

Universidade Federal de Uberlândia
Faculdade de Educação Física e Fisioterapia

Jhony Arthur da Silva

**Estudo do papel de receptores periféricos, presentes no gânglio da raiz dorsal, na
analgesia induzida por antagonistas de receptores NMDA**

Universidade Federal de Uberlândia
Faculdade de Educação Física e Fisioterapia

Jhony Arthur da Silva

**Estudo do papel de receptores periféricos, presentes no gânglio da raiz dorsal, na
analgesia induzida por antagonistas de receptores NMDA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Uberlândia, como
requisito para obtenção de título de bacharel
em fisioterapia

Orientadora: Profª. Dra. Celina Lotufo

Sumário

1. Introdução	4
2. Objetivos:	7
3. Metodologia	7
3.1. Animais	7
3.2 Fármacos utilizados	8
3.3. Testes comportamentais	8
3.3.1 Teste da capsaicina	8
3.3.2. Teste da carragenina	9
3.3.3. Teste da do campo aberto	10
4. Análise estatística:	11
5. Resultados	11
5.1. Resultados da participação dos receptores NMDA na nocicepção induzida por capsaicina	11
5.2. Resultados da participação dos receptores NMDA na nocicepção induzida por carragenina	13
5.3 Resultados da participação dos receptores NMDA no teste do campo aberto	15
6. Discussão	16
7. Conclusão	21
8. Referências	21

1. Introdução

Nos dias atuais, a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) conceitua a dor como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial” (DESANTANA, J. M. et al. 2020)

Portanto, a dor, em seu sentido amplo, é uma experiência subjetiva, envolvendo percepção e 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).

Já a nocicepção, em contrapartida, trata-se de um sistema sensorial que transmite ao sistema nervoso central informações do meio interno e externo que são usadas para diversos ajustes do funcionamento do organismo sem necessariamente chegar ao nível consciente (LENT, 2008).

Dessa forma, as etapas fisiológicas da dor nociceptiva ocorrem da seguinte forma: primeiramente temos processo de transdução, que se baseia na conversão dos estímulos ambientais, químicos ou físicos em potenciais de ação ao longo das fibras nervosas do sistema nervoso periférico para as do sistema nervoso central. Desse modo, o sinal elétrico só é gerado ao longo dos neurônios periféricos aferentes primários (também chamados de nociceptores), quando os estímulos térmicos, químicos ou físicos, superam o limiar de excitação ao interagirem com os receptores nociceptivos, deflagram um potencial de ação através do neurônio aferente de primeira ordem, para seu corpo celular, encontrado no gânglio da raiz dorsal (GRD), que por fim é direcionado para os neurônios de segunda ordem, rumo ao sistema nervoso central, a fim de obter a interpretação do estímulo doloroso pelo cérebro.

Além do mais, em situações de lesão tecidual ocorre um processo denominado sensibilização de nociceptores (sensibilização periférica ou hiperalgesia), 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 provocada por um estímulo nociceptivo. 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 na 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, prostanoídes, fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas, que com prótons e ATP compõem o que ficou conhecido como "sopa inflamatória" que é "experimentada" pela terminação do nociceptor e, como resultado, o 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, em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, foi observado que, quando administrada por via intraplantar, a PGE2 sensibiliza os neurônios periféricos e que essa sensibilização é inibida por administração interganglionar 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).

Sendo assim, a possível participação de receptores NMDA, alvo dos neurotransmissores glutamatérgicos, periféricos na sensibilização foi verificada apenas recentemente (FERRARI et al., 2014). Logo, é válido ressaltar, que este estudo demonstrou que esses receptores também estão presentes nos gânglios da raiz dorsal, mais especificamente, em células satélites gliais (CSGs). A participação de receptores NMDA na nocicepção é conhecida há bastante tempo, sendo que receptores NMDA presentes em neurônios de segunda ordem têm sido considerados os principais responsáveis por processos

de sensibilização central, na medula espinhal, em processos de dor crônica (SASHMAWI, H. A.; FREIRE, G. M. G, 2016.). Os gânglios sensitivos contêm os corpos celulares de neurônios aferentes que transmitem informações sensoriais da periferia para o sistema nervoso central 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 sistema nervoso central através de um gânglio da raiz dorsal (GRD). Estas estruturas se localizam perto da entrada de raízes dorsais da medula espinhal e não fazem parte do sistema nervoso central. 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 sistema nervoso central, 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).

Portanto, há fortes evidências, segundo estudos publicados por Ferrari et al. (2014), 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 células satélites gliais possuem receptores para NMDA, é possível que esses mediadores neuronais também participem da excitação cruzada entre o neurônio aferente primário e as células satélites gliais (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.

A dor influencia significativamente na qualidade de vida das pessoas, podendo gerar a incapacitação para o trabalho e ocasionar graves consequências psicossociais e econômicas. Este estudo faz parte de um projeto mais amplo que visa determinar se a analgesia induzida por cetamina pode ocorrer pelo bloqueio de receptores NMDA periféricos. Com isso, nosso estudo visou comparar os efeitos de dois antagonistas de receptores NMDA, a cetamina, que é muito utilizada na clínica e possui efeito central, e um antagonista que não é permeável à barreira hematoneural, podendo apresentar um efeito periférico, o 5-7-DCK. No estudo aqui

apresentado, realizamos experimentos para avaliar se as doses de cetamina necessárias para promover analgesia apresentam efeitos no sistema nervoso central. Dessa forma, o presente 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. Fato este que amplia e aprimora a utilização desses antagonistas na clínica médica como uma forma de amenizar a dor e melhorar a qualidade de vida das pessoas.

2. Objetivos:

Verificar o papel dos NMDAR periféricos, presentes no gânglio da raiz dorsal, na analgesia induzida pelo antagonista cetamina em modelos de dor e hiperalgesia em ratos.

- Determinar os efeitos da administração sistêmica (i.p.) da cetamina em modelos de dor e hiperalgesia em ratos.
- Verificar os efeitos da administração de cetamina sistêmica (i.p.) sobre receptores presentes no sistema nervoso central através da avaliação do efeito da cetamina sobre o comportamento motor de ratos.

3. Metodologia

3.1. Animais

Os testes foram e continuarão sendo realizados, utilizando ratas da espécie Wistar, com uma média de 10 animais por grupo. Todos os animais foram mantidos e devidamente tratados em salas com temperatura ideal, ciclo de luminosidade controlada, acesso à água e ração pelo instituto REBIR- UFU (rede de biotério). Além do mais, é válido afirmar que os experimentos obedeceram às normas éticas estabelecidas para experimentação com animais acordados. Ademais, para a realização dos experimentos, foi submetido, primeiramente, permissão ao Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia, registrada sob o protocolo 090/19.

3.2 Fármacos utilizados

- Capsaicina (Sigma)
 - Dose de 50 μ L contendo 10 μ g de capsaicina;
 - Via intraplantar;
 - Frequência única.
- Cetamina (Syntec) primeiro protocolo:
 - Dose de 0,5 mg/kg e 5 mg/kg, por via intraperitoneal;
 - Frequência única.
- Cetamina (Syntec) segundo protocolo:
 - Dose de 15 mg/kg e 30 mg/kg, por via intraperitoneal;
 - Frequência única.
- Carragenina (Sigma)
 - Dose de 100 μ g em 50 μ L de solução salina em ratos;
 - Via intraplantar;
 - Frequência única

3.3. Testes comportamentais

3.3.1 Teste da capsaicina

A capsaicina, um gradiente irritante encontrado na pimenta, assim como os ácidos, podem ser identificados por meio de um transdutor comum conhecido como VR1 (receptores de potencial transitório vaniloide do tipo I), delineando elementos de redundância na nocicepção (LENT, 2008). A ativação adequada de um número suficiente dessas moléculas instiga a geração de potenciais de ação, os quais são então conduzidos pelos axônios das fibras amielínicas C e mielínicas A δ em direção ao sistema nervoso central, desencadeando uma sensação de dor em estruturas supra-espinhais. Dessa forma, este teste visou uma injeção intraplantar, na pata direita do animal experimentado, com uma dose de 50 μ L contendo 10 μ g de capsaicina (em NaCl 0,9% contendo 1% de DMSO), utilizando uma seringa BD Ultra-fine II. É válido frisar que essa injeção foi subcutânea. Sendo assim, após a injeção intraplantar de capsaicina, o animal foi observado durante 5 minutos e registrado o número de sacudidas ou lambidas da pata, chamada de “reações nociceptivas”. A administração dos antagonistas foi realizada 15 minutos antes da injeção da capsaicina.

3.3.2. Teste da carragenina

Antes da realização do teste da carragenina, foi realizado um treinamento para o uso do von Frey, definido por um filamento utilizado para investigar o limiar de detecção tátil em testes sensoriais quantitativos, gerando uma pressão na pata dos animais e registrado o valor da força aplicada para que o animal retire a pata. Dessa forma, utilizamos os 5 animais que foram utilizados, anteriormente, para avaliar o efeito do antagonismo de receptores de NMDA no gânglio da raiz dorsal, no teste nociceptivo da capsaicina.

Desse modo, o teste da carragenina teve a finalidade de avaliar a hiperalgesia inflamatória das ratas Wister. Portanto, este teste consistiu na injeção intraplantar de um estímulo inflamatório não específico, a carragenina, um polissacarídeo isolado de alga. Consequentemente, esta injeção causa uma intrínseca resposta inflamatória, induzindo um aumento de sensibilidade dolorosa (hiperalgesia). Nas ratas, a sensibilidade mecânica foi avaliada por meio de um estesiômetro eletrônico (von Frey eletrônico Insight), caracterizado como um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g), ilustrado na “figura 1”. Desta forma, foi aplicada uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata da rata, com o objetivo de evidenciar seus devidos comportamentos nociceptivos, caracterizada como sacudida ou reflexo de retirada da pata estimulada. É válido afirmar, que o reflexo de retirada da pata é considerado representativo do limiar hipernociceptivo, ou seja, a força necessária aplicada à pata para que induza uma resposta aversiva a um estímulo nocivo.

Além disso, primeiro foi avaliado e registrado a sensibilidade mecânica dos animais antes da administração da carragenina (basal). Dessa forma, após as injeções intraplantar da mesma, a sensibilidade mecânica foi avaliada após 1, 4,5 e 6 horas. Ademais, 3 medidas foram realizadas para cada tempo experimental em cada animal. Os antagonistas ou veículo testados foram injetados 2 horas e 45 minutos após a administração de carragenina, isto é, 15 minutos antes do pico de sensibilização induzido por carragenina que ocorre após 3 horas da administração.



Figura 1. Von Frey sendo aplicada na pata traseira do rato. Fonte: retirado de métodos experimentais, 2019

3.3.3. Teste da do campo aberto

O teste do campo aberto é uma ferramenta amplamente utilizada na pesquisa comportamental para avaliar a atividade locomotora e a exploração de um animal em um ambiente desconhecido e aberto (RAVANDI et al., 2019).

Dessa forma, na pesquisa vigente, o teste teve como objetivo avaliar a atividade motora dos ratos e camundongos sob a dosagem de Cetamina. A fim de ponderar os efeitos centrais e periféricos dos fármacos, decorrente das suas dosagens.

Sendo assim, o teste foi realizado em uma arena circular, dividida por marcações em uma área central e uma área periférica, cada uma destas seccionadas em 8 partes, ilustrado na “Figura 2”. Por via intraperitoneal, foram administrados os antagonistas (ou veículos). Após 15 minutos da aplicação, foi avaliado os efeitos comportamentais do roedor. Então, cada animal, individualmente, foi posicionado no centro do campo, tendo a liberdade de explorá-lo livremente por 5 minutos. Os comportamentos dos animais, durante o teste, foram registrados por uma câmera de vídeo posicionada acima do aparato para posterior análise do cruzamento de linhas no centro e na periferia; bem como o número de rearing (empinamento).

Além disso, é válido afirmar que para avaliar os efeitos periféricos da Cetamina, foram analisadas as doses necessárias para promoção de analgesia e comparar com as doses que induzem efeitos centrais sobre o controle motor dos animais, através do teste do campo aberto.



Figura 2. Animal submetido ao teste do campo aberto. Fonte: retirado de Arrifano et. al, 2020.

4. Análise estatística:

Após análise da normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, as médias foram comparadas através de teste t ou ANOVA seguida de teste de Bonferroni, no caso de comparação entre mais de duas médias. No caso dos dados obtidos que não apresentaram distribuição normal, foram utilizados os testes de Mann-Whitney ou o teste de Kruskal-Wallis, de acordo com a quantidade de médias a serem comparadas. O nível de significância foi estabelecido em 0,05.

5. Resultados

5.1. Resultados da participação dos receptores NMDA na nocicepção induzida por capsaicina

Como a cetamina é um anestésico e analgésico amplamente utilizado na prática médica, ao administrá-la no animal e posteriormente provocar uma nocicepção por capsaicina nos animais, é esperado que o animal, de acordo com seus sinais comportamentais, tenha uma redução do número de reações nociceptivas. O gráfico 1 mostra os resultados observados nos

animais controle e tratados com as duas doses de cetamina por via intraperitoneal (2,5 e 5 mg/kg). Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) de uma via, através do aplicativo “GraphPad Prism, versão 5.00”. Os resultados mostraram que não houve efeito analgésico significativo com as doses testadas. Neste contexto, procedemos a aumentar as doses de cetamina para 15mg/kg e 30mg/kg, conforme demonstrado no gráfico 2. Além da alteração nas doses, encontramos um estudo (Analgesic, 2000, p. 520) que sugeriu que o tempo de efeito máximo quando a cetamina é administrada por via intratecal é de 15 minutos. Por este motivo, no experimento seguinte passamos a injetar a capsaicina após 15 minutos da administração da cetamina. Os resultados deste segundo experimento indicaram a manifestação de um efeito analgésico significativo com as doses de 30mg/kg testadas.

Teste de nociceção induzida por capsaicina em ratos

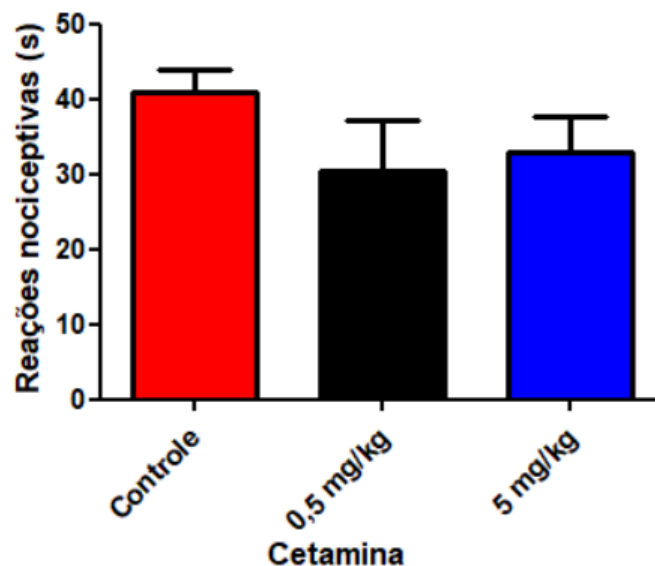


Gráfico 1. Foram utilizados nos animais testados a via de administração intraperitoneal da Cetamina (0,5 ou 5 mg/kg), após 30 minutos foi administrado por via intraplantar a Capsaicina (10 µg em 50 µl, em NaCl 0,9% contendo 1% de DMSO), em seguida foram avaliados os estímulos nociceptivos do animal por 5 minutos. Está sendo mostrada a média e E.P.M de 5 animais por grupo.

Teste de nociceção induzida por capsaicina em ratos

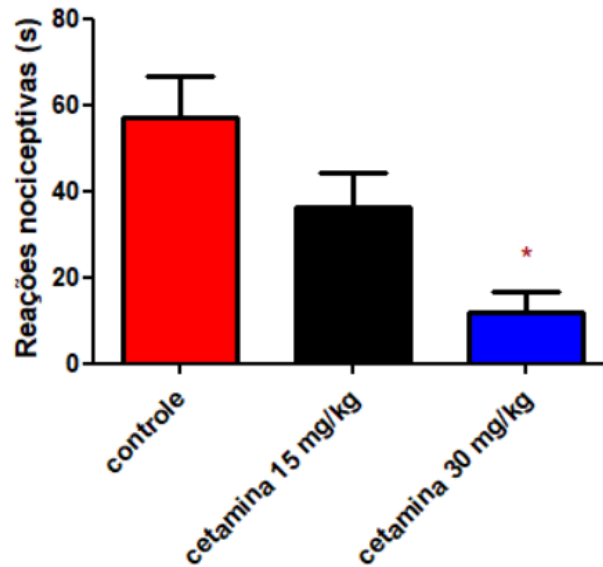


Gráfico 2. Teste de nociceção induzida por capsaicina. Foram utilizados nos animais testados a via de administração intraperitoneal da Cetamina (15 ou 30 mg/kg), após 30 minutos foi administrado por via intraplantar a Capsaicina (10 µg em 50 µl, em NaCl 0,9% contendo 1% de DMSO), em seguida foram avaliados os estímulos nociceptivos do animal por 5 minutos. *P<0,05 diferente do grupo controle (Anova seguida de teste de Bonferroni). Está sendo mostrada a média e E.P.M de 5 animais por grupo.

5.2. Resultados da participação dos receptores NMDA na nociceção induzida por carragenina

O teste da carragenina foi realizado para avaliar o efeito analgésico da cetamina em modelo de hiperalgesia inflamatória. Neste teste são avaliados os limiares de retirada da pata traseira dos animais frente a um estímulo mecânico. A administração de cetamina (2,5 ou 5 mg/kg) ou salina (controle) foi realizada após 2h45 da administração de carragenina. Deste modo, no gráfico 3 observamos inicialmente o efeito hiperalgésico da carragenina, que reduziu o limiar de sensibilidade mecânica após 1h30'. No tempo de 3 horas foi avaliado o efeito da administração de cetamina. No entanto, a análise estatística (teste de ANOVA de duas vias) obtido através do aplicativo “GraphPad Prism, versão 5.00” mostrou que não ocorreu efeito analgésico nas doses testadas neste experimento.

No gráfico 4, observa-se o efeito da carragenina, com incremento na dose de cetamina para 15 mg/kg e 30mg/kg. Este segundo experimento, com variações nas dosagens, demonstrou que houve manifestação de efeito analgésico tanto nas doses de 15mg/kg quanto

nas de 30mg/kg, com maior relevância estatística nas doses de 30mg/kg testadas neste experimento.

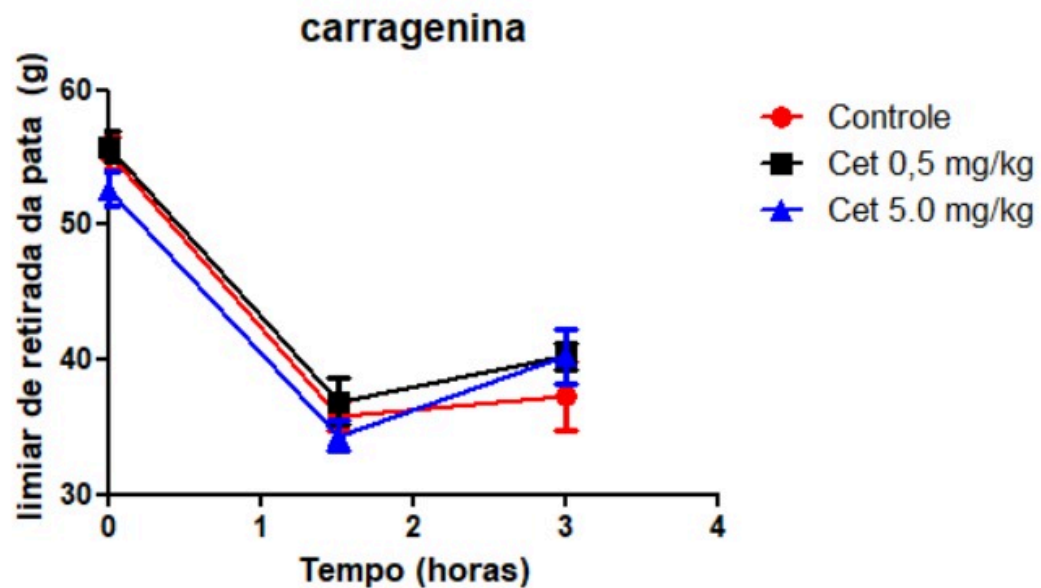


Gráfico 3. Teste de nocicepção induzida por carragenina. Avaliação do limiar mecânico em von Frey eletrônico; Primeiramente foi quantificado os valores basais (antes da administração da carragenina). Após um período de 1,5 e 3 horas da aplicação da carragenina (100 μ g em 50 μ l), por via intraplantar, foi avaliado e quantificado a sensibilidade mecânica do animal. Os antagonistas foram administrados 2 horas e 45 minutos após a Carragenina. O experimento apresentou uma média de 10 animais por grupo

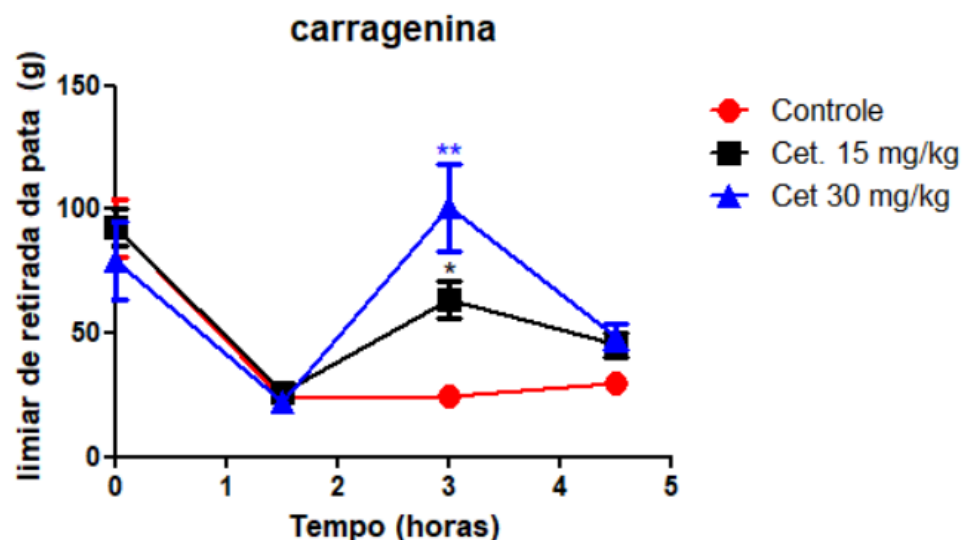


Gráfico 4. Teste de nociceção induzida por carragenina. Avaliação do limiar mecânico em von Frey eletrônico; Primeiramente foram quantificados os valores basais, antes da administração da carragenina (tempo 0). Após um período de 1,5 e 3 horas da aplicação da carragenina (100 µg em 50 µl), por via intraplantar, foi avaliado e quantificado a sensibilidade mecânica do animal. Os antagonistas foram administrados 2 horas e 45 minutos após a Carragenina. * $P < 0,05$ vs. grupo controle. ** $P < 0,001$ vs. grupo controle (Anova de duas vias seguida por teste de Bonferroni). Está sendo mostrada a média e E.P.M de 6 animais por grupo.

5.3 Resultados da participação dos receptores NMDA no teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi empregado para avaliar o impacto da cetamina na atividade motora dos ratos experimentais. O antagonista foi administrado por via intraperitoneal 15 minutos antes do início do teste. Cada animal foi individualmente posicionado no centro do aparato e permitido explorar o ambiente livremente por um período de 5 minutos. Os comportamentos foram subsequentemente analisados e quantificados, incluindo o cruzamento de linhas tanto no centro quanto na periferia e o número de empinamentos (rearing) (RAVANDI et al., 2019). Portanto, em relação à análise estatística conduzida por meio da metodologia de ANOVA de duas vias, utilizando o aplicativo "GraphPad Prism, versão 5.00",

evidenciou-se um efeito analgésico com diferença estatisticamente significativa apenas no grupo submetido à injeção de cetamina na dose de 30 mg/kg, conforme representado no Gráfico 5.

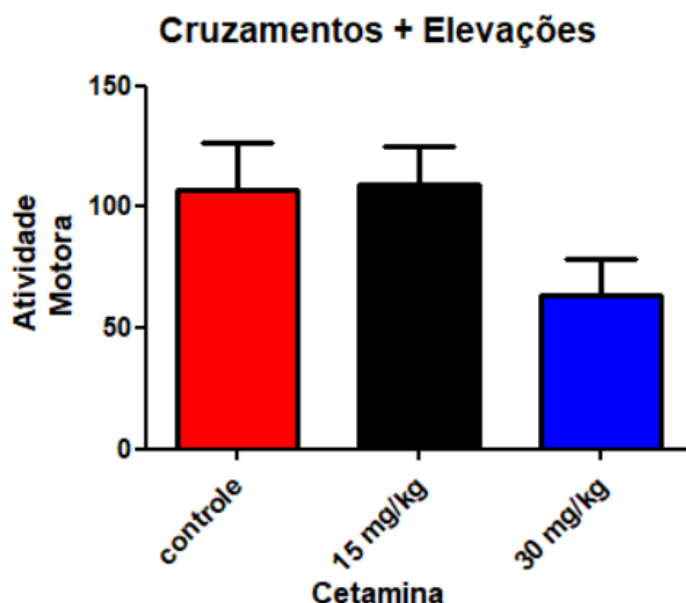


Gráfico 5. Teste do campo aberto. Teste que visa avaliar a influência da cetamina na atividade motora dos ratos experimentados. Os animais foram segregados em três grupos distintos: um grupo de controle, que recebeu injeção de salina, e dois grupos adicionais que foram administrados com cetamina, nas doses de 15 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente. Todos os grupos receberam administração por via peritoneal. Após um intervalo de 15 minutos desde a administração do veículo, os animais foram submetidos ao teste, com o propósito de analisar e quantificar suas atividades motoras.

6. Discussão

O glutamato é o aminoácido mais abundante no sistema nervoso central atuando como o principal neurotransmissor no encaminhamento do sinal doloroso entre neurônios de primeira e segunda ordem na medula espinal. Com isso, a participação dos receptores NMDA medulares é considerada fundamental nos processos de sensibilização central, notadamente em contextos de dor crônica e neuropática (MECANISMO, 2014, p. 58). Em estudo anterior de nosso grupo, mediante a administração intratecal e interganglionar de antagonistas dos

receptores N-metil D-aspartato (NMDA), observa-se uma manifestação consistentemente semelhante de analgesia induzida através destas duas vias de administração em distintos modelos experimentais de dor (ARAÚJO DF.; 2019). Importante esclarecer que quando substâncias são administradas por via intratecal, estas substâncias terão acesso os neurônios medulares, no caso onde ocorrem as sinapses entre os neurônios de primeira e segunda ordem, mas também tem acesso direto aos gânglios da raiz dorsal, podendo atuar nos neurônios e nas células gliais periféricas. Por outro lado, a administração intraganglionar (ARALDI et al., 2013; SOUZA et al., 2013; FERRARI et al., 2007) permite avaliação do efeito das substâncias apenas no gânglio da raiz dorsal, onde se encontram os corpos celulares dos neurônios de primeira ordem e células gliais satélites. Dessa forma, tais resultados sugerem que a inibição dos receptores periféricos por meio da administração de antagonistas de NMDAR (receptores NMDA) desencadeia substanciais efeitos analgésicos que provavelmente se devem a um efeito periférico destes antagonistas sobre o gânglio da raiz dorsal. Esses dados, estabelecem bases para uma investigação mais profunda neste campo, com o objetivo de desenvolver fármacos analgésicos que não apresentem efeitos colaterais no nível motor ou induzam psicose.

No estudo conduzido por Ferrari et al. (2014), foi observada a contribuição dos receptores NMDA localizados em células satélites do gânglio da raiz dorsal para a manutenção da hiperalgesia induzida pela administração de prostaglandina E2 na pata de ratos. Isso se dá pela liberação de glutamato no gânglio da raiz dorsal e a ativação de receptores NMDA em células satélites gliais. Portanto, no estudo publicado anteriormente foi determinada a participação de receptores NMDA na hiperalgesia, ou seja, na sensibilização dos neurônios nociceptivos e não na transmissão do sinal nociceptivo. No estudo mais recente (ARAÚJO DF., et al 2019), verificamos que o antagonista de receptores NMDA, AP-5, administrado por via intraganglionar é capaz também de reduzir a dor manifesta, ou seja, na ausência de sensibilização. Estes resultados mudaram a nossa forma de entender o papel dos receptores NMDA nos gânglios da raiz dorsal e indicam que as células satélites gliais participam do processamento da dor e não somente em situações de hiperalgesia ou sensibilização. Portanto, entendemos agora que ocorre um processamento do sinal nociceptivo enquanto os potenciais de ação estão passando pelos gânglios sensoriais e a comunicação entre neurônios e células satélites gliais possivelmente resulta em uma amplificação do sinal que vai ser transmitido à medula espinhal, nas sinapses com os neurônios de segunda ordem.

Os resultados anteriores, citados acima, nos motivaram a avaliar o efeito analgésico produzido por administração de cetamina em ratos. A cetamina é utilizada na clínica principalmente para produzir anestesia, mas também tem uma utilização importante para produção de analgesia (URMAN R., et al 2016). Interessante notar que a dose de cetamina responsável por produzir analgesia é menor do que aquelas necessárias para produzir anestesia e parecem não causar efeitos adversos relacionados com a ação central da cetamina, como incoordenação motora, alucinações e outros. Em conjunto com os nossos resultados anteriores, estes dados nos levaram a levantar a hipótese de que o efeito analgésico da cetamina pode ocorrer através de uma ação periférica, pelo bloqueio dos receptores presentes nos gânglios da raiz dorsal.

Para determinar o efeito analgésico da cetamina, inicialmente, procedeu-se à avaliação do impacto da administração intraperitoneal (sistêmica) do antagonista do receptor NMDA no teste da capsaicina. Este protocolo experimental envolve a aplicação de capsaicina na pata do animal, seguida pela observação e registro das respostas comportamentais nociceptivas, incluindo o chacoalhar e a lambertura da pata afetada, ao longo de um intervalo de observação de 5 minutos. Os resultados obtidos neste estudo de maiores dosagens (15 e 30mg/kg), evidenciam uma redução significativa da nocicepção no grupo experimental submetido à injeção de 30 mg/kg de cetamina. Ademais, observa-se que os resultados da menor concentração de cetamina apresentaram uma tendência de redução da nocicepção. Mais experimentos serão realizados de forma a aumentar o tamanho da amostra para verificar se esta redução será mantida e é significativa. Importante salientar que os experimentos com animais são realizados em blocos de 5 ou 6 animais e só aumentamos o tamanho da amostra se necessário, de forma a reduzir a necessidade de utilização dos animais experimentais. Estudos adicionais corroboram que a capsaicina promove uma estimulação dos neurônios sensoriais aferentes primários, por meio de uma interação direta com os canais dos receptores de potencial transitório vaniloide do tipo I (TRPV1), os quais são abundantemente expressos por um subgrupo de nociceptores associados a fibras C (HOLZER, 1991). Sendo assim, sugere-se que a liberação de glutamato no gânglio da raiz dorsal (GRD) pelas fibras C, desencadeada pela despolarização e ativação dos TRPV1, resulte na ativação dos receptores NMDA, presumivelmente nas células satélites no GRD (FERRARI et al., 2014).

Outro modelo experimental empregado nesta pesquisa para investigação da dor foi o teste da carragenina (CUNHA et al., 2004; POOLE et al., 1999), utilizado para avaliar a hiperalgesia inflamatória. Este teste consiste na medição da variação do limiar de sensibilidade mecânica na pata dos animais. Assim, o polissacarídeo conhecido como

carragenina, obtido de algas, encontra ampla aplicação na indústria alimentícia. Contudo, quando administrado por injeção no tecido intraplantar dos animais, provoca uma resposta característica de inflamação aguda, marcada pela concentração de neutrófilos e pela liberação de mediadores inflamatórios, tais como TNF- α , PGE2 e IL-1 β (CUNHA et al., 2008). A aplicação do antagonista de NMDAR pela via intraperitoneal, foi eficiente para promover analgesia no modelo de hiperalgesia inflamatória nos grupos experimentais testados, com ênfase significativa para o grupo submetido à injeção de 30 mg/kg de capsaicina. A dor aguda inflamatória é mediada pela atividade das prostaglandinas, as quais promovem a sensibilização dos neurônios sensoriais aferentes primários associados às fibras C. Nesse contexto, o envolvimento dos receptores NMDA no GRD foi previamente descrito na sensibilização induzida pela prostaglandina E2 na pata de ratos. Os resultados delineados neste estudo apontam que os antagonistas do NMDAR manifestam um efeito analgésico em um modelo de inflamação aguda, insinuando que tal efeito possa ser associado à inibição dos receptores periféricos. Todavia, será novamente necessário ampliar o tamanho da amostra, com a inclusão de um maior número de animais por grupo, visando obter resultados conclusivos.

Os testes comportamentais realizados para avaliação de nocicepção em ratos são fundamentais para que possamos determinar o efeito analgésico da cetamina. No entanto, esta substância é capaz de atuar em neurônios do sistema nervoso central e produzir anestesia, além de outros efeitos que alteram o comportamento motor. Deste modo, a avaliação do efeito da cetamina sobre o comportamento motor nos permite inferir sobre a ação deste fármaco no sistema nervoso central. Para avaliar o impacto da cetamina na atividade motora dos animais experimentais, foi conduzido o teste do campo aberto. Este procedimento visa investigar os efeitos da substância sobre o comportamento locomotor dos animais. O teste foi realizado em uma arena circular, dividida por marcações em uma área central e uma área periférica, cada uma subdividida em 8 partes. A administração da cetamina foi realizada por via intraperitoneal, 15 minutos antes do início do teste, a fim de permitir sua absorção e consequente ação no sistema nervoso central. Cada animal foi posicionado individualmente no centro do dispositivo e teve a oportunidade de explorar livremente o ambiente por um período de 5 minutos. Durante esse tempo, os comportamentos foram registrados por uma câmera de vídeo posicionada acima do dispositivo. Posteriormente, esses registros foram analisados para avaliar quantitativamente o cruzamento de linhas tanto no centro quanto na periferia da arena, bem como o número de empinamentos (rearing), proporcionando uma compreensão mais abrangente dos efeitos da cetamina na atividade

motora dos animais (RAVANDI et al., 2019). A analgesia refere-se ao processo de redução ou eliminação da sensação de dor, preservando a consciência e a capacidade de responder a estímulos. Todavia, a anestesia é um estado farmacologicamente induzido de ausência de sensação, consciência e resposta a estímulos dolorosos (FISH, R. et al. 2006). Dessa forma, o grupo experimental administrado com 15 mg/kg aparentemente experimentou um efeito analgésico de natureza periférica, uma vez que esta dose de cetamina não afetou o comportamento motor. Por outro lado, o grupo tratado com 30 mg/kg, apresentou significativa diminuição da atividade motora. Portanto, considerando em conjunto os resultados dos testes para avaliação da nocicepção e o teste de comportamento motor, não é possível determinar o quanto do efeito analgésico observado ocorreu de fato pela diminuição da nocicepção e o quanto dependeu de anestesia ou sedação.

Considerando a possibilidade do uso da cetamina na promoção de analgesia periférica, os resultados dos experimentos apresentados neste estudo sugerem que esta substância apresenta efeito analgésico em baixas doses, nas quais ainda não se observa efeito central, no entanto uma dose apenas duas vezes maior já é suficiente para promover alteração motora, indicando um efeito central da cetamina. Além disso, quando comparamos o efeito obtido com a administração da menor dose (15 mg/kg) de cetamina sistêmica com o efeito da administração de outro antagonista, o AP-5, diretamente no gânglio da raiz dorsal (ARAÚJO DF., et al 2019), percebemos que é possível obter um efeito analgésico mais potente pelo antagonismo de NMDAR periféricos. Ou seja, o efeito central da cetamina dificulta a utilização deste fármaco como analgésico, já que a dose que provavelmente apresenta o melhor efeito analgésico produz efeitos adversos decorrentes do bloqueio de NMDAR centrais.

Assim, considerando que os efeitos colaterais associados ao uso de antagonistas de NMDAR na analgesia podem ser atribuídos à influência desses medicamentos sobre o sistema nervoso central (HAMA et al., 2003) a investigação do efeito analgésico nos receptores periféricos do gânglio da raiz dorsal fornece fundamentação para futuras pesquisas envolvendo medicamentos que não cruzam a barreira hematoencefálica/hematoneural. Considerando que nossa equipe está atualmente conduzindo estudos neste campo de pesquisa sobre modelos de dor inflamatória, é importante mencionar que estamos investigando o 5-7DCK, um antagonista de NMDAR com acesso limitado ao sistema nervoso central e que demonstra um efeito analgésico comparável ao de um antagonista de ação central (CHRISTOPH e col., 2005). Dessa forma, com a restrição da permeabilidade dos fármacos

pela barreira hematoencefálica e a escassez de tecidos que excretam glutamato, particularmente os que possuem receptores NMDA fora do sistema nervoso central, é plausível que tais medicamentos possuam potencial terapêutico sem acarretar efeitos adversos. Nosso estudo busca expandir as possibilidades de uso da cetamina, tornando-a impermeável à barreira hematoneural por meio de uma reformulação de sua composição química. Essa abordagem é respaldada pela consideração de que a cetamina é um fármaco seguro e amplamente utilizado na prática clínica.

7. Conclusão

- A administração sistêmica de cetamina nas doses de 15 mg/kg e 30 mg/kg em ratos produz efeito analgésico.
- A administração de 30 mg/kg de cetamina parece afetar o comportamento motor dos animais, sugerindo efeito central da cetamina nesta dosagem.
- A administração de 15 mg/kg de cetamina possivelmente produz analgesia por atuar em receptores periféricos e não apresenta efeito central.

8. Referências

AS DORES. *In*: **NEUROCIÊNCIA da mente e do comportamento**. [S. l.: s. n.], 2008;

INFLAMMATORY sensitization of nociceptors depends on activation of NMDA receptors in DRG satellite cells. **PNAS**, [S. l.], p. 18363–18368, 29 out. 2014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420601111>;

UNEXPLAINED peculiarities of the dorsal root ganglion. **PAIN**, [S. l.], p. 527-535, 1 ago. 1999. [https://doi.org/10.1016/s0304-3959\(99\)00135-9](https://doi.org/10.1016/s0304-3959(99)00135-9);

TRATADO de Fisiologia Médica. **Guyton & Hall**, [s. l.], 2017;

SENSIBILIZAÇÃO periférica e central. **Revista dor**, [S. l.], p. 31-34, 17 jan. 2016.

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>;

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

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>;

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>;

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.;

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>;

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

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>

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>.

FISH, R. et al. **Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals**. [s.l.] Academic Press, 2011.

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>

ASHMAWI, H. A.; FREIRE, G. M. G. Peripheral and central sensitization. **Revista Dor**, v. 17, 2016.

ANALGESIC Mechanisms of Ketamine in the Presence and Absence of Peripheral Inflammation. **Anesthesiology** , [S. l.], p. 520-528, ago. 2000.
<https://doi.org/10.1097/00000542-200008000-00032>

MECANISMO DE AÇÃO DO GLUTAMATO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E A RELAÇÃO COM DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS. **REVISTA BRASILEIRA DE NEUROLOGIA E PSIQUIATRIA**, [S. l.], p. 58-67, 12 abr. 2014.

Araújo DF de. 2019. **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. EDUFU - Editora da Universidade Federal de Uberlândia.

Urman, R., Vadivelu, N., Schermer, E., Kodumudi, V., Belani, K., & Kaye, A. (2016). Role of ketamine for analgesia in adults and children. **Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology**, 32(3), 298. <https://doi.org/10.4103/0970-9185.168149>

MÉTODOS experimentais para o estudo da dor. [S. l.], 5 jun. 2019. Disponível em: <http://www.dol.inf.br/html/MetodosExperimentais.html>. Acesso em: 1 abr. 2024.

DESANTANA, J. M. et al. **Definition of pain revised after four decades**. Brazilian Journal Of Pain, v. 3, n. 3, 2020.
<https://doi.org/10.5935/2595-0118.20200191>