essas concentrações foram adotadas seguindo alguns critérios. Primeiro, buscou-se concentrações que fossem as mais frequentes na prática médica, de modo que qualquer resultado obtido desse estudo pudesse ter uma analogia mais direta com a clínica. As concentrações de lidocaína (2%) e ropivacaína (0,75%) são as mais altas disponíveis comercialmente, no entanto, optou-se nesse estudo pela bupivacaína a 0,5%. Isso se deve ao fato de que a bupivacaína a 0,75% tem cada vez menos procura comercial devido aos crescentes relatos de efeitos adversos no uso clínico, e o próprio Centro de Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo emitiu alerta sobre os efeitos adversos dose-dependente da bupivacaína (Alerta Terapêutico nº 07/06 - Cloridrato de bupivacaína - Anexo 4). O grupo bupivacaína não foi

capaz de inibir a SP na concentração de 0,5%, mas é improvável que uma concentração pouco maior (de 0,75%) possa alterar esse achado. Essa afirmação se baseia no estudo de DIAS *et al.*, de 2008, que utilizam AL's (lidocaína, levobupivacaína e ropivacaína) em duas concentrações para inibir os efeitos de NP's na pele de humanos e observaram que, apesar de haver diferenças de inibição dose-dependente, todos os anestésicos avaliados foram capazes de demonstrar inibição na formação de eritema causados pela SP em todas as doses. O presente estudo utilizou concentrações de lidocaína e ropivacaína que DIAS *et al.* chamaram de anestésica (respectivamente 2% e 0,75%), porém a levobupivacaína usada no estudo desses autores não pode ser comparada à bupivacaína a 0,5%. Sendo assim, a ação da bupivacaína a 0,75% ainda merece comprovação científica.

A bupivacaína é uma droga vendida comercialmente com a substância metilparabeno, que é um agente antimicrobiano utilizado como conservante em medicamentos e cosméticos. Essa substância pertence a classe dos parabenos, que são ésteres derivados do ácido p-hidroxibenzóico, utilizados com esta finalidade há mais de 50 anos. O metilparabeno é um dos conservantes de cosméticos de maior aceitação em todo o mundo e apresenta um amplo espectro de ação antimicrobiana, sendo efetivo contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, assim como leveduras e fungos. Optou-se por não utilizar a forma pura da bupivacaína e sim a forma comercial amplamente aceita, para que os resultados obtidos tivessem analogia com o uso clínico corrente. No entanto, é opinião desse autor que o metilparabeno presente na composição da bupivacaína não teria influência sobre os resultados obtidos nesse

trabalho, visto que ele não tem efeitos ou atividades inflamatórias conhecidas.

O presente estudo buscou uma maneira de quantificação direta dos neuropeptídeos na pele para obter resultados mais confiáveis e reprodutíveis. O método de escolha para quantificação direta foi o *Western blotting* (WB). No entanto, foi necessário o desenvolvimento de modificações laboratoriais pioneiras nas técnicas clássicas de WB para suplantiar certas dificuldades técnicas, discutidas adiante. O desenvolvimento do WB para quantificar NP's deu-se no Laboratório de Neurocirurgia Experimental - LIM 45 da Universidade de São Paulo, USP (Coordenador: Prof. Dr. Gerson Chadi).

Pesquisas que investigam neuropeptídeos na pele de animais in vivo, frequentemente, adotam a imuno-histoquímica (IHQ) como método de quantificação (DELGADO, MCMANUS, CHAMBERS, 2005; RAJKOVIC, MATAVULJ, JOHANSSON, 2005). A IHQ é um método de quantificação indireta, onde a substância marcada fica fluorescente ao microscópio confocal e é contada por um ou mais operadores humanos através de técnicas de amostragem e estereologia (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003; RAJKOVIC, MATAVULJ, JOHANSSON, 2005). A IHQ apresenta as vantagens de ser um método tecnicamente acessível, bem compreendido e pouco oneroso, pois os anticorpos primários e secundários estão entre os mais baratos do mercado. Os marcadores fluorescentes, como a fluoresceína isotiocianato (FITC), foram os primeiros a ser utilizados, demonstrando a localização de neuropeptídeos em fibras nervosas que, em cortes espessos, permite observar o trajeto sinuoso das fibras pelo tecido estudado. Assim, a IHQ é um método morfológico que se presta a determinação topográfica dos elementos imunomarcados e, deste

modo, qualitativa de eventos estudados. No entanto, a marcação não é permanente e a maioria dos marcadores tende a perder sua fluorescência num curto período de tempo, principalmente, sob a ação da luz, dificultando a documentação de lâminas através de fotografia microscópica. Além disso, tecidos fixados em formalina tendem a ser autofluorescentes e, quando contêm catecolaminas, podem ser induzidos a emitir fluorescência específica de cor aproximada à emitida pela fluoresceína.

A IHQ presta-se bem as informações qualitativas, contudo alguns autores desenvolveram métodos para sua quantificação, automatizados ou não, que permitissem comparações (HENDERSON, TERENGI, FERGUSON, 2011). No entanto, a quantificação das substâncias é indireta, operador-dependente e pode apresentar significativa variabilidade interexaminadores e imprecisão de resultados. Outra desvantagem da utilização da IHQ para a quantificação é o manuseio excessivo das amostras e tempo de execução das fases, dificultando o processamento simultâneo dos grupos experimentais. Entretanto, a maior limitação da IHQ como método quantitativo é a impossibilidade de fazer as marcações controle de inespecificidade nas mesmas amostras (secções do tecido) submetidas às marcações em questão e controle quantitativo do *background*.

Alguns estudos tem utilizado um método de quantificação da secreção de neuropeptídeos no interstício da pele por meio da técnica de microdiálise (MD) seguida de quantificação por ELISA (SAUERSTEIN *et al.*, 2000; WEIDNER *et al.*, 2000). A MD é um processo onde cateteres de entrada e de saída são introduzidos na derme com um espaçamento entre si. As substâncias do interstício são, então, captadas e esse lavado é

encaminhado para quantificação proteica pelo difundido método de ELISA (FUJII, SENGOKU, TAKAKURA, 2010). As vantagens desse método são a quantificação direta, de significativa acurácia, em valores absolutos, com unidades em molar e precisão digital de um leitor específico. Como desvantagens, a MD é tecnicamente complexa e trabalhosa, além de trazer alguns vieses devido à necessidade de cateteres inseridos na pele, que por si só poderiam estimular a liberação de substâncias inflamatórias e imunológicas, como histamina, serotonina, prostaglandinas, NGF, além de neuropeptídeos (ROOSTERMAN *et al.*, 2006). A utilização do ELISA também é dispendiosa devido ao alto preço dos anticorpos primários e secundários.

O Radioimunoensaio (RIE) também foi utilizado para detecção de neuropeptídeos em trabalhos científicos na pele (CAVIEDES-BUCHELI *et al.*, 2009). O RIE é um método preciso, específico e relativamente barato. No entanto, seu uso é restrito devido à necessidade de marcadores radioativos que requerem precauções especiais de instalações, manuseio e licença.

Esse estudo utilizou o WB por ser um método viável para detecção de neuropeptídeos na pele, com alta sensibilidade e especificidade, reprodutibilidade e acessibilidade técnica e econômica.

No entanto, por se tratar de uma técnica demorada e com várias etapas de execução, o autor acredita que o WB tem aplicação prática dificultada, principalmente quando se emprega número de amostras significativo. Por isso, sua utilização costuma ser restrita aos trabalhos de pesquisa, em detrimento de outras metodologias que são mais rápidas e de fácil execução, como a IHQ. A técnica de WB utilizada nesse estudo contorna sua principal desvantagem que é a dificuldade decorrente da

extração proteica de um tecido de alta densidade como a derme. Tais limitações foram ultrapassadas adaptando as técnicas clássicas de WB como: (1) manipulação específica das amostras, com séries de congelamentos e descongelamentos, maceração mais cuidadosa e uso de homogeneizador mais potente; (2) utilização de reagentes de lise em proporções maiores; (3) inibição de proteases em proporções maiores; e (4) utilização de meios de transferência proteica específicos para a pele, como a membrana de PVDF, já que a membrana habitual de nitrocelulose não foi eficaz.

Especificamente quanto ao *kit* de CGRP para WB, foram utilizados anticorpos para quantificação de sua forma ativa, com 5 kda, e de sua forma precursora, com 15 kda. O pró-CGRP é uma molécula de aproximadamente 15 kda que, após sofrer clivagem, dá origem a moléculas da forma ativa de CGRP (MISHIMA *et al.*, 2011). O pró-CGRP não tem outras funções biológicas específicas conhecidas e sua quantificação não foi considerada como objetivo desse trabalho, já que faz parte apenas da síntese do CGRP. No entanto, como MISHIMA *et al.* (2011) comentaram em seu artigo científico, a quantificação do pró-CGRP auxilia e é um grande indicador do comportamento do CGRP na sua forma ativa, visto que este último tem degradação rápida e comportamento ainda pouco estabelecido na literatura (BRAIN & WILLIAMS, 1989). Nas descrições da bula do anticorpo anti-CGRP utilizado (Sigma) não há a menção da sua habilidade em se ligar ao pró-CGRP, mas considerando-se a literatura, a similaridade do peso molecular do pró-CGRP e a localização da banda que esse anticorpo marca no gel, assumimos que esta banda refere-se ao pró-CGRP.

A demarcação visual com caneta da área a ser examinada seria conveniente para o experimento, mas um estudo-piloto demonstrou que a tinta das canetas dermográficas, ao pigmentar as camadas superficiais da derme, interfere com o método de quantificação dos neuropeptídeos na placa de gel do WB. Portanto, qualquer marcação da pele dos ratos com caneta deve ficar fora da área da amostra coletada para análise e servir apenas de referência operacional para o experimento. Outras maneiras de demarcação da área, com moldes de papel ou de plástico também poderiam ser usados e seriam inócuos ao método de quantificação por WB.

O WB não distingue qual a localização do neuropeptídeo dentro da amostra, isto é, não é possível dizer se ele está dentro de vesículas nas terminações nervosas ou se ele já foi excretado e se encontra no meio intersticial ou mesmo se já foi internalizado na célula-alvo.

Outros métodos seriam capazes de fazer essa distinção precisamente, sobretudo a MD onde apenas o lavado intersticial é analisado e marcado pelo ELISA (WEIDNER *et al.*, 2000). Estudos onde a posição exata do neuropeptídeo é de extrema importância podem se beneficiar mais de MD com ELISA do que com o presente modelo experimental, por isso nenhum método deve ser considerado definitivo. O WB quantitativo permite a análise quantitativa e segura dos neuropeptídeos, pois possibilita a retirada dos valores do *background* do filme e a normatização dos valores específicos do marcador em questão, em cada amostra, pelos valores de um marcador estrutural, no caso a beta-tubulina.

Quanto à análise estatística, foram realizados testes de Kolmogorov-Smirnov (KIRKWOOD & STERNE, 2003) para avaliar a distribuição de normalidade de probabilidade das medidas em cada grupo (Apêndice 3). Como os testes de normalidade não apresentaram qualquer evidência de

ausência de normalidade na distribuição dos dados, foram utilizadas análises de variâncias (ANOVA) (NETER *et al.*, 1996) seguidas de comparações múltiplas de Tukey (NETER *et al.*, 1996) para verificar se há diferença nas quantificações de neuropeptídeos entre os grupos de anestésicos. Os resultados foram ilustrados com uso de gráficos de barras representando as médias de cada grupo com os respectivos erros-padrão, com nível de significância de 5% e poder do teste de 80%. A quantificação de SP apresentou um *outlier*, ou valor atípico, no grupo B, que foi excluído sem prejuízo dos testes estatísticos. O teste de Tukey foi realizado de forma pareada entre os grupos, para SP e pró-CGRP. O CGRP-forma ativa não foi avaliado segundo o teste de Tukey já que a ANOVA não mostrou significância entre seus grupos.

Quanto aos resultados desse estudo, em relação à SP, os grupos (L) (lidocaína 2%) e (R) (ropivacaína 0,75%) se portaram de maneira semelhante em todo o experimento. Apesar de terem lipossolubilidade diferentes, o que se traduziria em distinta potência e durabilidade de bloqueio nervoso, ambas as drogas foram plenamente capazes de inibir a liberação de SP na pele em relação ao grupo controle. O grupo (B) (bupivacaína 0,5%) não teve influência sobre a liberação de SP, com resultado significativo em relação à lidocaína e à ropivacaína.

Em estudos que avaliam aspectos morfológicos e macroscópicos da cicatriz, vários autores já observaram a influência deletéria sobre o desenvolvimento da cicatriz causada pela lidocaína (CHVAPIL *et al.*, 1979; VASSEUR *et al.*, 1984; DRUCKER *et al.*, 1998) e também pela bupivacaína (CHVAPIL *et al.*, 1979; VASSEUR *et al.*, 1984). No entanto, o presente estudo demonstrou que a lidocaína interferiu sobre a liberação de SP, mas a bupivacaína não interferiu, o que impossibilita uma correlação

direta de que a ausência de SP seria a causa das alterações cicatriciais descritas nos trabalhos mencionados, onde tanto a lidocaína quanto a bupivacaína foram igualmente capazes de inibir aspectos da cicatrização. A influência da ropivacaína é inédita na literatura sob esse ponto de vista, mas pode-se fazer uma analogia aos resultados encontrados com o uso de lidocaína, já que ambas apresentaram comportamento semelhante sobre a liberação de SP, e assim levantar a hipótese de que a ropivacaína poderia inibir as fases iniciais da cicatrização tanto quanto a lidocaína.

DIAS *et al.*, em 2008, tentaram demonstrar a influência dos AL's lidocaína, levobupivacaína e ropivacaína sobre os NP's de maneira indireta, por meio da mensuração do eritema com laser Doppler. Dessa forma, injetaram concomitantemente SP ou bradicinina com AL's de diferentes tipos em diferentes concentrações na face volar do antebraço de dez voluntários. Esses autores observaram redução do eritema associada a todos os anestésicos, sem diferença entre si, mas com diferenças em relação às concentrações utilizadas, ou seja, quanto maior a concentração, maior foi a redução do eritema. A mensuração indireta do efeito da SP por meio do eritema pode conter viés já que cada AL tem um efeito sobre a dilatação dos vasos por si só, independente da ação da SP. MCCLURE em 1996 já havia descrito a capacidade vasoconstritora da ropivacaína em contraposição ao efeito vasodilatador da lidocaína, o que poderia causar variações na quantidade de eritemas, com consequente imprecisão na mensuração da ação da SP no trabalho de DIAS *et al.* (2008). Quanto ao uso de levobupivacaína, não se pode compará-la aos efeitos da bupivacaína por suas diferenças químicas estruturais. Mas, segundo DIAS *et al.* (2008), a levobupivacaína foi capaz de reduzir o eritema causado pela SP,

sugerindo que a levobupivacaína seria capaz de inibir a liberação de SP, ao contrário do que mostra o presente estudo em relação à bupivacaína.

CAVIEDES-BUCHELI *et al.*, em 2009, fizeram estudo de mensuração direta de SP com radioimunoensaio em polpas dentárias após injeção de lidocaína com vasoconstritor ou prilocaína (com e sem vasoconstritor) e comprovaram a ação da lidocaína sobre a inibição de SP. No entanto, o uso de vasoconstritor inviabiliza uma correlação direta com o presente estudo, já que a lidocaína 2% com epinefrina 1:80.000 poderia estar potencializando seu efeito e o próprio autor discute se a inibição de SP, de forma mais relevante, ocorreu devido à potencialização da lidocaína pela associação com a epinefrina, o que abre campo para uma nova pesquisa que esclareça esse ponto.

Em relação ao CGRP (forma ativa - 5kda), nenhum dos grupos experimentais foi capaz de inibi-lo na pele, no presente estudo. Paralelamente, o pró-CGRP (15kda) foi inibido por todos os grupos testados. A interpretação desses dados remonta à fisiologia do CGRP. Segundo MISHIMA *et al.*, em 2011, esse neuropeptídeo com 37 aminoácidos é produzido no corpo celular do neurônio do gânglio da raiz dorsal pela transcrição do gene da calcitonina/CGRP, onde uma molécula precursora com 15kda, denominada pró-CGRP, é sintetizada no retículo endoplasmático e processada no Complexo de Golgi. O pró-CGRP é levado por via axonal, em sentido antidrômico, para as terminações livres cutâneas onde é clivado em CGRP (forma ativa), com aproximadamente 5kda, para ser liberado no interstício diante de um estímulo local. MISHIMA *et al.*, em 2011, avaliaram a influência do CGRP na revascularização de membros isquêmicos em ratos e quantificaram o pró-CGRP para comprovar a liberação e aumento de produção de CGRP durante os dias do experimento.

O presente estudo demonstrou uma completa depleção dos níveis de pró-CGRP na pele, o que faz supor que houve clivagem desse precursor e liberação do CGRP na pele.

LEFFLER *et al.*, em 2008, demonstraram que a lidocaína pode ativar receptores da família de canais TRP (*transient receptor potential*) e provocar a liberação de CGRP, tanto em nervos periféricos como na pele, após cinco minutos de estímulo. O presente estudo adotou o tempo de 30 minutos como padronização para ambos os NP's e não observou alteração quanto à liberação de CGRP em nenhum dos grupos experimentais. Se realmente houve uma liberação cutânea de CGRP, inferida pela clivagem do pró-CGRP e sugerida pelo estudo de LEFFLER *et al.* (2008), o tempo de 30 minutos foi suficiente para degradar o excesso de CGRP na pele e deixá-lo novamente em níveis basais, o que explicaria o resultado obtido. Outros estudos seriam necessários para confirmar essa hipótese, visando estabelecer com maior precisão a curva de degradação de CGRP na pele.

SMITH & LIU, em 2002, realizaram injeções de capsaicina em ratos recém-nascidos e provocaram um ferimento cutâneo com *punch* de quatro milímetros. Após comprovarem a redução de 43% nos níveis de CGRP, esses autores observaram um aumento na área e volume da cicatriz, devido ao aumento relativo do tecido de granulação, além de atraso na queda da crosta e retardo na epitelização. Os autores sugeriram que a ausência do CGRP durante a cicatrização inibia a apoptose do tecido de granulação causando as alterações relatadas. Por outro lado, CHVAPIL *et al.* (1979), VASSEUR *et al.* (1984), DRUCKER *et al.* (1998), dentre outros, também demonstraram alterações cicatriciais semelhantes às descritas por SMITH & LIU (2002) após o uso de AL's. Se a hipótese de que os AL's estimulam a liberação de CGRP estiver correta, então, as alterações cicatriciais

observadas pelos autores citados diante do uso de AL's não poderão ser creditadas à ausência do CGRP na cicatrização, ao menos, não nos momentos iniciais (na fase de inflamação neurogênica), e SMITH & LIU (2002) podem ter observado um atraso cicatricial causado por outras substâncias também inibidas pela capsaicina, como a própria SP ou ainda outro NP, necessitando de outros estudos para confirmar.

O CGRP é um vasodilatador muito eficaz, como demonstrado por ESTEVES JUNIOR *et al.*, em 2009, que comprovaram seus efeitos no aumento da viabilidade de retalhos cutâneos em ratos. Esse efeito é, provavelmente, devido ao aumento de perfusão do retalho por dilatação duradoura das arteríolas pré-capilares, o que aumentaria o fluxo sanguíneo e a perfusão tecidual sem provocar, no entanto, extravasamento plasmático (WEIDNER *et al.*, 2000). Além disso, o CGRP comprovadamente potencializa os efeitos e a disponibilidade da SP ao inibir sua degradação pela NEP (ZEGARSKA, LELINSKA, TYRAKOWSKI, 2006); tem efeitos anti-inflamatórios ao reduzir acúmulo de neutrófilos e promover apoptose de linfócitos T (SMITH & LIU, 2002); e modula a liberação e quimiotaxia de substâncias e células pró-inflamatórias, respectivamente (ROOSTERMAN *et al.*, 2006). No entanto, sua ação direta sobre a cicatrização é discutível e contraditória entre os artigos da literatura (SMITH & LIU, 2002; ROOSTERMAN *et al.*, 2006; ZEGARSKA, LELINSKA, TYRAKOWSKI, 2006; LEFFLER *et al.*, 2008).

Outros meios químicos e físicos também parecem influenciar a secreção de NP's. RAJKOVIC, MATAVULJ, JOHANSSON, em 2005, investigaram a influência de campos magnéticos sobre a liberação de NP's na pele e não observaram diferença estatística pela quantificação indireta por IHQ. Considerando as limitações desse método de quantificação, os

autores relataram uma secreção menor de SP e uma secreção maior de CGRP nas amostras após o estímulo por campos magnéticos.

Segundo ROOK & MCCARSON, em 2007, a morfina tópica sobre ferimentos retarda a cicatrização. Em estudo onde foram injetados soluções de morfina, antagonistas de receptores NK-1 e NK-2 e morfina combinada com SP, esses autores demonstraram que a morfina atrasou a cicatrização através da inibição de secreção de SP e neurocinina A (NKA), efeito esse revertido ao se injetar esses NP's concomitantemente. O presente estudo mostrou que a LDC e a RVC também inibem a liberação de SP e poderiam ter os mesmos resultados da morfina, alterando a morfologia cicatricial e atrasando a cicatrização cutânea, o que justificaria as alterações demonstradas por outros autores diante do uso de AL's. Mas são necessários mais estudos para comprovação desse evento.

Para averiguar a possibilidade de que corticoides poderiam inibir a inflamação neurogênica, assim como inibem os processos inflamatórios clássicos, FUJII, SENGOKU, TAKAKURA, em 2010, testaram corticoides tópicos e sistêmicos, em uso prolongado e pontual, concomitantes a ferimentos em orelhas de ratos. Os autores observaram um aumento nos níveis de SP após uso crônico de corticoides tópicos (sete dias em ratos), atribuindo a esse mecanismo o advento de dermatite atópica em humanos que fazem uso inapropriado de corticoides tópicos. De fato, MISERY em 2011, fez um artigo de revisão abrangendo as funções imunológicas do sistema nervoso na pele, e ele ressalta trabalhos que comprovam as funções imunomoduladoras da SP e do CGRP na pele, sobretudo nas atopias. Segundo os estudos citados, os corticoides parecem não inibir a IN, mas fazem-se necessários outros estudos que abordem esse tema diretamente.

Perspectivas

A inflamação neurogênica está envolvida nos processos fisiológicos e patológicos da cicatrização; por isso, a possibilidade de modular suas fases iniciais, atrasando-a, inibindo-a, ou estimulando-a, traria a perspectiva de controlar tais processos, eventualmente otimizando o tempo de cicatrização normal e corrigindo as cicatrizações patológicas.

O uso de AL's é uma das maneiras de influenciar na liberação de NP's e, portanto, merece destaque nas perspectivas para futuro uso clínico visando controlar eventos fisiológicos e patológicos que envolvem a inflamação neurogênica.

Na área da clínica, doenças cutâneas com origem neuropeptidérgica, como psoríase e dermatites atópicas, e o quelóide (AKAISHI, OGAWA, HYAKUSOKU, 2008) poderiam se beneficiar de um complemento terapêutico através da modulação da secreção de neuropeptídeos, visando um melhor controle dessas patologias além do tratamento clássico atual.

Na área da cirurgia, o conhecimento de que a lidocaína e a ropivacaína inibem a liberação de SP, em contraposição à bupivacaína, que não a influencia, pode contribuir para selecionar o uso desses AL's quando não for desejável inibir a inflamação neurogênica ou talvez atrasar o processo cicatricial. Na prática cirúrgica, onde certas intervenções podem ser realizadas com anestesia local, a inibição de SP poderia trazer uma redução da contração cicatricial, uma menor resistência dos pontos cirúrgicos e uma cicatrização com menor força tênsil, unicamente pelo tipo de anestésico local utilizado. Por outro lado, procedimentos cirúrgicos onde existe chance de retrações cutâneas, formação de bridas ou qualquer advento de uma cicatrização exacerbada, comum em pacientes queimados

ou vítimas de traumas, poderiam ser melhorados com o uso de anestésicos com maior inibição da IN. Assim sendo, protocolos cirúrgicos seriam passíveis de revisão considerando-se conceitos de modulação de processos inflamatórios.

Da mesma forma, as cicatrizes fibroproliferativas, como cicatrizes hipertróficas e queloides merecem maiores estudos quanto à inclusão de proporções de AL's em seu tratamento. Enquanto um modelo animal para estudos de cicatriz hipertrófica estiver sendo desenvolvido (ENGRAV *et al.*, 2011), estudos terapêuticos em humanos com a injeção de um anestésico local concomitante ao já consagrado corticoide, poderia modular sua patogênese e impactar num maior sucesso de prevenção e recidiva pós-cirúrgica.

Uma das questões mais relevantes que esse trabalho levanta é sobre a real influência da SP no resultado final da cicatriz. Estudos anteriores mostram que a redução de SP parece, de fato, contribuir para algum retardo nas fases iniciais da cicatrização, que precisariam ser melhor caracterizados. No entanto, a influência da SP nas fases finais da cicatrização carece de mais estudos em animais e *in vitro* para depois serem pesquisadas em humanos.

O CGRP mostra indícios de não participar de modo direto sobre as alterações cicatriciais descritas por outros autores (SMITH & LIU, 2002; ROOSTERMAN *et al.*, 2006; ZEGARSKA, LELINSKA, TYRAKOWSKI, 2006; LEFFLER *et al.*, 2008). São necessários maiores estudos para se definir as consequências das atividades imunomoduladoras e vasodilatadoras do CGRP, assim como sua real função na cicatrização.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

1. A lidocaína e a ropivacaína diminuíram os níveis de SP na pele incisada de ratos.
2. A bupivacaína não tem influência sobre os níveis de SP na pele incisada de ratos.
3. Nenhum AL demonstrou influência sobre a presença de CGRP na pele incisada de ratos no tempo avaliado.

8. REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

Akaishi S, Ogawa R, Hyakusoku H. Keloid and hypertrophic scar: neurogenic inflammation hypotheses. *Med Hypotheses*. 2008;71(1):32-8.

Alves CJ, de Santana LP, dos Santos AJ, de Oliveira GP, Duobles T, Scorisa JM, et al. Early motor and electrophysiological changes in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis and gender differences on clinical outcome. *Brain Res*. 2011 Jun 7;1394:90-104.

Arlander E, Ekstrom G, Alm C, Carrillo JA, Bielenstein M, Bottiger Y, et al. Metabolism of ropivacaine in humans is mediated by CYP1A2 and to a minor extent by CYP3A4: an interaction study with fluvoxamine and ketoconazole as in vivo inhibitors. *Clin Pharmacol Ther*. 1998 Nov;64(5):484-91.

Beaussier M, Bouaziz H, Aubrun F, Belbachir A, Binhas M, Bloc S, et al. [Wound infiltration with local anesthetics for postoperative analgesia. Results of a national survey about its practice in France]. *Ann Fr Anesth Reanim*. 2012 Feb;31(2):120-5. French.

Besne I, Descombes C, Breton L. Effect of age and anatomical site on density of sensory innervation in human epidermis. *Arch Dermatol*. 2002 Nov;138(11):1445-50.

Birklein F, Schmelz M. Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). *Neurosci Lett*. 2008 Jun 6;437(3):199-202.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.

Brain SD, Williams TJ. Interactions between the tachykinins and calcitonin gene-related peptide lead to the modulation of oedema formation and blood flow in rat skin. *Br J Pharmacol*. 1989 May;97(1):77-82.

Brain SD, Cambridge H. Calcitonin gene-related peptide: vasoactive effects and potential therapeutic role. *Gen Pharmacol*. 1996 Jun;27(4):607-11.

Brain SD, Grant AD. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev*. 2004 Jul;84(3):903-34.

Brower MC, Johnson ME. Adverse effects of local anesthetic infiltration on wound healing. *Reg Anesth Pain Med*. 2003 May-Jun;28(3):233-40.

Caviedes-Bucheli J, Munoz HR, Azuero-Holguin MM, Ulate E. Neuropeptides in dental pulp: the silent protagonists. *J Endod*. 2008 Jul;34(7):773-88.

Caviedes-Bucheli J, Rojas P, Escalona M, Estrada A, Sandoval C, Rivero C, et al. The effect of different vasoconstrictors and local anesthetic solutions on substance P expression in human dental pulp. *J Endod*. 2009 May;35(5):631-3.

Chadi G, Silva C, Maximino JR, Fuxe K, da Silva GO. Adrenalectomy counteracts the local modulation of astroglial fibroblast growth factor system without interfering with the pattern of 6-OHDA-induced dopamine degeneration in regions of the ventral midbrain. *Brain Res*. 2008 Jan 23;1190:23-38.

Chvapil M, Hameroff SR, O'Dea K, Peacock EE, Jr. Local anesthetics and wound healing. *J Surg Res*. 1979 Dec;27(6):367-71.

Dahl V, Raeder JC. Non-opioid postoperative analgesia. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2000 Nov;44(10):1191-203.

Davies B, Guyuron B, Husami T. The role of lidocaine, epinephrine, and flap elevation in wound healing after chemical peel. *Ann Plast Surg*. 1991 Mar;26(3):273-8.

Delgado AV, McManus AT, Chambers JP. Exogenous administration of Substance P enhances wound healing in a novel skin-injury model. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005 Apr;230(4):271-80.

- Dias MP, Newton DJ, McLeod GA, Khan F, Belch JJ. The inhibitory effects of local anaesthetics on the vascular flare responses to bradykinin and substance P in human skin. *Anaesthesia*. 2008 Feb;63(2):151-5.
- Drucker M, Cardenas E, Arizti P, Valenzuela A, Gamboa A. Experimental studies on the effect of lidocaine on wound healing. *World J Surg*. 1998 Apr;22(4):394-7; discussion 7-8.
- Engrav LH, Tuggle CK, Kerr KF, Zhu KQ, Numhom S, Couture OP, et al. Functional genomics unique to week 20 post wounding in the deep cone/fat dome of the Duroc/Yorkshire porcine model of fibroproliferative scarring. *PLoS One*. 2011;6(4):e19024.
- Esteves Junior I, Tacani PM, Liggieri VC, Ruggi BG, Ferreira LM, Liebano RE. Histamine iontophoresis on the viability of random skin flap in rats. *Acta Cir Bras*. 2009 Jan-Feb;24(1):48-51.
- Ferreira LM, Gragnani A, Furtado F, Hochman B. Control of the skin scarring response. *An Acad Bras Cienc*. 2009 Sep;81(3):623-9.
- Fredman B, Shapiro A, Zohar E, Feldman E, Shorer S, Rawal N, et al. The analgesic efficacy of patient-controlled ropivacaine instillation after Cesarean delivery. *Anesth Analg*. 2000 Dec;91(6):1436-40.
- Fujii Y, Sengoku T, Takakura S. Repeated topical application of glucocorticoids augments irritant chemical-triggered scratching in mice. *Arch Dermatol Res*. 2010 Nov;302(9):645-52.
- Furutani K, Koro O, Hide M, Yamamoto S. Substance P- and antigen-induced release of leukotriene B4, prostaglandin D2 and histamine from guinea pig skin by different mechanisms in vitro. *Arch Dermatol Res*. 1999 Jul-Aug;291(7-8):466-73.
- Gupta SP. QSAR (quantitative structure-activity relationship) studies on local anesthetics. *Chem Rev*. 1991;91(6):1109-19.
- Hansson C, Holm J, Lillieborg S, Syren A. Repeated treatment with lidocaine/prilocaine cream (EMLA) as a topical anaesthetic for the cleansing of venous leg ulcers. A controlled study. *Acta Derm Venereol*. 1993 Jun;73(3):231-3.

- Henderson J, Terenghi G, Ferguson MW. The reinnervation and revascularisation pattern of scarless murine fetal wounds. *J Anat.* 2011 Jun;218(6):660-7.
- Hochman B, Nahas FX, Sobral CS, Arias V, Locali RF, Juliano Y, et al. Nerve fibres: a possible role in keloid pathogenesis. *Br J Dermatol.* 2008 Mar;158(3):651-2.
- Kahler CM, Sitte BA, Reinisch N, Wiedermann CJ. Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by substance P. *Eur J Pharmacol.* 1993 Nov 16;249(3):281-6.
- Kalman S, Linderfalk C, Wardell K, Eintrei C, Lisander B. Differential effect on vasodilatation and pain after intradermal capsaicin in humans during decay of intravenous regional anesthesia with mepivacaine. *Reg Anesth Pain Med.* 1998 Jul-Aug;23(4):402-8.
- Kirkwood BR, Sterne JA. *Essential medical statistics.* 2nd ed. Oxford: Blackwell Science; 2003.
- Leffler A, Fischer MJ, Rehner D, Kienel S, Kistner K, Sauer SK, et al. The vanilloid receptor TRPV1 is activated and sensitized by local anesthetics in rodent sensory neurons. *J Clin Invest.* 2008 Feb;118(2):763-76.
- Liang Z, Engrav LH, Muangman P, Muffley LA, Zhu KQ, Carrougher GJ, et al. Nerve quantification in female red Duroc pig (FRDP) scar compared to human hypertrophic scar. *Burns.* 2004 Feb;30(1):57-64.
- Madhuchandra SP, Bhat MP, Ramesh KV. Wound healing profile of topical xylocaine preparations in rodents. *Indian J Exp Biol.* 1991 Sep;29(9):877-8.
- Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc.* 2003 Dec;75(4):469-86.
- Martinsson T, Haegerstrand A, Dalsgaard CJ. Ropivacaine and lidocaine inhibit proliferation of non-transformed cultured adult human fibroblasts, endothelial cells and keratinocytes. *Agents Actions.* 1993 Sep;40(1-2):78-85.

- McClure JH. Ropivacaine. *Br J Anaesth*. 1996 Feb;76(2):300-7.
- McGovern UB, Jones KT, Sharpe GR. Intracellular calcium as a second messenger following growth stimulation of human keratinocytes. *Br J Dermatol*. 1995 Jun;132(6):892-6.
- Misery L. Atopic dermatitis and the nervous system. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011 Dec;41(3):259-66.
- Mishima T, Ito Y, Hosono K, Tamura Y, Uchida Y, Hirata M, et al. Calcitonin gene-related peptide facilitates revascularization during hindlimb ischemia in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Feb;300(2):H431-9.
- Moore EL, Salvatore CA. Targeting a family B GPCR/RAMP receptor complex: CGRP receptor antagonists and migraine. *Br J Pharmacol*. 2012 May;166(1):66-78.
- Morris T, Tracey J. Lignocaine: its effects on wound healing. *Br J Surg*. 1977 Dec;64(12):902-3.
- Morris T, Appleby R. Retardation of wound healing by procaine. *Br J Surg*. 1980;67(6):391-2.
- Pavlovic S, Liezmann C, Blois SM, Joachim R, Kruse J, Romani N, et al. Substance P is a key mediator of stress-induced protection from allergic sensitization via modified antigen presentation. *J Immunol*. 2011 Jan 15;186(2):848-55.
- Peters EM, Ericson ME, Hosoi J, Seiffert K, Hordinsky MK, Ansel JC, et al. Neuropeptide control mechanisms in cutaneous biology: physiological and clinical significance. *J Invest Dermatol*. 2006 Sep;126(9):1937-47.
- Powell DM, Rodeheaver GT, Foresman PA, Hankins CL, Bellian KT, Zimmer CA, et al. Damage to tissue defenses by EMLA cream. *J Emerg Med*. 1991 Jul-Aug;9(4):205-9.
- Quinlan KL, Song IS, Naik SM, Letran EL, Olerud JE, Bunnett NW, et al. VCAM-1 expression on human dermal microvascular endothelial cells is

directly and specifically up-regulated by substance P. *J Immunol.* 1999 Feb 1;162(3):1656-61.

Rajkovic V, Matavulj M, Johansson O. The effect of extremely low-frequency electromagnetic fields on skin and thyroid amine- and peptide-containing cells in rats: an immunohistochemical and morphometrical study. *Environ Res.* 2005 Nov;99(3):369-77.

Rodrigues FV, Hochman B, Wood VT, Simoes MJ, Juliano Y, Ferreira LM. Effects of lidocaine with epinephrine or with buffer on wound healing in rat skin. *Wound Repair Regen.* 2011 Mar-Apr;19(2):223-8.

Rook JM, McC Carson KE. Delay of cutaneous wound closure by morphine via local blockade of peripheral tachykinin release. *Biochem Pharmacol.* 2007 Sep 1;74(5):752-7.

Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev.* 2006 Oct;86(4):1309-79.

Schmelz M, Petersen LJ. Neurogenic inflammation in human and rodent skin. *News Physiol Sci.* 2001 Feb;16:33-7.

Smith PG, Liu M. Impaired cutaneous wound healing after sensory denervation in developing rats: effects on cell proliferation and apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2002 Mar;307(3):281-91.

Song IS, Bunnett NW, Olerud JE, Harten B, Steinhoff M, Brown JR, et al. Substance P induction of murine keratinocyte PAM 212 interleukin 1 production is mediated by the neurokinin 2 receptor (NK-2R). *Exp Dermatol.* 2000 Feb;9(1):42-52.

Steinhoff M, Stander S, Seeliger S, Ansel JC, Schmelz M, Luger T. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Arch Dermatol.* 2003 Nov;139(11):1479-88.

Theoharides TC, Singh LK, Boucher W, Pang X, Letourneau R, Webster E, et al. Corticotropin-releasing hormone induces skin mast cell degranulation and increased vascular permeability, a possible explanation for its proinflammatory effects. *Endocrinology.* 1998 Jan;139(1):403-13.

Thomson AH, Elliott HL, Kelman AW, Meredith PA, Whiting B. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of lignocaine and MEGX in healthy subjects. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1987 Apr;15(2):101-15.

Vasseur PB, Paul HA, Dybdal N, Crumley L. Effects of local anesthetics on healing of abdominal wounds in rabbits. *Am J Vet Res.* 1984 Nov;45(11):2385-8.

Wallengren J, Chen D, Sundler F. Neuropeptide-containing C-fibres and wound healing in rat skin. Neither capsaicin nor peripheral neurotomy affect the rate of healing. *Br J Dermatol.* 1999 Mar;140(3):400-8.

Weidner C, Klede M, Rukwied R, Lischetzki G, Neisius U, Skov PS, et al. Acute effects of substance P and calcitonin gene-related peptide in human skin--a microdialysis study. *J Invest Dermatol.* 2000 Dec;115(6):1015-20.
Zegarska B, Lelinska A, Tyrakowski T. Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Pharmacol Rep.* 2006 Jan-Feb;58(1):13-21.

NORMAS ADOTADAS

NORMAS ADOTADAS

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios éticos da experimentação animal (no caso do uso dos mesmos) [Internet]. 1991 [citado 2013 Abr 8]. Disponível em: <http://www.meusite.com.br/cobea/index.htm>.

DeCS Descritores em Ciências da Saúde [Internet]. São Paulo: BIREME; [cited 2010 May 20]. Available from: <http://decs.bvs.br/>

Ferreira LM. Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses: guia prático. São Paulo: Livraria Médica Paulista Editora; 2008.

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Writing and editing for biomedical publication [Internet]. Vancouver (CA); 2007 Oct [cited 2012 May 20]. Available from: <http://www.icmje.org/>

International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. Nomina anatómica veterinária. 3a ed. New York: Ithaca; 1983.

Ministério da Saúde (BR). Conselho Nacional de Saúde. Resolução no. 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 1996.

Terminologia Anatômica. Terminologia Anatômica Internacional. São Paulo: Manole; 2001.

ABSTRACT

ABSTRACT

Neurogenic inflammation (NI) is one of the earliest trigger in wound healing. After a nociceptive stimulus in the skin, occurs the release of skin pro-inflammatory neuropeptides (NP's), which are substances produced by the neurons of the dorsal root ganglia and secreted by nerve endings in the skin, triggering the inflammatory phase of wound healing. Local anesthetics (LA's) have widespread use due to its effectiveness and safety, but there is evidence that they could block the onset of neurogenic inflammation by inhibiting the secretion of NP's, potentially delaying the early stages of healing. **OBJECTIVE:** To evaluate the effect of LA's lidocaine (L), bupivacaine (B) and ropivacaine (R) in the secretion of SP and CGRP in incised rat skin. **METHODS:** We used 28 Wistar rats divided into 4 groups (n = 7), Group C (control saline 0.9%), L group (lidocaine 2%), group B (bupivacaine 0.5%) and group R (0.75% ropivacaine). After general anesthesia, the LA's were injected in each group in a straight line in the subcutaneous tissue of the dorsal midline of each rat, and after 30 minutes, an incision was made (nociceptive stimulus) along that segment. Then, each rat was subjected to induced painless death, and a square of skin, with the incised line inside, was taken with the aid of an electric dermatome. Finally, a skin sample from the midpoint of the incised line was removed with a skin punch of 8mm, to achieve standardized area and volume. This sample was submitted to a quantification of CGRP and SP by Western Blotting and followed for statistical analysis. **RESULTS:** regarding NP's in the skin of rats, group L and group R showed a reduction of SP in the samples; group B showed no reduction in the amount of SP; all groups showed reduction in the amount of pro-CGRP, with no difference between them; and neither group showed a decrease in the amount of

CGRP. **CONCLUSION:** The lidocaine and ropivacaine reduced secretion of SP by the nerve endings, the bupivacaine had no effect on secretion of SP; and no local anesthetic inhibited the secretion of CGRP in rat skin incision.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da UNIFESP – CEP 1537/09



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO/HOSPITAL SÃO PAULO

Data: 17-10-2009 10:52:33
Página 1/1
id = 4338

São Paulo, 16 de Outubro de 2009
CEP 1537/09

Ilmo(s). Sr(a).
Pesquisador(a) Guilherme Abbud Franco Lapin
Co-Investigadores:
Disciplina/Departamento Cirurgia Plástica da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador (Recursos Próprios)

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado:

'INFLUÊNCIA LOCAL DA LIDOCAÍNA, BUPIVACAÍNA E ROPIVACAÍNA SOBRE OS NEUROPEPTÍDEOS CUTÂNEOS EM RATOS'

DETALHAMENTO FINANCEIRA: A apresentação do orçamento detalhado permitiu a análise econômica viabilizando assim, a realização do projeto.

CRONOGRAMA: Adequado

OBJETIVO ACADÊMICO: Especialização

PRIMEIRO RELATÓRIO PREVISTO PARA: 21/10/2010, os demais relatórios deverão ser entregues ao CEP anualmente até o término do estudo

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

APÊNDICE 2

Randomização dos animais por grupo pelo www.randomization.com

A Randomization Plan

from

<http://www.randomization.com>

1. Ropi _____
2. Ropi _____
3. SF _____
4. Bupi _____
5. Lido _____
6. Lido _____
7. Ropi _____
8. SF _____
9. Bupi _____
10. Ropi _____
11. Lido _____
12. SF _____
13. SF _____
14. Ropi _____
15. SF _____
16. Bupi _____
17. Lido _____
18. Bupi _____
19. SF _____
20. Bupi _____
21. Ropi _____
22. Lido _____
23. Lido _____
24. Lido _____
25. Ropi _____
26. Bupi _____
27. Bupi _____
28. SF _____

28 subjects randomized into 1 block
To reproduce this plan, use the seed 16091
along with the number of subjects per block/number of blocks
and (case-sensitive) treatment labels as entered originally.

APÊNDICE 3

Tabela 3. Resultados dos testes de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade de distribuição dos valores medidos em cada grupo.

Variável	C		L		B		R	
	Valor Z (K-S)	p	Valor Z (K-S)	p	Valor Z (K-S)	p	Valor Z (K-S)	p
pró-CGRP-15kda	0,52	0,948	0,57	0,907	0,52	0,949	0,57	0,896
SP	0,51	0,954	0,58	0,892	0,54	0,937	0,47	0,981
CGRP-forma ativa-5kda	0,54	0,932	0,66	0,775	0,79	0,565	0,70	0,712

Nenhum teste mostrou-se significativo ($p > 0,05$), portanto os valores apresentaram distribuição normal em todos os grupos.

APÊNDICE 4

Tabela 4. Descrição dos valores de SP na amostra de cada animal, obtidos por WB (valores arbitrários).

Valores de SP			
C	L	B	R
0,35369	0,136501	0,536986	0,268101
0,506334	0,103062	0,564514	0,22573
0,4503	0,260166	0,3502	0,258444
0,29519	0,124815	0,26373	0,147469
0,328775	0,263412	0,091432	0,312309
0,558771	0,247437	0,665262	0,237628
0,659036	0,376234	0,182011	0,168663

APÊNDICE 5

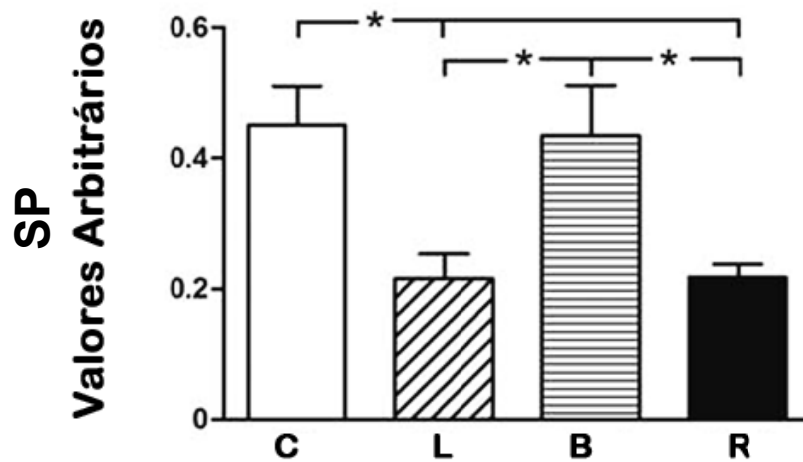


Figura 6. Quantificação de SP pelo método de *Western blotting* na pele incisada de ratos, submetidos à ANOVA e teste de Tukey.

Valores médios de SP e respectivos erros-padrão segundo Grupo Controle (C), grupo Lidocaína (L), grupo Bupivacaína (B), grupo Ropivacaína (R), n=7 em cada grupo, exceto no grupo B, onde n=6. (*=p<0,05).

APÊNDICE 6

Tabela 5. Descrição dos valores de pró-CGRP na amostra de cada animal, obtidos por WB (valores arbitrários).

Valores de pró-CGRP-15kda			
C	L	B	R
2,685	1,807063	2,619164	2,28417
3,506881	1,932656	1,904	1,94228
2,009867	2,11313	2,508114	2,290979
2,268262	2,289862	1,405298	1,451041
2,268246	1,86	1,734412	2,04782
2,706123	1,800701	2,366138	1,43291
3,231772	1,722812	1,343023	2,128217

APÊNDICE 7

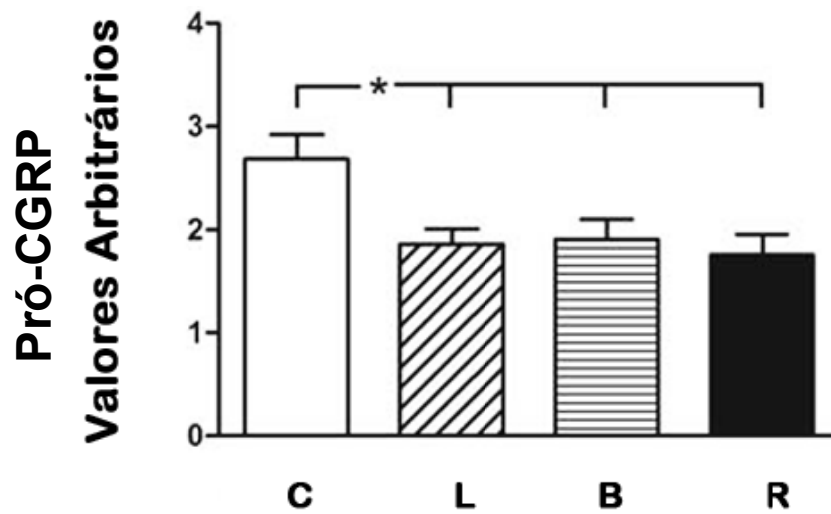


Figura 7. Quantificação de pró-CGRP pelo método de *Western blotting* na pele incisada de ratos, submetidos à ANOVA e teste de Tukey.

Valores médios de pró-CGRP e respectivos erros-padrão segundo Grupo Controle (C), grupo Lidocaína (L), grupo Bupivacaína (B), grupo Ropivacaína (R), $n=7$ em cada grupo. ($*=p<0,05$).

APÊNDICE 8

Tabela 6. Descrição dos valores de CGRP (forma ativa) na amostra de cada animal, obtidos por WB (valores arbitrários).

Valores de CGRP-5kda (forma ativa)			
C	L	B	R
0,841075	0,641226	0,967751	1,014612
1,629479	0,790347	2,447151	1,250436
1,258722	1,121951	1,102708	0,73252
0,859505	0,883853	1,045811	1,522207
2,365862	2,900004	1,573266	2,550571
1,422561	1,390465	2,616971	1,233214
2,896856	1,531504	1,137668	0,974968

APÊNDICE 9

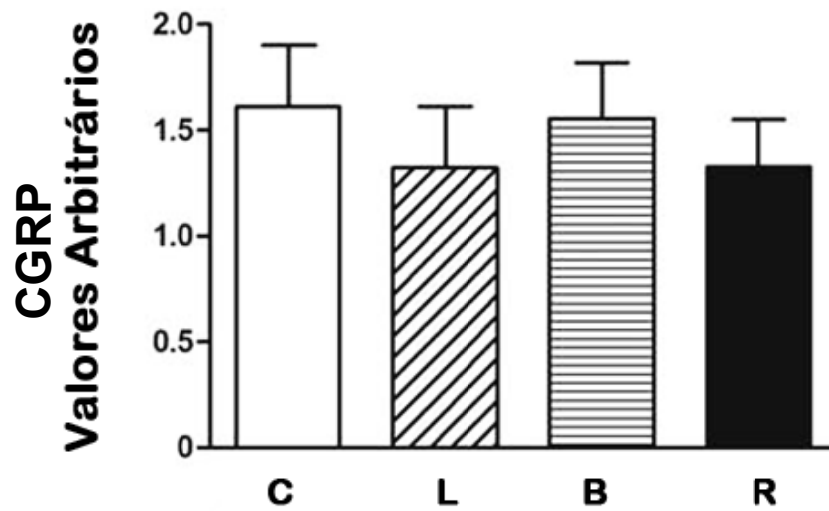


Figura 8. Quantificação de CGRP pelo método de *Western blotting* na pele incisada de ratos, submetidos à ANOVA.

Valores médios de CGRP e respectivos erros-padrão segundo Grupo Controle (C), grupo Lidocaína (L), grupo Bupivacaína (B), grupo Ropivacaína (R), n=7 em cada grupo. ($p < 0,05$).

ANEXOS

ANEXO 1

Máquina de cortar cabelo – Marca WAHL®



Super Taper

- › Cortador poderoso com motor vibratório.
- › Ideal para grandes exigências e uso contínuo.
- › Lâmina profissional à prova de ferrugem
- › Motor Shunt de maior potência.
- › Regulador de nível de corte.
- › A máquina mais vendida da Wahl a nível mundial.
- › 2 anos de garantia.

ESPECIFICAÇÕES

• Cutting Length: Pentas: nº1-3mm, nº2-6mm, nº3-10mm, nº4-13mm, nº6-19mm, nº8-25mm.

• Mains Voltage: Disponível em 2 voltagens, 110 e 220.

Fonte:

Wahlglobal [Internet]. Rio de Janeiro: Wahl Clipper Brasil; [citado 2013 Abr 8]. Super Taper. Disponível em:

<http://www.wahlglobal.com/brazil/wahl/linha-profissional/maquinas-de-cortar-cabelo/super-taper.html>

ANEXO 2

Dermátomo Eléctrico – Marca Integra/Padgett®

Product Information Downloads Request More Info.


Model PI Electric Dermatome

The Model PI Electric Dermatome was developed in response to requests by leading tissue banks. We gave it all of the superior quality, precision, dependability and value a surgeon has come to expect from Padgett Instruments. Now, you can harvest a skin graft up to six inches wide using Padgett's electric Dermatome Model PI. A six-inch wide graft can cover most adult hands or a small child's face without seams. Facts and Features:

- Only six-inch powered dermatome available
- Tested in tissue banks
- Fewer seams
- Two, three, four, five and six inch wide grafts
- Can cover most hands or a small child's face
- Constant on/off switch option

Order Numbers: 3539-600: PADGETT Model PI Dermatome, complete, 120 Volt 3539-600-230: PADGETT model PI Dermatome, complete, 230 Volts 3539-602: Sterile 6-Inch Dermatome Blades, Box of 10

If you prefer to receive this Instruction For Use in paper form, please contact our Technical Services Department by phone at 800-654-2873 or by e-mail at ReconUSProductSupportNJ@integralife.com.



Fonte:

Integra LifeSciences [Internet]. New Jersey: Integra LifeSciences Corporation; c2012. Jarit [cited 2013 Apr 8]. Available from:

<http://www.integralife.com/Jarit/Jarit-Product-Detail.aspx?Product=121&ProductName=Model%20PI%20Electric%20Dermatome&ProductLineName=PADGETT%C2%AE&ProductLineID=158>

ANEXO 3

Punch cutâneo de 8 mm de diâmetro – Marca Richter®



ANEXO 4

Alerta Terapêutico da bupivacaína pelo Centro de Vigilância Sanitária

Centro de Vigilância Sanitária

Page 1 of 2



Home	Áreas Técnicas	Legislação	Publicações	Serviços	Fale com a gente
Alerta Terapêutico					Busca

Alerta Terapêutico nº 07/06 - Cloridrato de Bupivacaína

Considerando o número crescente de notificações de reações adversas ao CLORIDRATO DE BUPIVACAÍNA (ATC - N01BB01), o Núcleo de Farmacovigilância do Centro de Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo julgou pertinente divulgar detalhes relativos às características do medicamento, às suas indicações, contra-indicações e principais eventos adversos possíveis, conforme descrito a seguir.

A bupivacaína é um anestésico local do tipo amida capaz de proporcionar anestesia prolongada, principalmente nas concentrações de 0,50% e 0,75%. É preconizado pelo FDA (Food and Drug Administration) para uso na anestesia espinal ou raquianestesia (quando ocorre a injeção do anestésico dentro do líquor no espaço lombar) e anestesia epidural ou peridural (quando o anestésico é injetado no espaço delimitado pelo pigmento amarelo posteriormente, pelo periosteio espinal lateralmente e pela dura-máter anteriormente) podendo ser utilizado no hiato sacral (bloqueio epidural sacral), nas regiões lombares, torácicas ou cervicais. Também pode ser prescrito como anestésico local por infiltração, loco-regional, bloqueio dental e bloqueio de nervo simpático. A sua administração por cateteres peridurais com infusões contínuas tem sido amplamente adotada.

Cabe esclarecer que seu efeito na função motora difere conforme a concentração empregada — 0,25%, 0,50% ou 0,75%. A concentração de 0,25% produz bloqueio motor incompleto quando empregada para bloqueio caudal, epidural ou periférico; esta concentração pode ser usada para procedimentos em que o relaxamento muscular não é importante, ou quando outros fármacos que propiciem relaxamento muscular sejam prescritos concomitantemente. A solução de 0,50% provê bloqueio motor caudal, epidural ou periférico, embora o grau de relaxamento muscular obtido possa ser inadequado para determinados tipos de cirurgias. Já a concentração de 0,75% produz bloqueio motor completo associado a um relaxamento muscular adequado, sendo portanto especialmente útil para bloqueios epidurais em cirurgias abdominais; por outro lado, esta concentração não deve ser usada em anestésias obstétricas, conforme se verá adiante.

As soluções de bupivacaína são **contra-indicadas** nas seguintes situações:

- hipersensibilidade a bupivacaína ou a outros anestésicos locais do tipo amida;
- infecção local no sítio da punção lombar;
- sepsse;
- hemorragia severa, hipotensão severa, choque e arritmias, como bloqueio cardíaco completo com restrição severa do débito cardíaco;
- em associação com anestesia regional intravenosa (bloqueio de Bier), uma vez que a passagem acidental de bupivacaína para a circulação pode causar reações de toxicidade sistêmica aguda.
- em gestantes, em concentração de 0,75%, devido ao risco elevado de cardiotoxicidade. As concentrações seguras para uso em trabalho de parto correspondem a 0,25%, 0,125% e 0,0625%, em geral em associação a 2µg/ml de fentanila. (Goodman e Gilman, 2003). Há inclusive relatos recentes comparando a concentração de 0,25% à de 0,125%, ambas associadas a fentanila, mostrando, com a dose menor, menor incidência de eventos adversos sem comprometimento da analgesia (Gomes, Balle, Machado et al, 2004). No entanto, há descrições de parada cardíaca com dificuldade de reanimação ou morte após o uso de bupivacaína para anestesia epidural em gestantes, conforme referido em buila.
- Além dessas contra-indicações absolutas, convém acrescentar que a administração em crianças com menos de 12 anos de idade não é recomendada. As reações adversas mais importantes associadas ao uso do fármaco estão especificadas na tabela 1, apresentando-se as sérias — essencialmente as que põem a vida em risco — em negrito.

