

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA

ESTUDO DA ANALGESIA INDUZIDA POR ADMINISTRAÇÃO DE ANTAGONISTA DE RECEPTORES NMDA – COMPARAÇÃO ENTRE A ADMINISTRAÇÃO CENTRAL (INTRATECAL) E PERIFÉRICA (GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL) EM MODELOS DE DOR E HIPERALGESIA EM RATOS.

DIEGO FERNANDES DE ARAÚJO

MESTRADO PROFISSIONAL

2019

DIEGO FERNANDES DE ARAÚJO

ESTUDO DA ANALGESIA INDUZIDA POR ADMINISTRAÇÃO DE ANTAGONISTA DE RECEPTORES NMDA - COMPARAÇÃO ENTRE A ADMINISTRAÇÃO CENTRAL (INTRATECAL) E PERIFÉRICA (GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL) EM MODELOS DE DOR E HIPERALGESIA EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora: Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo

UBERLÂNDIA

2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

A663 2019	<p>Araújo, Diego Fernandes de, 1989- Estudo da analgesia induzida por administração de antagonista de receptores NMDA - comparação entre a administração central e periférica em modelos de dor e hiperalgesia em ratos [recurso eletrônico] / Diego Fernandes de Araújo. - 2019.</p> <p>Orientadora: Celina Monteiro da Cruz Lotufo. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências da Saúde. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2137 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Ciências médicas. I. Monteiro da Cruz Lotufo, Celina , 1975-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências da Saúde. III. Título. CDU: 61</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

FOLHA DE APROVAÇÃO

Diego Fernandes de Araújo

Estudo da analgesia induzida por administração de antagonista de receptores NMDA - Comparação entre a administração central (intratecal) e periférica (gânglio da raiz dorsal) em modelos de dor e hiperalgesia em ratos

Presidente da banca: Profa. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Banca Examinadora

Titular: Prof. Dr. Felipe Silveira Rego Monteiro de Andrade
Instituição: Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV)

Titular: Prof. Dr. Guilherme Rabelo Souza
Instituição: Faculdade Patos de Minas

DEDICATÓRIA

*A minha mãe e professora Maria Jerônima
pela dedicação incondicional à minha formação profissional.*

Em memória do meu pai

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Dra. Celina Monteiro**, pelos ensinamentos, pelo exemplo de ética. Por confiar na minha capacidade, pela amizade e, sobretudo, sua paciência.

Aos colegas de laboratório, **Dra. Taís de Campos, Maria Vitória, Ms. Júlia Borges, Dra. Débora Oliveira**, que mesmo com o escasso tempo disponível, estavam sempre dispostas a ajudar. Vocês fizeram a caminhada mais leve. Muito obrigado.

À médica anesthesiologista, **Dra Beatriz Lemos**, verdadeira professora, comprometida com o conhecimento. Sem seu incentivo nada disso seria possível.

À minha mãe, **Maria Jerônima**, pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida. Por acreditar em mim e não medir esforços para a concretização dos meus sonhos.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”

Carl Jung

RESUMO

Os antagonistas de receptores NMDA são bastante utilizados como analgésicos na prática médica, no entanto, seus efeitos colaterais, relacionados à sua atuação em receptores centrais, limitam sua utilização. Os receptores NMDA medulares estão envolvidos em processos de sensibilização central em situações de dor crônica e neuropática. Por outro lado, estudo recente demonstrou um mecanismo inédito de ativação desses receptores na periferia, em gânglios da raiz dorsal, dependente de fibras do tipo C, em modelo de dor inflamatória. Assim, no presente estudo o objetivo foi avaliar a participação desses receptores periféricos no efeito analgésico induzido pelo antagonista AP-5 em diferentes modelos de nocicepção e hiperalgesia em ratos. Foi verificado que a administração intraganglionar de AP-5 apresentou efeitos analgésicos equivalentes àqueles apresentados pela injeção intratecal do mesmo antagonista em todos os modelos estudados. Nos modelos de nocicepção induzida por capsaicina e formalina observamos efeito analgésico semelhante tanto pela via intraganglionar quanto pela via intratecal no pré-tratamento com o antagonista de NMDAR. Nos testes de hiperalgesia induzida por carragenina ou neuropatia por constrição do nervo ciático os efeitos analgésicos obtidos por tratamento pelas vias intratecal e intraganglionar também foram semelhantes. Além destes testes, foi testado o efeito em modelo de dor pós-cirúrgica, sendo que a administração do antagonista AP-5 por ambas as vias não foi eficiente em promover analgesia. Diante desses resultados concluímos que os antagonistas de receptores NMDA podem ter seu efeito analgésico, no todo ou em parte, relacionado ao bloqueio de receptores periféricos. Deste modo, o estudo amplia o entendimento sobre os mecanismos envolvidos no processo de diferentes etiologias de dor e abre novas perspectivas para o desenvolvimento de fármacos de efeito exclusivamente periférico e que apresentem menos efeitos colaterais.

Palavras-chave: dor, NMDA, gânglio da raiz dorsal, AP-5

ABSTRACT

NMDA receptor antagonists are widely used as analgesics in medical practice, however, their side effects, related to their performance at central receptors, limit their wide use. Spinal NMDA receptors are involved in central sensitization processes in chronic and neuropathic pain situations. On the other hand, a recent study evidenced an unprecedented activation mechanism of these receptors in the periphery, in dorsal root ganglia, dependent on type C fibers, in an inflammatory pain model. Thus, in the present study the objective was to evaluate the peripheral receptors participation in the analgesic effect induced by the AP-5 antagonist in different models of nociception and hyperalgesia. Intraganglionic AP-5 administration was shown to have equivalent analgesic effects to those presented by intrathecal injection of the same antagonist in all the models tested. At nociception tests induced by capsaicin and formalin injections in rat paws we observed similar analgesic effects both using intraganglionic or intrathecal routes of NMDAR antagonist pretreatment, as well as in the tests of carrageenan-induced hyperalgesia and neuropathy by sciatic nerve constriction. However, we did not observe the same analgesic effect in the post-surgical hyperalgesia experiment. In view of these results, we conclude that NMDA receptor antagonists may have their analgesic effect, in whole or in part, due to the blockade of peripheral receptors. Thus, the study broadens the understanding of the mechanisms involved in pain processing and opens new perspectives for the use of drugs that act at peripheral level, reducing central side effects.

Keywords: pain, NMDA, analgesia, dorsal root ganglion, AP-5

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Componentes dos nociceptores.....	19
Figura 2. Sítios de ligação do receptor NMDA.....	22
Figura 3. Diagrama esquemático da organização entre as células satélites e os corpos neuronais no gânglio da raiz dorsal.....	24
Figura 4. Injeção intratecal em ratos. Inserção da agulha no espaço subaracnoide na região medial entre as vértebras L5-L6.....	28
Figura 5. Injeção intraganglionar.....	29
Figura 6. Diferentes estágios da incisão plantar em ratos.....	33
Figura 7. Cirurgia de contração crônica do nervo ciático.....	35
Figura 8. Teste de nocicepção induzida por capsaicina.....	36
Figura 9. Teste de nocicepção induzida por formalina.....	37
Figura 10. Teste de hiperalgesia induzida por carragenina.....	38
Figura 11. Teste de hiperalgesia pós-cirúrgica.....	39
Figura 12. Avaliação do efeito agudo de antagonistas de receptores NMDA sobre hiperalgesia mecânica induzida por constrição de nervo ciático	40
Figura 13. Avaliação do efeito de antagonistas de receptores NMDA em longo prazo sobre a hiperalgesia induzida por constrição de nervo ciático.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Limiar mecânico da pata obtidos 1 hora após administração dos tratamentos nos primeiros 4 dias após constrição crônica do nervo ciático.....40

Tabela 2. Limiar mecânico da pata obtidos após administração dos tratamentos nos primeiros 28 dias após constrição crônica do nervo ciático.....41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato
AP-5	2-amino-5-fosfopentóico
ATP	Adenosina trifosfato
CGRP	Peptídeo relacionado com o gene da calcitonina
CGS	Célula satélite glial
COX	Ciclooxigenase
DNQX	6,7-dinitroquinoxalina-2,3-diona
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
GRD	Gânglio da Raiz Dorsal
IL-1 β	Interleucina 1 β
I.pl.	Intraplantar
I.t.	Intratecal
I.gl.	Intraganglionar
LTP	Potenciação de longa duração
L5	Quinta vértebra lombar
NGF	Fator de crescimento neural
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR	Receptores NMDA
PGE2	Prostaglandina E2
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico

SP	Substância P
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
TRP	Potencial receptor transitório
TRPV	Canais em receptores de potencial transitório vanilóide
VGLUT	Transportador vesicular de glutamato
VR	Receptor vanilóide
μ l	Microlitros
μ g	Microgramas
5,7-DCK	Ácido 5,7-dicloroquinurênico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo Geral.....	25
3.2 Objetivos Específicos.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Animais.....	26
4.2 Drogas utilizadas.....	26
4.3 Administração de drogas.....	27
4.3.1 Administração intraplantar.....	27
4.3.2 Administração intratecal.....	27
4.3.3 Administração diretamente no GRD.....	28
4.4 Testes Comportamentais.....	30
4.4.1 Teste da capsaicina.....	30
4.4.2 Teste da formalina.....	30
4.4.3 Teste de pressão crescente: von Frey eletrônico.....	31
4.4.4 Teste da carragenina.....	32
4.4.5 Hiperalgisia pós-cirúrgica.....	32
4.4.6 Constrição crônica do nervo ciático.....	34
4.5 Análise Estatística.....	35
5. RESULTADOS.....	35

5.1 Participação dos receptores NMDA na nocicepção induzida por capsaicina.....	35
5.2 Participação dos receptores NMDA na nocicepção induzida por formalina.....	36
5.3 Participação dos receptores NMDA na hiperalgesia induzida por carragenina.....	37
5.4 Participação dos receptores NMDA na hiperalgesia pós-cirúrgica.....	38
5.5 Participação dos receptores NMDA na hiperalgesia induzida por constrição do nervo ciático.....	39
5.6 Avaliação do efeito de antagonistas do receptor NMDA sobre a cronificação da hiperalgesia induzida por contração de nervo ciático.....	41
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS.....	50
ANEXO – Certificado Comissão de Ética ne Utilização de Animais.....	60

1. INTRODUÇÃO

Os receptores NMDA têm sido consideravelmente estudados nos últimos anos devido ao seu papel tanto no desenvolvimento quanto no funcionamento do sistema nervoso central, além de sua participação em processos patológicos e neurodegenerativos (PETRENKO, 2003; NICKEL et al., 2012). O receptor NMDA é um dos três subtipos de canais receptores ionotrópicos sensíveis ao aminoácido excitatório glutamato, um dos mais importantes neurotransmissores do sistema nervoso. Sua estrutura consiste em componentes que reconhecem e se ligam ao glutamato e um canal transmembrana, seletivo para cátions como Na⁺, Ca²⁺, K⁺, porém sua maior permeabilidade é para o íon Ca²⁺ (McBAIN; MAYER, 1994).

Os receptores NMDA participam da transmissão de informação nociceptiva. Esses receptores são expressos em neurônios de primeira e segunda ordem. Na medula, os receptores NMDA têm sido amplamente estudados e estão envolvidos em processos de sensibilização central que ocorrem em dores inflamatórias e neuropáticas (ZHUO, 2009; CHIZH, 2007). Estudo mais recente, entretanto, indica a participação de receptores NMDA periféricos, localizados no gânglio da raiz dorsal na hiperalgesia inflamatória (FERRARI et al., 2014). O glutamato liberado por neurônios sensoriais no gânglio da raiz dorsal parece ativar receptores NMDA presentes em células satélites gliais, as quais são encontradas envolvendo o soma neuronal (FERRARI et al., 2014). Não ocorrem sinapses nos gânglios periféricos, de forma que esta interação entre neurônios e células satélites gliais pode ter relevância fisiológica, já que o glutamato não pode se difundir de um neurônio para outro. Essa possibilidade é reforçada pela expressão de transportadores de glutamato e glutamina sintetase em células satélites gliais (BERGER; HEDIGER, 2000). Ainda, estudo realizado por Christoph e colaboradores (2005) demonstrou que um antagonista que não tem acesso ao sistema nervoso central apresenta efeito analgésico sem causar efeitos sobre o controle motor de ratos, diferente do que ocorre com administração de um antagonista de ação central. Deste modo, o entendimento do potencial efeito analgésico na periferia (gânglio sensitivos), abre evidências para o desenvolvimento de novos fármacos que possuam efeito analgésico, com menos efeitos indesejados, fato que amplia e aprimora a utilização desses antagonistas na clínica médica.

Assim, levando em consideração que a liberação de glutamato e ativação dos receptores NMDA no gânglio da raiz dorsal estão envolvidos na manutenção da dor inflamatória, e que este receptor está também envolvido na sensibilização central que ocorre na medula espinal, e ainda, pensando em estratégias para uso clínico de fármacos dessa classe, no presente estudo foi realizada uma comparação do efeito analgésico do antagonista NMDAR, AP-5, administrado no gânglio da raiz dorsal (intraganglionar) com o efeito do mesmo administrado na medula (intratecal) em diferentes modelos de dor.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Atualmente, a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define dor como “experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual potencial ou de fato ou, ainda, descrita em termos que sugerem tal dano”.

