

Efeitos Observados com Diferentes Doses de Morfina Subaracnóidea em Ratos *

Effects of Different Spinal Morphine Doses in Rats

Neuzimar de Souza Freire Silva¹; Rioko Kimiko Sakata, TSA²; Adriana Machado Issy²

RESUMO

Silva NSF, Sakata RK, Issy AM - Efeitos Observados com Diferentes Doses de Morfina Subaracnóidea em Ratos

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: A morfina por via espinhal promove bom efeito analgésico, mas não é isenta de efeito colateral. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos observados com diferentes doses de morfina por via subaracnóidea.

MÉTODO: Foram estudados cinco grupos de sete ratos, 24 horas após colocação de cateter subaracnóideo via cisterna magna sob anestesia com cetamina e xilazina por via muscular. O G1 recebeu 10 µl de solução fisiológica; os grupos G2, G3, G4, e G5 receberam respectivamente 0,1; 0,3; 0,5 e 1 µg de morfina em 10 µl de solução fisiológica. Os animais foram submetidos ao teste de imersão da cauda em água quente no M₀ (antes da injeção), e M₁₅, M₃₀, M₆₀, M₁₂₀ e M₁₈₀ minutos após injeção.

RESULTADOS: Foi observada analgesia nos grupos que receberam morfina, em diversos momentos, quando comparados com o grupo controle e com o tempo antes da injeção de morfina. No G1 houve fraqueza das patas em 4 animais. Agitação ocorreu em M₁₅ no G2 e em M₁₅ e M₃₀ no G3. Tremor mandibular foi observado em M₅, M₁₅, M₃₀ e M₆₀ no G2; no G3 foi observado em M₅ e M₁₅; no G4, em M₅ e no G5, em M₅. Prurido foi observado em M₅, M₁₅, M₃₀ e M₆₀ no G2; em M₅, M₁₅, M₃₀, M₆₀ e M₁₂₀ no G3; em M₅, M₁₅, M₃₀, M₆₀, e M₁₂₀ no G4; em M₅, M₁₅, M₃₀, M₆₀, e M₁₂₀ no G5. Ausência de diurese ocorreu em M₆₀ no G2; no M₁₅, M₃₀, M₆₀ e M₁₂₀ no G3; no M₆₀ e M₁₂₀ no G4; e no M₃₀ e M₆₀ no G5. Sedação ocorreu em M₁₅, M₃₀ e M₆₀ nos grupos 2, 3 e 4; e em M₁₅, M₃₀, M₆₀ e M₁₂₀ no G5. Alteração respiratória foi observada em M₁₅, M₃₀, M₆₀ no G2; em M₁₅, M₃₀ e M₆₀ no G3; em M₁₅ e M₃₀ nos grupos 4 e 5.

CONCLUSÕES: Neste estudo, todas as doses de morfina subaracnóidea administradas provocaram efeitos colaterais; e doses menores que 1 µg promoveram analgesia de curta duração.

Unitermos: ANALGÉSICOS, Opióides: morfina; ANIMAL: rato; TÉCNICAS ANESTÉSICAS, Regional: subaracnóidea

SUMMARY

Silva NSF, Sakata RK, Issy AM - Effects of Different Spinal Morphine Doses in Rats

BACKGROUND AND OBJECTIVES: Spinal morphine promotes adequate pain relief, but is not free from side effects. This study aimed at investigating the effects of different spinal morphine doses.

METHODS: Five groups of seven rats were studied, 24 h after spinal catheter insertion via cisterna magna under anesthesia with muscular ketamine and xylazine. G1 received 10 µl saline solution; groups G2, G3, G4 and G5 received respectively 0.1; 0.3; 0.5 and 1 µg morphine in 10 µl saline solution. Animals were submitted to tail immersion test in hot water at M₀ (prior to injection), and M₁₅, M₃₀, M₆₀, M₁₂₀ and M₁₈₀ minutes after the injection.

RESULTS: Analgesic effects were observed in groups receiving morphine, in different times, as compared to control and to time before morphine injection. In G1 there was paws weakness in 4 animals. Agitation was observed at M₁₅ in G2 and at M₁₅ and M₃₀ in G3. Mandible tremors were observed at moments M₅, M₁₅, M₃₀ and M₆₀ in G2; at M₅ and M₁₅ in G3, in M₅ in G4, and in M₅ in G5. Pruritus was observed at M₅, M₁₅, M₃₀ and M₆₀ in G2; at M₅, M₁₅, M₃₀, M₆₀ and M₁₂₀ in G3; at M₅, M₁₅, M₃₀, M₆₀, and M₁₂₀ in G4; and at M₅, M₁₅, M₃₀, M₆₀ and M₁₂₀ in G5. Absence of diuresis was observed at M₆₀ in G2; at M₁₅, M₃₀, M₆₀ and M₁₂₀ in G3; at M₃₀ and M₁₂₀ in G4, and at M₃₀, and M₆₀ in G5. Sedation was observed at M₁₅, M₃₀ and M₆₀ in groups 2, 3 and 4; and at M₁₅, M₃₀, M₆₀ and M₁₂₀ in G5. Respiratory changes were observed at M₁₅, M₃₀ and M₆₀ in G2; at M₁₅, M₃₀ and M₆₀ in G3; at M₁₅ and M₃₀ in groups 4 and 5.

CONCLUSIONS: In this study all morphine doses below 1 µg have promoted short duration analgesia; all spinal morphine doses have produced side effects.

Key Words: ANALGESICS, Opioids: morphine; ANIMAL: rat, ANESTHETIC TECHNIQUES, Regional: spinal block

INTRODUÇÃO

Com o conhecimento das propriedades farmacológicas dos analgésicos administrados por diferentes vias, tornou-se possível melhorar o tratamento da dor, reduzindo as complicações decorrentes de diversas síndromes dolorosas.

As pesquisas realizadas em laboratório experimental nos forneceram as bases para a utilização clínica de opióides no homem, com segurança e eficácia no controle da dor aguda e crônica. Após a descoberta de receptores opióides em 1974¹, foi obtida analgesia de longa duração com morfina por via subaracnóidea em ratos² e no homem³. Desde então, esses fármacos vêm sendo empregados com frequência por via espinhal para alívio da dor aguda e crônica.

A morfina é um opióide hidrofílico que promove analgesia intensa e de longa duração, sem provocar bloqueios simpático

* Recebido da (Received from) Disciplina de Anestesiologia, Dor e Terapia Intensiva da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, SP

1. Pós-Graduando da Disciplina de Anestesiologia, Dor e Terapia Intensiva da UNIFESP

2. Professora Adjunta de Anestesiologia da UNIFESP

Apresentado (Submitted) em 04 de fevereiro de 2003

Aceito (Accepted) para publicação em 06 de maio de 2003

Endereço para correspondência (Correspondence to)

Dra. Rioko Kimiko Sakata
Rua Três de Maio 61/51 Vila Clementino
04044-020 São Paulo, SP
E-mail: riokoks.dcir@epm.br

© Sociedade Brasileira de Anestesiologia, 2004

ou motor. Entretanto, apresenta dispersão cranial, podendo provocar efeitos colaterais como prurido, náusea, vômito e insuficiência respiratória.

Para tentar verificar se é possível efeito analgésico com morfina por via subaracnóideia isenta de efeitos colaterais foram administradas diferentes doses observando os animais, em diferentes momentos.

MÉTODO

Este estudo experimental foi realizado após ter sido aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo e da Universidade Federal do Amazonas. Foram investigados 35 ratos da linhagem Wistar, machos, saudáveis, com idade aproximada de 90 dias e peso corporal entre 250 e 300 gramas. Foram excluídos do protocolo, ratos com paralisia ou flacidez das patas. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, recebendo 12 horas de luz por dia, água e ração à vontade durante todo o experimento.

Os animais foram distribuídos em 5 grupos de 7 e todos receberam 10 µl de solução por via subaracnóideia: os do G1 (controle), receberam 10 µl de solução fisiológica a 0,9%; os do G2, 0,1 µg de morfina; os do G3, 0,3 µg de morfina; os do G4, 0,5 µg de morfina; e os do G5, 1 µg de morfina.

Para preparo das soluções, foi diluído 1 mg do sal de sulfato de morfina em 1 ml de solução fisiológica a 0,9% (1 mg/ml). Para a solução de 0,1 µg/10 µl foram adicionados 4950 µl de solução fisiológica a 0,9% em 50 µl da solução inicial. Para solução de 0,3 µg/10 µl, foram adicionados 3000 µl de solução fisiológica a 0,9% em 100 µl. Para solução de 0,5 µg/10 µl foram adicionados 2000 µl de solução fisiológica a 0,9% em 100 µl. Para solução de 1 µg/10 µl, foram adicionados 4500 µl de solução fisiológica a 0,9% em 500 µl.

A colocação de cateter subaracnóideo foi feita pela técnica de Yaksh, Rudy (1976), modificada, sob anestesia geral com cetamina (60 µg.g⁻¹) e xilazina (16 µg.g⁻¹) por via muscular.

A extremidade livre do cateter foi exteriorizada na pele, entre o occipital e a coluna cervical alta e fixada com acrílico polimerizado e fio de nylon.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais para recuperação anestésica durante 24 horas e os com deficiência neurológica foram excluídos do estudo. Os animais foram submetidos ao teste de analgesia através da imersão da cauda em água quente a temperatura de 50 ± 0,2 °C. Para realização deste teste, as caudas dos animais receberam uma marca com tinta esmalte vermelha a 5 cm da extremidade, para imersão. Os animais foram colocados em um tubo cilíndrico de plástico semi-transparente, para impedir a livre movimentação. Foi avaliado o tempo para retirada da cauda não mantendo a cauda mais que 15 segundos.

Após o teste de analgesia no T₀ (antes da morfina), foram administradas aleatoriamente diferentes concentrações de morfina, 24 horas após a colocação do cateter no espaço subaracnóideo. Todos os animais que participaram do estudo estavam ativos, movimentando-se, recebendo ração e água livres; totalmente recuperados da anestesia.

A injeção pelo cateter foi efetuada com seringa de Hamilton de 10 µl, graduada de 1 em 1 µl, em uma velocidade de 5 µl por segundo.

O teste de analgesia foi realizado nos momentos: M₀ = antes da administração da morfina; M₁₅ = 15 minutos após a administração da morfina; M₃₀ = 30 minutos após a administração da morfina; M₆₀ = 60 minutos após a administração da morfina; M₁₂₀ = 120 minutos após a administração da morfina e M₁₈₀ = 180 minutos após a administração da morfina.

Foram observados e anotados os possíveis efeitos colaterais e complicações nos momentos M₀, M₅, M₁₅, M₃₀, M₆₀, M₁₂₀ e M₁₈₀.

Para análise estatística foram empregados os testes não-paramétricos. A Análise de Variância foi utilizada para o estudo da analgesia pelo teste de imersão da cauda, para comparar o grupo controle em cada momento avaliado e os momentos em cada grupo. Para todos os teste, foi fixado em 0,05 ou 5% (p ≤ 0,05) o nível de rejeição da hipótese de nulidade.

RESULTADOS

Efeito Analgésico

O efeito analgésico não foi avaliado no M₅ em nenhum dos grupos. Houve diferença estatisticamente significativa na analgesia avaliada pelo tempo de retirada da cauda entre os animais que receberam morfina e os do grupo controle (G1). No G2, o tempo para retirada da cauda foi maior que no G1 em M₁₅; no G3, em M₃₀, M₆₀ e M₁₂₀; no G4, em M₁₅, M₃₀, M₆₀, e M₁₂₀; e no G5, em M₁₅, M₃₀, M₆₀, M₁₂₀, e M₁₈₀ (Tabela I).

Tabela I - Valores das Médias dos Tempos para Retirada da Cauda nos Grupos (G1: controle, G2: 0,1 µg; G3: 0,3 µg; G4: 0,5 µg; G5: 1 µg de morfina) em cada Momento (M₀, M₁₅, M₃₀, M₆₀, M₁₂₀ e M₁₈₀)

Momentos	Grupos				
	G1	G2	G3	G4	G5
M ₀	8,66	8,14	9,29	8,43	10,57
M ₁₅	9,86	12,86*	11,71	13,14*	14,00*
M ₃₀	9,71	12,00	12,71*	14,86*	15,00*
M ₆₀	9,14	12,57	12,86*	13,29*	13,86*
M ₁₂₀	8,86	8,86	11,57*	12,43*	12,43*
M ₁₈₀	8,57	8,14	9,00	9,57	11,00*

M₀: G1 = G2 = G3 = G4 = G5; M₁₅: G2, G4 e G5 > G1 = G3; M₃₀: G3, G4 e G5 > G1 = G2; M₆₀: G3, G4 e G5 > G1 = G2; M₁₂₀: G3, G4 e G5 > G1 = G2; M₁₈₀: G5 > G1 = G2 = G3 = G4.

* = significância estatística; Análise de Variância (p ≤ 0,05)

No G2, foi observado efeito analgésico em 85,72% dos ratos em M₁₅; e 71,43% em M₃₀ e M₆₀. No G3, em 71,43% em M₁₅; 100% em M₃₀ e M₆₀ e 14,28% em M₁₂₀. No G4, em 100% dos animais em M₁₅, M₃₀ e M₆₀; 71,43% em M₁₂₀. No G5, em 100% em M₁₅, 85,72% em M₃₀ e 100% em M₆₀.

Não houve diferença estatisticamente significativa na média dos tempos para retirada da cauda entre os momentos (M₀,

M₁₅, M₃₀, M₆₀, M₁₂₀ e M₁₈₀) no grupo controle. Nos grupos 2, 3 e 5, em M₁₅, M₃₀ e M₆₀ foram maiores que em M₁₂₀ e M₁₈₀ que foram semelhantes a M₀. No G4, em M₁₅, M₃₀, M₆₀ e M₁₂₀ foram maiores que em M₁₈₀, que foi semelhante com M₀; Análise de Variância, $p \geq 0,05$ (Tabela II).

Tabela II - Valores das Médias dos Tempos para Retirada da Cauda nos Diferentes Períodos em cada Grupo (G1: controle, G2: 0,1 µg; G3: 0,3 µg; G4: 0,5 µg; G5: 1 µg de morfina)

Grupos	Momentos após Administração das Soluções					
	M ₀	M ₁₅	M ₃₀	M ₆₀	M ₁₂₀	M ₁₈₀
G1 (n = 7)	8,66	9,86	9,71	9,14	8,86	8,57
G2 (n = 7)	8,14	12,86*	12,00*	12,57*	8,86	8,14
G3 (n = 7)	9,29	11,71*	12,71*	12,86*	11,57	9,00
G4 (n = 7)	8,43	13,14*	14,86*	13,29*	12,43*	9,57
G5 (n = 7)	10,57	14,00*	15,00*	13,86*	12,43	11,00

G2: M₁₅, M₃₀ e M₆₀ > M₀ = M₁₂₀ = M₁₈₀; G3: M₁₅, M₃₀ e M₆₀ > M₀ = M₁₂₀ = M₁₈₀; G4: M₁₅, M₃₀, M₆₀ e M₁₂₀ > M₀ = M₁₈₀; G5: M₁₅, M₃₀ e M₆₀ > M₀ = M₁₂₀ = M₁₈₀;

*:significância estatística; Análise de Variância ($p \leq 0,05$)

Efeitos Colaterais Observados após Injeção das Soluções

No G1 não houve manifestação de nenhum efeito exceto no M₅, em que ocorreu fraqueza das patas em quatro (57,15%) animais.

Agitação foi observada no G2 em 14,28% dos animais em M₁₅; no G3, em 14,28% em M₁₅ e M₃₀.

Foi observado tremor mandibular no G2 em 85,72% dos animais em M₅; 71,43% em M₁₅ e 14,28% em M₃₀ e M₆₀. No G3, foi observado esse efeito colateral em 100% dos animais em M₅ e 14,28% em M₁₅. No G4, foi observado em 85,72% dos animais em M₅. No G5, foi observado em 85,72% dos animais em M₅.

Prurido ocorreu no G2 em 57,15% dos animais em M₅; 71,43% em M₁₅; 57,15% em M₃₀; e 42,86% em M₆₀. No G3, esse efeito foi observado em 42,86% em M₅, 85,72% em M₁₅; 100% em M₃₀ e M₆₀ e 57,15% em M₁₂₀. No G4, foi observado em 85,72% em M₅, 100% dos animais em M₁₅, M₃₀ e M₆₀ e 71,43% em M₁₂₀. No G5, foi observado 71,43% de prurido em M₅, 100% em M₁₅, M₃₀, M₆₀ e 28,58% em M₁₂₀.

Foi observada ausência de diurese no G2 em 85,72% dos animais em M₆₀. No G3, foi observado esse efeito em 14,28% em M₁₅ e M₃₀; 71,43% em M₆₀ e 28,58% em M₁₂₀. No G4, foi observada ausência de diurese em 85,72% em M₆₀ e 28,58% em M₁₂₀. No G5, foi observada ausência de diurese em 14,28% dos animais em M₃₀ e 100% em M₆₀.

Foi observada sedação no G2 em 100% dos animais em M₁₅, 85,72% em M₃₀ e 57,15% em M₆₀. No G3, foi observado o mesmo efeito em 57,15% em M₁₅, 85,72% em M₃₀ e 57,15% em M₆₀. No G4, observou-se sedação em 100% dos animais em M₁₅ e M₃₀ e 71,43% em M₆₀. No G5, observou-se sedação em 100% dos animais em M₁₅ e M₃₀, em 57,15% em M₆₀ e 14,28% em M₁₂₀.

Ocorreu alteração respiratória em G2 em 71,43% dos animais em M₁₅ e M₃₀, e 42,86% em M₆₀. No G3, houve alteração respiratória em 42,86% dos animais em M₁₅, 14,28% em M₃₀ e M₆₀. No G4, esse efeito ocorreu em 100% dos animais em M₁₅ e M₃₀. No G5, ocorreu alteração respiratória em 42,86% em M₁₅ e 57,15% em M₃₀.

DISCUSSÃO

Para este estudo foi escolhido o rato Wistar, não só pela facilidade de aquisição, devido à rapidez de reprodução e pelo pequeno porte, tornando-se fácil seu manuseio e a manutenção da alimentação e da higiene nas gaiolas, grande resistência às infecções e baixo custo. Muitos autores também optaram por ratos para injeção de morfina por via subaracnóide, pelos motivos descritos^{4,5}.

O opióide escolhido foi a morfina, por ser um analgésico potente, usado por via espinhal, principalmente para o tratamento da dor aguda e também para síndromes dolorosas crônicas. Por ser hidrofílico, sua duração de ação é prolongada, porém essa característica também é responsável por permanência do fármaco no líquido durante maior que com opióide lipofílico. Com isso, ocorrem maior difusão cranial e ligação do opióide aos receptores encefálicos, provocando efeitos colaterais como prurido, náusea, vômito e depressão respiratória. A presença desses efeitos colaterais limita o uso de opióides por via espinhal, portanto, se houver a possibilidade de administração de uma dose que produza efeito analgésico sem efeitos colaterais, seu uso poderia ser ampliado.

Nas primeiras investigações havia questionamento se alguma quantidade do opióide alcançava estruturas encefálicas imediatamente após a injeção. Inicialmente imaginou-se que a droga se moveria no sentido cranial, passivamente seguindo o movimento do líquido dentro do espaço subaracnóideo. Após administração de diferentes volumes de bromofenol azul no espaço subaracnóideo de ratos, seguida de estudo da medula espinhal⁴, os autores concluíram que volume de 10 µl é o mais adequado. Outros autores utilizaram volumes de 5 a 20 µl⁶, até 100 µl⁷ por via peridural e subaracnóide. Porém, um autor comparou diferentes volumes por via subaracnóide, concluindo que com 10 µl ocorreu melhor difusão e afirmou ainda que grandes volumes provocam perda por refluxo e pelas laterais do cateter⁸. Os estudos mostram que não há necessidade de grandes volumes para a morfina exercer efeito analgésico por via espinhal. Diante dos estudos mencionados, foram escolhidos 10 µl para esta pesquisa por ser o volume que mostrou proporcionar melhor uniformidade quanto à difusão da droga dentro do espaço subaracnóideo e pela segurança.

Foram escolhidas doses de 0,1 a 1 µg, porque estudo mostrou que 1 µg de morfina, por via subaracnóide, produz efeito analgésico⁸, porém essa dose provoca efeitos colaterais; portanto, tivemos necessidade de empregar doses menores para verificar se há efeito analgésico sem efeito colateral. Alguns autores avaliaram a concentração extracelular de morfina na medula espinhal, substância cinzenta periaque-

dutal, núcleo da rafe e hipotálamo lateral, após uma dose de morfina de 5 e 10 mg intraperitoneal. Na presente pesquisa as doses de morfina administradas promoveram analgesia em muitos tempos dos grupos estudados, porém na maioria dos tempos, a concentração de morfina no líquido foi menor que a concentração mínima de 200 a 400pg/100 µl, relatada na literatura⁹.

Para este trabalho, optou-se pelo cateter de borracha de silicone, por ser constituído de material flexível, inerte, atóxico e não causar reação inflamatória nos tecidos. Tais características foram comprovadas por estudos histopatológicos de medula espinhal de ratos, que permaneceram com cateteres de borracha de silicone implantados durante quatro semanas¹⁰. Foi escolhido cateter de pequeno diâmetro para este estudo para evitar compressão da medula espinhal.

Para colocação do cateter, foi utilizada a técnica cirúrgica descrita por Yaksh, Rudy⁴ modificada, por permitir acesso relativamente fácil ao espaço subaracnóideo através da cisterna magna. Também possibilita a manutenção do cateter durante períodos prolongados, porque permite sua fixação eficaz, além de isolá-lo do contato com a boca e as patas do animal, impedindo-o de retirá-lo. O método tem sido usado com sucesso para estudar a eficácia de agentes injetados por via subaracnóidea. Entretanto, se reproduzida fielmente, demanda um tempo muito grande para a colocação do cateter e apresenta um elevado índice de falha para a coleta de líquido.

Neste trabalho, inicialmente, a punção da membrana foi feita como os autores recomendam, com a punção no meio da membrana atlanto-occipital, mas não houve sucesso na coleta seriada de líquido. Com modificação e introdução do cateter na parte mais lateral (junção da membrana atlanto-occipital com o osso occipital) houve sucesso quanto à introdução e funcionalidade do cateter para administração de droga e coleta de líquido. A extremidade livre do cateter foi ocluída com um pequeno estilete metálico, para evitar perda de líquido.

O experimento foi feito 24 horas após a colocação do cateter para que não houvesse dúvidas sobre a analgesia residual da anestesia e também para que fosse possível avaliar a ausência de lesão neurológica. Os estudos de literatura também foram realizados somente em animais despertos e movimentando-se livremente, sem contenção⁴⁻⁶.

A imersão da cauda em água quente é um teste que pode ser utilizado em trabalho que utiliza grande número de animais, em que há necessidade de repetição do teste ao longo do experimento para pesquisa de analgesia. Esse teste é sensível e confiável na resposta; é fácil de reproduzir; pode ser executado de maneira rápida; e não provoca lesão térmica. Outros autores também utilizam esse teste¹¹.

Neste trabalho foram mergulhados 5 cm da cauda do animal na água quente, por um período máximo de 15 segundos, para evitar queimaduras, levando-se em conta que o teste foi realizado várias vezes durante o experimento. Nesse experimento, o aquecimento da água do banho-maria foi de 50 °C, porque essa temperatura não é prejudicial ao animal e o efeito do opióide pode ser observado.

Tornou-se evidente a partir de estudos recentes que a imobilização física ou restrição dos movimentos causam estresse em ratos e provocam alterações hormonais e de função do sistema nervoso central. Observa-se ativação do sistema opióide endógeno, resultando em alteração dos testes para analgesia¹².

Neste estudo foi utilizado um tubo plástico, com pequena abertura na extremidade posterior, para manter exteriorizada a cauda do animal. Não houve necessidade de contenção manual do animal, para a realização do teste, uma vez que os mesmos entraram espontaneamente no cilindro plástico, o que reduz o estresse e impede interferências no resultado do teste de imersão da cauda em água quente.

O presente trabalho utilizou doses pequenas de morfina (0,1; 0,3; 0,5; e 1 µg) para verificar a possibilidade de não ocorrer efeito colateral. Precocemente foram observados agitação em alguns animais e forte estímulo da mandíbula, com rápidos movimentos dos pêlos do focinho e tiritar dos dentes do animal.

Neste estudo foi observada fraqueza das patas em quatro animais logo após a injeção da solução fisiológica; esse efeito não foi provocado pelo opióide, já que não ocorreu após injeção de morfina. Pode estar relacionada à pressão provocada pela solução².

Apesar das buscas na literatura, de trabalhos que justificassem a presença do tremor mandibular observado precedendo o prurido, não foi encontrada nenhuma referência a esse efeito. Entretanto, no presente estudo, o tremor mandibular foi observado, em vários animais de todos os grupos que receberam morfina.

Neste trabalho, o prurido foi o efeito colateral observado com maior frequência. Esse efeito colateral foi observado clinicamente no focinho e na face de um grande percentual de animais, por aproximadamente duas horas, em concordância com o observado na literatura¹³. Quanto menor a dose utilizada, menor foi a intensidade e a duração do prurido.

Após injeção de morfina marcada por via subaracnóidea lombar de ratos realizando radiografias para identificação da distribuição do opióide, a maior concentração ocorreu após 14 minutos, resultando em prurido no focinho e na face, observado clinicamente até 2 horas após a injeção¹³. Esses autores sugerem que o prurido resultaria de altas concentrações de morfina no nervo trigêmeo. Após administração de morfina sistêmica, o prurido, em parte, envolve o efeito do opióide no sistema nervoso e também pode ser decorrente da liberação de histamina¹⁴.

Neste estudo, foi observada ausência de diurese em grande número de animais durante algum tempo do experimento e pode estar relacionado à retenção urinária comumente observada em humanos¹³.

Após a injeção subaracnóidea de morfina, os ratos ficam quietos, com pouca resposta ao manuseio². No presente estudo, foi observado um estado de quietude, em alguns animais, de todos os grupos; considerada sedação leve, pois despertavam facilmente.

Não foi observada depressão respiratória em nenhum animal investigado, com doses utilizadas neste estudo. As gasometrias arteriais não mostraram alterações, entretanto trata-se de medida isolada, porque foi feita a coleta de sangue de apenas um animal de cada grupo, devido a dificuldades técnicas. Depressão respiratória foi observada em voluntários humanos saudáveis com 2 a 10 mg de morfina por via peridural⁵. Neste estudo, foi observada alteração respiratória precoce, caracterizada por respiração irregular, mantida até aproximadamente 30 minutos após a injeção de morfina. Não foram observados efeitos colaterais no último tempo de avaliação nos grupos estudados, tal fato pode ser justificado por possível correlação com o tempo transcorrido após a injeção de morfina subaracnóidea. Além disso, foram observados efeitos colaterais mesmo sem analgesia.

Com base nos resultados deste estudo experimental realizado em ratos, com 0,1; 0,3; 0,5 e 1 µg de morfina subaracnóidea em 10 µl de solução fisiológica a 0,9%, pode-se concluir que doses menores que 1 µg promovem analgesia de curta duração e que não há dose analgésica sem efeito colateral.

Effects of Different Spinal Morphine Doses in Rats

Neuzimar de Souza Freire Silva, M.D.; Rioko Kimiko Sakata, TSA, M.D.; Adriana Machado Issy, M.D.

INTRODUCTION

With the understanding of pharmacological properties of analgesics administered by different routes, it became possible to improve pain control, decreasing complications resulting from different painful syndromes.

Experimental investigations have established the basis for the safe and effective use of opioids in men to control acute and chronic pain. After the discovery of opioid receptors in 1974¹, long duration analgesia was obtained with spinal morphine in rats² and men³. Since then, these spinal drugs have been frequently used to control acute or chronic pain.

Morphine is a hydrophilic opioid promoting deep and long lasting analgesia without sympathetic or motor block. However, it is cranially spread and may promote side effects such as nausea, vomiting and respiratory failure.

To evaluate the possibility of spinal morphine analgesic effects without side effects, different doses were administered and animals were observed in different moments.

METHODS

This experimental study was performed after the Research Ethics Committee of the Universidade Federal, São Paulo

and Universidade Federal, Amazonas approval and involved 35 Wistar, male, healthy rats aged approximately 90 days and weighing 250 to 300 grams. Excluded from the protocol were animals with paws paralysis or flaccidity. Animals were maintained in individual cages receiving 12 hours of light per day, water and feed ad libitum throughout the experiment.

Animals were distributed in 5 groups of 7 and all have received 10 µl spinal solution: G1 (control) has received 10 µl of 0.9% saline solution; G2, has received 0.1 µg morphine, G3 has received 0.3 µg morphine, G4 has received 0.5 µg morphine, and G5 has received 1 µg morphine.

Morphine was prepared through the dilution of 1 mg morphine sulfate salt in 1 ml of 0.9% saline solution (1 mg/ml). For the 0.1 µg/10 µl solution, 50 µl were removed from the stored solution and 4950 µl of 0.9% saline solution were added. For the 0.3 µg/10 µl solution, 100 µl were removed from the stored solution and 3000 µl of 0.9% saline solution were added. For the 0.5 µg/10 µl solution, 100 µl were removed from the stored solution and 2000 µl of 0.9% saline solution were added. For the 1 µg/10 µl solution, 500 µl were removed from the stored solution and 4500 µl of 0.9% saline solution were added.

Animals were submitted to general anesthesia with muscular ketamine (60 µg.g⁻¹) and xylazine (16 µg.g⁻¹) for spinal catheter insertion by the modified Yaksh, Rudy technique (1976).

Free catheter tip was externalized on the skin between the occipital and high cervical spine and was fixed with polymerized acrylic and nylon thread.

Animals were maintained in individual cages during anesthetic recovery and those with neurological deficits were excluded from the study. Animals were submitted to tail immersion test in hot water at a temperature of 50 ± 0.2 °C. For the test, animals' tails were marked with red ink 5 cm above the tip, for immersion. Animals were placed in a plastic semi-transparent cylindrical tube to prevent free movement. Time for tail removal was recorded and tail was not maintained immersed for more than 15 seconds.

After analgesia test in M₀ (before morphine), different morphine concentrations were randomly administered 24 hours after spinal catheter insertion. All animals participating in the study were active, moving, receiving free water and feed and totally recovered from anesthesia.

Catheter injection was performed with 10 µl Hamilton syringe graduated at 1 µl, at a rate of 5 µl per second.

Analgesia was tested at M₀ = before morphine; M₁₅ = 15 minutes after morphine; M₃₀ = 30 minutes after morphine; M₆₀ = 60 minutes after morphine; M₁₂₀ = 120 minutes after morphine and M₁₈₀ = 180 minutes after morphine.

Possible side effects and complications were recorded at M₀, M₅, M₁₅, M₃₀, M₆₀, M₁₂₀ and M₁₈₀.

Non-parametric tests were used for statistical analysis. Variance Analysis was used for tail immersion test analysis to compare control group in every evaluated time and times within each group. Null hypothesis rejection level for all tests was established as 0.05 or 5% (p ≤ 0.05).

RESULTS

Analgesic Effect

Analgesic effect was not evaluated at M₅ in all groups. There have been statistically significant differences in analgesia evaluated by tail removal between animals receiving morphine and control group animals (G1). In G2, time for tail removal was longer as compared to G1 in M₁₅; in G3, in M₃₀, M₆₀ and M₁₂₀; in G4 in M₁₅, M₃₀, M₆₀ and M₁₂₀; and in G5 in M₁₅, M₃₀, M₆₀, M₁₂₀ and M₁₈₀ (Table I).

Table I - Mean Times for Tail Removal in Groups (G1: control, G2: 0,1 µg; G3: 0,3 µg; G4: 0,5 µg; G5: 1 µg morphine) in Each Moment (M₀, M₁₅, M₃₀, M₆₀, M₁₂₀ and M₁₈₀)

Moments	Groups				
	G1	G2	G3	G4	G5
M ₀	8.66	8.14	9.29	8.43	10.57
M ₁₅	9.86	12.86*	11.71	13.14*	14.00*
M ₃₀	9.71	12.00	12.71*	14.86*	15.00*
M ₆₀	9.14	12.57	12.86*	13.29*	13.86*
M ₁₂₀	8.86	8.86	11.57*	12.43*	12.43*
M ₁₈₀	8.57	8.14	9.00	9.57	11.00*

M₀: G1 = G2 = G3 = G4 = G5; M₁₅: G2, G4 and G5 > G1 = G3; M₃₀: G3, G4 and G5 > G1 = G2; M₆₀: G3, G4 and G5 > G1 = G2; M₁₂₀: G3, G4 and G5 > G1 = G2; M₁₈₀: G5 > G1 = G2 = G3 = G4.

* = statistical significance; Variance Analysis ($p \leq 0.05$)

G2 presented analgesic effects in 85.72% of rats in M₁₅; and 71.43% in M₃₀ and M₆₀. In G2, 71.43% in M₁₅; 100% in M₃₀ and M₆₀ and 14.28% in M₁₂₀. In G4, 100% of animals in M₁₅, M₃₀, M₆₀; 71.43% in M₁₂₀. In G5, 100% in M₁₅, 85.72% in M₃₀ and 100% in M₆₀.

There were no statistically significant differences in mean times for tail removal in M₀, M₁₅, M₃₀, M₆₀, M₁₂₀ and M₁₈₀ in the control group. In groups 2, 3 and 5, in M₁₅, M₃₀ and M₆₀ they were longer than in M₁₂₀ and M₁₈₀, which were similar to M₀. In G4, in M₁₅, M₃₀, M₆₀ and M₁₂₀ they were longer than in M₁₈₀, which was similar to M₀. Variance Analysis, $p \geq 0.05$ (Table II).

Table II - Mean Times for Tail Removal During Different Periods in Each Group (G1: control, G2: 0.1 µg; G3: 0.3 µg; G4: 0.5 µg; G5: 1 µg morphine)

Groups	Moments after Solutions Administration					
	M ₀	M ₁₅	M ₃₀	M ₆₀	M ₁₂₀	M ₁₈₀
G1 (n = 7)	8.66	9.86	9.71	9.14	8.86	8.57
G2 (n = 7)	8.14	12.86*	12.00*	12.57*	8.86	8.14
G3 (n = 7)	9.29	11.71*	12.71*	12.86*	11.57	9.00
G4 (n = 7)	8.43	13.14*	14.86*	13.29*	12.43*	9.57
G5 (n = 7)	10.57	14.00*	15.00*	13.86*	12.43	11.00

G2: M₁₅, M₃₀ and M₆₀ > M₀ = M₁₂₀ = M₁₈₀; G3: M₁₅, M₃₀ e M₆₀ > M₀ = M₁₂₀ = M₁₈₀; G4: M₁₅, M₃₀, M₆₀ e M₁₂₀ > M₀ = M₁₈₀; G5: M₁₅, M₃₀ e M₆₀ > M₀ = M₁₂₀ = M₁₈₀;

*: statistical significance; Variance Analysis ($p \leq 0.05$)

Side Effects Observed after Injections

There have been no effects in G1, except for M₅ where there has been paws weakness in four animals (57.15%).

Agitation was observed in G2 in 14.28% of animals in M₁₅; in G3 in 14.28% in M₁₅ and M₃₀. There has been mandible tremor in G2 in 85.72% of animals in M₅; 71.43% in M₁₅ and 14.28% in M₃₀ and M₆₀. This side effect was observed in 100% of G3 animals in M₅ and in 14.28% in M₁₅. In G4, it has been observed in 85.72% of animals in M₅. In G5 it has been observed in 85.72% of animals in M₅.

There has been pruritus in G2 in 57.15% of animals in M₅; 71.43% in M₁₅; 57.15% in M₃₀; and 42.86% in M₆₀. In G3, this effect was observed in 42.86% in M₅, 85.72% in M₁₅; 100% in M₃₀ and M₆₀ and 57.15% in M₁₂₀. In G4, it has been observed in 85.72% in M₅, 100% of animals in M₁₅, M₃₀ and M₆₀ and 71.43% in M₁₂₀. No G5, it has been observed 71,43% pruritus in M₅, 100% in M₁₅, M₃₀, M₆₀ and 28,58% in M₁₂₀.

There has been absence of diuresis in G2 in 85.72% of animals in M₆₀. In G3, this effect has been observed in 14.28% in M₁₅ and M₃₀; 71.43% in M₆₀ and 28.58% in M₁₂₀. In G4, there has been absence of diuresis in 85.72% in M₆₀ and 28.58% in M₁₂₀. In G5, absence of diuresis has been observed in 14.28% of animals in M₃₀ and 100% in M₆₀.

Sedation was observed in G2 in 100% of animals in M₁₅, 85.72% in M₃₀ and 57.15% in M₆₀. In G3, the same effect has been observed in 57.15% in M₁₅, 85.72% in M₃₀ and 57.15% in M₆₀. In G4, sedation was observed in 100% of animals in M₁₅ and M₃₀ and 71.43% in M₆₀. In G5, sedation has been observed in 100% of animals in M₁₅, and M₃₀, in 57.15% in M₆₀ and 14.28% in M₁₂₀.

There has been respiratory changes in G2 in 71.43% of animals in M₁₅ and M₃₀, and 42.86% in M₆₀. In G3, there has been respiratory changes in 42.86% of animals in M₁₅, 14.28% in M₃₀ and M₆₀. In G4, this effect has been observed in 100% of animals in M₁₅ and M₃₀. In G5, respiratory changes have been observed in 42.86% in M₁₅ and 57.15% in M₃₀.

DISCUSSION

Wistar rats were used in this study due to their fast reproduction and small size, making easy their handling and the maintenance of hygiene and food in the cages. They are also very resistant to infections and have low cost. Several authors have also chosen rats for spinal morphine injections, due to the above-described reasons^{4,5}.

Morphine was the opioid of choice for being a potent spinal analgesic drug, especially to treat acute pain and chronic painful syndromes. For being hydrophilic, it has prolonged action time, but this characteristic is also responsible for longer CSF permanence, as compared to lipophilic opioids. This leads to more cranial spread and opioid binding to brain receptors promoting side effects such as pruritus, nausea, vomiting and respiratory depression. These side effects limit the use of spinal opioids; so, if there could be the possibility of administering a dose producing analgesic effect without side effects its use could be expanded.

First investigations have questioned whether any volume of opioids would reach brain structures immediately after injection. Initially, it was thought that the drug would move in the cranial direction passively following CSF movement within the spinal space. After the administration of different bromphenol blue volumes in the spinal space of rats followed by spinal cord analysis⁴, authors have concluded that 10 µl is the most adequate volume. Other authors have used 5 to 20 µl⁶, up to 100 µl⁷ epidural and spinal volumes. An author, however, has compared different spinal volumes and has concluded that there has been a better spread with 10 µl, even stating that large volumes would promote losses by reflux and by the lateral sides of the catheter⁸. Studies have shown no need for high spinal morphine volumes to obtain analgesic effects. As from the above-mentioned studies, we decided for 10 µl for this study, for being a volume with better drug spread uniformity within the spinal space, and for safety reasons.

Doses of 0.1 to 1 µg were chosen because a study has shown that 1 µg spinal morphine produces analgesic effects⁸, but also promotes side effects; so, we had to use lower doses to check whether there are analgesic effects without side effects.

Some authors have evaluated extracellular morphine concentrations in spinal cord, peri-aqueduct gray matter, raphe nucleus and lateral hypothalamus after 5 and 10 mg intraperitoneal morphine. In our study, morphine doses have promoted analgesia in several studied moments, however in most moments, morphine CSF concentration was lower than the minimum 200-400 pg/100 µl concentration reported in the literature⁹.

We decided for silicone rubber catheters for being flexible, inert and nontoxic, not promoting tissue inflammatory reactions. Such features were confirmed by spinal cord histopathological studies in rats which remained with silicone rubber catheters for four weeks¹⁰. Small catheters were used in this study to prevent spinal cord compression.

Modified Yaksh, Rudy technique⁴ was used for catheter insertion, for allowing relatively easy spinal space access via cisterna magna. It also allows for catheter maintenance for prolonged periods because they can be effectively fixed, in addition to being isolated from animal's mouth and paws, thus preventing removal. This method has been successfully used to study the efficacy of spinal agents. However, if strictly reproduced, it demands a very long time for catheter insertion with high CSF collection failure rate.

Initial transmembrane puncture was performed according to authors' recommendations, with puncture in the middle of the atlanto-occipital membrane, but there has been failure in serial CSF collection. With the modification and the catheter more laterally inserted (atlanto-occipital membrane and occipital bone junction) there has been successful catheter insertion and functionality for drug administration and CSF collection. Free catheter tip was occluded with a small metal probe to prevent CSF leakage.

The experiment was performed 24 hours after catheter insertion to eliminate issues on residual anesthetic analgesia, and

also to provide the evaluation of no neurological injuries. Studies in the literature were also just performed in awoken animals moving freely without contention⁴⁻⁶.

Tail immersion in hot water is a test which may be performed with a large number of animals when there is the need for repeating the test along the experiment to evaluate analgesia. It is sensitive, reliable and easy to reproduce. It is fast and does not induce heat injury. Other authors have also used this test¹¹.

In this study, 5 centimeters of tail were immersed in hot water for a maximum period of 15 seconds to prevent burns, taking into account that the test has been performed several times during the experiment. Water was heated in double boiler at 50 °C because this temperature is not deleterious to animals and allows for the observation of opioid's effects.

It has been apparent from recent studies that physical immobilization or movement restriction stresses rats and promotes hormonal and central nervous system changes. Endogenous opioid system is activated and changes analgesia tests results¹².

Our study has used plastic tubes with small posterior edge opening to maintain animal's tail externalized. There has been no need for manual contention of animals for the test because they have spontaneously entered the plastic cylinder, thus decreasing stress and preventing interferences in tail immersion test in hot water results.

We have used low morphine doses (0.1, 0.3, 0.5 and 1 µg) to check the possibility of no side effects. Agitation and strong mandible stimulation with fast muzzle hair movements and teeth shivering were earlier observed in some animals.

Paws weakness was observed in 4 animals soon after saline injection; this was not an opioid-induced effect since it was not seen after morphine injection, but could be related to solution-induced pressure².

No reference was found in the literature to justify the presence of mandible tremor preceding pruritus. However, mandible tremor was observed in our study in several animals of all groups receiving morphine.

Pruritus was the most common side effect. It has been clinically observed on muzzle and face of a large number of animals for approximately 2 hours and in line with the literature¹³. The lower the dose used, the milder the intensity and duration of pruritus.

After labeled lumbar spine morphine in rats with X-rays to identify opioid distribution, highest concentration was observed 14 minutes after, resulting in muzzle and face pruritus clinically observed up to 2 hours after injection¹³. These authors have suggested that pruritus would result from high morphine concentration on the trigeminal nerve. After systemic morphine administration, pruritus partially involves the opioid effect on nervous system and may also be a consequence of histamine release¹⁴.

There has been absence of diuresis in our study in a large number of animals for some time and this may be related to urinary retention commonly observed in men¹³.

After spinal morphine administration, rats remain quiet, with low response to handling². In our study, quietness has been

observed in some animals of all groups and was considered mild sedation since they were easily awakened.

There has been no respiratory depression in all studied animals with the doses used in our study. Arterial blood gases analysis has not shown changes, however this was an isolated measurement because blood was collected from one animal of each group only, due to technical difficulties. Respiratory depression has been observed in human healthy volunteers with 2 to 10 mg epidural morphine⁵. Our study has observed early respiratory changes characterized by irregular breathing maintained for approximately 30 minutes after morphine injection.

There have been no side effects in the last evaluation moment in all groups and this might be justified by a possible correlation with time elapsed after spinal morphine injection. In addition, side effects were observed even without analgesia. Based on this experimental study with rats and 0.1, 0.3, 0.5 and 1 µg spinal morphine in 10 µl of 0.9% saline solution, one may conclude that doses below 1 µg promote short duration analgesia and that there is no analgesic dose without side effects.

REFERÊNCIAS - REFERENCES

01. Snyder SH, Pert CB, Pasternak GW - The opiate receptor. *Ann Intern Med*, 1974;81:534-540.
02. Yaksh TL, Rudy TA - Studies on direct spinal action of narcotic in the production of analgesia in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 1977;202:411-428.
03. Wang JK, Nauss LA, Thomas JE - Pain relief by intrathecally applied morphine in man. *Anesthesiology*, 1979;50:149-151.
04. Yaksh L, Rudy TA - Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav*, 1976;17:1031-1036.
05. Van den Hoogen RGW, Colpaert FC - Long term catheterization of the lumbar epidural space in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 1981;15:515-516.
06. Dib B - Intrathecal chronic catheterization in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 1984;20:45-48.
07. Immelman L, Roth S, Sabourin MA et al - Analgesia and serum concentrations of extradural, subdural and intraperitoneal fentanyl in a rat model. *Can J Anaesth*, 1990;37:63-68.
08. Nishiyama T - A rat model of chronic lumbar epidural catheterization. *Can J Anaesth*, 1998;45:907-912.
09. Matos FF, Rollemma H, Taiwo Y et al - Relationship between analgesia and extracellular morphine in brain and spinal cord in awake rats. *Brain Research*, 1995;693:187-195.
10. Bahar M, Rosen M, Vickers MD - Chronic cannulation of the intradural or extradural space in the rat. *Br J Anaesth*, 1984;56:405-410.
11. Janssen PAJ, Niemeregeers CJE, Dony JG - The inhibitory effect of fentanyl and other dinorphine-like analgesics on the warm water induced tail withdrawal reflex in rats. *Arzneimittel-Forsch*, 1963;13:502-507.
12. Porro CA, Carli G - Immobilization and restraint effects on pain reactions in animals. *Pain*, 1988;32:289-307.
13. Gustafsson LL, Post C, Edvardsen B et al - Distribution of morphine and meperidine after intrathecal administration in rat and mouse. *Anesthesiology*, 1985;63:484-489.
14. Jaffe JH, Martin WR - Opioid Analgesics and Antagonists, em: Goodman & Gilman's - The Pharmacological Basis of Therapeutics. 8th Ed, New York: Pergamon Press, 1990;485-521.

RESUMEN

Silva NSF, Sakata RK, Issy AM - Efectos Observados con Diferentes Dosis de Morfina Subaracnoidea en Ratonos

JUSTIFICATIVA Y OBJETIVOS: La morfina por vía espinal promueve buen efecto analgésico, solamente no es exenta de efecto colateral. El objetivo de este estudio fue investigar los efectos observados con diferentes dosis de morfina por vía subaracnoidea.

MÉTODO: Fueron estudiados cinco grupos de siete ratones, 24 horas después de la colocación de catéter subaracnoideo vía cisterna magna bajo anestesia con cetamina y xilazina por la vía muscular. El G1 recibió 10 µl de solución fisiológica; los grupos G2, G3, G4, y G5 recibieron respectivamente 0,1; 0,3; 0,5 y 1 µg de morfina en 10 µl de solución fisiológica. Los animales fueron sometidos al teste de inmersión de la cola en agua caliente en el M₀ (antes de la inyección), y M₁₅, M₃₀, M₆₀, M₁₂₀ y M₁₈₀ minutos después de la inyección.

RESULTADOS: Se observó analgesia en los grupos que recibieron morfina, en diversos momentos, cuando comparados con el grupo control y con el tiempo antes de la inyección de morfina. En el G1 hubo flaqueza de las patas en 4 animales. Ocurrió agitación en M₁₅ en el G2 y en M₁₅ y M₃₀ en el G3. Tremor de mandíbula fue observado en M₅, M₁₅, M₃₀, y M₆₀ en el G2; en el G3 fue observado en M₅ y M₁₅; en el G4, en M₅ y en el G5, en M₅. Prurito fue observado en M₅, M₁₅, M₃₀ y M₆₀ en el G2; en M₅, M₁₅, M₃₀, M₆₀ y M₁₂₀ en el G3; en M₅, M₁₅, M₃₀, M₆₀, y M₁₂₀ en el G4; en M₅, M₁₅, M₃₀, M₆₀ y M₁₂₀ en el G5. Ausencia de diuresis ocurrió en M₆₀ en el G2; en el M₁₅, M₃₀, M₆₀ y M₁₂₀ en el G3; en el M₆₀ y M₁₂₀ en el G4; y en el M₃₀ y M₆₀ en el G5. Sedación ocurrió en M₁₅, M₃₀ y M₆₀ en los grupos 2, 3 y 4; y en M₁₅, M₃₀, M₆₀, y M₁₂₀ en el G5. Alteración respiratoria fue observada en M₁₅, M₃₀, M₆₀ en el G2; en M₁₅, M₃₀ y M₆₀ en el G3; en M₁₅ y M₃₀ en los grupos 4 y 5.

CONCLUSIONES: En este estudio, todas las dosis de morfina subaracnoideas administradas provocaron efectos colaterales; y dosis menores que 1 µg promovieron analgesia de corta duración.