Tabela 1. Reações adversas mais frequentes à bupivacaína conforme sistema-órgão (reações sérias em negrito).

Aparelho cardiovascular (as mais frequentes)	Bradicardia Hipotensão arterial (ocorre em mais de 10% dos pacientes) Bloqueio cardíaco Arritmias ventriculares / fibrilação ventricular Parada cardíaca Excitação Confusão mental Rebaixamento de consciência
Sistema nervoso Central	Convulsões Cefaléia Coma Tremores Neuropatias Incontinência urinária
Aparelho respiratório	Parada respiratória
Aparelho geniturinário	Retenção urinária
Fígado	Hepatotoxicidade
Pele	Dor no local da injeção Necrose tecidual

Fonte: Thomson Micromedex.. Micromedex Healthcare Series. www.portaldapesquisa.com.br Acesso em 23/03/06.

Tabela 2. Reações adversas à bupivacaína notificadas ao Núcleo de Farmacovigilância do CVS-SP entre Janeiro/05 e Março/06
(reações sérias em negrito).

Paciente	Concentração e dose	Via de administração	Origem	Reação Adversa Notificada
Gestante, 40 anos	Bupivacaína pesada 0,5%, 12,5mg	Raquidiana	Hospital	Convulsão, óbito*
Gestante, 20 anos	Bupivacaína pesada 0,5%, 15mg	Raquidiana	Hospital	Convulsão
Homem, 73 anos	Bupivacaína pesada 0,5%, 15mg	Raquidiana	Hospital	Convulsão
Gestante, 18 anos	Bupivacaína pesada 0,25%, 50mg	Raquidiana	Hospital	Confusão, rebaixamento do nível de consciência , tremor, náusea, vômitos, cefaléia intensa, febre
Gestante, 36 anos	Bupivacaína pesada 0,25%, 50mg	Raquidiana	Hospital	Agitação psicomotora, confusão , náusea, vômitos, cefaléia
Mulher não gestante, 47 anos	Bupivacaína pesada 0,5%, 10mg	Raquidiana	Hospital	Agitação psicomotora, confusão

* Não é possível afirmar com segurança se esse caso de óbito guardou relação efetiva com o uso de bupivacaína, uma vez que se tratava de paciente grave, vítima de abortamento.

Fonte: Núcleo de Farmacovigilância/CVS/SES-SP

Tendo portanto em vista as possíveis reações adversas mais descritas, percebe-se que pacientes portadores de um determinado perfil necessitam atenção especial tais como: portadores de bloqueio cardíaco completo ou parcial, doença hepática avançada, grave disfunção renal, idosos e pacientes em estado de saúde precário.

Assim, alertamos para os cuidados quanto ao uso correto de bupivacaína, bem como para a observação das orientações descritas em bula para os riscos associados aos anestésicos que contenham esta substância, em especial em pacientes obstétricos e portadores do perfil de risco descrito. Cabe ainda enumerar todos os nomes com que o cloridrato de bupivacaína é comercializado no Brasil:

- o Bupibott® e Bupibott plus® (Laboratório Abbott);
- o Marcaína com adrenalina®, Marcaína sem vasoconstritor® e Marcaína pesada® (Laboratório Astra Zeneca);
- o Neocaína com vasoconstritor®, Neocaína sem vasoconstritor®, Neocaína isobárica® e Neocaína Pesada® (Laboratório Cristália);
- o Tradinol® e Tradinol Pesado® (Laboratório Hipolabor).

Desse modo, o Núcleo de Farmacovigilância do CVS-SP solicita a todos os profissionais de saúde que notifiquem suspeitas de reações adversas a qualquer produto contendo cloridrato de bupivacaína (bem como todas as suspeitas de reações adversas a qualquer medicamento) por meio do formulário de Notificação de Suspeita de Reação Adversa e Desvio de Qualidade de Medicamento.

Referências Bibliográficas

1. Albright GA: What is the place of bupivacaine in obstetric epidural analgesia?. Can Anaesth Soc J 1985; 32:392-394.
2. Bacsik CJ, Swift JQ, & Hargreaves KM: Toxic systemic reactions of bupivacaine and etidocaine. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1995; 79:18-23.
3. Coates DP, Sanders R, & Edmonds-Seal J: Convulsions following regional hip blockade with bupivacaine and adrenaline. Anaesthesia 1983; 38:588-589.
4. Gomes MEW, Balle VR, Machado SB et al. Estudo comparativo entre concentrações de bupivacaína a 0,125% e a 0,25% associada a fentanila para analgesia de parto por via peridural. Rev Bras Anestesiol 2004; 54:4:467-72.
5. Goodman e Gilman, 100 edição, 2003; 15:285-291.
6. Holmboe J & Kongsrud F: Delayed respiratory arrest after bupivacaine. Anaesthesia 1982; 37:60-62.
7. Lumb AB & Carli F: Respiratory arrest after a caudal injection of bupivacaine. Anaesthesia 1989; 44:324-325.
8. McCloskey JJ, Haun SE, & Deshpande JK: Bupivacaine toxicity secondary to continuous caudal epidural infusion in children. Anesth Analg 1992; 75:287-290.
9. Moore DC, Thompson GE, & Crawford RD: Long-acting local anesthetic drugs and convulsions with hypoxia and acidosis. Anesthesiology 1982; 56:230-231.
10. Reynolds F & O'Sullivan G: Epidural fentanyl and perineal pain in labour. Anaesthesia 1989; 44:341-344.
11. Rodman DJ, Notaro S, & Peer GL: Respiratory depression following retrobulbar bupivacaine: three case reports and literature review. Ophthalm Surg 1987; 18:768-771.
12. Scott DB: Toxicity caused by local anesthetic agents. Br J Anesth 1984; 56:435-436
13. Thomson Micromedex. Micromedex Healthcare Series. www.portaldapesquisa.com.br. Acesso em 23/03/06.
14. Writer WDR, Davies JM, & Strunin L: Trial by media: the bupivacaine story. Can Anesth Soc J 1984; 31:1-4.

<< Volta

Fonte:

Centro de Vigilância Sanitária. Alerta Terapêutico nº 07/06 - Cloridrato de bupivacaína [Internet]. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; [citado 2013 Abr 8]. Disponível em:

http://www.cvs.saude.sp.gov.br/zip/Alerta%20Terap%C3%AAAutico%2007_06%20BUPIVACAINA.pdf

FONTES CONSULTADAS

FONTES CONSULTADAS

- Bastos EM, Sabino Neto M, Ferreira LM, Garcia EB, Liebano RE, Han YA. Modelo experimental de contratura capsular em implantes de silicone. *Acta Cir Bras.* 2003;18 (Edição Especial):22-8.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
- Cabral LM, Ferreira LM, Simões MJ, Mora AO. Modelo experimental de dupla lesão no dorso de ratos, para estudo do processo de cicatrização da pele, utilizando-se a película de celulose. *Acta Cir Bras.* 2003;18 (Edição Especial):65-8.
- Chadi G, Silva C, Maximino JR, Fuxe K, da Silva GO. Adrenalectomy counteracts the local modulation of astroglial fibroblast growth factor system without interfering with the pattern of 6-OHDA-induced dopamine degeneration in regions of the ventral midbrain. *Brain Res.* 2008 Jan 23;1190:23-38.
- Constantine VS, Mowry RW. Selective staining of human dermal collagen: the use of Picosirius Red F3BA with polarization microscopy. *J Invest Dermatol.* 1968;50:419-24.
- Ferreira ABH. *Miniaurélio século XXI escolar.* 4a ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 2001.
- Hochman B, Nahas FX, Oliveira Filho RS, Ferreira LM. Desenhos de pesquisa. *Acta Cir Bras.* 2005;20 (Suppl. 2):02-9.
- Hochman B, Nahas FX, Ferreira LM. Fotografia aplicada na pesquisa clínico-cirúrgica. *Acta Cir Bras.* 2005;20 (Suppl. 2):19-25.
- Kirkwood BR, Sterne JAC. *Essential medical statistics.* 2nd ed. Massachusetts: Blackwell Science; 2006.
- Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. *Applied Linear Statistical Models.* 4th ed. Illinois: Richard D. Irwing; 1996.