Dor, em seu sentido amplo, é uma experiência e, portanto, envolve consciência, já que se relaciona tanto com as dimensões sensorial-discriminativa (intensidade, localização, duração) como afetivo-emocional (relação entre dor e humor) (LENT, 2008). Serve, normalmente, como um dispositivo de alerta, permitindo ao indivíduo adotar comportamentos de proteção adequados em resposta aos danos ocorridos ou iminentes (BASBAUM et al., 2009; SCHOLZ; WOOLF, 2002).

A nocicepção, no entanto, trata-se de um sistema sensorial que transmite ao SNC informações do meio interno e externo que são usadas para diversos ajustes do funcionamento do organismo sem necessariamente chegar ao nível consciente (LENT, 2008).

De forma resumida, ocorre uma cascata de eventos para que o fenômeno doloroso se origine, o primeiro passo é a transformação dos estímulos ambientais, físicos ou químicos intensos em potenciais de ação, que são transferidos, das fibras nervosas do sistema nervoso periférico (SNP) para o sistema nervoso central (SNC). O processo de transdução dos eventos térmicos, mecânicos e químicos intensos em potenciais de ação se iniciam nos neurônios aferentes primários, que também podem ser entendidos como nociceptores (WOOLF; MA, 2007), nas porções mais distais desse neurônio. O restante da membrana axonal não apresenta a propriedade de gerar os potenciais repetitivos frente aos estímulos naturais (NETO,

2009). Estímulos químicos (radicais ácidos, capsaicina, bradicinina), mecânicos (pressão) ou térmicos (calor ou frio) intensos ativam receptores ou canais de membrana dos nociceptores e deflagram, quando superam o limiar de excitação, potenciais de ação que percorrem todo o neurônio, cujo corpo celular se encontra no gânglio da raiz dorsal (GRD) e daí para o SNC. Há subpopulações de neurônios somatossensitivos que são ativados somente por estímulos intensos e com possibilidade de lesar os tecidos. Os receptores sofrem fadiga e sensibilização. A aplicação repetitiva de estímulos reduz a percepção de muitas sensações. Entretanto, quando ocorre lesão tecidual, há sensibilização dos nociceptores e instala-se a hiperalgesia. (NETO, 2009)

Ao interagir com o meio ambiente, os organismos vivos têm que reconhecer e reagir a estímulos nocivos para evitá-los. Para isso, os nociceptores têm um limiar alto e normalmente respondem, como Sherrington reconheceu claramente, apenas a estímulos de alta intensidade com potencial de danificar os tecidos (WOOLF; MA, 2007).

Alguns nociceptores são pouco mielinizados (fibras A δ), mas a maioria é não-mielinizada (fibras C), sendo estes aferentes de condução lenta a maioria dos neurônios sensoriais no sistema nervoso periférico. Todos os neurônios sensoriais primários possuem seus corpos celulares nos gânglios da raiz dorsal ou nos gânglios do nervo trigêmeo e dão origem a um único axônio que se bifurca em um processo periférico (inerva tecido alvo periférico) e um processo central que entra no SNC para fazer sinapse em neurônios de segunda ordem (WOOLF; MA, 2007).

O nociceptor, portanto, tem quatro componentes funcionais principais, o terminal periférico onde se iniciam os potenciais de ação, o axônio que conduz os potenciais de ação, o corpo celular que controla a identidade e integridade do neurônio, e o terminal central pré-sináptico que forma o elemento da primeira sinapse na via sensorial no SNC (Figura 1).



Fonte: Adaptado de Woolf; Ma (2007).

Figura 1. Componentes dos nociceptores. Os componentes operacionais do nociceptor incluem um terminal periférico que inerva o tecido alvo e transduz estímulos nocivos, um axônio que conduz potenciais de ação da periferia para o sistema nervoso central, um corpo celular no gânglio da raiz dorsal, e um terminal central onde a informação é transferida via sinapses para neurônios de segunda ordem.

Os nociceptores utilizam diferentes tipos de mecanismos de transdução para detectar estímulos nocivos diversos. Na membrana plasmática dos nociceptores encontram-se famílias de proteínas transmembranares constituindo receptores e canais que participam do processo transdução das várias modalidades de estímulos nocivos. Assim, as moléculas protéicas que constituem os canais iônicos responsáveis pela detecção do calor nocivo são parte de uma família denominada “potencial receptor transitório” (TRP), que inclui os receptores vanilóides VR1 e VRL-1. Os canais envolvidos na detecção dos estímulos mecânicos nocivos são denominados “canais epiteliais de sódio”. Os estímulos nocivos químicos, tais como aqueles produzidos pela capsaicina (gradiente irritante encontrado na pimenta) e os ácidos podem ser detectados por meio de um transdutor comum, o VR1, o que ilustra aspectos de redundância na nocicepção (LENT, 2008). A ativação de um número suficiente dessas moléculas origina potenciais de ação que são conduzidos pelos axônios de fibras amielínicas C e mielínicas A δ para o sistema nervoso central, produzindo sensação de dor, em estruturas supra-espinhais.

Os nociceptores de fibras A δ respondem a estímulos mecânicos intensos, mas se diferenciam com relação à sua resposta aos estímulos térmicos. Já os nociceptores de fibras amielínicas C são denominadas polimodais, porque respondem satisfatoriamente às três formas de estímulos nocivos (térmicos, mecânicos e químicos). Assim como as fibras A δ do subtipo II, eles também respondem a estímulos térmicos moderados e à capsaicina, e possuem receptores com características vanilóides VR1.

Todos os nociceptores possuem glutamato, o aminoácido excitatório mais abundante no sistema nervoso. Porém, um grupo de nociceptores C possui também neuropeptídeos como a substância P (SP) e o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP) e expressam o receptor de neurotrofina TrkA, alvo do fator de crescimento neural (NGF). A população de nociceptores C não peptidérgicos expressa o receptor de neurotrofina c-Ret, alvo do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), receptores acoplados à proteína G da família Mrg, bem como o receptor purinérgico P2X3, um subtipo específico de canal iônico ativado por ATP (BASBAUM et al., 2009; JULIUS; BASBAUM, 2001; SNIDER; MCMAHON, 1998).

Em situações de lesão tecidual ocorre um processo denominado sensibilização do nociceptores (sensibilização periférica), que passam a responder a estímulos leves (químicos, mecânicos e térmicos) devido a diminuição do limiar de ativação ou propiciar o aparecimento de atividade espontânea. A sensibilização periférica representa uma forma de plasticidade neuronal evocada por um estímulo no nociceptor. O estímulo, no caso, é um conjunto de mediadores inflamatórios liberados de células lesadas e inflamatórias que reduzem o limiar de excitação, aumentando a capacidade de resposta. No local da lesão ou inflamação e como resultado da mudança no meio químico produzido pelo rompimento de células, degranulação de mastócitos, secreção por células inflamatórias e indução de enzimas como a ciclooxigenase-2 (COX-2), os nociceptores deixam de detectar exclusivamente estímulos nocivos, mas também estímulos inócuos. Como resultado, estímulos de baixa intensidade terão acesso às vias nociceptivas e começarão a produzir dor. Uma gama de sensibilizadores estão envolvidos nesse processo, incluindo cininas, aminas, prostanóides, fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas, que com prótons e ATP compõem o que ficou conhecido como "sopa inflamatória" que é "provada" pela terminação do nociceptor e, como resultado, altera (WOOLF; MA, 2007).

Entre essas substâncias químicas, as prostaglandinas, produzidas pela ação das enzimas COX, sobretudo a prostaglandina E2 (PGE2), tem sido muito estudada, visto que sua injeção periférica produz hiperalgesia e alodinia (sensação dolorosa induzida por um estímulo inócuo) tanto em animais experimentais quanto em humanos (FERREIRA; MONCADA; VANE, 1973).

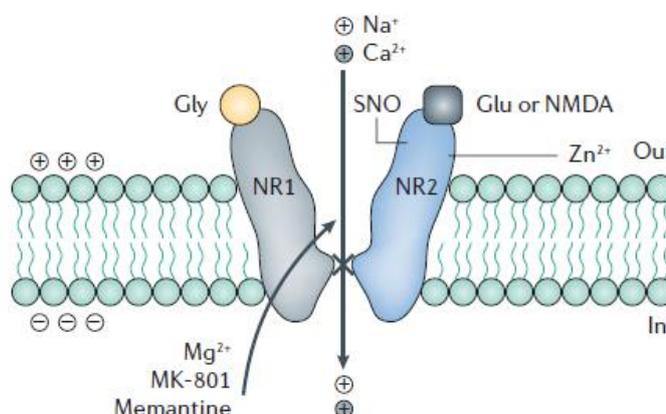
O mecanismo de sensibilização neuronal induzido por PGE2 além de estar associado à fosforilação de canais iônicos, importantes para a atividade elétrica neuronal, relaciona-se também à indução de alterações na liberação de neurotransmissores no GRD de ratos. Nesse sentido, foi observado que, quando administrada por via intraplantar, a PGE2 sensibiliza os neurônios periféricos e que essa sensibilização é inibida por administração intraganglionar do antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), especificamente o AP-5, sugerindo que a hiperalgesia induzida por injeção PGE2 possa desencadear a liberação de glutamato no GRD e que este neurotransmissor atue em receptores presentes em células satélites gliais (FERRARI et al., 2014).

A possível participação de receptores NMDA periféricos na sensibilização foi verificada apenas recentemente (FERRARI et al., 2014). Estes receptores, entretanto, têm sido implicados em processos de sensibilização central, que ocorre em situações de dores crônicas e neuropáticas (WOOLF; MA, 2007). A sensibilização central é dependente do incremento de excitabilidade de neurônios do corno dorsal da medula espinhal, em resposta aos altos níveis de atividade dos aferentes nociceptivos. Como sobre esses neurônios de segunda ordem podem convergir aferências mecanorreceptoras (inócuas, correspondentes as fibras β), estas, ao serem ativadas nessas circunstâncias, produzem dor (alodinia). A alodinia pode resultar de duas condições diferentes: respostas aumentadas de neurônios de transmissão da dor localizados na medula espinhal (sensibilização central) ou diminuição do limiar de ativação do nociceptor (sensibilização periférica). Ao contrário, o aumento da dor produzido por estímulo nocivo é denominado hiperalgesia, que se caracteriza por uma resposta exacerbada de dor por um estímulo nocivo. Uma das características dos processos inflamatórios é o aparecimento da condição denominada “wind-up” (termo da língua inglesa que significa amplificação), que resulta de um progressivo aumento da frequência de disparo dos neurônios da medula espinhal em resposta a uma ativação repetida dos aferentes nociceptivos, principalmente de fibras C.

A primeira inibição farmacológica desse fenômeno, o “wind-up”, foi conseguido com antagonistas do receptor NMDA, tais como cetamina ou 2-amino-5-fosfonopentanoato, d-AP5, (DAVIES; LODGE, 1987; DICKENSON; SULLIVAN,

1987), sugerindo assim que o receptor NMDA fosse intimamente envolvido nos mecanismos de “wind-up”.

Os receptores NMDA funcionam como conjuntos heteroméricos compostos por duas subunidades NR1 em combinação com duas ou três subunidades NR2 e/ou NR3 (SCHORGE; COLQUHOUN, 2003). Para que ocorra sua ativação ocorre a ligação de aminoácidos em sítios das subunidades NR1 e/ou NR3 (glicina), e em sítios na subunidade NR2 (glutamato) (LIPTON, 2006) (Figura 2). A glicina é capaz de induzir uma mudança conformacional no complexo canal-receptor, essencial para a abertura do canal ou para a ligação do glutamato.



Fonte: Adaptado de LIPTON, 2006.

Figura 2. Sítios de ligação do receptor NMDA. Glicina e glutamato/N-metil-D-aspartato (Glu/NMDA) ligados aos seus respectivos sítios de ligação, o local de ligação para Mg^{2+} , MK-801 está na região do poro do canal iônico. NR1 subunidade 1 do receptor NMDA; NR2 subunidade 2 do receptor NMDA.

O receptor NMDA está bloqueado pelo cátion Mg^{2+} em condições basais de potencial de membrana, condição que pode ser revertida pela despolarização neuronal (LAUBE; KUHSE; BETZ, 1998). A expressão da subunidade NR3A está presente em receptores NMDAs de células satélites gliais e sua presença reduz a sensibilidade de receptores NMDA ao Mg^{2+} extracelular (FERRARI et al., 2014; SASAKI et al., 2002).

O modelo original para explicar a contribuição de receptores NMDA para o “wind-up” dependem do bloqueio do canal do receptor NMDA pelos íons magnésio extracelular, quando em potencial de membrana em repouso (NOWAK et al., 1984; DICKENSON, 1990; DICKENSON; SULLIVAN., 1997).

A ideia é de que o estímulo em fibras do tipo C seja suficientemente intenso para despolarizar a membrana celular através da ativação de receptores do tipo AMPA, e assim aliviar o bloqueio de Mg^{2+} , permitindo assim que o receptor NMDA possa ser co-ativado pelo glutamato (WOOLF; MA, 2007).

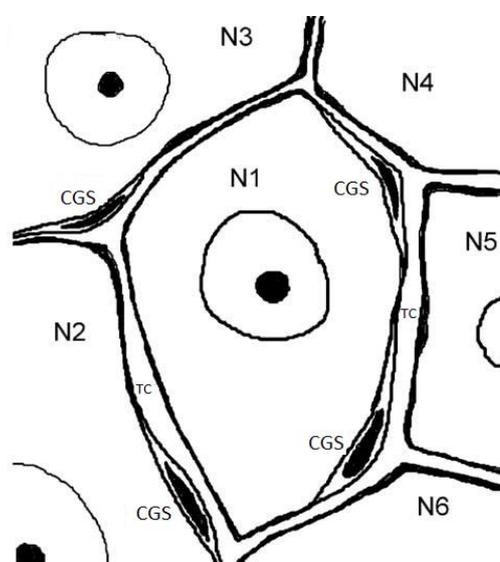
Este modelo, baseado em observações extracelulares, pressupõe que a ativação do receptor NMDA produz uma despolarização cumulativa que resulta no “wind-up”. Deve-se notar que as despolarizações cumulativas são muitas vezes observadas sem “wind-up” e que o fenômeno pode ocorrer sem que essa despolarização seja perceptível, como parece ser o caso dos neurônios do trato espinotalâmico registrado de macacos (ZHANG et al., 1991).

Aqui, devemos ressaltar, que esses receptores também estão presentes nos GRDs, mais especificamente, em células satélites gliais (CSGs). Os gânglios sensitivos contêm os corpos celulares de neurônios aferentes que transmitem informações sensoriais da periferia para o SNC e também envia colaterais para os gânglios simpáticos pré-vertebrais (ALDSKOGIUS; ELFVIN; FORSMAN, 1986; MATTHEWS; CUELLO, 1982). A maioria dos sinais sensoriais corporais são encaminhados ao SNC através de um gânglio da raiz dorsal (GRD). Estas estruturas se localizam perto da entrada de raízes dorsais na medula espinhal e não fazem parte do SNC. É interessante notar que os neurônios sensoriais ganglionares não possuem dendritos, portanto, sua estrutura é muito mais simples do que a maioria dos outros neurônios e, ainda, não recebem sinapses, mas são dotados de receptores para inúmeros neurotransmissores (DEVOR, 1999).

Na maioria dos locais no SNC, as células endoteliais formam uma barreira para impedir a difusão de grandes moléculas dos vasos sanguíneos para o espaço extracelular em torno dos neurônios, o que denominamos de barreira hemato encefálica. No entanto, nos gânglios sensoriais essa barreira inexistente, aparentemente porque alguns dos capilares são fenestrados (ARVIDSON, 1979). Sugere-se que este arranjo possa permitir a comunicação entre neurônios, nos GRD, pela difusão de neurotransmissores, base proposta da excitação cruzada encontrada entre essas células (SHINDER; DEVOR, 1994).

Informações atuais mostram que as CGSs, presentes nesses gânglios sensoriais, participam de inúmeros processos normais e patológicos no sistema

nervoso. Aparentemente, essas células possuem características muito particulares que as diferem de outras (oligodendrócitos, astrócitos) presentes em outros locais, sugerindo uma função peculiar em processos fisiológicos e farmacológicos. Estruturalmente, formam uma grande variedade de associações anatômicas com células neuronais (REICHENBACH et al., 2004). Os corpos celulares dos neurônios sensoriais encontram isolados por bainhas de células gliais. Cada corpo celular é envolvido por uma bainha de CGSs, formando uma unidade morfológica e funcional. Essas unidades estão separadas da bainha perineural adjacente por tecido conjuntivo (HANANI, 2005; PANNESE, 1981) (Figura 3).



Fonte: Adaptado de HANANI, 2005.

Figura 3. Diagrama esquemático da organização entre as células satélites e os corpos neuronais no gânglio da raiz dorsal. CGS, célula glial satélite; N1-N6, corpo celular dos neurônios sensoriais; TC, tecido conjuntivo.

Alguns estudos mostraram que as CGSs em grande parte do sistema nervoso são acopladas por junções comunicantes, que permitem a passagem de íons e pequenas moléculas (peso molecular de até 1000 Da) (LEDDA, 2009). O significado funcional desse acoplamento ainda é indeterminado, mas por analogia com as células gliais centrais entende-se que elas permitam as CGSs de captarem K^+ e outras substâncias, como o glutamato, e transportá-las para outros locais, impedindo assim o seu acúmulo potencialmente prejudicial ao gânglio.

As CGSs apresentam inúmeros receptores para diversos agentes neuroativos (ATP, bradicinina, NMDA) e podem, portanto, receber sinais de outras células e responderem a mudanças em seu ambiente. A possibilidade de que o glutamato também seja liberado dentro do gânglio sensorial veio de estudos que demonstraram a presença de transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT1, 2 e 3) associados à membrana plasmática somática (BRUMOVSKY; WATANABE; HÖKFELT, 2007), a presença de proteínas necessárias à captação e reciclagem de glutamato em células gliais satélites (JASMIN et al., 2011) e a presença de receptores funcionais de glutamato no corpo celular neuronal e nas células satélites gliais (KUNG et al., 2013).

Estudos esses que corroboram com aqueles publicados por Ferrari et al. (2014) onde há fortes evidências de que quando o neurônio aferente primário é estimulado química ou eletricamente, ocorre a liberação de glutamato, além da liberação de ATP no GRD (ZHANG et al, 2007). Uma vez que as CGSs possuem receptores para NMDA, é possível que esses mediadores neuronais também participem da excitação cruzada entre o neurônio aferente primário e as CGSs (FERRARI et al., 2014). Entretanto, o mecanismo exato pelo qual as células satélites ativadas por glutamato influenciam a excitabilidade neuronal e contribuem para a transmissão de estímulos dolorosos não está totalmente esclarecido.

Diante das características únicas dessas estruturas, sugere-se que possuam papéis fisiológicos de extrema importância, assim, seu entendimento permite a compreensão ampla e possível tratamento de doenças relacionadas a esses processos. Sabemos das limitações para o uso clínico dos antagonistas de receptores NMDA diante de seus efeitos adversos relacionados à atuação desses fármacos no SNC, como psicose e agitação motora. Portanto, estudos sobre o efeito de antagonistas NMDA em nível periférico pode trazer embasamento científico para a criação de novos fármacos com efeitos analgésicos sem esses efeitos colaterais típicos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Comparar os efeitos analgésicos dos AP-5 (antagonista do receptor NMDA) administrado por via intratecal e por via intraganglionar em modelos de dor e hiperalgesia em ratos.

3.2 Objetivos Específicos

Comparar os efeitos analgésicos do antagonista NMDA (AP-5) administrado por via intratecal com os efeitos da administração intraganglionar em modelos de dor em ratos, sendo estes:

- Nocicepção induzida por injeção de formalina e capsaicina na pata de ratos;
- Hiperalgesia inflamatória induzida por injeção de carragenina na pata de ratos;
- Hiperalgesia em modelo pós-cirúrgico;
- Neuropatia por constrição do nervo ciático.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Para realização dos testes foram utilizadas ratas *Wistar* (com média de massa de 250 gramas), de 5 – 10 animais por grupo, mantidas em sala com temperatura e ciclo de luminosidade controlada e acesso à água e ração *ad libitum*. Todos os experimentos seguiram as normas éticas estabelecidas para experimentação com animais acordados, recomendadas pela IASP (ZIMMERMANN, 1983). Todos os procedimentos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia, registrado sob o **Protocolo 109/17**.

4.2 Drogas utilizadas

- Isoflurano 1mL/mL;
- 2-amino-5-fosfopentóico (AP-5)
 - Intratecal contendo 18 µg diluído em 10 µL de salina (FERRARI et al., 2014);
 - Intraganglionar contendo 9 µg diluído em 5 µL de salina (FERRARI et al., 2014);

- Capsaicina intraplantar contendo 10 µg em 50 µl de salina (LEMES et al., 2018);
- Carragenina intraplantar contendo 100 µg em 50 µl de salina (VIVANCOS et al., 2004);
- Formalina 1% (SHIELDS et al., 2010) intraplantar diluída em 50 µl de salina (VIVANCOS et al., 2003);

4.3 Administração de drogas

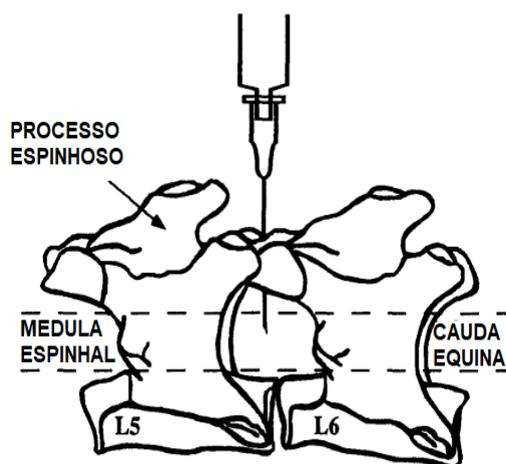
Nos testes comportamentais, as drogas foram administradas pelas vias: intraplantar (i.pl.), intratecal (i.t.) ou intraganglionar (i.gl.).

4.3.1 Administração intraplantar (i.pl.)

As drogas foram injetadas na pata traseira direita dos ratos por meio de uma agulha hipodérmica 26G, conectada a uma seringa e inserida no meio da pata, entre as cinco calosidades distais. As injeções foram realizadas utilizando um volume de 50 µl (VIVANCOS et al., 2003).

4.3.2 Administração intratecal (i.t.)

Os animais foram anestesiados com inalação de isoflurano (Isoforine® 1mL/mL). Em seguida realizou-se a tricotomia dorsal na altura das cristas ilíacas. Posteriormente, os animais foram posicionados em decúbito ventral sobre um cilindro, para que sua região lombar ficasse hiperfletida. O método de injeção intratecal foi realizado de acordo com o trabalho publicado por Mestre et al., (MESTRE et al., 1994). Uma agulha fixa em seringa (Injex®), 29G, 50 unidades, para insulina foi inserida no espaço subaracnóide, perfurando a região medial entre as vértebras L5-L6 (± 1), local onde a medula termina e a calda equina se inicia, em ângulo de aproximadamente 90°, e um volume de 10 µL (contendo 18 µg de AP-5) foi injetado (Figura 4). A correta localização da punção no espaço subaracnóide foi verificada pela observação de um reflexo motor na cauda do animal. Após a injeção, a agulha foi mantida por dois segundos em posição antes de sua cuidadosa retirada, para evitar o refluxo da solução injetada.



Fonte: Adaptado de Mestre et al., 1994

Figura 4. Injeção intratecal em ratos. Inserção da agulha no espaço subaracnóideo na região medial entre as vértebras L5-L6.

4.3.3 Administração diretamente no gânglio da raiz dorsal

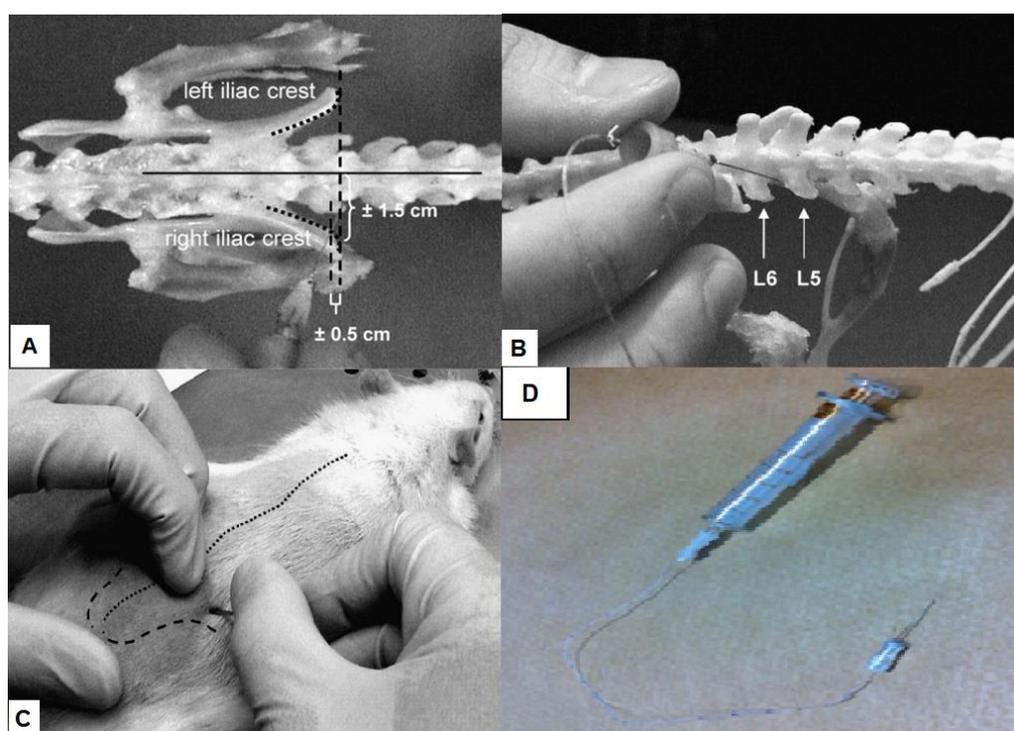
(i.gl.)

A injeção de drogas via intraganglionar, em específico, no GRD-L5 foi realizada segundo a técnica de injeção direta descrita por Ferrari et al. em 2007.

Devido ao pequeno tamanho do gânglio, volumes acima de 5 μ L são passíveis de extravasar e permear estruturas adjacentes ao gânglio. Dessa maneira, para que o volume de 5 μ l (contendo 9 μ g de AP-5 ou salina) pudesse ser administrado sem o risco de permear estruturas adjacentes ao gânglio, foi confeccionada uma escala utilizada para controle fino da quantidade de solução injetada. Esta escala foi adaptada a um cateter de 30 cm PE-10 (Intramedic Clay Adams®, diâmetro interno de 0.28 mm e externo de 0.61 mm), calibrado de maneira que 25 mm de deslocamento da solução dentro do cateter corresponderiam ao depósito de 1 μ l de solução. O cateter foi conectado a uma agulha gengival (Dentbras®, 30G curta), e, em sua outra extremidade, a uma seringa de vidro (BD® Glass LOR Syringe).

Os animais foram anestesiados com inalação de isoflurano (Isoforine® 1mL/mL). Logo após a realização da tricotomia dorsal na altura das cristas ilíacas, os animais então foram posicionados em decúbito ventral sobre um cilindro, de modo

que sua região lombar ficasse hiperfletida. A 1,5 cm lateralmente à coluna vertebral, cerca de 0,5 cm em direção caudal a uma linha imaginária passando pelas bordas rostrais das cristas ilíacas, foi inserida uma cânula-guia (agulha hipodérmica 25x7) com o objetivo de facilitar a penetração da agulha gengival na pele dos animais. A agulha gengival foi inserida, através da cânula-guia, em direção ao espaço intervertebral entre a quinta e a sexta vértebra lombar, até que o processo ósseo lateral vertebral seja atingido. Com movimentos finos a agulha atinge o GRD e neste momento ocorre um reflexo motor característico da pata ipsilateral, indicando a penetração da ponta da agulha no gânglio da raiz dorsal do quinto nervo espinal lombar, o qual está localizado sob o processo transverso da quinta vértebra lombar (Figura 5).



Fonte: Adaptado de Ferrari et al., 2006

Figura 5. Injeção intraganglionar. **A:** linha imaginária tangente às bordas das cristas ilíacas utilizadas como referência para localizar o processo dorsal da sexta vértebra lombar (L6) no rato (linha tracejada). **B:** posição da ponta da agulha injetora sob o processo lateral da quinta vértebra lombar, onde o GRD-L5 está alojado. **C:** agulha injetora sendo inserida em um ângulo de 45° no intuito de alcançar o GRD-L5. **D:** material utilizado para a realização do teste (agulha gengival-cateter-seringa de vidro).

4.4 Testes Comportamentais

4.4.1 Teste da capsaicina

Neste teste, proposto por Sakurada et al. em 1992, foi realizada injeção intraplantar subcutânea de 50 µl contendo 10 µg de capsaicina (Sigma®) na pata traseira direita dos animais tratados. A injeção foi realizada após 30 minutos da injeção intraganglionar (9 µg diluído em 5µL de salina) ou intratecal (18 µg diluído em 10 µL de salina) do antagonista do receptor NMDA AP-5 (diluído em salina). No grupo controle realizou-se a administração intraganglionar de veículo (5µL de salina) e injeção intraplantar da mesma dose (50 µl contendo 10 µg) de capsaicina após 30 minutos da administração intraganglionar de salina. Em todos os grupos (tratados e controle) foram contados o número de reações nociceptivas (lambidas, movimentos de “sacudida” relacionada a sensação de dor em ratos) observados por 5 minutos. Os grupos experimentais foram os seguintes:

- 1) Salina i.gl., no qual foi realizada a constrição do nervo e administração de solução salina (5µl) através da injeção intraganglionar.
- 2) AP-5 i.gl., no qual foi realizada a constrição do nervo e administração de 9 µg/5µl de AP-5 através da injeção intraganglionar.
- 3) AP-5 i.t., no qual foi realizada a constrição do nervo e administração de 18 µg/10µl de AP-5 através da injeção intratecal.

4.4.2 Teste da Formalina

Utilizamos o teste da formalina como modelo para avaliar o sistema sensorial nociceptivo dos animais. Segundo estudos prévios (CODERRE et al., 1990, 1994, PARADA et al., 2001) este experimento induz uma resposta bifásica, que parece estar relacionada a mecanismos de sensibilização centrais e periféricos.

O teste foi realizado após 30 minutos da injeção intraganglionar (9 µg diluído em 5µL de salina) ou intratecal (18 µg diluído em 10 µL de salina) do antagonista do receptor NMDA AP-5. No grupo controle realizou-se a administração intraganglionar de veículo (5µL de salina).

Os animais foram colocados em uma câmara de acrílico por cerca de 15 minutos para adaptação. Então, realizada injeção intraplantar de 50 µL de Formalina a 1%. Sem intervalo, os animais foram observados por 60 minutos. O tempo de registro foi separado em blocos de 5 minutos e um score de dor foi determinado para cada bloco de acordo com o número de reações nociceptivas que cada animal apresentou durante a observação. Os grupos experimentais foram os seguintes:

- 1) Salina i.gl., no qual foi realizada a constrição do nervo e administração de solução salina (5µl) através da injeção intraganglionar.
- 2) AP-5 i.gl., no qual foi realizada a constrição do nervo e administração de 9 µg/5µl de AP-5 através da injeção intraganglionar.
- 3) AP-5 i.t., no qual foi realizada a constrição do nervo e administração de 18 µg/10µl de AP-5 através da injeção intratecal.

4.4.3 Teste de pressão crescente: von Frey eletrônico

Esse teste foi empregado neste trabalho nos testes de carragenina, hiperalgesia pós-cirúrgica e de constrição do nervo ciático. Foi realizado pelo método de pressão crescente descrito em 2004 por Vivancos et al. Para tanto, utilizamos o aparelho (von Frey eletrônico, Insight®) composto de um transdutor de pressão ligado por um cabo a um detector digital de força, expressa em gramas. Ao transdutor é adaptada uma ponteira Universal Tips10 µL (T-300, Axygen®) que estimula diretamente a pata do animal. O teste consiste em aplicar a ponteira em ângulo reto na região central da pata traseira do animal com uma pressão gradualmente crescente, o que provoca uma resposta de flexão característica. O estímulo é interrompido após a observação da resposta, na qual o animal retira e agita a pata.

A pressão registrada no aparelho no momento do reflexo do animal é considerada como o limiar mecânico nociceptivo. Durante os experimentos os animais são mantidos em caixas acrílicas medindo 12 x 100 x 17 cm de altura, com assoalho formado por uma rede de malhas medindo cerca de 5 mm² constituída de arame não maleável de 1 mm de diâmetro. Essas caixas são mantidas a cerca de 25 cm da superfície de uma bancada, de modo que a estimulação da pata traseira dos animais seja realizada. Antes de iniciar o experimento os animais permanecem

nessas caixas por quinze minutos para a adaptação. A sensibilidade mecânica é obtida pela média de pelo menos 4 medidas de cada pata.

4.4.4 Teste da Carragenina

Esse teste também foi realizado pelo método descrito em 2004 por Vivancos et al. Realizamos injeção intraplantar subcutânea de 50 µl contendo 100 µg de carragenina na pata traseira direita dos animais. Meia hora antes da terceira hora após a administração de carragenina, foi realizada aplicação de AP-5 (9 µg/5µL i.gl. ou 18 µg/10µL i.t.) ou salina (5µL i.gl.), no grupo controle. Em todos os grupos (tratados e salina) o limiar de sensibilidade mecânica (von Frey eletrônico) foi avaliado antes da injeção de carragenina (medida basal) e a cada 1,5 hora até a sexta hora da injeção de carragenina. Os grupos experimentais foram os seguintes:

- 1) Salina i.gl., no qual foi realizada a constrição do nervo e administração de solução salina (5µl) através da injeção intraganglionar.
- 2) AP-5 i.gl., no qual foi realizada a constrição do nervo e administração de 9 µg/5µl de AP-5 através da injeção intraganglionar.
- 3) AP-5 i.t., no qual foi realizada a constrição do nervo e administração de 18 µg/10µl de AP-5 através da injeção intratecal.

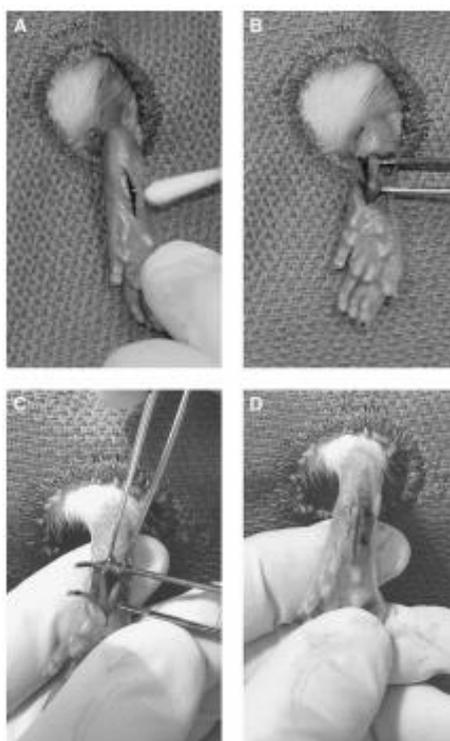
4.4.5 Hiperalgisia pós-cirúrgica

Da mesma forma que o experimento da carragenina, descrito anteriormente, aqui os animais também foram submetidos ao teste para a detecção do limiar de nocicepção mecânica (von Frey eletrônico, descrito anteriormente) basal. O teste foi repetido com uma, três e seis horas após a conclusão do procedimento cirúrgico.

O procedimento cirúrgico foi realizado de acordo com a técnica descrita por Brennan et al. em 2005 (Figura 6). A cirurgia foi realizada em todos os animais após 30 minutos da injeção intraganglionar (9 µg diluído em 5µL de salina) ou intratecal (18 µg diluído em 10 µL de salina) do antagonista do receptor NMDA AP-5. No grupo controle realizou-se a administração intraganglionar de veículo (5µL de salina). Os animais foram anestesiados com isoflurano (Cristália® 1mL/mL). Antissepsia com clorexidina aquosa 1% (Cimed®) foi realizada na pata direita traseira. Uma incisão

longitudinal, com lâmina de bisturi número 11, de cerca de 1 cm foi realizada através da pele e fáscia, iniciando-se a 0,5 cm do calcanhar até os dedos da pata. Solução de gentamicina 40 mg/mL (Hypofarma®) embebida em algodão foi aplicada localmente para que, então, a incisão fosse suturada com ponto simples utilizando fio nylon 5-0 (Shalon®). Os grupos experimentais foram os seguintes:

- 1) Salina i.gl., no qual foi realizada a constrição do nervo e administração de solução salina (5 μ l) através da injeção intraganglionar.
- 2) AP-5 i.gl., no qual foi realizada a constrição do nervo e administração de 9 μ g/5 μ l de AP-5 através da injeção intraganglionar.
- 3) AP-5 i.t., no qual foi realizada a constrição do nervo e administração de 18 μ g/10 μ l de AP-5 através da injeção intratecal.



Fonte: Adaptado de Brennan et. al, 2005.

Figura 6. Diferentes estágios da incisão plantar em ratos. A: lesão longitudinal de 1 cm é feita através da pele e fáscia iniciando a 0,5 cm da porção proximal do calcanhar extendendo até o meio da pata. **B:** o músculo flexor é elevado e também incisionado longitudinalmente. **C:** o músculo é seccionado longitudinalmente. **D:** Depois de realizada hemostasia, a ferida foi suturada com Nylon 5-0.

4.4.6 Constrição Crônica do Nervo Ciático

A constrição crônica do nervo ciático foi realizada segundo uma adaptação do modelo proposto por Bennett e Xie em 1988. Sob anestesia induzida por Tiopental Sódico (40 mg/Kg), o nervo ciático do lado direito foi exposto por meio de uma incisão na pele e corte feito através do tecido conjuntivo entre o músculo superficial do glúteo e o bíceps femoral. Quatro ligaduras (Poligalactina 910, 4-0), foram amarradas ao redor do nervo ciático com intervalo de 1 mm entre cada, para obstruir, mas não interromper o fluxo sanguíneo epineural. A incisão foi suturada e o animal permaneceu em recuperação por um período de 24 horas (AUSTIN et al., 2012) (Figura 7).

Após a mensuração dos valores basais referentes a estímulos mecânicos através do teste von Frey eletrônico foi realizado o procedimento cirúrgico para a constrição do nervo ciático. As administrações da solução salina e do antagonista foram realizadas de acordo com os grupos descritos abaixo, 30 minutos antes da cirurgia e durante os quatro dias posteriores. Os grupos experimentais foram, então, submetidos ao teste de sensibilidade mecânica durante 28 dias, sendo que as avaliações ocorreram diariamente nos quatro primeiros dias e semanalmente nas quatro semanas subsequentes à cirurgia. Nos dias em que foram realizados os tratamentos (1º ao 4º) o teste von Frey foi realizado duas vezes, a primeira antes da administração da droga e a segunda uma hora após. Os grupos experimentais foram os seguintes:

- 1) Sham, no qual foi realizada uma simulação da cirurgia, que consiste na exposição do nervo sem que sejam feitas as ligaduras no mesmo.
- 2) Salina i.gl., no qual foi realizada a constrição do nervo e administração de solução salina (5µl) através da injeção intraganglionar.
- 3) AP-5 i.gl., no qual foi realizada a constrição do nervo e administração de 9 µg/5µl de AP-5 através da injeção intraganglionar.
- 4) AP-5 i.t., no qual foi realizada a constrição do nervo e administração de 18 µg/10µl de AP-5 através da injeção intratecal.



Fonte: Fagundes et. al, 2017

Figura 7 Cirurgia de contração crônica do nervo ciático. Em **A**: apresenta o nervo exposto após incisão na pele e através do tecido conjuntivo. Em **B**: apresenta as ligaduras (em azul) posicionadas ao redor do nervo.

4.5 Análise Estatística

Os dados representam a média \pm EPM de 5-10 animais por grupo experimental. Os dados obtidos nos experimentos foram comparados através da Análise de Variância (ANOVA) de uma via ou duas vias, seguidos dos pós-testes de Dunnet e Bonferroni, quando adequados. As análises estatísticas foram feitas com o auxílio do software GraphPadPrism 4®, e as diferenças consideradas estatisticamente significativas para $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Participação dos receptores NMDA na nociceção induzida por capsaicina

O pré-tratamento com AP-5 tanto por via intraganglionar (i.gl.) como pela via intratecal (i.t.) diminuiu o número de reações nociceptivas observadas após a aplicação de capsaicina intraplantar (i.pl) quando comparados ao grupo controle (salina i.gl.). ($55,2 \pm 4,8$ vs. $31,8 \pm 4,7$ e $30,5 \pm 6,1$; controle vs. AP-5 i.gl. e i.t., respectivamente; $P < 0,05$). Foram usados 10 animais por grupo (Figura 8).

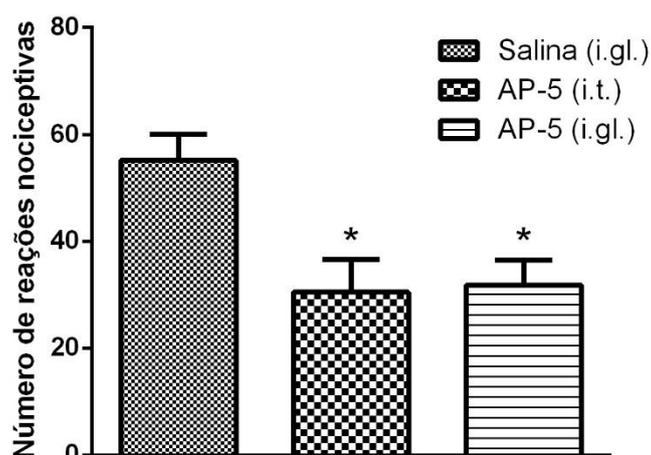


Figura 8. Teste de nociceção induzida por capsaicina. Os animais foram tratados por via intraganglionar com veículo (NaCl 0,9%, 5 μ l) ou AP-5 (9 μ g/5 μ l, i.gl. ou 18 μ g/10 μ l, i.t.) 30 minutos antes da injeção intraplantar de capsaicina (10 μ g/50 μ l). O número de reações nociceptivas foi avaliado durante 5 minutos após a injeção de capsaicina. * $p < 0,05$ vs. Salina. (ANOVA-Dunnet). Os dados representam média \pm EPM de 10 animais por grupo.

5.2 Participação dos receptores NMDA na nociceção induzida por formalina

Este teste apresenta duas fases características: a primeira, neurogênica, quando ocorre ativação direta dos nociceptores pela formalina, e a segunda, inflamatória. Na primeira fase os animais pré-tratados com AP-5 pela via i.gl. apresentaram diminuição significativa do comportamento nociceptivo em relação ao controle (93,8 \pm 7,2 vs. 53,3 \pm 10,1; controle vs. AP-5 i.gl.; $P < 0,05$). Já na segunda fase, o tratamento com o antagonista de NMDAR diminuiu as reações nociceptivas tanto pela via central, quanto pela via periférica (75,4 \pm 4,1 vs. 47,6 \pm 5,4 e 51,1 \pm 8,3; controle vs. AP-5 i.t. e i.gl., respectivamente; $P < 0,05$). Foram usados 6 animais por grupo (Figura 9).

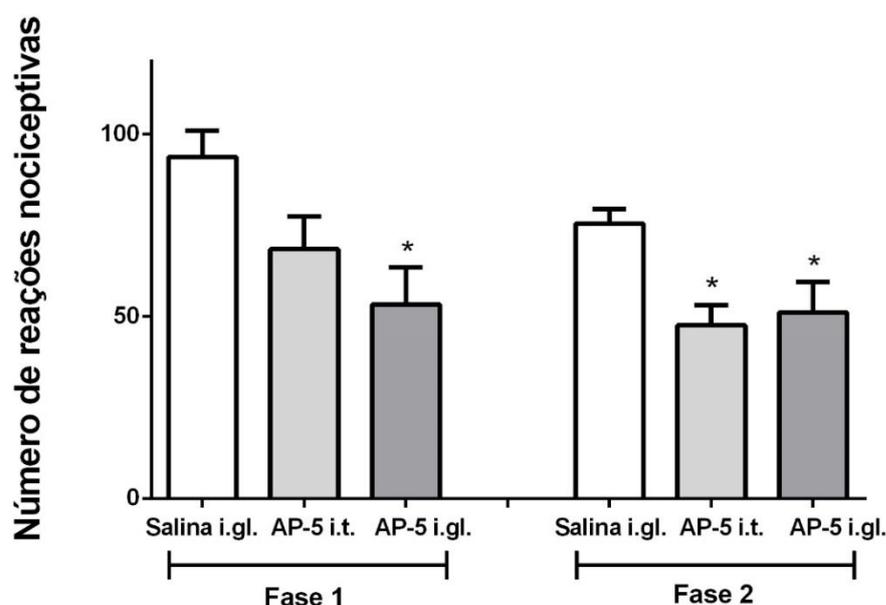


Figura 9. Teste de nociceção induzida por formalina. Os animais foram tratados por via intraganglionar com veículo (NaCl 0,9%, 5 μ l) ou AP-5 (9 μ g/5 μ l, i.gl. ou 18 μ g/10 μ l, i.t.) 30 minutos antes da injeção intraplantar de formalina 1%. O número de reações nociceptivas foi contada nos primeiros 15 minutos (fase 1) e de 20 a 60 minutos (fase 2). * $p < 0,05$ vs. Salina ANOVA-Dunnet. Os dados representam média \pm EPM de 6 animais por grupo.

5.3 Participação dos receptores NMDA na hiperalgesia induzida por carragenina

O pré-tratamento com AP-5 tanto por via intraganglionar (i.gl.) como pela via intratecal (i.t.) aumentou significativamente os limiares de nociceção mecânica observados após três (55 \pm 1,8 vs. 69,5 \pm 2,7 e 73,3 \pm 1,1; controle vs. AP-5 i.gl. e i.t., respectivamente; $P < 0,0001$) e quatro horas e meia (55,2 \pm 0,9 vs. 70,4 \pm 1,2 e 68 \pm 1; controle vs. AP-5 i.gl. e i.t., respectivamente; $P < 0,0001$) da aplicação de carragenina intraplantar (i.pl.) quando comparados ao grupo controle (salina i.gl.). Foram usados 6 animais por grupo (Figura 10).

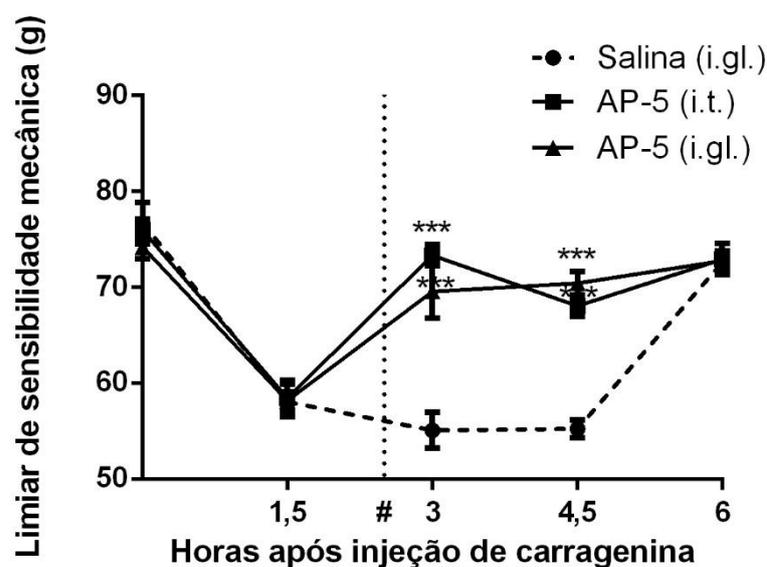


Figura 10. Teste de hiperalgesia induzida por carragenina. Avaliação do limiar mecânico em von Frey eletrônico antes; 1,5; 3; 4,5 e 6 horas após aplicação intraplantar de carragenina (100 µg/50µl). Os animais foram tratados por via intraganglionar com veículo (NaCl 0,9%, 5 µl) ou AP-5 (9 µg/5µl, i.gl. ou 18 µg/10µl, i.t.) 30 minutos antes da terceira hora após a injeção intraplantar de carragenina. *** $p < 0,0001$ vs. Salina. (ANOVA-duas vias). Os dados representam média±EPM de 6 animais por grupo. # indica a aplicação intraplantar de carragenina.

5.4 Participação dos receptores NMDA na hiperalgesia pós-cirúrgica

No teste para avaliar hiperalgesia pós-cirúrgica o antagonista NMDAR (por via intratecal ou intraganglionar) ou veículo (intraganglionar) foi injetado 30 minutos antes da cirurgia de incisão na pata de ratos. Não houve aumento do limiar mecânico sensitivo dos grupos tratados com AP-5 (i.gl. e i.t.) em relação ao grupo salina (i.gl.) em nenhum dos momentos avaliados, isto é, a cirurgia realizada não produziu uma sensibilização suficiente para que o efeito analgésico pudesse ser observado. Foram usados de 9-10 animais por grupo (Figura 11).

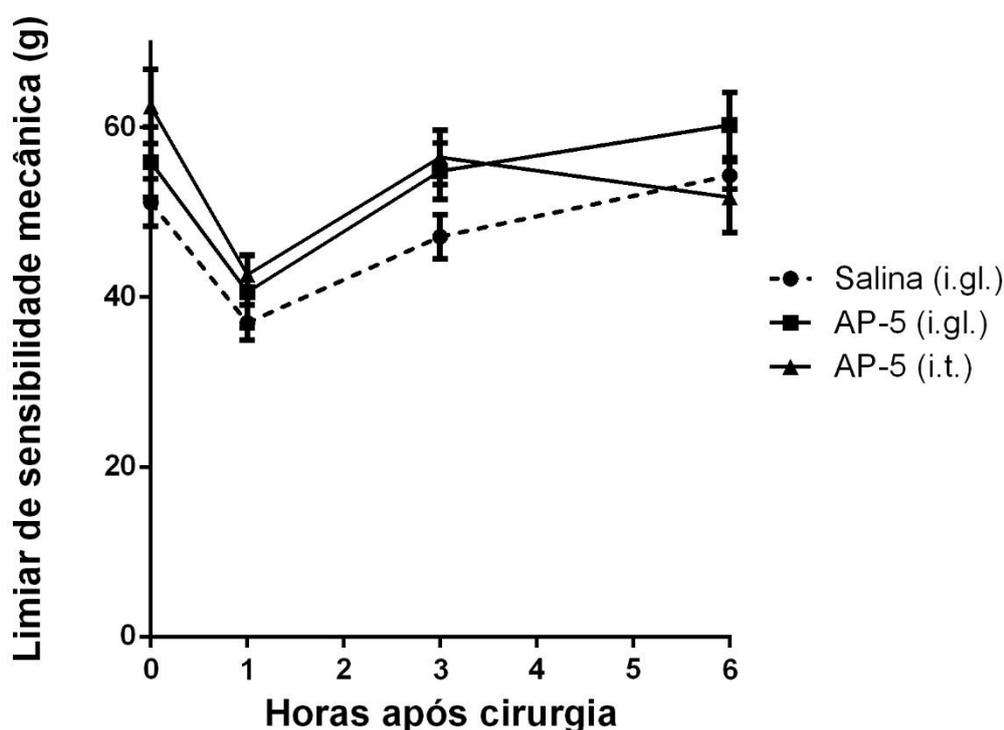


Figura 11. Teste de hiperalgesia pós-cirúrgica. Avaliação do limiar mecânico em von Frey eletrônico antes; 1; 3 e 6 horas após lesão cirúrgica plantar. Os animais foram pré-tratados por via intraganglionar com veículo (NaCl 0,9%, 5 μ l) ou AP-5 (9 μ g/5 μ l, i.gl. ou 18 μ g/10 μ l, i.t.) 30 minutos antes do procedimento cirúrgico. (ANOVA uma via). Os dados representam média \pm EPM de 9-10 animais por grupo.

5.5 Participação dos receptores NMDA na hiperalgesia induzida por constrição do nervo ciático

Para avaliar o efeito do antagonista NMDA sobre a hiperalgesia induzida por neuropatia, os animais foram tratados com o antagonista (via intratecal ou via intraganglionar) ou com salina imediatamente antes da cirurgia para constrição do nervo ciático e depois diariamente durante os próximos 4 dias após a cirurgia. A cronificação da hiperalgesia foi avaliada semanalmente até o 28º dia após a cirurgia. Os grupos tratados com AP-5 (i.t. ou i.gl.) apresentaram um aumento no limiar de sensibilidade mecânica (teste de von Frey eletrônico), quando comparados ao grupo salina (i.gl.), no primeiro e no terceiro dia após cirurgia. Já no segundo e no quarto dia apenas o grupo AP-5 (i.t.) apresentou redução na sensibilidade. A administração dos antagonistas por via intratecal resultou em efeito analgésico superior àquele

induzido pela administração de AP-5 por via intraganglionar. Foram usados de 5-7 animais por grupo (Tabela 1; Figura 12)

Tabela 1. Limiar mecânico (em gramas) da pata obtidos 1 hora após administração dos tratamentos nos primeiros 4 dias após constrição crônica do nervo ciático

	Dias após a cirurgia			
	1	2	3	4
Salina i.gl. [7]	10,937 ± 0,7	15,095 ± 0,8	13,861 ± 1,4	20,966 ± 1,5
AP-5 i.gl. [6]	24,905 ± 2,8 ^{***}	22,022 ± 3,9	26,705 ± 1,5 ^{***}	26,594 ± 1,7
AP-5 i.t. [5]	37,480 ± 2,4 ^{***}	31,005 ± 4,4 ^{***}	32,660 ± 1,7 ^{***}	38,060 ± 4,3 ^{***}

Valores representam média ± EPM, (***) indica $p < 0,001$ quando comparado por meio de ANOVA de duas vias a medida referente ao grupo Salina i.gl. [n].

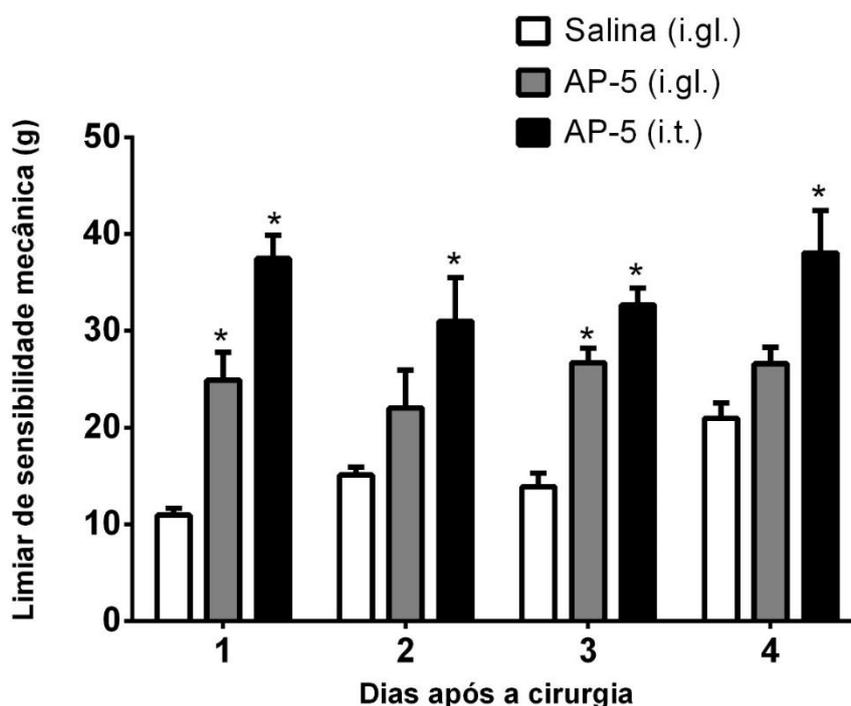


Figura 12. Avaliação do efeito agudo de antagonistas de receptores NMDA sobre hiperalgesia mecânica induzida por constrição de nervo ciático. Avaliação do limiar mecânico em von Frey eletrônico nos quatro dias após cirurgia uma hora após administração intraganglionar de veículo (NaCl 0,9%, 5 µl) ou AP-5 (9 µg/5µl, i.gl. ou 18 µg/10µl, i.t.). * $p < 0,01$ vs. Salina. (ANOVA duas vias - Bonferroni). Os dados representam média±EPM de 5-7 animais por grupo.

5.6 Avaliação do efeito de antagonistas do receptor NMDA sobre a cronificação da hiperalgesia induzida por contração de nervo ciático.

Os animais dos grupos tratados que passaram pela cirurgia de contração crônica do nervo ciático manifestaram um reduzido limiar mecânico a partir do primeiro dia após a cirurgia. A partir da primeira semana (7º dia) os grupos tratados apresentaram um aumento crescente do limiar mecânico, indicando efeito analgésico para os grupos tratados do AP-5. No 21º dia ambos os grupos tratados com AP5 (i.t. e i.gl.) apresentaram aumento significativo no limiar de sensibilidade mecânica e o grupo AP-5 i.t. manteve este efeito também no 28º (Tabela 2; Figura 13)

Tabela 2 - Limiar mecânico (em gramas) da pata ipsilateral e contralateral dos grupos controle e tratados.

	Dias após a cirurgia			
	7	14	21	28
Salina i.gl. [7]	23,3 ± 1,5	28,7 ± 2,9	34,8 ± 3,2	40,9 ± 3,6
Sham [6]	56,4 ± 4,1	53,9 ± 2,7	54,4 ± 1,3	58,6 ± 4,1
AP5 i.gl. [6]	29,4 ± 5,6	39,4 ± 5,1	52,3 ± 5,8**	54,2 ± 3,9
AP5 i.t. [5]	33,3 ± 3,1	39,6 ± 4,1	59,3 ± 5,4***	59,7 ± 5,7**

Valores representam média ± EPM, (**) indica $p < 0,01$ e (***) indica $p < 0,001$ quando comparado por meio de ANOVA de duas vias a medida referente ao grupo Salina i.gl. [n].

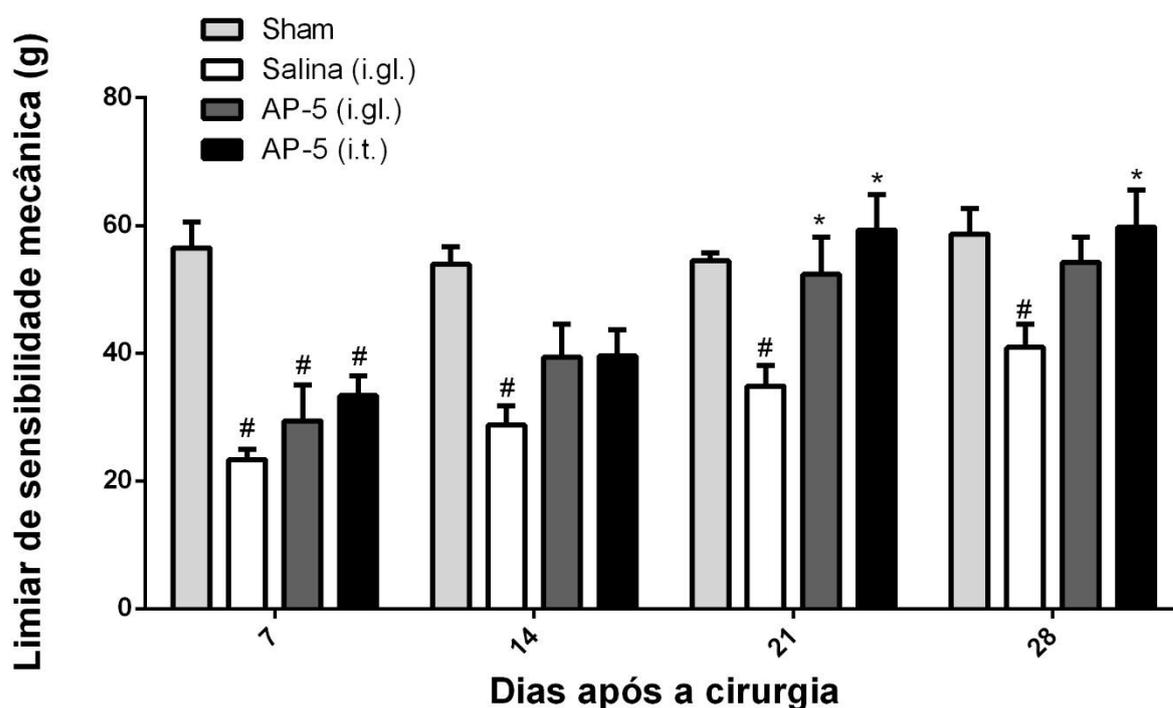


Figura 13. Avaliação do efeito de antagonistas de receptores NMDA em longo prazo sobre a hiperalgesia induzida por constrição de nervo ciático. Avaliação do limiar mecânico através do teste de von Frey eletrônico em diferentes dias após a cirurgia de constrição crônica do nervo ciático. * $p < 0,05$ vs. Salina. (ANOVA duas vias - Bonferroni). # $p < 0,01$ vs. Sham. (ANOVA duas vias - Bonferroni) Os dados representam média \pm EPM de 5-7 animais por grupo.

6. DISCUSSÃO

O glutamato é o principal neurotransmissor do sinal doloroso entre neurônios de primeira e de segunda ordem na medula espinal. Atualmente, considera-se que receptores NMDA medulares estão envolvidos em processos de sensibilização central, ocorrendo especialmente em situações de dor crônica e neuropática. Os resultados mostrados neste estudo indicam que a administração intratecal e intraganglionar de antagonistas dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) produzem analgesia de maneira semelhante em diferentes modelos experimentais de dor. Estes dados indicam que a analgesia obtida pela administração de antagonistas de NMDAR na clínica pode ocorrer, ao menos em parte, através do bloqueio de receptores periféricos. Deste modo, o estudo abre novas perspectivas para o desenvolvimento de fármacos com efeitos analgésicos e menos efeitos

colaterais, que são característicos da administração central de antagonistas NMDAR, como psicose e agitação motora.

Em estudo anterior (FERRARI et al., 2014) foi evidenciada a liberação de glutamato no gânglio da raiz dorsal e a ativação de receptores NMDA em células satélites gliais. Neste trabalho foi determinada a participação destes receptores periféricos na hiperalgesia inflamatória, induzida por injeção de prostaglandina E2 na pata de ratos. Resultados mais recentes de nosso laboratório, entretanto, sugeriram que a participação dos receptores NMDA periféricos também na dor aguda. Considerando estes resultados e a importância da utilização de antagonistas de NMDAR na clínica, decidimos por avaliar a participação dos receptores periféricos, presentes no gânglio da raiz dorsal, na analgesia induzida por um antagonista de NMDAR, o AP-5, em diferentes modelos de dor. Para tanto, foram comparados os efeitos obtidos pela administração central do antagonista, pela via intratecal, com os efeitos obtidos pela administração do antagonista por via intraganglionar. Importante salientar que substâncias administradas por via intratecal tem acesso ao gânglio da raiz dorsal (JOUKAL et al., 2016). No estudo de Ferrari e col (2014) verificamos que a administração intratecal de NMDA pode ser bloqueada através da administração intraganglionar do antagonista AP-5. Isto demonstra, não só a importância dos receptores presentes no gânglio da raiz dorsal, mas também a comunicação entre o espaço subaracnóide e o gânglio. Além disso, foi mostrado que a injeção do agonista AMPA causa um efeito pró-nociceptivo que não é bloqueado pela administração de antagonista (DNQX) no gânglio da raiz dorsal. Esta é uma evidência de que substâncias administradas por injeção intraganglionar tem ação restrita ao gânglio injetado. A seletividade deste tipo de injeção foi demonstrada também em outros estudos (ARALDI et al., 2013; SOUZA et al., 2013). Utilizando a técnica de injeção intraganglionar no gânglio L5 direito podemos avaliar efeitos sobre estimulação da pata traseira direita, visto que este gânglio possui uma parte importante dos neurônios que inervam este membro (FERRARI et al., 2007). Deste modo, para que fosse possível comparar o efeito central (intratecal) do antagonista de NMDAR com o efeito periférico (intraganglionar), foram escolhidos testes de dor e hiperalgesia que envolvam avaliação da pata traseira de ratos.

No primeiro teste comparamos o efeito da administração intraganglionar e intratecal do antagonista de NMDAR no teste da capsaicina. Neste experimento,

administra-se capsaicina na pata e avalia-se a resposta comportamental nociceptiva, durante 5 minutos. Os resultados aqui apresentados mostram que a aplicação intraganglionar e intratecal de AP-5 inibiram a nocicepção estimulada por capsaicina de forma semelhante. A capsaicina ativa os neurônios sensoriais aferentes primários através de ação direta sobre o receptor TRPV1 (canais em receptores de potencial transitório vanilóide, tipo 1) altamente expresso por um subconjunto de nociceptores associados a fibras C (HOLZER, 1991). Este receptor é um canal iônico que promove despolarização e excitação direta dos neurônios, esse resultado sugere, que a ativação de fibras C leva à liberação de glutamato no GRD seguido da ativação de receptores NMDA, possivelmente em células satélites no GRD (FERRARI et al., 2014). Considerando que não houve diferença entre os efeitos das administrações intratecal e intraganglionar, e lembrando que as substâncias administradas por via intratecal chegam ao GRD, podemos inferir que o efeito analgésico da administração de antagonista NMDAR ocorra, ao menos em parte, no GRD. Ainda, este resultado mostra que os receptores NMDA periféricos participam também do processamento da dor aguda e não apenas em processos envolvendo sensibilização, como assumido em trabalho anterior (FERRARI et al, 2014).

Considerando a possível aplicação clínica destes achados, decidimos por avaliar a participação dos NMDAR periféricos em outros modelos de dor ou hiperalgesia. Um teste nociceptivo bastante utilizado em estudos de analgesia é o teste da formalina (McROBERTS et al., 2011; SHIELDS et al., 2010). Este teste consiste na aplicação intraplantar de formalina, que, neste caso foi utilizada na concentração de 1% para então podermos avaliar a resposta comportamental nociceptiva, durante uma hora, dividida em blocos de 5 minutos. O mecanismo exato pela qual o teste da formalina acontece ainda precisa ser esclarecido. De fato, estudos eletrofisiológicos demonstraram que os nociceptores associados a fibras A δ , C e até mesmo as A β (não nociceptivas) parecem ser ativadas durante as duas fases do teste. A primeira fase, também denominada de neurogênica, momento em que ocorre ativação direta de nociceptores pelo agente irritante e a segunda fase, conhecida como fase inflamatória, caracterizada pela marcante presença de mediadores inflamatórios (PARADA et. al, 2001). Na primeira fase do presente estudo, podemos observar uma diminuição do número de reações nociceptivas dos animais tratados com AP-5 i.gl. em relação ao grupo controle, enquanto houve uma

tendência a diminuição também no grupo tratado pela via intratecal. Na segunda fase encontramos diminuição tanto pela via central como periférica. Considerando que alguns autores sugerem que a segunda fase do teste da formalina depende de sensibilização central (McROBERTS et al., 2011), seria de se esperar um efeito analgésico de maior intensidade quando o antagonista NMDAR fosse administrado por via intratecal, o que não ocorreu visto que os efeitos foram semelhantes nas duas vias testadas. Um estudo interessante publicado por Christoph e col., (2005) mostrou que a administração do antagonista de NMDAR, o 5,7-DCK, um antagonista que tem muito pouco acesso ao sistema nervoso central apresentou efeito analgésico semelhante a um antagonista de ação central. Neste estudo, os autores sugerem que deve haver um alvo periférico para o antagonista de NMDAR, que ainda não estaria identificado. Os resultados aqui apresentados indicam que o gânglio da raiz dorsal deve ser o alvo para efeito do antagonista periférico.

Também foi realizado um teste de hiperalgesia em modelo pós-cirúrgico. O pré-tratamento com o antagonista NMDAR por via intratecal ou intraganglionar não afetou a sensibilidade nociceptiva em nenhum dos tempos avaliados. Neste experimento verificamos que ocorreu um aumento na sensibilidade mecânica apenas na primeira hora após a cirurgia. Nesse modelo a lesão gera a ativação e sensibilização de nociceptores centrais e periféricos (BRENNAN et al., 2005). Em concordância com nossos resultados, Zahn et. al em 1998, também não detectaram inibição da hiperalgesia mecânica no mesmo modelo com a administração de AP-5 por via intratecal, sugerindo que talvez o estímulo não fosse intenso o suficiente para sustentar a ativação de receptores NMDA centrais e, ainda, que a plasticidade e sensibilização central nesse modelo seja menos intensos do que nos modelos de irritação química, lesão neuronal e inflamação.

Outro modelo experimental clássico no estudo da dor é o teste da carragenina (CUNHA et al., 2004; POOLE et al., 1999), que é um modelo para avaliação da hiperalgesia inflamatória. Neste caso, é avaliada a variação no limiar de sensibilidade mecânica na pata dos animais. A carragenina é um polissacarídeo extraído de algas, bastante utilizado na indústria alimentícia e que, quando injetado no tecido intraplantar dos animais induz uma resposta inflamatória aguda típica, com migração neutrofílica e liberação de mediadores inflamatórios, tais como TNF- α , IL-1 β e PGE2 (CUNHA et. al., 2008). A injeção do antagonista de NMDAR pelas duas vias testadas

foi igualmente eficiente em promover analgesia no modelo de hiperalgisia inflamatória. A dor aguda inflamatória é reconhecidamente dependente da ação de prostaglandinas que atuam por sensibilizar neurônios aferentes primários associados a fibras C. O papel de receptores NMDA do GRD foi anteriormente descrito na sensibilização induzida por prostaglandina E2 na pata de ratos (FERRARI et al., 2014). Os resultados apresentados neste estudo mostram que antagonista do NMDAR apresenta efeito analgésico em modelo de inflamação aguda e ainda sugere que este efeito se deva à inibição de receptores periféricos.

O envolvimento de receptores NMDA na dor tem sido implicado principalmente em processos que envolvem sensibilização central. Estudos eletrofisiológicos demonstram que a estimulação repetida de fibras aferentes primárias leva a um aumento da resposta em neurônios de segunda ordem (HERRERO; LAIRD; LÓPEZ-GARCÍA, 2000). Este processo foi denominado de “Wind up” e depende de uma plasticidade sináptica que ocorre de forma similar à potenciação de longa duração (LTP). O LTP pode aumentar funções sinápticas em certas regiões do cérebro, e também no corno dorsal da medula, onde pode ser induzido por lesão periférica. Uma característica do LTP é a participação dos receptores NMDA (ZHUO, 2009). Com o intuito de diferenciar a participação de receptores NMDA centrais e periféricos em um modelo que possivelmente envolva sensibilização central, decidimos por testar os efeitos da administração intratecal e intraganglionar do AP-5 em modelo de dor neuropática induzida por constrição do nervo ciático (BENNETT; XIE, 1988). O experimento consiste em uma lesão periférica causada por constrição crônica unilateral do nervo ciático. Os grupos experimentais foram submetidos ao teste de sensibilidade mecânica (von Frey eletrônico) durante 28 dias, sendo que as avaliações ocorreram diariamente nos quatro primeiros dias e semanalmente nas quatro semanas subsequentes à cirurgia. O tratamento com o antagonista AP-5 por via intraganglionar ou intratecal foi realizado antes da cirurgia e depois, diariamente nos 4 dias seguintes. O efeito analgésico agudo induzido pelo antagonista foi avaliado nos quatro primeiros dias após a cirurgia. Neste caso, percebe-se que o antagonista de NMDAR promoveu efeito analgésico mais intenso quando administrado por via intratecal. Acreditamos que isso se deva ao fato de que a injeção central alcance um número maior de neurônios e gânglios, já que o AP-5 se dispersa pela medula através do líquido

cefalorraquidiano, enquanto a via intraganglionar tem efeito restrito a um gânglio (L5), o qual se relaciona a maior parte dos neurônios que inervam a região central da pata. Por outro lado, quando o efeito dos antagonistas sobre a dor crônica neuropática foi avaliado ao longo das semanas, podemos observar que a administração periférica do antagonista apresentou efeito semelhante ao causado pela administração central. Estes resultados são corroborados por estudo de Christoph e col (2005) que verificaram que administração do antagonista de ação periférica, 5,7-DCK, apresenta efeito equivalente a um antagonista de ação central também em modelo de neuropatia por constrição do nervo. Neste estudo é mostrado que o antagonista de ação central é capaz de bloquear, na medula espinhal, o processo de “Wind-up” causado por estimulação repetida do nervo periférico enquanto que a administração do antagonista periférico não apresentou este efeito central. Ainda, neste estudo foi avaliado o comportamento motor dos animais tratados com o antagonista de ação periférica e estes não apresentaram alteração alguma, diferente dos animais que foram tratados com o antagonista de ação central. Este estudo (CHRISTOPH et al., 2005) foi publicado antes daquele em que foi demonstrado o papel dos receptores NMDA no gânglio da raiz dorsal (FERRARI et al., 2014). Os resultados apresentados neste estudo indicam que os efeitos observados pelo primeiro estudo devem estar relacionados a efeitos nos gânglios sensitivos.

A forma exata pela qual o glutamato atua no gânglio da raiz dorsal ainda carece de investigação. Os resultados obtidos pelo grupo até então, juntamente com aqueles obtidos por outras publicações sobre o tema apontam que durante um evento nociceptivo o glutamato seja liberado no GRD a partir do neurosoma de neurônios nociceptivos. Já é sabido que transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT), os quais são responsáveis pela absorção do aminoácido excitatório em vesículas sinápticas, já foram identificados no soma de neurônios de pequeno diâmetro no gânglio da raiz dorsal (KUNG et al., 2013). De fato, em trabalhos realizados por Hwang et al. (2004), foi relatado que após a lesão nervosa há um aumento da liberação de glutamato no GRD a qual é acompanhada pelo aumento do transportador vesicular VGLUT2 em neurônios ganglionares de pequeno diâmetro.

Além do mais, esses eventos parecem estar estreitamente relacionados a atuação dos antagonistas de NMDAR em células satélites e não nos neurônios sensoriais propriamente ditos. Isso porque os receptores NMDA neuronais encontram-se bloqueados por um “plug” de Mg^{2+} (LAUBE; KUHSE; BETZ, 1998), que só é liberado quando ocorre uma despolarização, em geral por ativação de receptores do tipo ácido aminometilfosfônico (AMPA). Todavia, estudos anteriores demonstraram que a injeção do antagonista do receptor AMPA DNQX no gânglio da raiz dorsal não altera a hipernocicepção induzida por injeção intraplantar de prostaglandina E2 (PGE2), embora a administração intratecal deste antagonista tenha inibido esta resposta (FERRARI et al., 2014). Como sugerido nesse mesmo estudo, os receptores ganglionares AMPA, em contraste com aqueles que se expressam pós-sinapticamente no corno da raiz dorsal, não parecem estar envolvidos na sensibilização do neurônio sensitivo primário (FERRARI et al., 2014). Além disso, experimentos de imagem de transientes de Ca^{2+} intracelular em cultura primária de GRD revelaram que os receptores NMDA, canal permeável ao Ca^{2+} , são ativados apenas em células satélites, sendo que nessas células esses receptores não são sensíveis ao bloqueio por Mg^{2+} (FERRARI et al., 2014). Portanto, é provável que os receptores NDMA responsáveis pelo efeito periférico de antagonistas esteja localizado em células satélites gliais. Estas células gliais devem ser ativadas por ação do glutamato liberado por neurônios nociceptivos. Hanani et al. em 2002, 2005 e Ledda et al. em 2009 demonstraram em modelos de dor neuropática (axionotomia) e inflamatória (neurite do nervo ciático) que essas células, presentes nos gânglios da raiz dorsal, podem receber sinais de outras células e responderem a mudanças ambientais, sugerindo a participação das mesmas no processamento e transmissão de sinais nos gânglios sensoriais. O mecanismo proposto pelos autores foi de que a lesão periférica aumentaria a comunicação celular através de junções comunicantes, provado através de microscopia eletrônica. Diante dos nossos resultados, sugerimos que o efeito analgésico do AP-5 possa estar relacionado a diminuição da ativação dessas células.

Diante do exposto, portanto, podemos dizer que os nossos resultados ampliam o entendimento sobre a ação desses receptores não só em modelos de dor inflamatória, mas também em modelo de dor neuropática. De fato, os resultados sugerem um papel inédito dos receptores NMDA periféricos no mecanismo da dor.

Ainda, visto que os efeitos adversos do uso de antagonistas de NMDAR na analgesia são possivelmente decorrentes do efeito dessas drogas sobre o sistema nervoso central (HAMA et al., 2003), a determinação do potencial efeito analgésico sobre os receptores periféricos, no gânglio da raiz dorsal, fornecem evidências que justificam mais estudos que utilizem fármacos que não atravessem a barreira hematoencefálica/hematoneural. Assim, uma vez que não há tal barreira nos gânglios periféricos e que há muitos poucos tecidos que liberam glutamato ou, especialmente, que possuam receptores NMDA fora do sistema nervoso central (DEVOR, 1999), tais fármacos possivelmente apresentem efeito terapêutico sem apresentarem os efeitos adversos (alucinações, sonolência, inquietação, dissociação, sonhos vívidos e déficits de memória e motor) desses antagonistas utilizados no presente.

7. CONCLUSÕES

- A administração intraganglionar do antagonista de receptor NMDA, AP-5, produz analgesia de maneira equivalente àquela induzida por aplicação intratecal em modelos experimentais de dor aguda, inflamatória e neuropática.
- O efeito analgésico induzido por administração periférica de antagonistas de NMDAR pode, ao menos em parte, ocorrer por bloqueio de receptores periféricos presentes no gânglio da raiz dorsal.
- Antagonistas NMDA de ação preferencialmente periférica podem ser úteis no tratamento de dores de origem neuropática, possivelmente apresentando menos efeitos adversos.

REFERÊNCIAS

ALDSKOGIUS, H.; ELFVIN L.G.; FORSMAN, C.A. Primary sensory afferents in the inferior mesenteric ganglion and related nerves of the guinea pig. An experimental study with anterogradely transported wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase conjugate. **J. Auton. Nerv. Syst**, v. 15, p. 179–190. 1986.

ARALDI, D. et al. Peripheral inflammatory hyperalgesia depends on the COX increase in the dorsal root ganglion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 9, p. 3603–8, 2013.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1220668110>

ARVIDSON, B. Distribution of intravenously injected protein tracers in peripheral ganglia of adult mice. **Exp. Neurol**, n. 63, p. 388–410. 1979.
[https://doi.org/10.1016/0014-4886\(79\)90134-1](https://doi.org/10.1016/0014-4886(79)90134-1)

AUSTIN, P.J., WU, A., MOALEM-TAYLOR, G. Chronic Constriction of the Sciatic Nerve and Pain Hypersensitivity Testing in Rats. **J. Vis. Exp**, v. 61.2012.
<https://doi.org/10.3791/3393>

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–284. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>

BENNETT G.J., XIE, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33; n. 1; p. 87–107. 1988.
[https://doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90209-6](https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90209-6)

BERGER, U. V., HEDIGER, M. A. Distribution of the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in rat circumventricular organs, meninges, and dorsal root ganglia. **J Comp Neurol**, v. 421; p. 385–399. 2000. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(20000605\)421:3<385::AID-CNE7>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(20000605)421:3<385::AID-CNE7>3.0.CO;2-S)

BRENNAN, T.J. et al. Mechanisms of Incisional Pain. **Anesthesiology Clin N Am**, n. 23, p. 1-20. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.atc.2004.11.009>

BRUMOVSKY, P.; WATANABE, M.; HÖKFELT, T. Expression of the vesicular glutamate transporters-1 and -2 in adult mouse dorsal root ganglia and spinal cord and their regulation by nerve injury. **Neuroscience**, v. 147, n. 2, p. 469–490. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.02.068>

CHIZH, B. A. Low dose ketamine: a therapeutic and research tool to explore N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated plasticity in pain pathways. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 21; p. 259–271. 2007. <https://doi.org/10.1177/0269881105062484>

CHRISTOPH, T. et al. Antiallodynic effects of NMDA glycine B antagonists in neuropathic pain: Possible peripheral mechanisms. **Brain Research**, v.1048 p. 218–227. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.04.081>

CODERRE, T.J, VACCARINO, A.L.; MELZACK, R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. **Brain Research**, v.535; p.155-158. 1990. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91835-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91835-5)

CODERRE, T.J, EMPEL, I.V. The utility of excitatory amino acid (EAA) antagonists as analgesic agents. I. Comparison of the antinociceptive activity of various classes

of EAA antagonists in mechanical, thermal and chemical nociceptive tests. **Pain**, v. 59; p. 345-352. 1994. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(94\)90020-5](https://doi.org/10.1016/0304-3959(94)90020-5)

CUNHA, T.M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **PNAS**, v. 102; p. 1755-1760. 2004. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409225102>

CUNHA, T.M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83; 824-832. 2008. <https://doi.org/10.1189/jlb.0907654>

DAVIES, S.N., LODGE, D. Evidence for the involvement of N-methylaspartate receptors in 'wind-up' of class 2 neurones in the dorsal horn of the rat. **Brain Res**, v. 424, p. 402-406. 1987. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)91487-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)91487-9)

DEVOR, M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. **Pain**, v. 82; p. 27-35. 1999. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(99\)00135-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(99)00135-9)

DICKENSON, A.H., SULLIVAN, A.F. Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following C fibre stimulation. **Neuropharmacol**, n. 26, p. 1235-1238. 1987. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(87\)90275-9](https://doi.org/10.1016/0028-3908(87)90275-9)

DICKENSON, A.H. A cure for wind-up: NMDA receptor antagonists as potential analgesics. **Trends in Pharmacol Sci**, v. 11, p. 307-309. 1990. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(90\)90228-Z](https://doi.org/10.1016/0165-6147(90)90228-Z)

FAGUNDES, R.G.M. et. al. **Estudo da participação de receptores NMDA dos Gânglios da Raiz Dorsal em modelo de neuropatia por Constrição Crônica em ratos**. Trabalho de Conclusão de Curso (Biotecnologia) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia. 2017.

FERRARI, L. F. et al. A novel technique to perform direct intraganglionar injections in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 159; p. 236–243. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.07.025>

FERRARI, L. F. et al. Inflammatory sensitization of nociceptors depends on activation of NMDA receptors in DRG satellite cells. **Proc Natl Acad Sci U.S.A.** v. 111, n. 51, 2014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420601111>

FERREIRA, S. H.; MONCADA, S.; VANE, J. R. Prostaglandins and the mechanism of analgesia produced by aspirin-like drugs. **British Journal of Pharmacology**, v. 49, n. 1, p. 86–97. 1973. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1973.tb08270.x>

HANANI, M.; et al. Glial cell plasticity in sensory ganglia induced by nerve damage. **Neuroscience**, v. 114; p.279–283. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00279-8](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00279-8)

HANANI, M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. **Brain Res Brain Res Ver**, v. 48; p. 457–476. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.09.001>

HERRERO, J.F.; LAIRD, J.M.; LÓPEZ-GARCÍA, J.A. Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? **Prog. Neurobiol**, v. 61; p. 169-203. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00051-9](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00051-9)

HOLZER, P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacol. Rev**, v. 43, p. 143-201. 1991.

HWANG, I.K. et al. Chronological alterations of P2X3 receptor expression in the trigeminal ganglion after ischaemic insult in the Mongolian gerbil. **Anat Histol Embryol**, v.33; p.220–224. 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2004.00540.x>

JOUKAL, M.; KLUSÁKOVÁ, I.; DUBOVY, P. Direct communication of the spinal subarachnoid space with the rat dorsal root ganglia. **Annals of Anatomy**, v. 205; p. 9-15. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2016.01.004>

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203–210. 2001. <https://doi.org/10.1038/35093019>

KUNG, L.H. et al. Evidence for glutamate as a neuroglial transmitter within sensory ganglia. **PLoS ONE**, 8(7):e68312. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068312>

LAUBE, B.; KUHSE, J.; BETZ, H. Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 18, p. 2954–61.1998. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-08-02954.1998>

LEDDA, M. et al. Augmentation in GAP Junction-mediated cell coupling in Dorsal Root Ganglia Following Sciatic Nerve Neuritis in Mouse. **Neuroscience**, v. 164; p. 1538–1545. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.09.038>

McBAIN, C.J.; MAYER, M.L. N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. **Physiol Rev**, v. 74; p. 723-760. 1994. <https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.3.723>

LEMES, J.B.P. et al. Participation of satellite glial cells of the dorsal root ganglia in acute nociception. **Neuroscience Letters**, n. 676, p. 8-12. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.04.003>

LENT, Roberto. **Neurociência da Mente e do Comportamento**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 356 p. <https://doi.org/10.1590/s0004-282x2008000500042>

LIPTON, S. A. Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: Memantine and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 2, p. 160–170, 2006. <https://doi.org/10.1038/nrd1958>

MATTHEWS, M.R.; CUELLO, A.C. Substance P-immunoreactive peripheral branches of sensory neurons innervate guinea pig sympathetic neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** n. 79, p. 1668–1672. 1982. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.5.1668>

McROBERTS, J.A. et al. Selective knockdown of NMDA receptors in primary afferent neurons decreases pain during phase 2 of the formalin test. **Neuroscience**, v. 172; p. 474-482. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.10.045>

MESTRE, C. et al. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 32; p. 197–200. 1994. [https://doi.org/10.1016/1056-8719\(94\)90087-6](https://doi.org/10.1016/1056-8719(94)90087-6)

NETO, A.N. **Dor: Princípios e Prática**. Porto Alegre: Artmed, 2009. 1438 p.

NICKEL, F. T. et al. Mechanisms of neuropathic pain. *European Neuropsychopharmacology*, v. 22, n. 2, p. 81–91. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2011.05.005>

NOWAK, L. et al. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, v. 307, p. 462–465. 1984. <https://doi.org/10.1038/307462a0>

PANNESE, E. **Advances in anatomy, embryology, and cell biology**. Berlin: Springer-Verlag, 1981. https://doi.org/10.1007/978-3-540-32948-0_1

PARADA, C.A., TAMBELI, C.H., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience*, v. 102; p. 937-944. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00523-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00523-6)

PETRENKO, A. B. et al. The Role of N-Methyl-d-Aspartate (NMDA) Receptors in Pain: A Review. *Anesthesia & Analgesia*, p. 1108–1116. 2003. <https://doi.org/10.1213/01.ANE.0000081061.12235.55>

SASAKI, Y. F. et al. Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. *Journal of Neurophysiology*, v. 87, n. 4, p. 2052–2063. 2002. <https://doi.org/10.1152/jn.00531.2001>

SAKURADA, T. et al. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. *Neuropharmacology*, v. 31, p. 1279-1285. 1992. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(92\)90057-V](https://doi.org/10.1016/0028-3908(92)90057-V)

SHINDER, V.; DEVOR, M. Structural basis of neuron-to-neuron cross-excitation in dorsal root ganglia. **J Neurocytol**, v. 23, n. 9, p. 515–531. 1994. <https://doi.org/10.1007/BF01262054>

SCHORGE, S.; COLQUHOUN, D. Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 23, n. 4, p. 1151–8. 2003. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-04-01151.2003>

SHIELDS, S.D. et al. Pain behavior in the formalin test persists after ablation of the great majority of C-fiber nociceptors. **Pain**, v. 151; p. 422-429. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.08.001>

SNIDER, W.D.; MCMAHON, S.B. Tackling pain at the source: New ideas about nociceptors. **Neuron**, v. 20, n. 4, p. 629–632. 1998. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81003-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81003-X)

VIVANCOS, G.G.; PARADA, C.A.; FERREIRA S.H. Opposite nociceptive effects of the arginine/NO/cGMP pathway stimulation in dermal and subcutaneous tissues. **Br J Pharmacol**, v. 138; p. 1351-1357. 2003. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705181>

VIVANCOS, G.G. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 37; p. 391-399. 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000300017>

PARADA, C.A.; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced

nociception. **Neuroscience**, v. 102; p.937-944. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00523-6](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00523-6)

POOLE, S. et al. Bradykinin B1 and B2 receptors, tumour necrosis factor α and inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 126; p. 649-656. 1999. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702347>

REICHENBACH, A. et al. Structural association of glia with the various specialized compartments of neurons, in: G.I. Hatton, V. Parpura (Eds.), **Neuron Glia Interactions**, Kluwer Publishers, Boston, 2004, pp. 53– 97. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-7937-5_3

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nat Neurosci**, v. 5 Suppl, n. november, p. 1062–1067. 2002. <https://doi.org/10.1038/nn942>

SOUZA, G.R. et al. Fractalkine mediates inflammatory pain through activation of satellite glial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 110, p. 11193–11198. 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307445110>

WOOLF, C.J.; MA, Q. Nociceptors-Noxious Stimulus Detectors. **Neuron**, n. 55. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.016>

ZHAN, P.K.; BRENNAN, T.J. Lack of effect of Intrathecally Administered N-methyl-D-aspartate Receptor Antagonists in a Rat Model for Postoperative Pain. **Anesthesiology**, n. 88, p. 143-156. 1998. <https://doi.org/10.1097/00000542-199801000-00022>

ZHANG, D.; OWENS, C.M.; WILLIS, W.D. Intracellular study of electrophysiological features of primate spinothalamic tract neurons and their responses to afferent inputs. **J. Neurophysiol**, n. 65, p. 1554–1566. 1991. <https://doi.org/10.1152/jn.1991.65.6.1554>

ZHANG, X. Neuronal somatic ATP release triggers neuron-satellite glial cell communication in dorsal root ganglia. **Proc Natl Acad Sci USA**, n. 104, p. 9864–9869. 2007. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611048104>

ZHUO, M. Plasticity of NMDA receptor NR2B subunit in memory and chronic pain. **Molecular Brain**, v. 2, n. 1, p. 4. 2009. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-2-4>

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16; p.109-110. 1983. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(83\)90201-4](https://doi.org/10.1016/0304-3959(83)90201-4)

ANEXO - Certificado Comissão de Ética na Utilização de Animais



Universidade Federal de Uberlândia

- Comissão de Ética na Utilização de Animais -

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado “Comparação entre os efeitos analgésicos promovidos por antagonistas NMDA administrados na medula e gânglio da raiz dorsal em ratos”, protocolo nº 109/17, sob a responsabilidade de **Celina Monteiro da Cruz Lotufo** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião 11 de maio de 2018.

(We certify that the project entitled “Comparação entre os efeitos analgésicos promovidos por antagonistas NMDA administrados na medula e gânglio da raiz dorsal em ratos”, protocol 109/17, under the responsibility of Celina Monteiro da Cruz Lotufo- involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of may 11th, 2018).

Vigência do Projeto	Início: 25/05/2018 Término: 25/05/2019
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Wistar
Número de animais	135
Peso / Idade	200 g / 8 semanas
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem / Local	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia
Local onde será mantido o animal:	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia

Uberlândia, 24 de maio de 2018.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU