

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Estudo da participação de receptores NMDA
dos Gânglios da Raiz Dorsal em modelo de neuropatia
por Constrição Crônica em ratos

Ruth Gabriela Marques Fagundes

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para a obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG
Julho – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Estudo da participação de receptores NMDA
dos Gânglios da Raiz Dorsal em modelo de neuropatia
por Constrição Crônica em ratos

Ruth Gabriela Marques Fagundes

Celina Monteiro da Cruz Lotufo

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para a obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

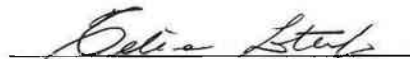
Uberlândia - MG
Julho – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Estudo da participação de receptores NMDA dos
Gânglios da Raiz Dorsal em modelo de neuropatia
por Constrição Crônica em ratos

Ruth Gabriela Marques Fagundes

Aprovado pela Banca Examinadora em: 26 / 07 / 2017 Nota: 100


Celina Monteiro da Cruz Lotufo

Uberlândia, 26 de julho de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Estudo da participação de receptores NMDA
dos Gânglios da Raiz Dorsal em modelo de neuropatia
por Constrição Crônica em ratos

Ruth Gabriela Marques Fagundes

Celina Monteiro da Cruz Lotufo
Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do Curso de

Biotechnology em ____/____/____

Edgar Silveira Campos

Uberlândia - MG
Julho – 2017

*Aos meus pais, por quem tenho imensa admiração e
gratidão, que com carinho me incentivaram e
me apoiaram ao longo da minha trajetória.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente àqu'Ele que pela fé me guiou até aqui.

Aos meus pais, Hélio e Elisabeth, por todo apoio e incentivo que me motivaram a estudar e perseguir meus sonhos com esforço e dedicação.

À minha orientadora e amiga Dr^a. Celina Monteiro da Cruz Lotufo pela dedicação, paciência e os valiosos ensinamentos que vou levar para toda a vida.

Aos amigos do laboratório, Maria Vitória, Débora, Taís, Daniele, Paulla, Bruno, Felipe, e principalmente Júlia, pelo companheirismo e auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas e professores da graduação que fizeram parte dessa jornada e contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao CNPq e a Universidade Federal de Uberlândia pelo financiamento que possibilitou a realização desse trabalho.

RESUMO

A dor neuropática induzida por cirurgia é um problema clínico significativo, e desenvolve-se devido a lesões de nervos periféricos durante procedimentos cirúrgicos. Estudos sugerem que após a lesão nervosa os corpos celulares dos neurônios sensoriais primários presentes nos gânglios da raiz dorsal passam a ser uma significativa fonte de descargas ectópicas. Nessas estruturas encontram-se os receptores glutamatérgicos NMDA, que segundo pesquisas participam na dor de origem inflamatória, e sua ativação está relacionada em manifestações anormais de dor. Nesse estudo buscamos investigar a participação dos receptores NMDA nos gânglios da raiz dorsal no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática pós-cirúrgica. Para tal, foi realizado teste de sensibilidade mecânica durante 28 dias, em modelo animal de constrição crônica do nervo ciático tratados com antagonistas de receptores NMDA via intratecal e intraganglionar. Os resultados mostraram aumento no limiar de sensibilidade nos grupos tratados através das duas vias, sugerindo que o processo de cronificação da dor pode estar relacionado a eventos mediados pelo receptor NMDA presente nos gânglios sensoriais e o controle da dor na fase inflamatória pode evitar o desenvolvimento da dor crônica pós-operatória.

Palavras-chave: Receptores NMDA, Gânglios da Raiz Dorsal, Dor Neuropática

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Animais	18
3.2 Drogas	19
3.3 Testes e Técnicas	19
3.3.1 Constrição Crônica do Nervo Ciático	19
3.3.2 Administração de drogas por via intraganglionar	20
3.3.3 Administração de drogas por via intratecal	21
3.3.4 Teste de pressão crescente: Von Frey eletrônico	22
3.4 Procedimento experimental	23
3.5 Análise Estatística	24
4. RESULTADOS	25
4.1 Avaliação do efeito analgésico de antagonistas de receptores NMDA diante de diferentes vias de administração	25
4.2 Avaliação do efeito de antagonistas do receptor NMDA sobre a cronificação da hiperalgesia induzida por cirurgia.	28
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37
ANEXO	41

LISTA DE TABELAS

1. Limiar mecânico (em gramas) da pata ipsilateral obtidos 1 hora após administração dos tratamentos nos primeiros 4 dias após constrição crônica do nervo ciático.....	25
2. Limiar mecânico (em gramas) da pata ipsilateral e contralateral dos grupos controle e tratados.....	29

LISTA DE FIGURAS

1. Cirurgia de constrição crônica do nervo ciático.....	20
2. Injeção intraganglionar.....	21
3. Injeção intratecal.....	21
4. Teste de pressão crescente na pata (Von Frey eletrônico).....	23
5. Esquema geral dos experimentos.....	24
6. Avaliação do efeito de antagonistas de receptores NMDA sobre hiperalgesia mecânica.....	26
7. Avaliação do efeito analgésico de antagonistas de receptores NMDA.....	27
8. Avaliação do efeito de antagonistas do receptor NMDA sobre a cronificação da hiperalgesia induzida por cirurgia.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS

1. μL – microlitros
2. d-AP5 - d-2-amino-phosphonopentanoato
3. g – gramas
4. GFAP - Proteína ácida fibrilar glial
5. GRD – Gânglio da raiz dorsal
6. GT – Gânglio Trigeminal
7. i.gl. – intraganglionar
8. i.t. – intratecal
9. i.pl. - intraplantar
10. IASP – *International Association for the Study of Pain* (Associação Internacional para o Estudo da Dor)
11. L5 - vértebra lombar 5
12. L6 - vértebra lombar 6
13. LTP – Potencial de longa duração
14. Mg^{+2} – magnésio
15. NMDA – N-metil-D-aspartato
16. PGE_2 – Prostaglandina E_2

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial ou descrito em termos de tais danos. Quando esta apresenta função fisiológica, também apresenta caráter transitório. Já a dor crônica tem como principal característica a persistência, mesmo na ausência de estímulos, podendo durar meses e até mesmo anos (OLIVEIRA IN LENT, 2008).

Os estímulos ocorridos nos tecidos periféricos são captados por células nervosas especializadas, chamadas nociceptores. Os nociceptores são terminações livres de neurônios aferentes primários que inervam diferentes tecidos como pele, músculos, articulações, vasos, meninges, ossos e vísceras (LOESER e TREEDE, 2008; OLIVEIRA IN LENT, 2008).

Os neurônios aferentes primários são neurônios do tipo pseudounipolar, que apresentam um único axônio bifurcado na forma de T, sendo que um ramo da bifurcação estende-se para a periferia (ramo distal) e outro ramo para medula espinhal (ramo proximal) (LIEBERMAN, 1976). Os corpos celulares desses neurônios estão localizados dentro dos gânglios trigeminais (GT) e da raiz dorsal (GRD), e seus axônios inervam a cabeça e o corpo, respectivamente (OLIVEIRA IN LENT, 2008).

Nos gânglios existem subpopulações de neurônios classificadas por critérios anatômicos e funcionais, sendo divididos em fibras mielinizadas (Fibras A) e não mielinizadas (Fibras C). As fibras A apresentam maior velocidade de condução e são classificadas em A β e A δ . A primeira participa de respostas táteis inócuas enquanto que a segunda está relacionada a respostas nocivas (BASBAUM e JESSELL, 2000; LIU et al., 2001). Enquanto as fibras A δ estão envolvidas na dor rápida ou primária resultante de um estímulo pontual, as fibras C são responsáveis pela dor lenta e que compartilha características com a dor crônica (OLIVEIRA IN LENT, 2008).

Os gânglios sensoriais são a primeira estrutura a receber o sinal sensorial detectado pelo ramo distal, que é então encaminhado pelo ramo proximal, que entra na medula de forma ordenada pela raiz dorsal. A informação nociceptiva é então transmitida aos neurônios de segunda ordem na medula espinhal. A substância cinzenta da medula espinhal, onde estão localizados os corpos neuronais, é dividida em lâminas, as quais apresentam funções diferentes. As seis primeiras lâminas compõem o corno dorsal, no qual se encontram os neurônios envolvidos no processo de modulação da dor (OLIVEIRA IN LENT, 2008).

As fibras A δ terminam principalmente nas lâminas I e V, as fibras C nas lâminas I e II e as fibras A β nas lâminas III, IV e V. Nessas regiões encontram-se neurônios de projeção e interneurônios de segunda ordem, os quais direcionam a informação nociceptiva ao tronco encefálico e ao tálamo (PURVES et al., 2010). Os aspectos sensoriais são interpretados no córtex somatossensorial, enquanto que amígdala, hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal e núcleos talâmicos estão associados ao componente emocional da dor.

A dor neuropática é uma das principais modalidades de dor crônica com prevalência de 10 – 18% da população mundial (AUSTIN, 2012; COLLOCA et al., 2017). É definida pela IASP como sendo uma condição decorrente de uma lesão ou disfunção do sistema somatossensorial a nível central ou periférico, o que resulta em respostas nociceptivas anormais. Essa desordem é um dos maiores e mais debilitantes problemas clínicos, resistente aos tratamentos disponíveis, e que permanece pouco elucidada. Os tratamentos tradicionais envolvem terapias farmacológicas e complementares, nos quais são utilizados antidepressivos tricíclicos, gabapentinoides e antagonistas de receptores NMDA, como a cetamina (COLLOCA et al., 2017), que é provavelmente a droga mais estudada para o tratamento de dor neuropática (COLLINS, 2010). O impacto da dor neuropática no bem estar físico, psicológico e econômico do paciente é significativo e está associado a morbidades como insônia, depressão, ansiedade crônica e obesidade (LI et al., 2016; BORSOOK et al., 2013).

Dentre as principais razões para o desenvolvimento da lesão no nervo ou disfunção do sistema somatossensorial estão: Neuropatias diabéticas, infecções virais, traumatismos e procedimentos cirúrgicos (COLLOCA et al., 2017). Nesse último caso é dado o nome de dor neuropática induzida por cirurgia ou dor neuropática pós-cirúrgica.

A dor neuropática induzida por cirurgia atinge de 10% a 40% dos pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos (BORSOOK et al., 2013). Entretanto, lesão nervosa originada em cirurgia nem sempre leva a dor neuropática, e a manifestação da neuropatia depende da susceptibilidade genética, idade, sexo, fatores psicossociais, e dores anteriores (KEHLET et al., 2006). Além disso, a relação entre a gravidade da lesão e o desenvolvimento da dor crônica pós-cirúrgica ainda não foi esclarecida (MARTINEZ et al., 2015).

Muitos estudos consideram a possibilidade de prevenção da dor neuropática induzida por cirurgia através de diversas abordagens, como analgesia preventiva, bloqueio das vias nociceptivas em diferentes níveis, uso de opióides e anestesia local (DAHL e KEHLET, 2011; GRAPE e TRAMER, 2007; KARANIKOLAS et al., 2011). Porém o impacto dessas técnicas em longo prazo ainda não está totalmente esclarecido (BORSOOK et al., 2013).

O sistema nervoso, periférico e central, pode passar por modificações químicas, estruturais e funcionais como resultado de eventos inflamatórios e mecanismos de dor desencadeados por uma lesão nervosa ocasionada durante um processo cirúrgico. Essas alterações se manifestam nos pacientes afetados como um estado neuropático através de alodinia, hiperalgesia, perda sensorial e episódios dolorosos semelhantes a choques, que podem ocorrer muito tempo após a lesão provocada pela cirurgia ter sido resolvida (BORSOOK et al., 2013). Sendo que hiperalgesia refere-se ao aumento da dor de um estímulo normalmente doloroso, enquanto alodinia refere-se à dor produzida por um estímulo não doloroso inócuo (MERSKEY e BOGDUK, 1994).

A ação de mediadores inflamatórios como citocinas, bradicinina e prostaglandinas liberadas no local da lesão por células inflamatórias, ativa uma cascata de sinalização intracelular que levam a mudança de perfil de expressão e permeabilidade dos receptores e canais iônicos na membrana terminal dos nociceptores. Esse mecanismo leva a redução do limiar e aumento da excitabilidade resultando na sensibilização periférica (KEHLET al., 2006).

Há evidências pré-clínicas que sugerem que hiperalgesia e alodinia seguindo lesão nervosa ou tecidual periférica, são resultado do aumento na sensibilidade dos nociceptores aferentes primários, bem como de mudanças centrais e periféricas mediadas pelo receptor NMDA (PARSONS, 2001).

Os receptores NMDA são receptores glutamatérgicos encontrados em todo o sistema nervoso. São abundantemente expressos no cérebro e participam do desenvolvimento neuronal, aprendizagem e memória (MORRIS, 2013). Já na medula e nas estruturas periféricas tem grande relevância no processo de modulação e cronificação da dor, devido à sua relação com o glutamato, principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, inclusive no sistema de dor (PETRENKO, 2003; NICKEL et al., 2012).

Os receptores NMDA são tetrâmeros resultados da combinação de subunidades originadas de três diferentes famílias: NR-1, NR-2 e NR-3. Há oito tipos de subunidades na família NR-1, quatro tipos na família NR-2 e duas na NR-3. Entre essas famílias, apenas as subunidades NR-2 se ligam ao glutamato, as demais possuem sítio de ligação para um co-agonista, que pode ser glicina ou d-serina (WU e ZHUO, 2009; ZHOU et al., 2011). Em células de mamíferos é necessária a combinação de pelo menos um subtipo de NR-1 e dois tipos de NR-2, iguais ou diferentes (WU e ZHUO, 2009). As configurações entre as subunidades determinam as propriedades biofísicas e farmacológicas. Assim a participação do receptor NMDA na dor crônica pode justificar a heterogeneidade do grupo de pacientes a

respeito da manifestação e intensidade dos sintomas, já que a composição dos receptores também se apresenta de forma diversa (ZHOU et al., 2011).

O receptor NMDA é fisiologicamente bloqueado por um íon de Mg^{2+} . Este bloqueio é removido por despolarizações repetitivas como resultado da mediação de proteínas inflamatórias e neuropeptídeos como substância P, peptídeo ligado ao gene da calcitonina (NICKEL et al., 2012) e estímulos causados por dor prolongada ou de alta intensidade. Lesões aos nervos periféricos levam ao aumento e persistência da transmissão sináptica no corno dorsal da medula, os quais envolvem os receptores NMDA encontrados nos neurônios nociceptivos espinhais. A ativação prolongada dos nociceptores pode levar a ativação destes receptores pelo glutamato. Esta ativação resulta em excitação neuronal, manifesta através de anormalidades no sistema somatossensorial (PARSONS, 2001) e parece ter um papel importante na cronificação da dor (CHIZH, 2002; HAMA e SAGEN, 2014).

Em ratos com lesão nervosa periférica a administração intratecal de antagonistas do receptor NMDA diminuiu tanto a atividade anormal dos neurônios do corno dorsal da medula, quanto à hipersensibilidade cutânea (SOTGIU e BIELLA, 2000; SUZUKI et al., 2001). Estudos demonstraram que moléculas administradas por via intratecal, que consiste na administração de drogas no espaço subaracnoide, podem transpassar para os gânglios da raiz dorsal. Deste modo, drogas injetadas por via intratecal atingem os neurônios presentes na medula, mas também alcançam os neurônios aferentes primários nos gânglios da raiz dorsal. No entanto, a maior parte dos estudos que utilizam esta via de administração consideram apenas a medula espinhal como sítio de ação dos fármacos administrados. Em contrapartida a técnica da injeção intraganglionar, consiste na administração de drogas por meio de uma injeção direta nos gânglios da raiz dorsal (L5), possibilitando que a droga injetada permaneça restrita ao gânglio da raiz dorsal (FERRARI et al., 2007).

Os gânglios da raiz dorsal, os quais aparentam ser relevantes no processo de manutenção da dor também apresentam receptores NMDA. Essas estruturas do sistema nervoso periférico contêm os corpos celulares dos neurônios aferentes primários envolvidos por células gliais chamadas células satélite.

Os corpos celulares dos neurônios sensoriais primários passam a ser uma significativa fonte de descargas aferentes após lesão nervosa, além de possuírem juntamente com as células satélite, receptores para mediadores inflamatórios, sugerindo que estes têm um papel importante na condução da informação nociceptiva (AMIR et al., 2002).

As células satélite gliais apresentam várias funções, além de envolver e sustentar os neurônios. Elas são capazes de controlar o microambiente, receber e transmitir sinais químicos, que por vezes modulam a atividade neuronal (HANANI, 2005; COSTA e NETO, 2014).

As células satélite apresentam algumas características e funções observadas em astrócitos, células gliais do sistema nervoso central, relevantes no processo de indução e manutenção da dor neuropática (HANANI, 2005; LIU et al., 2012). Após lesões, os gânglios sensoriais passam por alterações que afetam também as células satélite, que por sua vez passam a apresentar mudanças no número de células, estrutura e função (LIU et al., 2012). Tais alterações influenciam no desenvolvimento e manutenção da dor crônica. Os primeiros estudos da participação das células gliais dos gânglios sensoriais foram mostrados em modelo de dor crônica (WOODHAM et al., 1989). Nesse estudo observou-se o aumento de GFAP (proteína ácida fibrilar glial), marcador de ativação glial após lesão no nervo (COSTA e NETO, 2014).

Estudos mostram que as células satélite gliais têm a capacidade de modular sinais dos gânglios sensoriais fisiologicamente e durante eventos patológicos (HANANI, 2005). Um desses mecanismos foi apresentado por Ferrari et al., em 2014, que demonstra que um evento

inflamatório ocorrido no tecido periférico apresenta uma sinalização glutamato-dependente, na qual o neurotransmissor é liberado pelo corpo celular dos neurônios e ativa o receptor NMDA presente nas células satélite gliais. Este mecanismo garante a manutenção da hiperalgesia de origem inflamatória.

Pouco se sabe sobre o papel das células satélite na dor neuropática, mas estudos (HANANI et al., 2014; OHARA et al., 2009) demonstram que elas podem ser tão relevantes para o desenvolvimento da dor crônica quanto sua contraparte central, os astrócitos.

Em suma, as células satélite gliais apresentam inúmeros mecanismos ainda não desvendados que influenciam a atividade neuronal. Estas células e os receptores NMDA nelas presentes se destacam como um importante alvo de estudos, principalmente em relação à dor crônica.

Devido à relevância do receptor NMDA no processo de cronificação da dor, muitos estudos clínicos já foram feitos utilizando antagonistas. Por outro lado, o uso em humanos tem sido limitado devido à alta toxicidade e o grande número de efeitos adversos como perda de memória, efeitos psicomiméticos, ataxia e etc.

Uma vez que os gânglios sensoriais não são protegidos pela barreira hematoneural (DEVOR, 1999), o desenvolvimento de drogas que não ultrapassem essa barreira poderia garantir aos pacientes a possibilidade de desfrutar do potencial dos antagonistas do receptor NMDA, sem prejudicar a função fisiológica destes receptores no sistema nervoso central.

Assim, investigações que aprofundem o conhecimento a respeito do papel dos receptores NMDA presentes nos gânglios sensoriais no desenvolvimento e manutenção da dor neuropática pós-cirúrgica podem indicar uma nova alternativa para a prevenção da cronificação da dor pós-cirúrgica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a participação e a importância dos receptores NMDA presentes no gânglio da raiz dorsal no desenvolvimento da dor neuropática pós-cirúrgica em modelo animal de constrição crônica do nervo ciático.

2.2 Objetivos Específicos

1) Avaliar o efeito de antagonistas do receptor NMDA (d-AP5 e Cetamina) administrado por via intratecal no desenvolvimento da dor neuropática por constrição crônica do nervo ciático em ratos.

2) Avaliar o efeito de antagonista do receptor NMDA (d-AP5) administrado por via intraganglionar no desenvolvimento da dor neuropática por constrição crônica do nervo ciático em ratos e comparar com o efeito promovido pela administração por via intratecal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar fêmeas adquiridos no biotério Central da Universidade Federal de Uberlândia, todos com peso entre 180 e 220 gramas no início do experimento e com idades entre 2 e 3 meses. Os ratos foram mantidos no depósito de experimentação da Área de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU (ARFIS/ICBIM), em sala com temperatura (25°C) e ciclo de luminosidade controlada (12/12h), com acesso livre à água filtrada e ração *ad libitum*. As caixas passam por trocas a cada 2 ou 3 dias e foram mantidas em estantes ventiladas com exaustão de ar próprias para este fim.

Todos os experimentos seguiram as normas de ética estabelecidas para experimentação com animais acordados, recomendadas pela IASP (ZIMMERMANN, 1983), e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia segundo o Protocolo 025/16 (Anexo I).

3.2 Drogas

- Tiopental sódico - Cristália;
- Isoflurano - Cristália;
- d-AP5 - antagonista de receptores NMDA - Sigma;
- Cetamina – antagonista de receptor NMDA - Rhobifarma.

3.3 Testes e Técnicas

3.3.1 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).

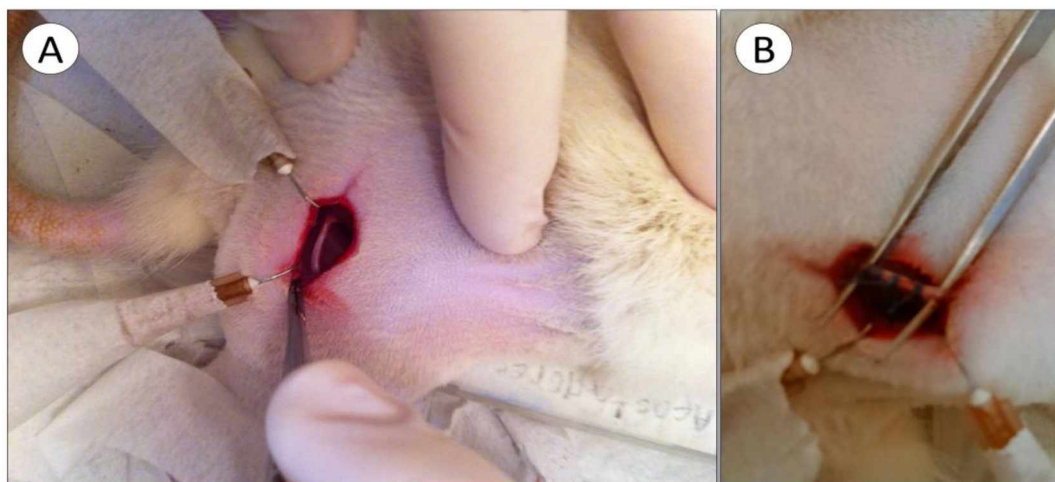


Figura 1: Cirurgia de contração crônica do nervo ciático. Em **A**: apresenta o nervo exposto após incisão na pele e através do tecido conjuntivo. Em **B**: apresenta as ligaduras (em azul) posicionadas ao redor do nervo.

3.3.2 Administração de drogas por via intraganglionar

A administração de drogas no gânglio da raiz dorsal de ratos foi realizada através do método de injeção direta (FERRARI et al., 2007). Esse método permite verificar os efeitos das drogas apenas sobre neurônios nociceptivos primários (ARALDI et al., 2012).

Para a realização desse processo, foi utilizado um cateter conectado a uma agulha de 0,16 mm, em uma de suas extremidades e na outra extremidade conectada a uma seringa de vidro, por meio de uma válvula tri-way. A aplicação da droga foi feita através da inserção da agulha próxima a vértebra L-5 e ao atingir o gânglio da raiz dorsal foi observado um reflexo na pata do animal, nesse momento foi feita a injeção de solução com volume de 5 μ L e concentração de 9 μ L de d-AP5. Todo o procedimento foi realizado com o rato sob anestesia inalatória (Isoflurano).

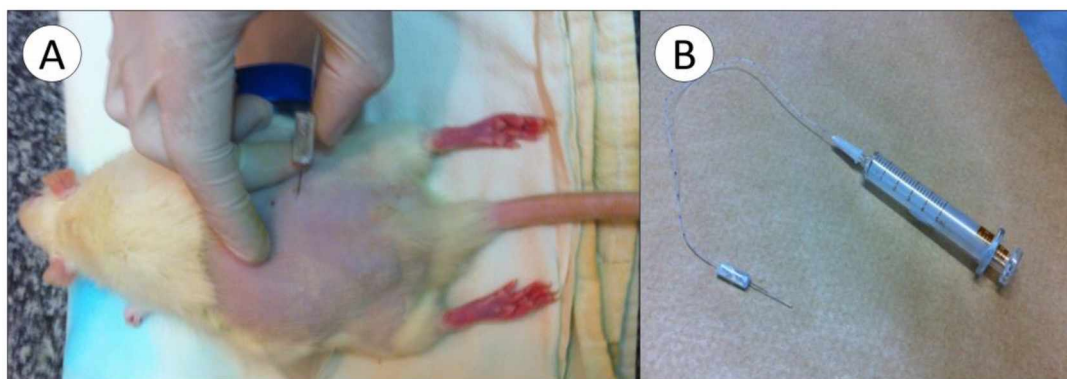


Figura 2: Injeção intraganglionar. Em A: rato anestesiado recebendo a droga via intraganglionar, salina ou d-Ap5 (9 μ g) no grupo tratado. Em B: material utilizado para a realização do teste (agulha-cateter-seringa de vidro).

3.3.3 Administração de drogas por via intratecal

A administração de drogas por via intratecal foi realizada com o rato sob anestesia inalatória (Isoflurano), utilizando uma agulha conectada a uma seringa contendo o volume de 10 μ L da solução com concentração de 40 μ L de Cetamina ou 9 μ L de d-AP5. A agulha foi inserida no tecido entre as vértebras L5 e L6, perpendicular à coluna vertebral. Quando a agulha atinge o espaço subaracnoide é observado um movimento repentino na cauda, que indica o sucesso da injeção. (MESTRE et al., 1994).



Figura 3: Injeção intratecal. Rato anestesiado recebendo o tratamento (cetamina ou d-AP5) via intratecal.

3.3.4 Teste de pressão crescente: Von Frey eletrônico

A avaliação do limiar de sensibilidade mecânica na pata de ratos foi feita pelo método de pressão crescente previamente descrita Vivancos et al. (2004). Este aparelho é composto de um transdutor de pressão ligado por um cabo a um detector digital de força, a qual é expressa em gramas. Ao transdutor é adaptada uma ponteira Universal Tips10 μ L (T-300, Axygen) que estimula diretamente a pata do animal. O teste consiste de o experimentador aplicar a ponteira em ângulo reto na região central da pata traseira do animal com uma pressão gradualmente crescente, o qual 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 por 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 3 medidas de cada pata, realizadas com intervalos de aproximadamente 5 minutos.

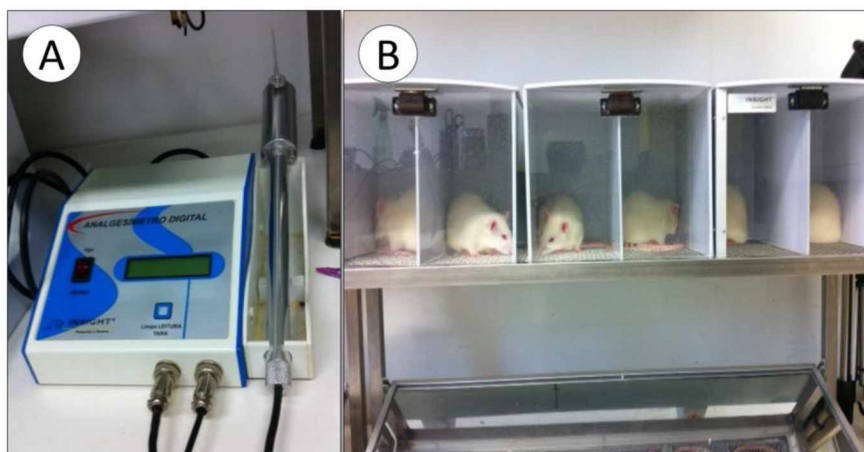


Figura 4: Teste de pressão crescente na pata (Von Frey eletrônico). Em A: apresenta transdutor de pressão, que mede a força em gramas. Em B: apresenta as caixas acrílicas onde os ratos são colocados para a estimulação mecânica.

3.4 Procedimento experimental

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 dos antagonistas foram realizadas de acordo com os grupos descritos abaixo, 30 min. 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 através da injeção intraganglionar.
- 3) d-Ap5 i.gl., no qual foi realizada a constrição do nervo e administração de 9 µg de d-Ap5 através da injeção intraganglionar.

- 4) d-AP5 i.t., no qual foi realizada a constrição do nervo e administração de 9 µg de d-AP5 através da injeção intratecal.
- 5) Cetamina i.t., no qual foi realizada a constrição do nervo e administração de 40 µg de Cetamina através da injeção intratecal.

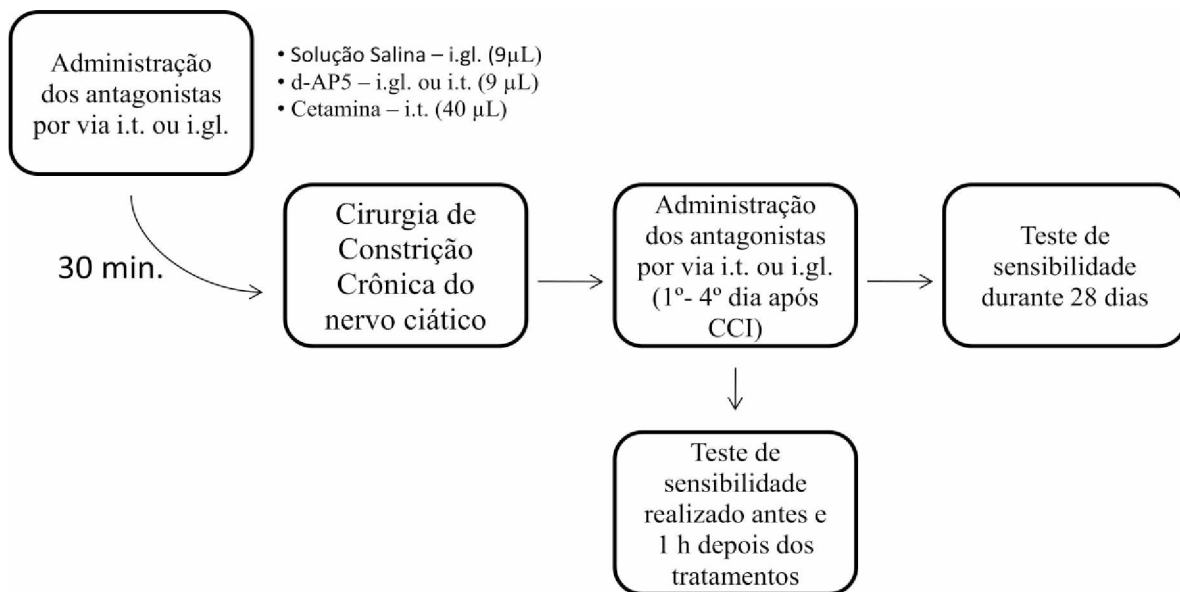


Figura 5: Esquema geral dos experimentos. O experimento iniciou com a administração de antagonistas do receptor NMDA por via intraganglionar ou via intratecal. Após 30 minutos foi feito a cirurgia de constrição crônica do nervo ciático e administração dos antagonistas ou solução salina pelos quatro dias seguintes. Os testes de sensibilidade foram realizados diariamente nos quatro primeiros dias após a cirurgia e semanalmente após o sétimo dia. Nos dias dos tratamentos os testes foram realizados antes e uma hora após a administração dos antagonistas.

3.5 Análise Estatística

As médias obtidas nos testes comportamentais foram comparadas por meio de teste t ou ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. O nível de significância foi estabelecido em $p \leq 0,05$. Cada grupo experimental apresenta de 5 a 7 animais. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism. Valores apresentados como média $\pm$ EPM.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação do efeito analgésico de antagonistas de receptores NMDA diante da administração por via intratecal e intraganglionar

Para avaliar o efeito analgésico de antagonistas de receptores NMDA foram realizadas medições pelo teste de Von Frey eletrônico durante todo o período de tratamento, sendo que as medidas foram realizadas antes da administração das drogas e 1 hora após, conforme descrito nos métodos. Durante esse período foram comparadas as médias entre os tratamentos e o grupo Salina i.gl. (Figura 5), bem como entre os grupos antes e depois da administração dos antagonistas (Figura 6). As médias referentes às medidas realizadas 1 hora após o tratamento seguem relatadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Limiar mecânico (em gramas) da pata ipsilateral 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 ± 0,744	15,095 ± 0,805	13,861 ± 1,428	20,966 ± 1,559
d-AP5 i.gl. [6]	24,905 ± 2,887***	22,022 ± 3,908	26,705 ± 1,520***	26,594 ± 1,706
d-AP5 i.t. [5]	37,480 ± 2,402***	31,005 ± 4,492***	32,660 ± 1,771***	38,060 ± 4,397***
Cetamina i.t. [5]	35,746 ± 3,391***	36,213 ± 2,579***	37,406 ± 2,758***	46,273 ± 1,760***

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].

Quando comparados ao controle por administração de Salina i.gl. todos os grupos tratados com antagonistas do receptor NMDA apresentaram um aumento no limiar de sensibilidade no primeiro e no terceiro dia (Figura 6; Figura 7 - A;C; Tabela 1), enquanto no segundo e no quarto dia após CCI apenas os grupos d-AP5 i.t. e Cetamina i.t. apresentaram redução na sensibilidade mecânica (Figura 6; Figura 7 - B;D; Tabela 1). A administração dos

antagonistas por via intratecal resultou em efeito analgésico superior àquele induzido pela administração de d-AP5 por via intraganglionar.

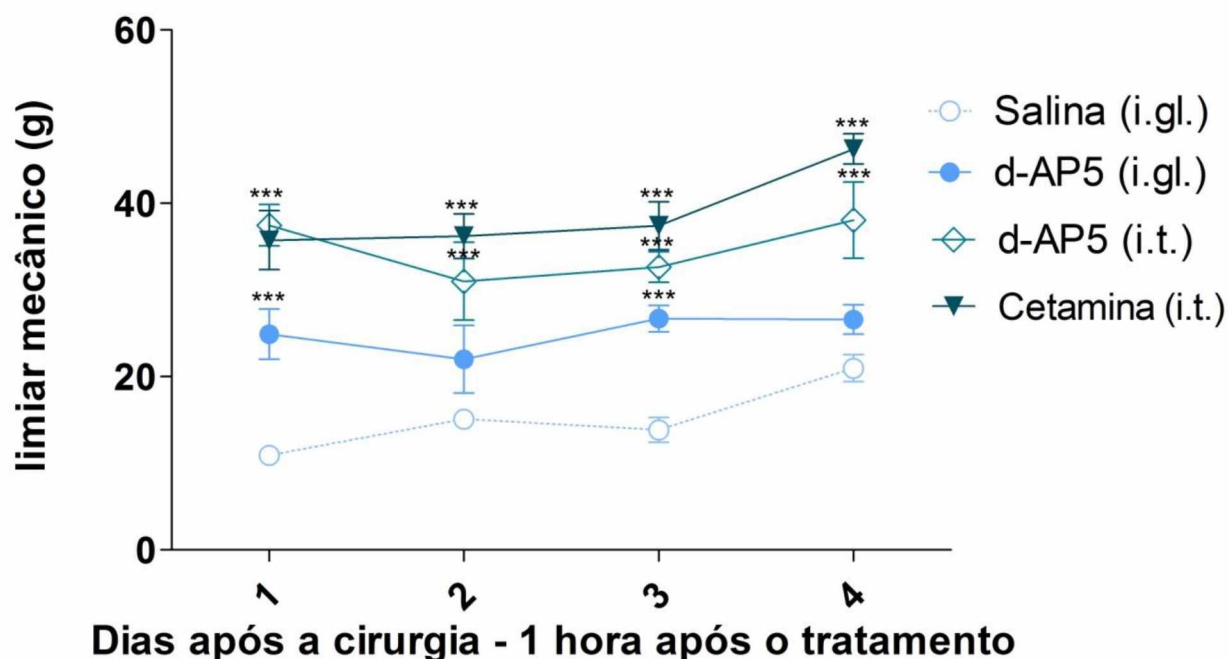


Figura 6: Avaliação do efeito de antagonistas de receptores NMDA sobre hiperalgesia mecânica. Avaliação do limiar mecânico através do teste de Von Frey eletrônico antes e uma hora após a administração de solução salina por via intraganglionar (Salina i.gl.), 9 µg de d-AP5 ou 40 µg de Cetamina através de injeção intraganglionar (d-AP5 i.gl.) ou intratecal (d-AP5 i.t. e Cetamina i.t.). Valores representam média ± EPM. (***) indica $p < 0.001$, quando comparada por meio de ANOVA de duas vias a medida referente ao grupo Salina i.gl.

Na Figura 6 está sendo mostrada a sensibilidade mecânica após 1 hora de administração dos antagonistas NMDA ou veículo. Para verificar se houve efeito analgésico agudo após administração dos antagonistas NMDA, foram também comparadas as sensibilidades mecânicas nos mesmos animais, antes e após o tratamento realizado (Figura 7).

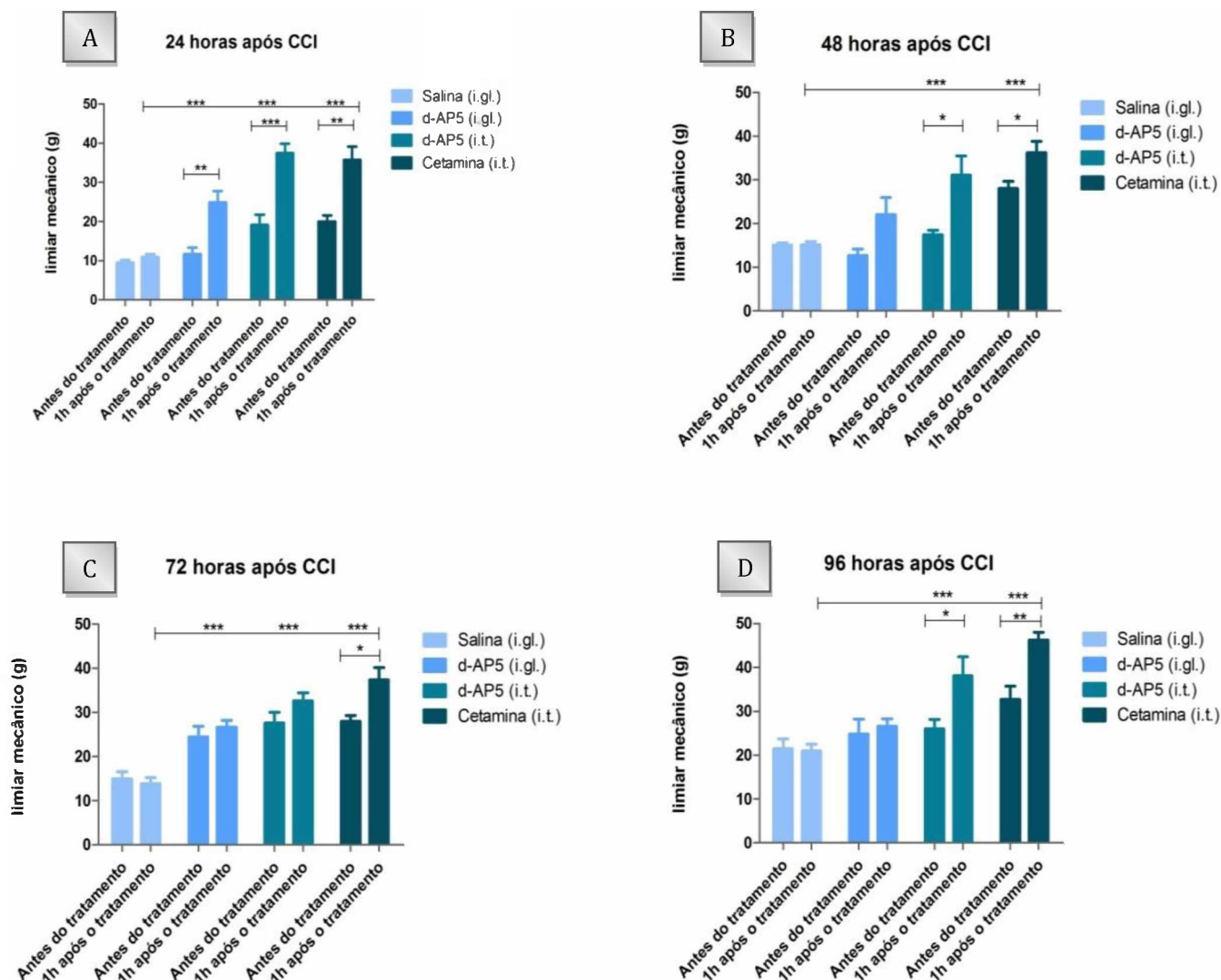


Figura 7: Avaliação do efeito analgésico de antagonistas de receptores NMDA. Avaliação do limiar mecânico através do teste de Von Frey eletrônico antes e uma hora após a administração de solução salina por via intraganglionar (Salina i.gl.), 9 µg de d-AP5 ou 40 µg de Cetamina através de injeção intraganglionar (d-AP5 i.gl.) ou intratecal (d-AP5 i.t. e Cetamina i.t.). Valores representam média ± EPM, (***) indica $p < 0.001$, (**) indica $p < 0.01$, (*) indica $p < 0.05$ quando comparado pelo teste t a medida referente ao grupo antes do tratamento, ou quando comparada por meio de ANOVA de duas vias a medida referente ao grupo Salina i.gl.

No primeiro dia de tratamento, 24 horas após a cirurgia de contração crônica do nervo ciático (Figura 7 - A) todos os grupos tratados apresentaram aumento no limiar mecânico uma hora após receberem a administração dos antagonistas. No segundo e no quarto dia (Figura 7- B;D) somente os grupos que foram tratados com o antagonista por via intratecal apresentaram

diferença quanto à diminuição da sensibilidade, enquanto no terceiro dia (Figura 7 - C) apenas o grupo Cetamina i.t. apresentou melhora significativa.

4.2 Avaliação do efeito de antagonistas do receptor NMDA sobre a cronificação da hiperalgesia induzida por cirurgia.

Todos os grupos partiram de valores basais (dia 0) estatisticamente equivalentes no teste de Von Frey eletrônico e foram avaliados quanto à resposta a estímulo mecânico durante 28 dias (Figura 8). Nos dias de tratamento, quatro primeiros dias, as sensibilidades mecânicas foram registradas antes e após 1 hora da administração dos tratamentos. Para avaliar o desenvolvimento da dor neuropática está sendo considerada na Figura 8 a medida realizada antes dos tratamentos.

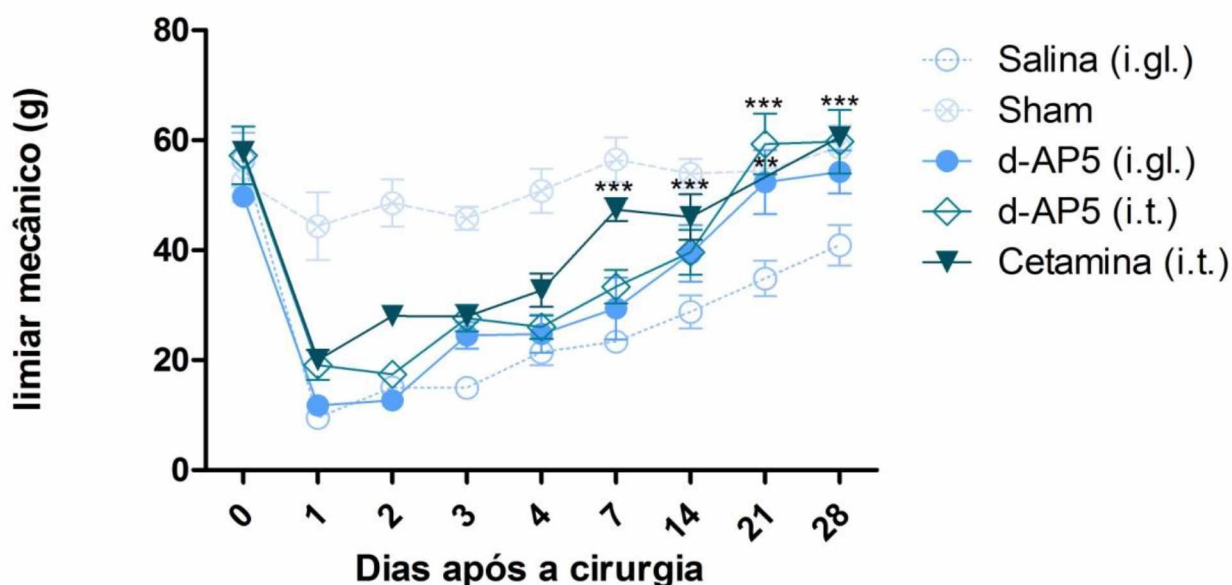


Figura 8: Avaliação do efeito de antagonistas de receptores NMDA sobre a cronificação da hiperalgesia induzida por cirurgia. Avaliação do limiar mecânico através do teste de Von Frey eletrônico em diferentes dias após a cirurgia de constrição crônica do nervo ciático. Valores representam média $\pm$ 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.

Os animais tratados que passaram pela constrição crônica do nervo ciático manifestaram um limiar mecânico reduzido a partir do primeiro dia após a cirurgia, com persistência até o quarto dia. A partir da primeira semana (7º dia) os grupos tratados apresentaram um aumento crescente do limiar mecânico. A partir do 7º dia após a constrição, o grupo tratado com cetamina i.t. apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo e manteve o limiar mecânico próximo ao basal até o fim do experimento. No 21º dia ambos os grupos tratados com d-AP5 apresentaram diminuição significativa na sensibilidade mecânica e o grupo d-AP5 i.t. manteve a sensibilização reduzida também no 28º (Figura 8; Tabela 2).

A pata contralateral dos animais de todos os grupos também foi avaliada através do teste de sensibilidade mecânica. Os dados relativos a essas medidas seguem relatados na Tabela 2, e pode-se observar que não houve alteração na sensibilidade de nenhum dos animais. Por razões técnicas não foram realizadas as medições relativas ao grupo Cetamina i.t. no 21º dia após a cirurgia.

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

	Dias após a cirurgia								
	0	1	2	3	4	7	14	21	28
<i>Ipsilateral</i>									
Salina i.gl. [7]	56,4 ± 4,9	9,5 ± 0,6	15,1 ± 0,5	14,9 ± 1,6	21,4 ± 2,3	23,3 ± 1,5	28,7 ± 2,9	34,8 ± 3,2	40,9 ± 3,6
Sham[6]	52,4 ± 3,7	44,3 ± 6,1	48,5 ± 4,3	45,7 ± 2,1	50,7 ± 4,1	56,4 ± 4,1	53,9 ± 2,7	54,4 ± 1,3	58,6 ± 4,1
d-AP5 i.gl. [6]	49,7 ± 1,6	11,7 ± 1,6	12,6 ± 1,5	24,4 ± 2,4	24,7 ± 3,3	29,4 ± 5,6	39,4 ± 5,1	52,3 ± 5,8**	54,2 ± 3,9
d-AP5 i.t. [5]	57,2 ± 5,2	19,1 ± 2,7	17,4 ± 1,1	27,6 ± 2,4	26,1 ± 2,1	33,3 ± 3,1	39,6 ± 4,1	59,3 ± 5,4***	59,7 ± 5,7**
Cetamina i.t. [5]	57,8 ± 1,2	20,1 ± 1,5	28,0 ± 1,5	27,9 ± 1,3	32,7 ± 3,1	47,3 ± 2,1***	46,3 ± 4,2***	Não realizado	60,5 ± 1,4***
<i>Contralateral</i>									
Salina i.gl. [7]	54,1 ± 3,2	55,3 ± 2,1	60,2 ± 1,1	51,6 ± 1,4	51,1 ± 2,1	50,9 ± 2,2	49,5 ± 1,1	50,5 ± 1,2	52,1 ± 1,8
Sham[6]	55,3 ± 1,1	56,5 ± 0,5	53,1 ± 0,6	54,5 ± 0,8	56,4 ± 1,6	51,8 ± 0,8	54,9 ± 0,7	55,2 ± 0,7	57,5 ± 1,5

d-AP5 i.gl. [6]	51,4± 2,1	49,1 ± 5,5	52,6 ± 4,5	56,4 ± 1,9	55,1 ± 1,6	50,5 ± 3,6	52,1 ± 1,9	54,3 ± 2,5	54,5 ± 2,6
d-AP5 i.t. [5]	56,2 ± 1,9	56,8 ± 1,6	56,9 ± 0,8	57,6± 1,5	59,4 ± 1,5	54,5± 1,6	54,4 ± 1,1	56,7 ± 1,3	56,7 ± 2,1
Cetamina i.t.[5]	56,5 ± 1,3	54,7 ± 0,7	55,5 ± 1,1	54,8 ± 1,1	57,2 ± 0,9	54,1± 2,8	59,1± 1,7	Não realizado	57,8 ± 2,3

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].

5. DISCUSSÃO

Para o estudo de dor neuropática periférica são utilizados diversos modelos animais que mimetizam lesão a nervos periféricos. Um dos modelos mais utilizados e aceitos foi proposto em 1988 por Bennett e Xie, e consiste em uma lesão periférica causada por constrição crônica unilateral do nervo ciático. Desde sua proposição o modelo foi amplamente adaptado, possibilitando variações no número de ligaduras, lado no qual é realizado a cirurgia, e materiais de sutura (AUSTIN et al., 2012).

No trabalho original os autores observaram manifestação de hiperalgesia térmica ao calor, alodinia ao frio e comportamentos relacionados à dor espontânea, como guarda da pata e supressão de apetite. Entretanto ao realizarem o teste Randall Sellito, não foi detectada nenhuma evidência de hiperalgesia mecânica, o que contraria a proposta do modelo. Em contrapartida, estudos posteriores como de Austin (2012) indicaram a presença de hiperalgesia mecânica após a CCI em ratos, observada através da diminuição do limiar mecânico, quantificado pelo teste de Von Frey manual. Em estudo similar, foram observadas mudanças no comportamento na primeira semana pós-cirurgia, atingindo o máximo na segunda semana e recuperação progressiva com início após o 20º dia. (GUILBAUD et al., 1993). Esses achados contrastam com nossos resultados, nos quais é possível observar uma recuperação gradativa dos grupos, inclusive do grupo sem

tratamento (Salina i.gl.) ao longo dos 28 dias de experimento, e que pôde ser percebida a partir do quarto dia após a cirurgia.

As diferenças encontradas podem ser atribuídas ao alto grau de variabilidade apresentado pelo modelo, e as diferenças experimentais, como o uso do fio de poligalactina revestido, em substituição ao fio gut cromado para realizar as ligaduras no nervo. Segundo Maves et al. (1993) o tipo de material de sutura pode ter importância crítica nas alterações comportamentais associadas ao modelo de CCI. Maves ainda concluiu que o gut cromado parece produzir inflamação maior do que outros materiais e que substâncias presentes nesse material de sutura são responsáveis pelos sinais comportamentais associados à dor neuropática, e não apenas a natureza constritiva da lesão. Experimentos posteriores observaram que os ratos lesionados com o fio gut cromado mantiveram a pata lesionada em posição anormal por uma porcentagem de tempo maior do que os ratos nos quais foi utilizado o fio de poligalactina (KAJANDER et al., 1996). Dessa forma é possível concluir que a resposta inflamatória associada com cada tipo de sutura pode ter contribuído para as diferenças na duração da sensibilização observada nos animais.

Neste estudo, os antagonistas do receptor NMDA foram administrados por via intratecal (d-AP5 e cetamina) ou intraganglionar (d-AP5) nos quatro primeiros dias após a cirurgia. Pode-se afirmar que no modelo de CCI assim como na neuropatia pós-cirúrgica, o processo inflamatório é determinante para o desenvolvimento e manutenção da dor. Gabay e Tal, em 2004, demonstraram que imediatamente após a lesão, ocorre pressão mecânica e inflamação ao redor do nervo, que induz uma axonopatia significativa das fibras mielinizadas e não mielinizadas. Mediadores inflamatórios secretados pelas fibras lesadas desencadeiam atividade espontânea nas fibras intactas e, conseqüentemente, o comportamento relacionado à dor neuropática (GUILBAUD et al., 1996; GABAY e TAL,

2004). Deste modo, nos dias em que foram administrados os antagonistas NMDA no presente estudo, é provável que a resposta inflamatória induzida pela constrição do nervo estava acontecendo.

Os resultados obtidos mostraram que a administração de antagonista NMDA por via intraganglionar induziu efeito analgésico, observado uma hora após a administração. Esse resultado está em harmonia com os dados anteriores de nosso grupo, descritos por Ferrari et al. (2014), nos quais a administração de d-AP5 intraganglionar diminuiu a hipernocicepção induzida pela administração intraplantar (i.pl.) de prostaglandina E2 (PGE₂). O modelo com PGE₂ promove alodinia e hiperalgesia mecânica, e é amplamente utilizado no estudo de dor inflamatória visto que este prostanóide é capaz de sensibilizar diretamente os nociceptores. No estudo de Ferrari concluiu-se que a sensibilização dos nociceptores induz a liberação de glutamato pelos corpos celulares dos neurônios nos gânglios sensitivos e que este neurotransmissor atua nos receptores NMDA presentes nas células satélite. A comunicação entre neurônios e células satélites, mediada por glutamato e receptores NMDA, parece ser essencial para a manutenção da hiperalgesia inflamatória.

Levando em consideração os resultados obtidos, podemos sugerir que da mesma maneira que a administração de d-AP5 no GRD é capaz de modular a sensibilização neuronal induzida pela administração de PGE₂, também é possível, que este possa modificar a sensibilização dos nociceptores causada pelos eventos inflamatórios provocados nos primeiros dias após lesão nervosa.

Quando comparadas as médias de sensibilidade mecânicas obtidas antes e uma hora depois dos tratamentos (Figura 7), percebe-se que a sensibilidade estava aumentada nos primeiros dias após a constrição e que antagonistas de receptor NMDA promoveram efeitos analgésicos quando administrados por via intraganglionar ou intratecal. O padrão de resposta, no entanto, é diferente quando comparadas as duas vias. Enquanto que o

efeito analgésico de antagonistas NMDA administrados por via intratecal ocorreram em praticamente todos os primeiros 4 dias, os efeitos da administração por via intraganglionar parecem ocorrer apenas nos primeiros 2 dias. Novamente, considerando a participação de receptores NMDA ganglionares na hiperalgesia de origem inflamatória, um efeito analgésico induzido pela administração intraganglionar é esperado. A participação de resposta inflamatória possivelmente diminua nos dias seguintes enquanto que um componente central parece ser mais importante neste período. Interessante notar que 72 horas após o tratamento, o limiar de sensibilidade encontrava-se aumentado antes da administração dos antagonistas administrados tanto por via intraganglionar quanto por via intratecal. Considerando que as substâncias administradas por via intratecal alcançam os gânglios da raiz dorsal, podemos inferir que há um componente periférico na sensibilização neuronal neste momento. Novamente, os efeitos analgésicos observados uma hora após a administração dos antagonistas NMDA administrados por via intratecal sugerem a participação destes receptores na sensibilização central. Esses resultados concordam com pesquisas anteriores que mostraram a capacidade de antagonistas do receptor NMDA em prevenir manifestações possivelmente ligadas à potenciação de longa duração que ocorre em neurônios de segunda ordem na medula espinhal (ZHOU, 2009; CHIZH, 2007). A administração i.t. de antagonistas como MK-801, cetamina e memantina em modelos de neuropatia propiciaram a diminuição da hiperexcitabilidade e hiperatividade dos neurônios do corno dorsal da medula, produzindo redução da sensibilidade térmica e mecânica (SOTGIU e BIELLA, 2000; SUZUKI et al., 2001).

Além do processo inflamatório, sabe-se que a dor neuropática é uma manifestação de neuroplasticidade. Mudanças na periferia após trauma levam ao fenômeno de sensibilização e hiperalgesia. Essa sensibilização, entretanto possui um componente central. A sensibilização central é um estado em que a excitabilidade no corno dorsal da

medula aumenta, e como consequência, a resposta ao estímulo sensorial é facilitada (PETRENKO et al., 2003). Uma das formas de plasticidade sináptica é a 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 grade característica do LTP é a necessidade de ativação dos receptores NMDA (ZHUO, 2009). Dessa forma, o bloqueio desses receptores por meio de antagonistas reduz significativamente a indução de LTP, justificando os resultados encontrados.

Como discutido anteriormente, a participação dos receptores NMDA medulares no desenvolvimento da dor crônica já foi relatada e estabelecida em outros estudos (EISENBERG e PUD, 1998; EIDE, 2000; LEFÈVRE et al., 2015). Por essa razão não foi surpresa observar que os grupos tratados por via i.t. apresentaram melhora significativa ao longo das semanas após o tratamento. Enquanto o grupo tratado com d-AP5 i.t. apresentou melhora significativa a partir do 21º dia após a cirurgia, o grupo tratado com cetamina exibiu aumento significativo no limiar mecânico a partir do 7º dia após a cirurgia. Possivelmente esse resultado se deve ao fato da cetamina ser um dos antagonistas mais potentes disponíveis atualmente e possuir outras atividades, como interação com receptores opióides e bloqueio de outros receptores glutamatérgicos (HIROTA e LAMBERT, 1996; SHEN et al., 2016). Também é possível observar no gráfico que o grupo tratado com d-AP5 por via i.gl. apresentou um comportamento similar ao grupo tratado com o antagonista por via i.t., apresentando inclusive redução significativa na sensibilidade mecânica no 21º dia após a cirurgia. De mesmo modo, apesar do grupo cetamina i.t. demonstrar atividade já na primeira semana após a constrição, ao fim do experimento apresentou média estatisticamente idêntica ao grupo d-AP5 i.t., demonstrando não haver diferenças entre os efeitos das drogas em longo prazo.

Especula-se que a administração i.gl. de antagonistas diminuiu a atividade ectópica das fibras aferentes no GRD durante os primeiros dias após a cirurgia, quando possivelmente essa atividade estava em seu ponto máximo. De acordo com Liu (2000), o disparo ectópico é o fator causador do desenvolvimento da sensibilização central, sendo então, possível deduzir que a administração i.gl. de antagonistas de receptores NMDA pode de maneira indireta, evitar a sensibilização central, o que justificaria os resultados encontrados. Deste modo, verificamos que embora o efeito analgésico obtido pela administração intratecal de antagonistas NMDA nos primeiros dias após a cirurgia pareça ser superior ao efeito da administração de antagonista por via intraganglionar, ambos apresentaram efeitos semelhantes em prazo maior. Sugere-se, portanto, a participação de receptores NMDA presentes nos gânglios sensoriais e de células satélites gliais no desenvolvimento da dor neuropática. Ainda não foi possível realizar o experimento com administração intraganglionar de cetamina, que será realizado posteriormente e pode contribuir para o fortalecimento desta hipótese.

Entendemos que em muitas situações não é possível prever o desenvolvimento de neuropatias de forma que seja possível um tratamento no início do processo. Entretanto, este não é o caso para um dos tipos de dor crônica bastante frequente, que é a dor crônica pós-cirúrgica. A dor crônica pós-cirúrgica é considerada uma dor neuropática, causada pela lesão de nervos no sítio cirúrgico (DWORKIN et al., 2010). Neste caso, é possível adequar o tratamento dos pacientes durante a cirurgia e período pós-cirúrgico de forma a minimizar o desenvolvimento deste tipo de dor. Ainda, conhecimento da participação de receptores NMDA periféricos no desenvolvimento da dor neuropática pode levar ao desenvolvimento de tratamentos melhores para este tipo de dor. Já que os antagonistas de receptores NMDA disponíveis provocam diversos efeitos adversos que limitam sua utilização devido à ação central dos mesmos, os receptores presentes nos GRD podem

constituir um melhor alvo terapêutico, tendo em mente que estão localizados fora da barreira hematoencefálica. O design de antagonistas NMDA que tenham ação exclusivamente periférica pode permitir o tratamento de dor neuropática e possivelmente de outros tipos de dor sem indução dos efeitos adversos centrais dos antagonistas conhecidos.

6. CONCLUSÃO

- A administração de antagonista NMDA por via intraganglionar apresentou efeito analgésico agudo nos primeiros 1 ou 2 dias após lesão do nervo periférico sugerindo a participação de células satélites gliais neste momento.
- A administração de antagonistas NMDA por via intratecal induziu efeito analgésico em praticamente todos os dias testados, sugerindo um papel dos receptores NMDA medulares no processamento da dor ou em sensibilização central.
- Em longo prazo, o efeito da administração intraganglionar de antagonista NMDA d-AP5 foi semelhante àquele obtido pela administração intratecal do mesmo antagonista, indicando a participação de receptores NMDA periféricos, provavelmente em células satélites gliais, no desenvolvimento da dor neuropática.
- Cetamina parece ter um efeito melhor que d-AP5, quando administrados por via intratecal, sobre o desenvolvimento da dor de origem neuropática.
- Antagonistas NMDA de ação preferencialmente periférica podem ser úteis no tratamento de dores de origem neuropática, possivelmente apresentando menos efeitos adversos.

REFERÊNCIAS

AMIR, R.; MICHAELIS, M.; DEVOR, M. Burst Discharge in Primary Sensory Neurons: Triggered by Subthreshold Oscillations, Maintained by Depolarizing Afterpotentials. **The Journal of Neuroscience**, v.22, n.3, p.1187–1198. 2002.

ARALDI, D, FERRARI, L.F., 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.

AUSTIN, P. J.; WU, A.; MOALEM-TAYLOR, G. Chronic Constriction of the Sciatic Nerve and Pain Hypersensitivity Testing in Rats. **Journal of Visualized Experiments**, n. 61, p. 1–6. 2012.

BASBAUM A., JESSELL T. The perception of pain. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editors. Principles of Neural Science. 4^a ed. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division; 2000.

BENNETT, J.; XIE, Y. 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.

BORSOOK, D. et al. Surgically induced neuropathic pain: understanding the perioperative process. **Ann Surg**, v. 257, n. 3, p. 403–12. 2013.

CHAKRABORTY, A.; MURPHY, S.; COLEMAN, N. The role of NMDA receptors in neural stem cell proliferation and differentiation. **Stem Cells and Development**, p. scd.2016.0325. 2017.

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, n. 3, p. 259–71. 2007.

CHIZH, B. A. Novel approaches to targeting glutamate receptors for the treatment of chronic pain: Review article. **Amino Acids**, v. 23, n. 1–3, p. 169–176, 2002.

COLLINS, S. et al. Review Article NMDA Receptor Antagonists for the Treatment of Neuropathic Pain. **Pain Medicine**, p. 1726–1742. 2010.

COLLOCA, L. et al. Neuropathic pain. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17002. 2017.

COSTA, F. A. L.; MOREIRA NETO, F. L. Células gliais satélite de gânglios sensitivos: O seu papel na dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 65, n. 1, p. 73–81. 2015.

DAHL, B.; KEHLET, H. Preventive analgesia. **Current Opinion in Anesthesiology**, v. 24, n. 3, p. 331-338, 2011.

DEVOR, M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. **Pain**, v. 82, p. S27–S35. 1999.

DWORKIN, R. H.; MCDERMOTT, M. P.; RAJA, S. N. Preventing Chronic Postsurgical Pain. **Anesthesiology**, v. 112, p. 516–518. 2010.

EIDE, P. K. Wind-up and the NMDA receptor complex from a clinical perspective. **European Journal of Pain**, v. 4, n. 1, p. 5–15. 2000.

EISENBERG, E.; PUD, D. Can patients with chronic neuropathic pain be cured by acute administration of the NMDA receptor antagonist amantadine? **Pain**, v. 74, n. 2–3, p. 337–339. 1998.

FERRARI, L. F. et al. A novel technique to perform direct intraganglionic injections in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 159, n. 2, p. 236–243. 2007.

FERRARI, L. F. et al. Inflammatory sensitization of nociceptors depends on activation of NMDA receptors in DRG satellite cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 51, p. 18363–18368. 2014.

GABAY, E.; TAL, M. Pain behavior and nerve electrophysiology in the CCI model of neuropathic pain. **Pain**, v. 110, n. 1–2, p. 354–360. 2004.

GRAPE, S.; TRAMÈR, R. Do we need preemptive analgesia for the treatment of postoperative pain? **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 21, n. 1, p. 51–63, 2007.

GUILBAUD, G. et al. Time course of degeneration and regeneration of myelinated nerve fibres following chronic loose ligatures of the rat sciatic nerve: can nerve lesions be linked to the abnormal pain-related behaviours? **Pain**, v. 53, n. 2, p. 147–158. 1993.

HAMA, A.; SAGEN, J. Selective antinociceptive effects of a combination of the N-methyl-D-aspartate receptor peptide antagonist [Ser(1)] histogranin and morphine in rat models of pain. **Pharmacology research & perspectives**, v. 2, n. 2, p. e00032. 2014.

HANANI, M. Satellite glial cells in sensory ganglia: From form to function. **Brain Research Reviews**, v. 48, n. 3, p. 457–476. 2005.

HANANI, M. et al. Satellite glial cells in dorsal root ganglia are activated in streptozotocin-treated rodents. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 18, n. 12, p. 2367–2371. 2014.

HIROTA, K.; LAMBERT, D. G. Ketamine: its mechanism(s) of action and unusual clinical uses. **British Journal of Anaesthesia**, v. 77, n. 4, p. 441–444. 1996.

KAJANDER, K. C.; POLLOCK, C. H.; BERG, H. Evaluation of hindpaw position in rats during chronic constriction injury (CCI) produced with different suture materials. **Somatosensory & motor research**, v. 13, n. 2, p. 95–101. 1996.

KARANIKOLAS, M. et al. Optimized Perioperative Analgesia Reduces Chronic Phantom Limb Pain Intensity, Prevalence, and Frequency A Prospective, Randomized, Clinical Trial. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 114, n. 5, p. 1144–1154, 2011.

- KEHLET, H.; JENSEN, T. S.; WOOLF, C. J. Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. **The Lancet**, v. 367, n. 9522, p. 1618–1625. 2006.
- LI, L. et al. Chloride Homeostasis Critically Regulates Synaptic NMDA Receptor Activity in Neuropathic Pain. **Cell Reports**, v. 15, n. 7, p. 1376–1383. 2016.
- LEFÈVRE, Y. *et al.* Neuropathic pain depends upon d-serine co-activation of spinal NMDA receptors in rats. **Neuroscience Letters**, v. 603, p. 42–47. 2015.
- LIEBERMAN, AR. Sensory ganglia, in: D.N. Landon (Ed.), *The Peripheral Nerve*, Chapman and Hall, London, p. 188–278. 1976.
- LIU, C. N. et al. Tactile allodynia in the absence of C-fiber activation: Altered firing properties of DRG neurons following spinal nerve injury. **Pain**, v. 85, n. 3, p. 503–521. 2000.
- LIU, X., ZHOU JL., CHUNG, K., CHUNG, JM. Ion channels associated with the ectopic discharges generated after segmental spinal nerve injury in the rat. **Brain Res.** v. 900, p. 119–127. 2001.
- LIU, F. Y. et al. Activation of satellite glial cells in lumbar dorsal root ganglia contributes to neuropathic pain after spinal nerve ligation. **Brain Research**, v. 1427, p. 65–77, 2012.
- LOESER, J.D., TREEDE R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v.137, n.3, p. 473–477. 2008.
- MARTINEZ, V. et al. Clinical, histological, and biochemical predictors of postsurgical neuropathic pain. **Pain**, v. 156, n. 11, p. 2390–2398, 2015.
- MAVES, J. et al. Possible chemical contribution from chronic gut sutures produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 54, n. 1, p. 57–69, 1993.
- MERSKEY, H; BOGDUK, N. Classification of chronic pain. 2nd ed. Seattle: IASP Press. 1994.
- MESTRE, C. et al. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 32, n. 4, p. 197–200, 1994.
- MORRIS, R. G. M. NMDA receptors and memory encoding. **Neuropharmacology**, v. 74, p. 32–40. 2013.
- NICKEL, F. et al. Mechanisms of neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 81–91. 2012.
- OHARA, Peter T. et al. Gliopathic pain: when satellite glial cells go bad. **The Neuroscientist**, v. 15, n. 5, p. 450–463, 2009.
- OLIVEIRA, L. M. As Dores. In: Lent, R. *Neurociência da Mente e do Comportamento*. 1ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 8. p. 183–201. 2008.

PARSONS, C. G. NMDA receptors as targets for drugaction in neuropathicpain. **Eur J Pharmacol**, v. 429, n. 1–3, p. 71–8. 2001.

PETRENKO, A. B. et al. The Role of N-Methyl-d-Aspartate (NMDA) Receptors in Pain: A Review. **Anesthesia & Analgesia**, p. 1108–1116. 2003.

PURVES, D. et al. **Neurociências** – Cap. 10. 4 Ed. p. 231-250. 2010.

SHEN, Y. *et al.* The effects of an intraperitoneal single low dose of ketamine in attenuating the postoperative skin/muscle incision and retraction-induced pain related to the inhibition of N-methyl-d-aspartate receptors in the spinal cord. **Neuroscience Letters**, v. 616, p. 211–217. 2016.

SOTGIU, M. L.; BIELLA, G. Differential effects of MK-801, a N-methyl-d-aspartate non-competitive antagonist, on the dorsal horn neuron hyperactivity and hyperexcitability in neuropathic rats. **Neuroscience Letters**, v. 283, n. 2, p. 153–156. 2000.

SUZUKI, R.; MATTHEWS, E. A.; DICKENSON, A. H. Comparison of the effects of MK-801, ketamine and memantine on responses of spinal dorsal horn neurones in a rat model of mononeuropathy. **Pain**, v. 91, n. 1, p. 101–109. 2001.

VIVANCOS, G. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 3, p. 391-399, 2004.

WOODHAM, P. et al. Satellite cells surrounding axotomised rat dorsal root ganglion cells increase expression of a GFAP-like protein. **Neuroscience Letters**, v. 98, n. 1, p. 8–12. 1989.

WU, L.; ZHUO, M. Targeting the NMDA receptor subunit NR2B for the treatment of neuropathic pain. **Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental Neuro Therapeutics**, v. 6, n. 4, p. 693–702, 2009.

ZHUO, M. Plasticity of NMDA receptor NR2B subunit in memory and chronic pain. **Molecular Brain**, v. 2, n. 1, p. 4. 2009.

ZHUO, M.; WU, G.; WU, L. Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain. **Molecular Brain**, v. 4, n. 1, p. 31, 2011.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, n.2, p.109-10.1983.



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação do tratamento com antagonistas do receptor NMDA no desenvolvimento de dor neuropática pós-operatória”, protocolo nº 025/16, 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 **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de **20 de maio de 2016**.

(We certify that the project entitled "Avaliação do tratamento com antagonistas do receptor NMDA no desenvolvimento de dor neuropática pós-operatória", protocol 025/16, 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 20th, 2016).

Vigência do Projeto	Início: 01/07/2016 Término: 01/07/2017
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Ratos Wistar
Número de animais	40 a 80
Peso / Idade	200 g / 8 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem / Local	Biotério CBEA/UFU
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 25 de maio de 2016.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU