

Flávia Lage Pessoa da Costa

**Papel da cetamina sobre receptores TRPV1
da via sensorial aferente periférica: implicações
celulares e moleculares.**

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina

Programa de Pós - Graduação em Medicina Molecular

Belo Horizonte - 2017

Flávia Lage Pessoa da Costa

Papel da cetamina sobre receptores TRPV1 da via sensorial aferente periférica: implicações celulares e moleculares.

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG
como pré-requisito para obtenção do grau de doutora em
Ciências da Saúde: Medicina Molecular.

Orientador: Professor Dr. Renato Santiago Gomez

Co-orientador: Dr. Célio José de Castro Júnior

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina

Programa de Pós - Graduação em Medicina Molecular

Belo Horizonte – 2017

Costa, Flávia Lage Pessoa da.
C837p Papel da Cetamina sobre receptores TRPV1 da via sensorial aferente periférica [manuscrito]: implicações celulares e moleculares. / Flávia Lage Pessoa da Costa. - - Belo Horizonte: 2017.
101f.: il.
Orientador (a): Renato Santiago Gomes.
Área de concentração: Medicina Molecular.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Ketamina. 2. Anestésicos Gerais. 3. Canais de Cátion TRPV. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Gomes, Renato Santiago. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título

NLM: QV 81

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca J. Baeta Vianna – Campus Saúde UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA FLÁVIA LAGE PESSOA DA COSTA

Realizou-se, no dia 22 de maio de 2017, às 09:00 horas, 526, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *Papel da cetamina sobre receptores TRPV1 da via sensorial aferente periférica: implicações celulares e moleculares.*, apresentada por FLÁVIA LAGE PESSOA DA COSTA, número de registro 2013707651, graduada no curso de CIENCIAS BIOLOGICAS/DIURNO, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Renato Santiago Gomez - Orientador (UFMG), Prof(a). Celio Jose de Castro Junior (IEP - SANTA CASA), Prof(a). Luciene Bruno Vieira (UFMG), Prof(a). Marcus Vinicius Gomez (UFMG), Prof(a). Caroline Maria de Oliveira Volpe (IEP - SCBH), Prof(a). karla Simone da Silva Fernandes (IEP - SCBH).

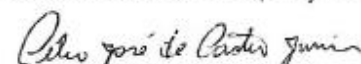
A Comissão considerou a tese:

☒ Aprovada

() Reprovada

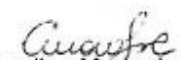
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 22 de maio de 2017.

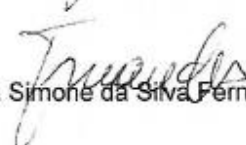

Prof(a). Renato Santiago Gomez (Doutor)


Prof(a). Celio Jose de Castro Junior (Doutor)


Prof(a). Luciene Bruno Vieira (Doutora)


Prof(a). Marcus Vinicius Gomez (Doutor)


Prof(a). Caroline Maria de Oliveira Volpe (Doutora)


Prof(a). karla Simone da Silva Fernandes (Doutora)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



FOLHA DE APROVAÇÃO

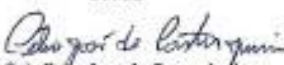
Papel da cetamina sobre receptores TRPV1 da via sensorial aferente periférica: implicações celulares e moleculares.

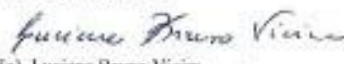
FLÁVIA LAGE PESSOA DA COSTA

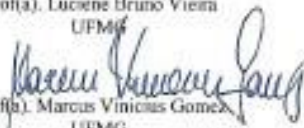
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA MOLECULAR, como requisito para obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, área de concentração MEDICINA MOLECULAR.

Aprovada em 22 de maio de 2017, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Renato Santiago Gomez - Orientador
UFMG


Prof(a). Celso Jose de Castro Junior
IEP - SANTA CASA


Prof(a). Luciene Bruno Vieira
UFMG


Prof(a). Marcus Vinicius Gomez
UFMG


Prof(a). Caroline Maria de Oliveira Volpe
IEP - SCBH


Prof(a). Karla Simone da Silva Fernandes
IEP - SCBH

Belo Horizonte, 22 de maio de 2017.

APOIO INSTITUCIONAL

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

- Laboratório de Neurociências - Departamento de Saúde Mental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais;
- Laboratório de Genética Molecular- Departamento de Saúde Mental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais;
- Centro de Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais;
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia– Medicina Molecular (INCT-MM);
- Laboratório de Neurotransmissores do Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, Minas Gerais (LAB-NEURO).
- Laboratório de eletrofisiologia celular (ELETROCEL).
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);

“Tudo tem seu tempo e até certas manifestações mais vigorosas e originais entram em voga ou saem de moda. Mas a sabedoria tem uma vantagem: é eterna.”

Baltasar Gracián

“Entrego, confio, aceito e agradeço.”

PARTES DOS RESULTADOS DESTA DISSERTAÇÃO FORAM APRESENTADAS NOS SEGUINTE ENCONTROS:

- 1º Simpósio internacional de Neurociências da UFES. Título de melhor trabalho do simpósio na categoria de doutorado -2016.
- XXIII Semana do conhecimento da UFMG – 2014.

Dedico esse trabalho às pessoas pelas quais cultivo amor e admiração incondicionais: Israel, Cida, Alexandre, Marina, Bruno, Gustavo e Henrique.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por ter me dado saúde e persistência, frente a todas as adversidades, para que eu pudesse desenvolver esse trabalho.

Aos meus pais, Israel e Cida, por serem meus maiores exemplos de que o conhecimento nos transforma! Mãe, seu exemplo diário de dedicação aos estudos e sua capacidade notória de “auto-aprendizado” me ensinou que podemos ser do tamanho que quisermos e que o limite para aprender está em nós mesmos! Pai, o prazer que você tem em adquirir conhecimento, em ler, em debater ideias e a dedicação que mantém em seus estudos é contagiante, emocionante e motivo de muito orgulho para mim! Vocês sempre me incentivaram a ir além! Obrigada por me transmitirem o prazer de aprender!

Aos meus irmãos, Marina e Bruno, pelo carinho e por torcerem sinceramente pelas minhas conquistas. Aos meus sobrinhos Gustavo e Henrique pela diversão, pela descontração nos momentos em que eu não conseguia mais estudar e pelos calorosos afetos! Ao Theo, pela simples existência!

Ao Alexandre, meu marido e melhor amigo, agradeço pela transformação positiva que causou em minha vida! Sua presença, seu amor, sua dedicação, sua capacidade de me ouvir, de me apoiar e de me oferecer conselhos contribuíram imensamente para que nunca desistisse e continuasse a seguir em frente, mesmo nos dias mais difíceis! Obrigada por acreditar em mim, pela compreensão pelos inúmeros finais de semana em que apenas dediquei aos estudos, pela minha falta de disponibilidade, pelos lanches e “abraços surpresa” durante meus estudos! Amo você!

À Madalena pelo carinho, orações e energia positiva.

Ao meu orientador Professor Dr. Renato Santiago Gomez agradeço pelo aceite em me orientar novamente e por confiar em meu trabalho. Obrigada por me

auxiliar nos momentos em que precisei e por ter possibilitado que eu pudesse realizar esse trabalho de forma ética, competente e prazerosa.

Ao meu co-orientador Professor Dr. Célio José de Castro Júnior, agradeço pela orientação que me deu em cada momento desse projeto, pelos nobres ensinamentos, pelas ricas discussões científicas, por me incentivar a sempre ir além e pela disponibilidade! Celinho, além de um grande amigo, você sempre será uma pessoa pela qual nutrirei extrema admiração, respeito e gratidão!

Ao professor Dr. Marcus Vinícius Gomez agradeço pela oportunidade que me deu de fazer parte do seu grupo de pesquisa e pelo acolhimento agradável em seu laboratório. Agradeço pelos desafios que me apresentou, que muito contribuíram para o meu crescimento científico e pela confiança em mim depositada. O seu espírito científico, o seu humor e o seu prazer visível na carreira acadêmica e científica são alvos de minha admiração e me motivam a seguir este caminho. O senhor sempre será um grande exemplo de profissionalismo, comprometimento e seriedade.

Ao professor Dr. Marcelo Diniz Monteiro de Barros pelo exemplo extremo de profissionalismo, pelos grandes aprendizados e pelas oportunidades profissionais!

Aos professores Dr. Luiz Armando, Dr. Marco Aurélio e Dra. Débora Miranda agradeço pelo acolhimento nos laboratórios que coordenam permitindo que eu desenvolvesse este trabalho.

Às amigas Cinthia Vila Nova, Natália Virtude e Duana Santos agradeço pelo incansável apoio nos momentos em que quis desistir e precisei de ânimo para seguir; pelas ricas discussões científicas; pelo aprendizado que me trouxeram; pelas palavras confortantes nas horas certas; pelos abraços renovadores e pelo exemplar trabalho experimental que tivemos juntas. Certamente esse trabalho não teria sido finalizado sem o apoio incondicional de vocês. Vocês

tornaram os dias de experimento menos cansativos e mais divertidos! Serei eternamente grata a cada uma de vocês!

Aos colaboradores Juliana Figueira da Silva e Itamar Couto Guedes de Jesus agradeço pelos ensinamentos profissionais e por me auxiliarem a desenvolver esse trabalho com qualidade e excelência.

Aos alunos de iniciação científica Michele Sampaio e Rodrigo Tempori agradeço pela disponibilidade e boa vontade para me acompanharem nos experimentos!

Aos amigos de laboratório do Lab-Neuro do IEP e aos amigos do INCT-MM agradeço pelas contribuições, que cada um à sua maneira soube me dar; agradeço pelo apoio, aprendizado, discussões científicas e pelos momentos agradáveis.

Aos colegas e alunos do CSD agradeço pelo apoio, incentivo e energias positivas!

Aos meus familiares e amigos agradeço, pelo apoio, pelas orações, pelo incentivo e pela compreensão de minhas ausências.

Aos funcionários: Marcelo e Dona Nívea meus sinceros agradecimentos pela seriedade, competência e colaboração para a realização deste trabalho.

Aos animais utilizados neste trabalho, meu respeito e imensa gratidão.

À UFMG, à Faculdade de Medicina, ao Departamento de Saúde Mental, ao Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de BH/MG e às entidades financiadoras CNPq, CAPES e FAPEMIG agradeço por propiciarem uma pós-graduação de tão elevado nível no Brasil.

SUMÁRIO

RESUMO	XVIII
ABSTRACT	XIX
I. INTRODUÇÃO	01
1.0 ANESTÉSICOS	02
1.1 ANESTÉSICOS GERAIS	02
1.2 MECANISMOS DE AÇÃO DOS ANESTÉSICOS GERAIS	03
1.3 CETAMINA	05
1.4 MECANISMOS DE AÇÃO DA CETAMINA	07
1.5 CANAIS IÔNICOS E ALGESIA	09
1.6 TRPV1	09
1.7 PROTEÍNA QUINASE C	12
1.8 PROTEÍNA QUINASE DO TIPO “ε”	14
II. OBJETIVO	15
2.1 OBJETIVO GERAL	16
III. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 EQUIPAMENTOS	18
3.2 SOLUÇÕES	19
3.2.1 SOLUÇÕES PARA FLUORÍMETRO E CONFOCAL	19
3.2.2 SOLUÇÕES PARA EXPERIMENTO DE COMPORTAMENTO	20
3.2.3 SOLUÇÕES PARA WESTERN BLOTTING	20
3.3 MEIOS DE CULTURA	22
3.4 DROGAS E REAGENTES	23
3.5 CULTURA DE CÉLULAS HEK-293	24
3.5.1 REPIQUE CELULAR	24
3.5.2 PLAQUEAMENTO DAS CÉLULAS HEK	24

3.5.3 TRANSFEÇÃO COM O CANAL TRPV1-----	25
3.5.4 ENSAIO FLUORIMÉTRICO PARA AVALIAR O CÁLCIO INTERNO EM CÉLULAS TRANSFECTADAS COM O CANAL TRPV1 -----	25
3.6 ANIMAIS-----	26
3.7 PREPARO DA CULTURA PRIMÁRIA DE DRGS-----	27
3.7.1 DISSECAÇÃO -----	27
3.7.2 DISSOCIAÇÃO DOS GÂNGLIOS-----	27
3.7.3 PLAQUEAMENTO DOS GÂNGLIOS -----	28
3.7.4 IMAGENS DE Ca^{2+} POR MICROSCOPIA CONFOCAL -----	28
3.7.5 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DE METABOLIZAÇÃO DE METILTIAZOLTETRAZÓLIO (MTT)-----	30
3.8 EXPERIMENTOS DE COMPORTAMENTO ANIMAL -----	31
3.8.1 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO ATRAVÉS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPLANTAR DE REAGENTES -----	31
3.9 WESTERN BLOTTING-----	32
3.9.1 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DAS CÉLULAS HEK-293 TRANSFECTADAS-----	32
3.9.2 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS -----	33
3.9.3 CORRIDA E TRANSFERÊNCIA -----	33
3.9.4 BLOQUEIO E REVELAÇÃO-----	34
4.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA -----	35

IV. RESULTADOS-----Página 37

4.1 EFEITO DA CETAMINA NA $[Ca^{2+}]_i$ EM CÉLULAS HEK-293 TRANSFECTADAS COM O RECEPTOR TRPV-1 -----	38
4.2 EFEITO DA PRÉ-INCUBAÇÃO DA CETAMINA NA $[Ca^{2+}]_i$ EM CÉLULAS HEK-293 TRANSFECTADAS COM O RECEPTOR TRPV-1 -----	39
4.3 EFEITO DA CETAMINA NA $[Ca^{2+}]_i$ EM DRGS DE RATOS-----	41
4.4 A CETAMINA POTENCIALIZA A RESPOSTA DE $[Ca^{2+}]_i$, INDUZIDA PELA CAPSAICINA, EM DRGs-----	42
4.5 A CETAMINA PREVINE A DESSENSIBILIZAÇÃO INDUZIDA POR CAPSAICINA EM DRGs-----	44

4.6 O MECANISMO DE AÇÃO DA CETAMINA É DEPENDENTE DA PKC ϵ -----	
-----	46
4.7 EFEITOS DA CETAMINA NA VIABILIDADE CELULAR EM DRGs -----	50
4.8 CETAMINA SENSIBILIZA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR CAPSAICINA----	
-----	54
4.9 CETAMINA FOSFORILA TRPV1-S800 VIA PKC ϵ -----	56
V. DISCUSSÃO -----	Página 59
VI. CONCLUSÃO-----	Página 67
VII. REFERÊNCIAS-----	Página 69

LISTA DE FIGURAS

Figura 01- As sete subfamílias TRP	10
Figura 02- O TRPV1 é diretamente fosforilado pela PKC em 16 resíduos	13
Figura 03- Sistema de perfusão acoplado ao microscópio confocal para aquisição de imagens de cálcio intracelular	29
Figura 04- A cetamina não é capaz de ativar o TRPV1	38
Figura 05- A pré-incubação com cetamina potencializa a resposta do receptor induzida pela cetamina	40
Figura 06- Cetamina não é capaz de provocar o aumento da $[Ca^{2+}]$ em DRGs de ratos	41
Figura 07- Cetamina restaura e potencializa a resposta induzida por capsaicina no DRG de ratos.	42
Figura 08- Cetamina reverte a dessensibilização do TRPV1 em DRGs de ratos.	44
Figura 09- A ação da cetamina é dependente da PKC ϵ	47
Figura 10- A cetamina reduz a quantidade de células responsivas à capsaicina	51
Figura 11- A cetamina apresenta efeitos citotóxicos em DRGs	53
Figura 12- A cetamina aumenta o tempo de nocicepção em ratos, de forma dose-dependente nas concentrações de 20, 40 e 80 nmol/pata	55

Figura 13- Níveis de expressão de PKC ϵ e de TRPV1 fosforilados e totais em células HEK na presença e na ausência de cetamina 10 μ M.....	57
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Tabela 1: Solução Krebs-Ringer-Hepes (KRH) – sem cálcio	19
Tabela 02- Tampão de lise (RIPA Buffer)	20
Tabela 03- Tampão 6X (TA 6X)	20
Tabela 04- Tampão de corrida	21
Tabela 05- Tampão de transferência (1X)	21
Tabela 06- Solução TBS	21
Tabela 07- Solução TBS-T (Tris-Buffered Saline- Tween 20)	21
Tabela 08- Meio de cultura para DRG	22
Tabela 09- Meio de cultura para células HEK-293	22
Tabela 10- Meio para transfecção de células HEK-293	23
Tabela 11- Delineamento do experimento de comportamento animal	32
Tabela 12- Descrição dos anticorpos primários e secundários utilizados no Western Blotting	34

LISTA DE ABREVIATURAS

ϵ V1-2	Inibidor de PKC ϵ
ψ ϵ RACK	Ativador de PKC ϵ
[Ca ²⁺]	Concentração de íons cálcio
[Ca ²⁺] _i	Concentração de íons cálcio intracelular
Ca ²⁺	Íons Cálcio
μ M	Micromolar
12-HPETE	Ácido 12-Hidroperóxido Eicosatetraenóico
5-HT	Serotonina (5-hidroxitriptamina)
ANOVA	Análise de variância de uma via
ATP	Adenosina trifosfato
CAPS	Capsaicina
CEBIO	Centro de bioterismo
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CO ₂	Gás carbônico (Dióxido de carbono)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRGs	Gânglios da raiz dorsal
EGTA	Ácido tetra acético etileno glicol bis- (β -aminoetil éter)
FLUO-4-AM	Marcador fluorescente de cálcio
FURA-2-AM	Marcador fluorescente de cálcio
GABA-A	Ácido gama-aminobutírico
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HANKS	Solução Salina Balanceada de Hanks
HCl	Ácido Clorídrico

HEK-293	Células humanas embrionárias de rim
HEK-TRPV1	Células transfectadas com o receptor TRPV1
HEPES	Ácido 2-etanossulfônico
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir 50% da ação máxima efetiva de uma determinada substância
KCl	Cloreto de potássio
KET	Cetamina
KRH	Solução de Krebs Ringer Hepes
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
mL	Mililitro
MTT	Metil-Tiazol-Tetrazólio
NaCl	Cloreto de Sódio
NADA	Dopamina N-araquidonoil
NGF	Fator de crescimento neuronal
nm	Nanômetro
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NP ₄₀	Éter poliglicol (tergitol)
NT	Células não transfectadas
PBS	Tampão fosfato-salino
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PKC ϵ	Proteína quinase C do tipo epsilon
pH	Potencial hidrogeniônico
PMA	4-beta-phorbol 12-miristato 13-acetato

ROIs	Regiões de interesse
SB / SB-366791	Antagonista potente e seletivo de TRPV1
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TREK-1	Two-pore-domain K ⁺ (K2P) channel subunits
TRIS	Trisaminometano
TRPA	Receptor de potencial transiente anquirina
TRPC	Receptor de potencial transiente canônicos
TRPM	Receptor de potencial transiente melastatina
TRPML	Receptor de potencial transiente mucolipina
TRPN	Receptor de potencial transiente mecanoreceptores potencial C
TRPP	Receptor de potencial transiente policistina
TRP	Receptor de potencial transiente
TRPV	Receptor de potencial transiente vanilóide
TRPV1	Receptor de potencial transiente vanilóide tipo 1
U.A.	Unidades arbitrárias
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

A cetamina é um anestésico intravenoso utilizado para a indução da anestesia geral, sedação em pacientes com cuidados intensivos, analgesia em pacientes queimados e em medicina veterinária. Seu mecanismo de ação envolve interação com múltiplos sítios incluindo receptores glutamatérgicos NMDA e não NMDA, receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos, receptores monoaminérgicos e opióides. Doses sub-anestésicas são utilizadas na terapia de dor pós operatória e dor crônica. O TRPV1 é um canal catiônico não-seletivo, que é expresso em fibras nociceptivas. Ele está presente em neurônios sensíveis à capsaicina e em, aproximadamente, 50% dos gânglios da raiz dorsal (DRGs). O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da cetamina sobre os receptores TRPV1 da via sensorial periférica. Células HEK-293 transfectadas com o TRPV1 foram estimuladas ou pré-incubadas com concentrações variadas do anestésico e avaliadas quanto à variação da $[Ca^{2+}]_i$ em fluorímetro. Os resultados sugeriram que apesar da cetamina não ativar diretamente o receptor ela potencializa a resposta das células transfectadas induzida por capsaicina. Culturas de DRGs foram realizadas e analisadas em microscopia confocal apresentando resultado semelhante às células transfectadas quando estimuladas e pré-incubadas com o anestésico. Em experimentos também realizados com cultura de DRGs foi possível observar que a cetamina previniu a dessensibilização dos DRGs após estímulos consecutivos com a capsaicina, de forma dependente da PKC ϵ . Experimentos de western blotting indicaram que os níveis de expressão proteicos de TRPV1 e de PKC ϵ fosforilados aumentam na presença do anestésico. Análises de culturas de DRGs indicaram que o pré-tratamento com o anestésico reduziu a proporção de neurônios responsivos à capsaicina, independentemente do tamanho dos mesmos. Experimentos de MTT sugeriram que o anestésico apresenta efeito citotóxico em DRGs provocando redução da viabilidade das fibras nociceptivas responsivas à capsaicina em, aproximadamente, 20%. Experimentos comportamentais corroboraram os resultados encontrados *in vitro*. Em conjunto nossos dados indicam que a cetamina modula a sensibilidade do TRPV1 à capsaicina através de um mecanismo dependente da fosforilação do receptor pela PKC ϵ .

ABSTRACT

Ketamine is an intravenous anesthetic used for induction of anesthesia, as an adjuvant to local anesthesia, for sedation of patients in intensive care, to induce analgesia in burned patients and in dental and veterinary procedures. Ketamine's mechanism of action involves interaction with multiple sites including glutamatergic NMDA and non-NMDA receptors, muscarinic and nicotinic cholinergic receptors, opioid and monoaminergic receptors. Sub-anesthetic doses are used in postoperative pain therapy and chronic pain. The TRPV1 is a nonselective cation channel which is expressed in nociceptive fibers. It is present in capsaicin-sensitive neurons and approximately 50% of dorsal root ganglia (DRG). In this study we investigated ketamine's effect on TRPV1 receptors present in peripheral sensory pathway. HEK-293 cells transfected with TRPV1 receptors were stimulated or incubated with different anesthetic concentrations and evaluated for changes in $[Ca^{2+}]_i$ using a fluorometer machine. The results have suggested that although ketamine didn't activate the receptor directly it potentiates the capsaicin response in transfected cells. DRG cultures were performed and analyzed in confocal microscopy. The experiments confirmed the previous results and suggests that ketamine could prevent DRG's desensitization induce by capsaicin successive stimulations *via* activation of PKC ϵ . Western blotting experiments indicated that phosphorylated TRPV1 and phosphorylated PKC ϵ protein expression levels were increased in anesthetic's presence. DRG's culture pretreatment with ketamine reduced the amount of capsaicin's responsive neurons regardless the neuron's size. MTT cell viability experiments were performed and suggest that ketamine's incubation has a cytotoxic effect on DRG's cultures that promotes reduction in 20% in the amount of nociceptive fibers responsive to capsaicin. Behavioral experiments corroborate results found *in vitro*. Taken together our data indicate that ketamine modulates TRPV1 sensitivity to capsaicin through a mechanism dependent of receptor phosphorylation by PKC ϵ .

I.INTRODUÇÃO

1.0 ANESTÉSICOS

A história da anestesia pode ser dividida em duas fases distintas: antes e após 1846. Antes de 1846 os métodos para se aliviar a dor em procedimentos cirúrgicos eram bastante rudimentares. Algumas vezes utilizavam-se métodos físicos para produzir analgesia como, por exemplo, envolver um membro em gelo, ou torná-lo isquêmico com um torniquete. A inconsciência produzida por um golpe na cabeça ou por estrangulamento produzia alívio da dor, porém a um custo bastante elevado para o paciente. O método mais utilizado para se conseguir um campo cirúrgico era a simples contenção do paciente pela força. Dessa forma não era de se admirar que a cirurgia fosse considerada o último recurso empregado (Davidson et al., 1965).

Em 1846, em uma demonstração pública, o dentista Willian T.G. Morton apresentou à comunidade científica o efeito promissor dos anestésicos ao submeter o paciente Edward Gilbert Abbott a uma cirurgia para a retirada de um tumor na glândula submaxilar e na língua. Após a inalação de éter por alguns minutos, o paciente permaneceu inconsciente e não apresentou sinais de dor, nem sequer reflexos motores embora estivesse vivo e respirando. Desde este dia a técnica de Morton propiciou um rápido desenvolvimento na cirurgia moderna e tornou-se uma das descobertas mais revolucionárias da medicina, de forma que atualmente mais de 45 milhões de pacientes nos Estados Unidos da América são submetidos à anestesia anualmente (American Society of Anesthesiologists, 2015).

1.1 ANESTÉSICOS GERAIS

Apesar de utilizados, pioneiramente, há mais de 170 anos e de serem amplamente empregados em procedimentos médicos e em cirurgias, o mecanismo de ação desses agentes ainda permanece em estudo. A dificuldade de determinação dos alvos potenciais desses agentes reside na multiplicidade de efeitos que os mesmos são capazes de gerar nos pacientes, uma vez que cada efeito anestésico envolve a participação de diferentes

regiões nervosas e consequentemente, distintos alvos celulares e moleculares (Hemmings, Myles, et al., 2005).

Os anestésicos gerais são caracterizados, clinicamente, por causarem amnésia, inconsciência, imobilidade aos estímulos nociceptivos e analgesia (Antognini, Carstens, 2002; Hemmings et al., 2005). São divididos em dois grupos, conforme sua via de administração: inalatórios e intravenosos. Os anestésicos inalatórios geralmente são utilizados para a manutenção da anestesia enquanto os anestésicos intravenosos são empregados para induzir a anestesia.

A amnésia ocasionada pelo uso de anestésicos gerais presumivelmente envolve circuitos do hipocampo, amígdala, córtex entorrinal e córtex perirrinal, todos os quais são implicados na aprendizagem e memória (Hemmings et al., 2005). O efeito da inconsciência relaciona-se ao tálamo, ao córtex e ao tronco cerebral (Sonner et al., 2003), enquanto que a imobilidade aparentemente está envolvida com a depressão de vias reflexas na medula espinhal como consequência da supressão de mecanismos excitatórios ou da potencialização de mecanismos inibitórios (Sonner et al., 2003). Já a analgesia está relacionada à atuação dos anestésicos no circuito da dor.

Além desses efeitos, os anestésicos gerais produzem consideráveis efeitos colaterais, sendo os principais, a depressão cardiovascular e respiratória, fraqueza, excitação e sonolência.

1.2 MECANISMOS DE AÇÃO DOS ANESTÉSICOS GERAIS

Os anestésicos gerais inalatórios compreendem um grupo diverso de substâncias voláteis e gasosas que apresentam a capacidade de suprimirem a atividade do sistema nervoso central (SNC) (Franks, 2008) e de excitar neurônios nociceptivos periféricos, ativando os circuitos sensoriais da dor (Mutoh et al., 1998; Mutoh, Tsubone, 2003).

Numerosos estudos sugerem que os mecanismos de ação dos anestésicos gerais inalatórios no SNC envolvem sensibilização ou ativação dos

receptores gabaérgicos tipo A (Nakahiro et al., 1991; Wakamori et al., 1991, Franks, Lieb, 1994; Hemmings et al., 2005), modulação dos canais de K⁺ da família TREK-1 (Franks, Lieb, 1988; Gray et al., 1998; Honoré, 2007), bloqueio ou alteração da afinidade do agonista pelos receptores nicotínicos (Firestone et al., 1986; Violet et al., 1997; Flood, Role, 1998; Raines et al., 2002; Raines, 2003, Rada et al., 2003), inibição dos receptores glutamatérgicos (Yamakura, Harris, 2000; Hoffmann et al., 2001) e alteração da liberação pré-sináptica de neurotransmissores (Van Swinderen et al., 1999).

No sistema nervoso periférico (SNP) os anestésicos gerais inalatórios exercem seus efeitos através da ativação direta com o receptor TRPA1 (Cornett et al., 2008) ou pela sensibilização do TRPV1, um canal iônico expresso em neurônios nociceptivos. Cornett e colaboradores demonstraram em 2008 que concentrações clínicas de isoflurano, sevoflurano, enflurano e de desflurano são capazes de sensibilizarem o TRPV1 para capsaicina e para prótons e, além disso, reduzem o limiar de ativação térmica do receptor. Nesse mesmo trabalho ainda foi sugerido que o isoflurano ativa o TRPV1 diretamente através de um mecanismo dependente da proteína quinase C (PKC).

A atuação dos anestésicos gerais intravenosos no SNC envolve mecanismos diversos e muito similares aos mecanismos de ação dos anestésicos inalatórios: ativação dos receptores GABA_A (Franks, Lieb, 1994; Hemmings et al., 2005;), inibição dos receptores colinérgicos (Maleque et al., 1981; Tsai, 1989, Hass, Harper, 1992), bloqueio dos receptores glutamatérgicos NMDA (Haas, Harper, 1992; Orser et al., 1995) e não NMDA (Gonzales, 1995), inibição dos canais de Ca²⁺ (Inoue et al., 1999; Shiraska et al., 2004; Martella et al., 2005), bloqueio dos canais de Na⁺ sensíveis à voltagem (Ratnakumari, Hemmings, 1997; Irnaten et al., 2002; Reckiegel et al., 2002; Ouyang et al., 2003; Haeseler et al., 2003;) e alteração da liberação de neurotransmissores (Ratnakumari, Hemmings, 1997; Kikuchi et al., 1998; Costa, et al., 2014).

Escassas são as publicações acerca do efeito dos anestésicos gerais intravenosos no SNP. Em 2010, Wickley e colaboradores desvendaram que o

propofol modula a sensibilidade do TRPV1 à capsaicina através de um mecanismo dependente da fosforilação do TRPV1 pela PKC ϵ .

1.3 CETAMINA

A cetamina é um anestésico geral intravenoso, derivada do cloridrato de fenciclina (Micallef et al., 2003) que foi sintetizado em 1963 por Calvin Stevens e utilizado pela primeira vez como mistura racêmica em humanos em 1965 (Kohrs, Durieux, 1998; Craven, 2007). Ao ser introduzida na clínica médica buscava-se a criação de uma substância que fosse capaz de induzir analgesia, amnésia, perda de consciência e imobilidade. Tal objetivo não foi atingido, uma vez em que a cetamina exerce potente vasodilatação cerebral, o que acarreta aumento da pressão intracraniana (Urwin, Menon; 2004). Além disso, diversos efeitos colaterais, tais como fortes alucinações, ansiedade, desorientação e agitação foram relatados contribuindo para a redução do uso de tal agente rapidamente (Kohrs, Durieux, 1998). Apesar disso, foi reconhecido que a cetamina apresentava efeito analgésico atrativo, o que motivou o aumento do número de pesquisas sobre essa substância.

Estudos, com o objetivo de reavaliar o potencial terapêutico desse anestésico, avaliaram a solução comercial de cetamina. Esta era composta por dois enantiômeros, as formas S (+) e R (-), preservados em cloreto de benzetônio. Tais estudos sugeriram que a S(+) cetamina era 3-4 vezes mais potente que o isômero dextrógiro para alívio da dor e apresentava menor incidência de efeitos psicomiméticos do que a mistura racêmica, sugerindo que a S (+) cetamina poderia ser usada em doses menores, gerando recuperação mais rápida do estado anestésico, com a possibilidade de ocasionar menores efeitos colaterais. Em 1992, a “Food and Drug Administration” determinou a separação dos enantiômeros S (+) e R (-) da cetamina (Kohrs, Durieux, 1998).

A partir desse período pesquisas com o isômero S (+) da cetamina se intensificaram e revelaram que tal agente poderia ser classificado como um “anestésico dissociativo”, ou seja, capaz de gerar analgesia profunda, perda sensorial marcante, perda do movimento e amnésia, sem necessariamente haver perda de consciência (Morgan et al., 2004; Rang et al., 2004) . Apesar de

não ficar adormecido, o paciente submetido ao uso da cetamina apresenta intensa sensação de dissociação do meio. Beneficamente o estado clínico causado pelo uso da cetamina induz, além da analgesia, broncodilatação e estimulação simpática (Bowles, Gold, 2012). A estimulação simpática pode ocasionar aumento da pressão sanguínea, da frequência cardíaca, da pressão na artéria pulmonar e das secreções orais (Kohrs, Durieux; 1998). No entanto, a estimulação é dita benéfica, pois, quando a cetamina é administrada com agonistas gabaérgicos ocorre estabilização hemodinâmica, o que reduz a necessidade de medicações vasoativas pelo paciente (Bowles, Gold, 2012).

A S (+) cetamina é utilizada em indução de anestesia em pacientes com choque hemodinâmico ou crise asmática; como sedativa em pacientes não cooperativos, particularmente crianças; suplemento da anestesia local; sedação de pacientes sob cuidados intensivos; analgesia em pacientes queimados; procedimentos odontológicos e em anestesia veterinária (Haas, Harper, 1992; Kohrs, Durieux, 1998; Lamont, 2008). Doses sub-anestésicas são utilizadas na terapia de dor pós operatória e dor crônica (Craven, 2007). Também tem sido utilizada, em pesquisas laboratoriais, como modelo para induzir esquizofrenia em animais (Becker et al., 1978). Além do uso terapêutico, a droga tem sido utilizada, ilicitamente, por jovens, produzindo efeito alucinógeno.

Apesar de apresentar efeitos atrativos, convencionalmente, a cetamina não tem seu uso clínico disseminado. Pesquisas diversas (Sakai, et al., 2000; Engelhard et al., 2001; Nagase et al., 2001; Bourgoin, et al., 2003; Bar-Joseph et al., 2009) demonstraram que quando a cetamina é utilizada como adjuvante, com outros agentes anestésicos, e quando a normocapnia é mantida com ventilação mecânica, a pressão intracraniana se mantém estável e não há desenvolvimento de problemas hemodinâmicos cerebrais indesejados ou consequências neurológicas. Em 2003, Bourgoin e colaboradores avaliaram pacientes que usaram cetamina como adjuvante e demonstraram que estes apresentaram resultados estatisticamente indistinguíveis dos pacientes que receberam anestesia com propofol, anestésicos voláteis, opióides ou benzodiazepínicos.

1.4 MECANISMOS DE AÇÃO DA CETAMINA

O mecanismo de ação da cetamina é complexo. Este anestésico interage com múltiplos sítios incluindo receptores glutamatérgicos tipo-NMDA e não NMDA, receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos, receptores monoaminérgicos e opióides. Além disso, parece bloquear canais iônicos para sódio e cálcio do tipo L provocando modesto efeito anestésico local e vasodilatação cerebral, respectivamente (Kohrs, Durieux; 1998).

Os receptores pós sinápticos glutamatérgicos do tipo NMDA são considerados o principal sítio de ação do anestésico no SNC. A administração de cetamina em humanos promove o bloqueio não competitivo de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA (Haas e Harper, 1992) e parece estar envolvida com a ação anestésica da cetamina (Bowles, Gold, 2012).

A ação analgésica da cetamina parece estar relacionada ao bloqueio causado por este anestésico nos receptores glutamatérgicos não NMDA (Gonzales, 1995). Quando ativados, os receptores glutamatérgicos NMDA e não NMDA estimulam a síntese de óxido nítrico (NO), um neurotransmissor, central e periférico, que se relaciona com a percepção da dor, pelo menos, na coluna vertebral (Wod et al., 1990; Garthwaite, 1991; Marin et al., 1993;). A cetamina inibe a óxido nítrico sintase (NOS) causando efeito analgésico (Gordh et al., 1995).

Os receptores colinérgicos, muscarínicos e nicotínicos, são bloqueados pela cetamina. A administração intravenosa do anestésico potencializa o efeito de drogas bloqueadoras neuromusculares de maneira dose-dependente, possivelmente interagindo com receptores colinérgicos (Maleque et al., 1981; Tsai, 1989; Hass, 1992). A afinidade da S (+) cetamina pelos receptores muscarínicos é 10-20 vezes menor que pelos receptores NMDA (Kohrs, Durieux, 1998).

Receptores opióides também são alvo de ação da cetamina, ainda que a afinidade do anestésico seja de 10 a 20 vezes menor nesses receptores do que nos receptores NMDA. Tal fato sugere que a ativação dos receptores opióides pelo anestésico não justifique de maneira relevante o efeito analgésico da

cetamina (Kohrs, Durieux, 1998). A similaridade dos efeitos causados pela cetamina e pelos agonistas opióides nos receptores opióides do tipo κ explica os efeitos psicotomiméticos do anestésico (Kohrs, Durieux, 1998).

Em relação à liberação de neurotransmissores sabe-se que a cetamina, em concentrações clínicas, inibe a liberação de acetilcolina (Silva et al., 2009). A R(-) cetamina inibe a captação neuronal de noradrenalina e a S(+) cetamina adicionalmente inibe a captação extra- neuronal, produzindo uma resposta sináptica prolongada e aumento da transferência de noradrenalina para dentro da circulação, que pode ser observada no sistema cardiovascular pelo aumento da pressão arterial, da frequência cardíaca e do débito cardíaco. A captação de dopamina também é inibida pela cetamina, o que pode levar ao aumento da atividade dopaminérgica central, sugerindo uma relação com os fenômenos de dependência química (Vasconcelos et al., 2005). Estudos demonstram que a captação neuronal de serotonina parece ser inibida pela cetamina, já que a metisergida, um antagonista serotoninérgico (5-HT), é capaz de abolir o efeito analgésico da administração intratecal de cetamina. Isto implica que mecanismos serotoninérgicos estão envolvidos nos efeitos analgésicos desse anestésico (Crisp et al., 1991).

A cetamina pode atuar também em canais iônicos. A cetamina bloqueou canais para sódio operados por voltagem em neurônios e em células de músculo esquelético (Haeseler et al., 2003). Além desse dado, o anestésico inibiu a condutância do sódio em canais para sódio em neuroblastomas (Reckiegel et al., 2002). Foram observados, também, efeitos em canais iônicos pós-sinápticos. De fato, investigou-se a ação da cetamina em canais para sódio e potássio em neurônios do corno dorsal da medula de ratos e o anestésico determinou o bloqueio dos canais para sódio com IC_{50} de 128 μM (Schnoebel et al., 2005). Corroborando com estes achados, estudos relacionados ao efeito da cetamina em canais iônicos têm demonstrado que este anestésico bloqueia canais para sódio nos sistemas nervoso central e periférico (Seeler et al., 1996), bloqueia canais para potássio (Brau et al., 1997) e canais para cálcio sensíveis a voltagem (Hirota, Lambert 1996).

1.5 CANAIS IÔNICOS E ALGESIA

Uma vez que um estímulo nocivo é aplicado num tecido inicia-se a propagação da dor, pois, um potencial de ação é imediatamente gerado e ativa um nociceptor. Nociceptores (ou receptores da dor) são terminações livres de fibras aferentes primárias sensíveis a estímulos nocivos (Millan, 1999) que apresentam quatro componentes básicos: um terminal periférico, que é o transdutor dos estímulos externos e que inicia os potenciais de ação; o axônio, que conduz os potenciais de ação; o corpo celular que controla a integridade do neurônio e um terminal central que forma o elemento pré-sináptico que forma a 1ª sinapse da via sensoria no SNC (Woolf, Ma, 2007). São encontrados na pele, mucosa, membranas, tecido conjuntivo de órgãos viscerais, ligamentos e cápsulas articulares, periósteo, músculos, tendões e vasos arteriais (Almeida et al., 2003). Durante a geração do potencial de ação há a participação de canais iônicos, permeáveis principalmente à cátions, que controlam: o disparo do potencial, a condução do potencial e a transmissão sináptica para o segundo neurônio.

Os principais canais responsáveis pela geração das correntes iônicas de entrada nas membranas dos nociceptores são os canais iônicos sensíveis à voltagem de sódio e de cálcio, enquanto as correntes de saída são mediadas principalmente por canais iônicos de potássio sensíveis à voltagem. Além disso, a ativação dos neurônios sensoriais é dependente de canais de cátions não seletivos (Lee et al., 2005) tais como os canais pertencentes à superfamília de receptores de potencial transiente (TRP).

1.6 TRPV1

Os canais TRPV1 (receptor de potencial transiente vanilóide tipo1) são canais iônicos membros da superfamília TRP, que apresenta canais distintos expressos em mamíferos, invertebrados e fungos. Os canais agrupados nessa superfamília participam dos mecanismos moleculares de sinalização da dor atuando como tradutores de estímulos nocivos térmicos, mecânicos e químicos (O'Neill et al., 2012). Sendo canais não seletivos para cátions permitem o fluxo destes, pela membrana plasmática, movidos pelos respectivos gradientes

eletroquímicos, levando assim a uma possível despolarização da membrana celular. A superfamília TRP é composta por sete subfamílias: TRPV (Vanilóides); TRPC (Canônicos); TRPM (Melastatina); TRPA (Anquirina), TRPP (Policistina), TRPN (mecanoreceptores potencial C) e TRPML (Mucolipina) (Montell, 2005; Gudermann, Flockerzi, 2005; Nilius et al., 2007), conforme ilustrado na figura 01, sendo as isoformas TRPV1 e TRPA1 consideradas as mais bem estudadas no que se refere ao desenvolvimento de tratamentos para dor e para condições inflamatórias (Radresa et al., 2013).

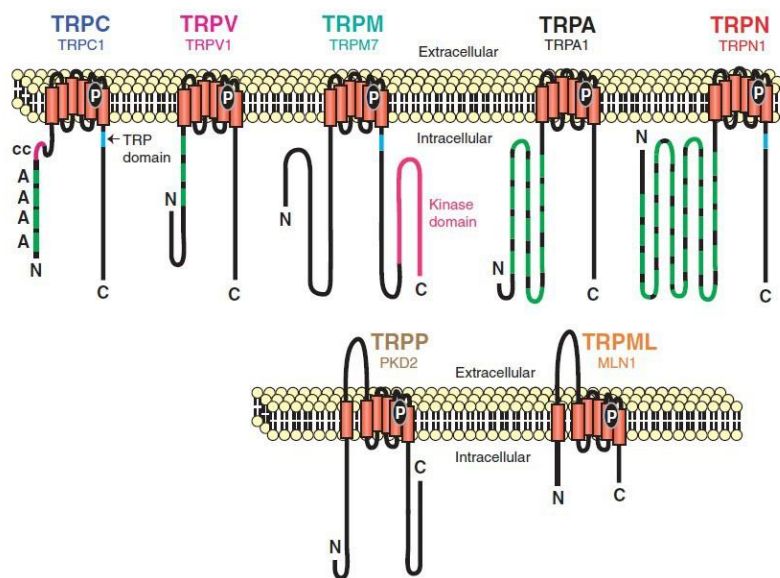


Figura 01- As sete subfamílias TRP. A imagem representa a organização geral dos canais TRPs. Esses canais são compostos por uma estrutura proteica com seis domínios transmembrana, com o poro condutor de cátions localizando-se entre o quinto e o sexto domínio. Há ainda duas extremidades intracelulares: a amino e a carboxiterminal. Alguns domínios importantes presentes nos canais podem ser identificados: segmentos transmembrana, domínio TRP, domínio da proteína quinase (apenas presente no TRPM6/7) A: anquirinas. CC: domínio da espiral enrolada. Imagem adaptada de Montell. The TRP superfamily of cations channels. *Science Signaling*. (272) 1-24,3. 2005.

Os canais TRPV1 foram os primeiros canais nociceptivos TRPs identificados (Catherina et al., 1997). Esses receptores são expressos em todo o organismo, principalmente nos neurônios sensoriais primários de pequeno diâmetro dos gânglios da raiz dorsal (DRGs) e dos

gânglios trigeminais. Também são expressos na membrana do retículo endoplasmático de neurônios DRG (Olah et al., 2001; Sandín et al., 2009; Kwak, 2012). Esses canais participam de processos fisiológicos diversos, tais como: motilidade intestinal, metabolismo ósseo, controle da micção, controle da audição e visão, controle da liberação de neurotransmissores, e, por fim, a proliferação de células saudáveis e tumorais, etc. Apresentam também importante papel na transmissão da sensação já que eles servem de sensores moleculares que detectam uma variedade de estímulos como tato, cheiro, audição, mecanossensação, termosensação e dor (Scott, Zuker, 1998; Minke, Cook, 2002).

O TRPV1 é um dos canais da família TRP que apresenta o maior número de ligantes conhecidos além de apresentar grande número de moduladores de sua função. Seus agonistas exógenos mais conhecidos são a capsaicina e a resiniferatoxina e, os agonistas endógenos principais são os endocannabinóides anandamida e a dopamina N-araquidonoil (NADA), além dos produtos da oxidação do ácido araquidônico tais como o ácido 12-(S)-hidroperoxieicosatetraenoico (12-HPETE) e o leucotrieno B₄. Além disso, um grande número de estímulos físicos e químicos podem atuar no TRPV1, ativando-o, tais como calor, prótons, cátions, ácidos graxos inflamatórios, etc (Pingle et al., 2007). Em 2008, Cornett e colaboradores demonstraram que concentrações clínicas de anestésicos gerais inalatórios eram capazes de aumentar a sensibilização do TRPV1 à capsaicina e de potencializar sua ativação amplificando a sinalização nociceptiva periférica em cirurgias.

Um importante aspecto a respeito do TRPV1 refere-se aos mecanismos através dos quais ocorre a regulação da sensibilização e da dessensibilização deste receptor, uma vez em que, tal regulação parece estar associada, respectivamente, à hipersensibilidade induzida por inflamação e à anti-nocicepção (Mandadi et al., 2006).

Diversas vias, envolvendo fosforilações do receptor, foram associadas aos mecanismos de regulação do TRPV1 (Mohapatra et al., 2005; Novakova-Tousova et al., 2007; Vycklický et al., 2008), através de proteínas quinases “A” (De Petrocellis et al., 2001; Bhawe et al., 2002; Hu et al., 2002; Rathee et al.,

2002,) de proteínas quinases “C” (Premkumar and Ahern, 2000; Tominaga et al., 2001; Sugiura et al., 2002; Bhave et al., 2003; Dai et al., 2004), e do complexo Ca^{2+} /Calmodulina, que dessensibiliza o TRPV1 através de um mecanismo dependente de Ca^{2+} extracelular (Numazaki et al., 2003; Jung et al., 2004; Rosenbaum et al., 2004).

Em 2002, os grupos de pesquisa de Numazaki e de Bhave demonstram que os domínios citoplasmáticos do TRPV1 apresentam sítios que podem ser regulados pela PKC e pela PKA mediante fosforilação. Dentre esses sítios, destacam-se os resíduos de serina (S502 e S800) que já foram associados como essenciais para que a resposta do TRPV1 induzida pela capsaicina seja potencializada por PMA, por ATP e por temperatura (Numazaki et al., 2002).

Dentre essas vias de segundos mensageiros que regulam o TRPV1, destaca-se a associação com as proteínas quinases “C”, uma vez em que Wickley e colaboradores, em 2010, sugeriram que a modulação induzida pelo propofol, um anestésico intravenoso, na sensibilidade do TRPV1 à capsaicina, ocorre por um mecanismo de fosforilação do receptor dependente de PKC ϵ .

1.7 PROTEÍNA QUINASE C

As proteínas quinases correspondem à maior família de proteínas presentes em eucariotos. Muitas foram descobertas no início dos anos 80 e pesquisas contínuas indicam que o genoma humano apresente por volta de 2000 quinases. Elas são a chave central de comunicação no controle intracelular, na regulação e na transdução de sinais (Silva et al., 2009).

As proteínas quinases são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas celulares através da transferência de um grupo fosforila de ATP e, em casos excepcionais, de GTP, para os grupos hidroxila presente nos aminoácidos treonina, serina ou resíduos de tirosina presentes nas proteínas. A fosforilação destes resíduos é responsável por estímulos extracelulares e intracelulares, que fornecem um mecanismo altamente eficiente para o controle da atividade de proteínas (Silva et al., 2009). As proteínas quinases

conseguem fosforilar o receptor TRPV1, diretamente, em 16 regiões possíveis (figura 02). Tais regiões estão localizadas na cauda amino (NH₂) terminal do receptor, no primeiro loop intracelular e na cauda carboxiterminal (COOH) e se caracterizam por conterem resíduos de serina ou de treonina (Numazaki et al., 2002).

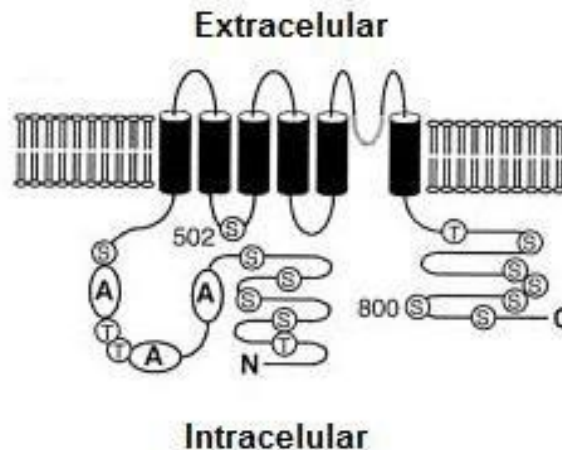


Figura 02- O TRPV1 é diretamente fosforilado pela PKC em 16 resíduos. A imagem representa um canal TRPV1 com seus domínios transmembrana. Destaca-se, na imagem, duas extremidades intracelulares: a amino (NH₂) e a carboxiterminal (COOH) e um loop transmembrana representado. A figura apresenta 16 posições contendo resíduos de serina ("S") ou de treonina ("T") que são sensíveis à fosforilação pela PKC. Imagem adaptada de Numazaki et al.. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VRI by protein kinase C epsilon and identification of two targets serine residues. J Biol Chem 277: 13375-8. 2002.

Atualmente, são descritos na literatura 11 isotipos de PKC presentes em mamíferos que são classificados em 3 grupos distintos de acordo com a estrutura e a característica de ativação de cada isoforma.

O primeiro grupo é constituído pelas PKCs convencionais (PKC α , PKC β I, PKC β II e PKC γ), que são dependentes de cálcio e ativadas pela fosfatidilserina ou diacilglicerol (DAG). O segundo grupo contém as PKCs denominadas de "novas", que apesar de serem independentes de cálcio são também reguladas pela fosfatidilserina ou diacilglicerol (DAG). Nesse grupo estão as PKCs " σ ", " δ ", " ϵ " e " η ". No terceiro grupo estão as PKCs atípicas

(PKC “ζ” e PKC “λ”) que são independentes de cálcio e não necessitam do diacilglicerol para ativação (Mackay, Twelves; 2007).

1.8 PROTEÍNA QUINASE DO TIPO “ε”

Apesar de alguns trabalhos científicos sugerirem o envolvimento das PKCs na regulação dos nociceptores (Mandadi et al., 2004; Mohapatra, Nau; 2005), poucos conseguiram desvendar quais isoformas dessa classe de proteínas estão envolvidas, especificamente, neste processo.

Em 1999, Khasar e colaboradores sugeriram que a PKCε é necessária para a expressão de epinefrina induzida por estímulos mecânicos e químicos em nociceptores. No mesmo ano, Cesare e colaboradores demonstraram que a PKCε é a principal responsável pela sensibilização da resposta térmica induzida pela bradicinina nos nociceptores. Em 2003, Numazaki e seu grupo de pesquisa indicou que os substratos para fosforilação direta do TRPV1 pela PKCε estão localizados no primeiro loop intracelular e na cauda carboxiterminal do receptor, sendo respectivamente os resíduos S502 e S800. Em 2010, Wicley e colaboradores indicaram que na presença de propofol, um anestésico intravenoso, a sensibilidade do TRPV1 à capsaicina é modulada por um mecanismo de fosforilação desse receptor, no resíduo S800, que envolve a participação da PKCε. Esse mesmo grupo de pesquisa, já havia indicado, em 2006 que a PKCε era ativada pelo propofol, em cardiomiócitos.

Assim, a literatura nos informa que a PKCε está envolvida na modulação de nociceptores e parece ser sensível à atuação dos anestésicos gerais. Apesar de diversos mecanismos de ação da cetamina já terem sido desvendados e de se reconhecer a atuação desse agente em canais iônicos, não há na literatura publicações que avaliem o efeito deste anestésico intravenoso em canais iônicos TRPV1. Sendo a ação analgésica um importante efeito desse agente justifica-se a verificação da atuação da cetamina em canais iônicos TRPV1, canais conhecidos por serem relacionados aos mecanismos de sinalização da dor.

II. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da cetamina sobre receptores TRPV1 da via sensorial aferente periférica.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador de Solução Corning (Modelo: PC420).
- Agitador Vortex para tubos Quimis Aparelhos Científicos Ltda (Modelo: Q220).
- Balança eletrônica de precisão decimal Indústria e Comércio Eletro-Eletrônica Gehaka Ltda (Modelo BG 2000).
- Banho Maria microprocessado com agitação e temperatura regulável Quimis Aparelhos Científicos Ltda (Modelo: Q215M1).
- Cuba de eletroforese BIO-RAD (Modelo: semi-dry).
- Espectrofluorímetro (Modelo: shimadzu rf-5301 pc).
- Estufa de CO₂ Shel Lab (Modelo 5215-2).
- Centrífuga refrigerada Hitachi (Modelo: HIMAC CR20B2).
- Guilhotina para decapitação Insight® Pesquisa e Ensino Ltda (Modelo: EB-271).
- Homogenizador de tecidos Marconi (Modelo MA099).
- ImageQuant (Modelo LAS 4000 – GE).
- Microscópio invertido de fase Axiovert 25 (Carl Zeiss).
- Microscopia confocal Leica (Modelo SP5, software Leica LAS) acoplado a um sistema de perfusão (Bioptechs).
- Lupa para dissecação PIEZA (M18SL).
- pHômetro de bancada Quimis Aparelhos Científicos Ltda (Modelo: Q400AS).
- Sonicador (Ultrasonicador/homogenizador) da Biologics, INC (Modelo 150 V/T).
- Victor™ X4 PERKIN ELMER (Modelo 2030- 0040- Multilabel plate reader).

3.2 SOLUÇÕES

3.2.1 SOLUÇÕES PARA FLUORÍMETRO E CONFOCAL

- CaCl_2 (1M).

- Solução Krebs-Ringer-Hepes (KRH) – sem cálcio.

Reagente	Concentração (mM)
NaCl	124
KCl	4
MgSO ₄	1,2
Glicose	10
HEPES	25

O pH final era ajustado para 7,4 com solução de NaOH 5M.

Tabela 01- Solução Krebs-Ringer-Hepes (KRH) – sem cálcio.

- Solução Krebs-Ringer-Hepes (KRH) – com cálcio 1,5 mM.

Em uma alíquota de 40 mL de KRH - sem cálcio era adicionado 60 μL de solução de CaCl_2 (1M) .

- Solução Krebs-Ringer-Hepes (KRH) – com cálcio 1,0 mM.

Em uma alíquota de 40 mL de KRH - sem cálcio era adicionado 40 μL de solução de CaCl_2 (1M).

- Solução de cetamina 1 μM , 10 μM , 30 μM , 100 μM .

A cetamina era diluída em KRH com Ca^{2+} 1,5M.

- Solução de capsaicina 500nM.

A capsaicina era diluída em KRH com Ca^{2+} 1,5M.

- Solução de Ativador de PKC ϵ ($\psi\epsilon$ RACK) 0,5 μM .

O ativador era diluído em KRH com Ca^{2+} 1,5M.

-Solução de Inibidor de PKC ϵ ($\epsilon\text{V1-2}$) 0,5 μM .

O ativador era diluído KRH com Ca^{2+} 1,5M.

3.2.2 SOLUÇÕES PARA EXPERIMENTOS DE COMPORTAMENTO

- Solução salina 0,9% (veículo).
- Solução de cetamina 20; 40; 80 e 160 µg/pata.
- Solução de SB 2mM.
- Solução de Capsaicina 1mM.

3.2.3 SOLUÇÕES PARA WESTERN BLOTTING

- Tampão de lise (RIPA Buffer).

Reagente	Concentração
NaCl	150mM
Tris-HCl	25mM
Desoxicolato de sódio	1%
Tergitol (NP ₄₀)	1%
SDS	1%
Inibidores de protease (Sigma fast)	1 pastilha para 100mL

Tabela 02- Tampão de lise (RIPA Buffer).

- Tampão 6X (TA 6X).

Reagente	Concentração
Glicerol	20% v/v
SDS	4% m/v
2-β-mercaptoetanol	10% v/v
Azul de bromofenol	0,2% m/v
Tris	100mM

O pH foi ajustado para 6,8.

Tabela 03 - Tampão 6X (TA 6X).

- Tampão de corrida (1X).

Reagente	Concentração
Tris-base	25 mmol/L
SDS	3,5 mmol/L
Glicina	210 mmol/L

Tabela 04 - Tampão de corrida.

- Tampão de transferência (1X).

Reagente	Concentração
Tris-base	48mM
Metanol	20%
Glicina	39mM

Tabela 05- Tampão de transferência (1X).

- Solução TBS.

Reagente	Concentração
Tris-base	20mM
NaCl	137mM

O pH foi ajustado para 7,4.

Tabela 06- Solução TBS.

- Solução TBS-T (Tris-Buffered Saline- Tween 20).

Reagente	Concentração
NaCl	150 mmol/L
Tris	25 mmol/L
Tween 20	0,05%

O pH foi ajustado para 8,0.

Tabela 07 - Solução TBS-T (Tris-Buffered Saline- Tween 20).

- Solução de leite em pó 1% e 5%.

O leite era diluído em TBS-T.

3.3 MEIOS DE CULTURA

- Solução filtrada de HANKS sem bicarbonato de sódio, cloreto de cálcio e sulfato de magnésio.

- DMEM low glicose e DMEM high glicose.

- Meio para cultura de DRG.

Reagente	Concentração
DMEM low glucose	89%
Soro fetal bovino	10%
Glutamina	2mM
Penicilina/Estreptomicina	1% (100µg/mL)
5-fluoro-2'-deoxiuridina	50µg
Uridina	150µg

Tabela 08- Meio de cultura para DRG.

- Meio para cultura de células HEK-293.

Reagente	Concentração
DMEM high glucose	89%
Soro fetal bovino	10%
Penicilina/Estreptomicina	1%

Tabela 09- Meio de cultura para células HEK-293.

- Meio para transfecção de células HEK-293.

Reagente	Concentração
DMEM high glucose	90%
Soro fetal bovino	10%

Tabela 10- Meio para transfecção de células HEK-293.

3.4 DROGAS E REAGENTES

- Fura-2 acetoximetil éster (AM) e Fluo-4- acetoximetil éster (AM) foram adquiridos da Life technologies.

- Solução de Hanks' balanced salt solution sem bicarbonato de sódio, Capsaicina (8-methyl N-vanilil-6-noneamida), Cloreto de cálcio, Sulfato de magnésio, DMEM low glucose, DMEM high glucose, SB-366791, Colagenase, Laminina, Papaína, Reagente de Bradford e Ponceau S foram adquiridos da foram adquiridos da Sigma Chemical Co., (Mo, USA).

- Penicilina/Estreptomicina foi adquirida da GIBCO® Life technologies.

- Anticorpos anti PKCe fosforilado no resíduo S729 e Anti PKCe foram adquiridos da Abcam; anti TRPV1 fosforilado no resíduo S800 foi comprado da Abnova e o anti-TRPV1 foi comercializado pela Santa Cruz. Anticorpos secundários e Lipofectamina 2000^R foram adquiridos da Invitrogen.

- Ativador (ψ ε RACK) e inibidor de PKCe (εV1-2) foram comprados da Anaspec.

- Membrana para blotting PVDF (0,45µm; 300 mm x4m) e o ECL Plus foram adquiridos da GE Healthcare Life Science, Fairfield – EUA).

-As soluções estoque de capsaicina e de SB-366791 foram dissolvidas em DMSO 100%, armazenadas a -20°C e diluídas para a concentração desejada imediatamente antes do uso. Fura-2 acetoximetil éster (AM) foi dissolvido em DMSO 100%, e armazenado a -20°C. Deve-se ressaltar que a concentração final de DMSO presente nessas diluições não excedeu a 0,01%.

3.5 CULTURA DE CÉLULAS HEK-293

Células HEK-293 (células embrionárias de rim humano), adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro (Cell Bank), foram mantidas em cultura (37°C, 5% CO₂ e 80% de umidade) em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% penicilina/estreptomicina.

3.5.1 REPIQUE CELULAR

Após atingirem a confluência de, aproximadamente, 80% as células mantidas em cultura eram replicadas. Imediatamente antes do repique o meio das placas era esgotado e adicionado 10 mL de PBS previamente aquecido (37°C) para lavagem e retirada das células mortas. Em seguida eram acrescentados 2 mL de tripsina para soltar as células aderidas às placas seguido de 8 mL de PBS aquecido. Após homogeneizações sequenciais e intermitentes todo o conteúdo era transferido para um tubo falcon de 15 mL e centrifugado à 800g, à 4°C por 5 minutos. Posteriormente à centrifugação o sobrenadante era descartado e o pellet resuspendido em 5 mL de meio de cultura para células HEK. Placas de petri (100X20mm) contendo 9,5 mL de meio de cultura para células HEK recebiam, cada uma, 0,5mL da suspensão celular e eram incubadas em estufa (37°C, 5% CO₂ e 80% de umidade) .

3.5.2 PLAQUEAMENTO DAS CÉLULAS HEK

Após atingirem confluência aproximada de 50-70% as células replicadas eram removidas enzimaticamente e transferidas para lamínulas de 22X22 mm, partidas ao meio, previamente tratadas com 100 µL de poli-lisina para os experimentos em fluorímetro. Para os experimentos de western blotting após a confluência ter sido atingida as células eram removidas enzimaticamente das placas e transferidas para placas de cultivo de 6 poços tratadas com poli-lisina de dimensões de 35X17,5mm e com área de crescimento de 9,6cm².

Após plaqueamento, as células eram mantidas na estufa (37°C, 5% CO₂ e 80% de umidade), para recuperação, por 48 horas antes da realização da transfecção com o canal TRPV1.

3.5.3 TRANSFEÇÃO COMO O CANAL TRPV1

A transfecção dos plasmídeos contendo os insertos do canal TRPV1 (gentilmente cedidos pelo Dr. David Julius - UCSF/CA/EUA) foi realizada utilizando lipofectamina de acordo com as instruções do fabricante. Em suma, foi utilizada a proporção de 1:3 (μg de DNA: μL de lipofectamina, respectivamente). A quantidade de DNA por poço foi definida em 128 ng/poço. Após 4 horas da adição da mistura DNA + lipofectamina o meio da placa era substituído por meio de cultura para células HEK até o momento do experimento. Em todo procedimento de transfecção era realizado um grupo controle (células eram incubadas com lipofectamina, sem DNA). Após a transfecção as células eram mantidas na estufa (37°C , 5% CO_2 e 80% de umidade) para recuperação por 24 horas e, então, eram executados os experimentos para avaliar a variação de cálcio intracelular no fluorímetro ou eram aplicados os tratamentos prévios aos experimentos de western blotting.

3.5.4 ENSAIO FLUORIMÉTRICO PARA AVALIAR O CÁLCIO INTERNO EM CÉLULAS TRANSFECTADAS COM O CANAL TRPV1

A sonda FURA 2-AM (forma acetoximetilester) é um importante indicador de Ca^{2+} e tem contribuído para significativos avanços no estudo do papel do mesmo em diversos tipos celulares (Nakamura et al., 1996). A sonda atravessa a membrana plasmática, sendo posteriormente desesterificada no citosol por esterases específicas. Esta sonda é seletiva para o Ca^{2+} , sendo que a sua ligação a este íon altera o espectro de excitação em, aproximadamente, 30nm de modo que a intensidade obtida na faixa de excitação de 340 e 380nm permite a medida da $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

As lamínulas contendo as células transfectadas foram, inicialmente, marcadas com Fura-2 AM. Para tanto, um mL de KRH contendo cálcio 1,0 mM foi adicionado à placa de cultura de 35X16mm juntamente com Fura-2 AM (1,0 μM), por uma hora, e incubados na estufa (37°C , 5% CO_2 e 80% umidade) protegidos da luz.

Após o período de incubação, as células foram lavadas com KRH contendo cálcio 1,5 mM para a retirada do excesso de sonda não internalizada. A lamínula contendo as células marcadas foi acoplada a um adaptador de

cubeta e levada ao espectrofluorímetro com agitação e temperatura (37°C) constantes. Em cada dosagem fluorimétrica, foram adicionados capsaicina (500 nM) ou cetamina (1, 10, 30 e 100 µM) aos 100 segundos, SDS (10%) aos 300 segundos e Tris - EGTA (4 mM) aos 370 segundos, sendo a emissão da fluorescência medida em um período de 500 segundos. Alguns pontos foram pré-incubados com a cetamina (1, 10, 30 e 100 µM) ou com SB-366791 (3 µM), por 5 minutos.

A leitura foi iniciada com dupla faixa de excitação 340 e 380 nm e a emissão detectada em 510 nm sob temperatura controlada a 37°C e sob constante agitação, utilizando um espectrofluorímetro SHIMADZU RF-5301 PC. A calibração do sinal de fluorescência foi obtida pela adição de SDS e Tris-EGTA. A concentração em nanomolar de cálcio foi calculada por meio da fórmula: $C = K_d * [(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)] * S_f / S_b$, fórmula essa já contida no software de análise do fluorímetro (Grynkiewicz et al., 1985).

3.6 ANIMAIS

Foram utilizados ratos albinos adultos da raça Wistar, machos pesando entre 180 a 300 gramas fornecidos pelo CEBIO do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG- campus Pampulha. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado, com temperatura entre 22 e 26°C e disponibilidade luminosa controlada (12/12h luz/noite).

Os ratos foram armazenados em caixas de dimensão 40X34X16 cm com, no máximo, cinco animais de mesmo sexo e idade, contendo água e comida disponíveis *ad libitum*. A cada dois dias as caixas dos animais eram assepsiadas, a maravalha trocada e a comida e a água eram renovadas.

Os animais foram acondicionados até o momento dos experimentos conforme sugerido pelo CETEA da UFMG e também foram sacrificados conforme os princípios do mesmo comitê - projeto 265/2011.

3.7 PREPARO DA CULTURA PRIMÁRIA DE DRGS

3.7.1 DISSECAÇÃO

Os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina. Para a obtenção do gânglio da raiz dorsal dois animais, machos e de massa compreendida entre 180-300 g, foram utilizados em cada experimento.

Após o sacrifício dos animais, rapidamente, a região dorsal compreendendo os segmentos cervicais a lombar da coluna vertebral, era retirada e colocada em solução de HANKS.

Em seguida a coluna era aberta por dois cortes longitudinais no lado ventral para expor a medula. Após retirar a medula as fibras do corno dorsal eram puxadas, com auxílio da pinça e de uma lupa, expondo o gânglio que era cortado na outra extremidade da fibra. Imediatamente os gânglios eram transferidos (em média 20 a 25 gânglios) para outra placa contendo solução de HANKS.

3.7.2 DISSOCIAÇÃO DOS GÂNGLIOS

A preparação e manutenção da cultura de neurônios foi feita como descrito anteriormente (Eckert et al., 1997) com pequenas modificações.

Os gânglios dissecados eram transferidos para um tubo falcon de 15 mL contendo 3 mL de solução de HANKS com papaína 0,1% (3mg/3mL) por 20 minutos, com agitação mecânica sutil a cada 5 minutos. Após esse período os gânglios eram centrifugados a 800g por 3 minutos. O sobrenadante era descartado e adicionado 3 mL da solução de HANKS com colagenase 0,3% (9mg/3mL) seguido de nova incubação a 37° C por 10 minutos, com agitações sutis e mecânicas a cada 5 minutos. Sequencialmente os gânglios eram centrifugados a 800g por 3 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspensionado em 3 mL de HANKS. Uma nova centrifugação era feita a 800g por 3 minutos e novamente os gânglios eram ressuspensionados em 3 mL de HANKS e centrifugados.

Finalmente o sobrenadante era descartado e o pellet ressuspensionado em 3 mL de meio para cultura de DRG (item 3.3 dessa secção). Uma nova centrifugação era feita a 800g por 3 minutos, o meio descartado e o pellet ressuspensionado em meio para cultura de DRG. Nesse momento era feita uma

dissociação mecânica dos gânglios com auxílio da pipeta de Pauster de vidro com a ponta polida em fogo. O volume de meio para cultura de DRG utilizado nessa última ressuspensão do pellet dependia do número de placas a ser feito (100 μ L de meio por placa).

3.7.3 PLAQUEAMENTO DOS GÂNGLIOS

Cem microlitros do meio contendo os gânglios eram adicionados no centro das lamínulas previamente tratadas por duas horas com poli-lisina (20 μ g/mL) e por uma hora com laminina (200 μ g/mL). Após esse tempo era acrescentado 2,5 mL de meio completo contendo 12,5 μ L de NGF em cada placa.

As lamínulas de vidro usadas no plaqueamento da cultura de DRG eram previamente tratadas com poli-lisina e com laminina para garantir melhor aderência e desenvolvimento dos gânglios.

A poli-lisina, diluída em solução de HANKS, era adicionada na região central das lamínulas, e mantida à temperatura ambiente por duas horas. Em seguida a poli-lisina era aspirada da lamínula e lavada com água duas vezes. As placas eram então tratadas com solução de laminina, diluída em solução de HANKS, por uma hora e em seguida a lamina era aspirada.

Seqüencialmente os gânglios eram adicionados no centro das lamínulas por duas horas e, após esse tempo, era acrescentado meio completo contendo NGF. As placas eram incubadas na estufa (37° C, 5% CO₂ e 80% umidade) por 24 horas e avaliadas quanto à variação da $[Ca^{2+}]_i$ em microscopia confocal.

3.7.4 IMAGENS DE Ca^{2+} POR MICROSCOPIA CONFOCAL

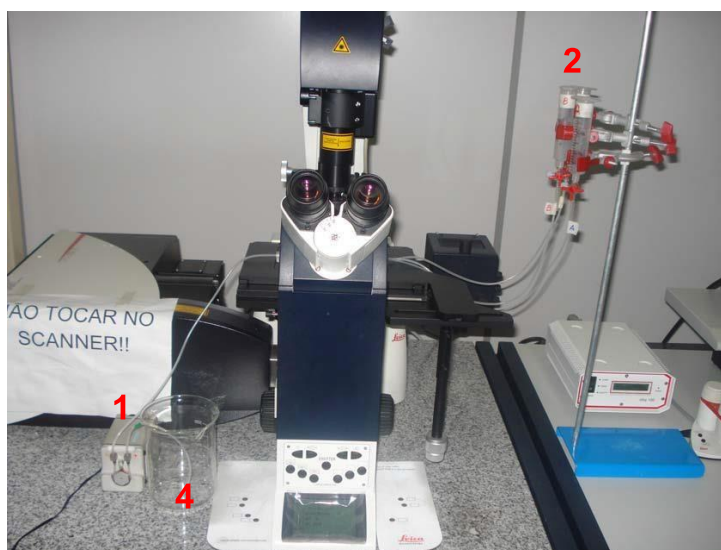
A avaliação da variação de $[Ca^{2+}]_i$ foi realizada através da sonda fluo-4 aceto-metil-éster (Fluo-4 AM), um indicador fluorescente de cálcio que apresenta K_d (constante de dissociação) elevada (345 nM à 22°C) e grande fluorescência, o que permite maior sensibilidade de mensuração na presença de altas concentrações de cálcio intracelular.

As lamínulas contendo a cultura de DRG foram, inicialmente, marcadas com Fluo-4 AM. Para tanto, um mL de KRH contendo cálcio 1,0 mM foi adicionado à uma placa de cultura de 60X15 mm juntamente com Fluo-4 AM

(1,0 μ M), por uma hora, e incubados na estufa (37° C, 5% CO₂ e 80% umidade) protegidos da luz.

Após o período de incubação, as lamínulas eram lavadas com meio KRH com cálcio (1,5M) sem fluo-4AM e transferidas para um suporte padronizado de perfusão (Bioptechs) o qual formava um sistema hermético de aproximadamente 100 μ L e com controle preciso da entrada e saída da solução que era perfundida continuamente com fluxo padronizado de 0,6 mL/min. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (20-22°C) baseado em trabalhos prévios (Gomes et al., 2004; Altier et al., 2006). A aquisição de imagens foi feita em modo curso-temporal utilizando-se microscópio confocal Leica modelo SP5, software Leica LAS e sistema de perfusão (Bioptechs) para permitir o fluxo de soluções/agonistas/antagonistas durante a aquisição de imagens. A figura 03 apresenta a montagem do sistema de perfusão acoplado ao microscópio confocal. Foi usada objetiva de 20x com imersão em água.

As imagens das células marcadas com fluo-4 foram obtidas pela excitação do fluoróforo com uma linha de laser de argônio a 488 nm e a luz emitida coletada na banda 510-560nm. A coleta de imagens era feita a cada três segundos. Durante a coleta de imagens as células eram tratadas com estimuladores de transiente de cálcio KCl (66 mM) ou capsaicina (500 nM) na presença ou ausência de cetamina (10 μ M) e com ativadores e inibidores de PKC conforme descrito em resultados.



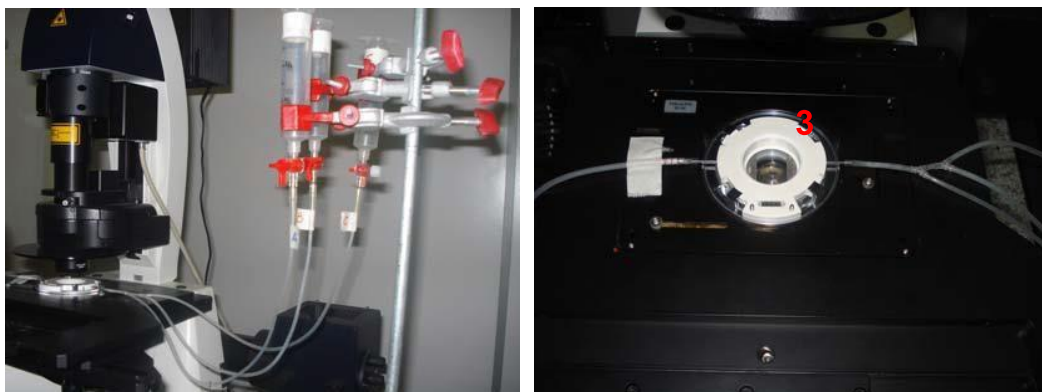


Figura 03- Sistema de perfusão acoplado ao microscópio confocal para aquisição de imagens de cálcio intracelular. 1 – Bomba peristáltica; 2 – Seringas com as soluções de perfusão; 3 – Suporte com a câmara de perfusão contendo a lamínula com as células. 4 – Descarte.

3.7.5 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DE METABOLIZAÇÃO DE METILTIAZOLTETRAZÓLIO (MTT)

A citotoxicidade de uma substância pode ser investigada usando diferentes tipos de ensaios, tal como o de MTT. O ensaio de MTT é um teste laboratorial colorimétrico usado para mensurar a atividade mitocondrial de células e, conseqüentemente, serve como parâmetro de medição da viabilidade celular.

O sal solúvel MTT (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico) apresenta coloração amarela e, quando a célula se apresenta viável é reduzido na mitocôndria através da clivagem realizada pela enzima succinato desidrogenase, em cristais insolúveis de formazan, de coloração púrpura. A quantidade de cristais formados é quantificada no espectrofotômetro e é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

Os DRGs dissecados e enzimaticamente tratados foram plaqueados na densidade de, aproximadamente, 3,5 gânglios por poço e incubados *overnight* a 37°C para estabilização da cultura. Após a estabilização cada poço foi incubado com diferentes substâncias (Cetamina 1, 10, 30 e 100µM; Capsaicina 500 nM; DMEM; H₂O₂) em um volume final de 500 µL por poço. Os ensaios foram realizados em duplicata. Foi utilizado como controle negativo um poço

que foi incubado com DRGs e DMEM. Como controle positivo foi realizado a incubação dos DRGs com H₂O₂ (1000 µM). Para determinação da concentração a ser utilizada de H₂O₂ foi realizada uma curva de doses nas concentrações de 300 µM, 600 µM, 1.000 µM, 5.000 µM e 10.000 µM. As concentrações de 1.000 µM; 5.000 µM e 10.000 µM não apresentam diferença estatística em relação à mortalidade celular, que foi, aproximadamente, de 90% (dado não mostrado).

A metodologia utilizada foi descrita por Mosman et al. (1983) e realizada com modificações. Decorrido o período de incubação das células com as substâncias, foram adicionados a cada poço, 500 µL de uma solução de 0,5 mg/mL MTT diluída em meio DMEM, preparada no momento de uso. Após três horas de incubação com o reagente, ou seja, após 3 horas para a formação dos cristais de formazan, o sobrenadante foi retirado com pipeta monocal de maneira a preservar os cristais. Posteriormente, a cada poço foi adicionado 500 µL de uma solução de HCl 0,4N diluída em isopropanol. Após solubilização dos cristais de formazan formados pela metabolização do MTT pelos gânglios viáveis, as placas foram analisadas no VITOR X 4 no comprimento de onda de 595 nm.

Os resultados foram expressos como porcentagem de viabilidade celular. A porcentagem de células viáveis foi calculada da seguinte forma: (Média de absorbância da amostra / Média da absorbância do controle negativo) x 100. Foi subtraído da média de cada amostra a média da amostra “branca”.

3.8 EXPERIMENTOS DE COMPORTAMENTO ANIMAL

3.8.1 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO ATRAVÉS DA ADMINISTRAÇÃO INTRAPLANTAR DE REAGENTES

Ratos wistar machos de peso médio de 200 gramas foram divididos em seis grupos contendo dez animais cada. Em cada grupo os animais foram, previamente ao experimento, ambientados na sala de comportamento por uma hora. Após esse período, cada animal de cada grupo recebia em cada dia experimental, duas injeções intraplantares de 25 µl cada, num total de 50 µl de reagente aplicado em uma mesma pata por experimento (Romero, Duarte,

2013). Entre cada injeção era realizado um intervalo de 10 minutos. O delineamento experimental executado em cada grupo, assim como os reagentes aplicados em cada grupo animal está resumido na tabela abaixo.

Número do grupo	Descrição do grupo	1ª aplicação	Intervalo	2ª aplicação
01	Controle	Solução salina	10 minutos	Capsaicina 1 nmol/pata
02	SB 3nmol/pata	SB 3 nmol/pata	10 minutos	Capsaicina 1 nmol/pata
03	Cetamina 20 µg/pata	Cetamina 20 µg/pata	10 minutos	Capsaicina 1 nmol/pata
04	Cetamina 40 µg/pata	Cetamina 40 µg/pata	10 minutos	Capsaicina 1 nmol/pata
05	Cetamina 80 µg/pata	Cetamina 80 µg/pata	10 minutos	Capsaicina 1 nmol/pata
06	Cetamina 160 µg/pata	Cetamina 160 µg/pata	10 minutos	Capsaicina 1 nmol/pata

Tabela 11- Delineamento do experimento de comportamento animal.

Após receber a segunda aplicação cada animal era colocado, imediata e individualmente, em caixas de acrílico transparentes que serviram como câmaras de observação. O tempo despendido pelos animais para lambem ou morder a pata injetada foi registrado com o auxílio de um cronômetro e considerado como indicativo de nocicepção. Foi estabelecido que o período máximo de observação da nocicepção dos animais seria de cinco minutos.

A definição das doses de cada reagente aplicada nos grupos animais foi determinada pela consulta à literatura (Castro-Júnior et al., 2013; Romero, Duarte; 2016) associada à execução de curvas dose-resposta (dados não apresentado).

3.9 WESTERN BLOTTING

3.9.1 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DAS CÉLULAS HEK-293 TRANSFECTADAS

Após 24 horas da realização da transfecção, o meio de cultura das placas era aspirado e trocado por novo meio. Cada poço da placa era então submetido a uma das seguintes condições experimentais por 30 minutos:

controle não transfectado; controle transfectado; grupo cetamina 10 μ M; grupo cetamina 10 μ M + inibidor de PKC ϵ e grupo ativador de PKC ϵ .

Sequencialmente ao tratamento as células eram lavadas cuidadosamente com PBS a 37 °C por duas vezes. Em seguida as células eram removidas das placas com PBS à 37°C, transferidas para eppendorfs e centrifugadas por 3 minutos a 800 x g a 4°C. O sobrenadante era descartado e as células eram ressuspensas em 80 μ L de tampão de lise (RIPA BUFFER). A seguir eram sonicadas em gelo (com amplitude de ondas ultrasônicas de 20-30%) para que ocorresse a lise celular.

Após homogeneização, os lisados eram mantidos no gelo por 20 minutos e logo em seguida centrifugados a 16.000 x g por 10 minutos para remoção de debris celulares e teciduais. Alíquotas de cada lisado eram submetidas à quantificação de proteínas (passo 3.9.2) e mantidas a -80 °C até as análises posteriores.

3.9.2 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A quantificação proteica foi realizada como descrita no método de Bradford (Bradford, 1976). Entre 1,0 e 2,0 μ L de extrato proteico era adicionado ao reagente de Bradford em microplacas de 96 poços. Após a homogeneização, a mistura foi levada para leitura das absorbâncias no leitor de microplacas Victor™ X4 no comprimento de onda de 595 nm. Em cada dosagem, uma curva de calibração com albumina sérica bovina (0,2 a 2,0 μ g) era utilizada como padrão.

3.9.3 CORRIDA E TRANSFERÊNCIA

Quantidades iguais de proteína (30-50 μ g) foram adicionadas ao tampão 6X e incubadas à 95 °C por 5 minutos. Logo em seguida as proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida 10%. As corridas foram realizadas com voltagem fixa em 120 volts e com tempo máximo de 2 horas.

Sequencialmente foi realizada transferência para membrana PVDF (0,45 μ m; 300 mm x 4m), previamente ativada em metanol, utilizando-se o aparato *semi-dry* com voltagem fixa de 20 volts e tempo de transferência de 25-

30 minutos. Todas as membranas foram coradas com Ponceau S para monitorar a qualidade da transferência.

3.9.4 BLOQUEIO E REVELAÇÃO

As membranas foram lavadas com TBS-T por 30 minutos (6 vezes de 5 minutos) e incubadas à temperatura ambiente por uma hora, em solução de leite 5% com TBS-T.

As membranas foram incubadas overnight a 4° C com os anticorpos primários de interesse (tabela 12) diluídos em solução de leite 1% com TBS-T.

Após a incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas com TBS-T por 30 minutos (6 vezes de 5 minutos) e incubadas à temperatura ambiente por uma hora em solução de leite 5% com TBS-T.

Seqüencialmente, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários específicos diluídos em solução de leite 1% com TBS-T, por uma hora, sob agitação, em temperatura ambiente.

Após nova lavagem com TBS-T por 30 minutos (6 vezes de 5 minutos), as membranas foram submetidas à detecção de quimioluminescência conforme instruções do kit ECL Plus e visualizadas no equipamento ImageQuant 4000. Os valores obtidos foram normalizados pelos valores da GAPDH.

Anticorpo	Número de catálogo	Diluição	Fornecedor
Anti PKCε fosforilado no resíduo S729	Ab 63387	1:250	Abcam
Anti PKCε	ab124806	1:250	Abcam
Anti TRPV1 fosforilado no resíduo S800	PAB 8499	1:1000	Abnova
Anti-TRPV1	ACC-030	1:1000	Santa Cruz
Anti- GAPDH	SC-47724	1:3000	Santa Cruz
Anti-coelho	G-21234	1:15000	Invitrogen
Anti-camundongo	G-21040	1:15000	Invitrogen

Tabela 12- Descrição dos anticorpos primários e secundários utilizados no Western Blotting.

4.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos de medidas dos níveis de cálcio em fluorímetro foram realizados em dias independentes e foram repetidos, no mínimo, cinco vezes. Os resultados foram analisados inicialmente por uma tabela de Excel onde eram inseridos os valores de fluorescência emitida por cada célula. Com a introdução desses valores na tabela, os dados de fluorescência (F) foram normalizados pela fluorescência inicial (F_0) e foram expressas como $(F/F_0) \times 100$. A média do pico de fluorescência induzida pelo anestésico em diferentes concentrações foi normalizada pela média do pico de fluorescência induzida pela capsaicina do dia e expressa como variação da $[Ca^{2+}]_i$.

Esses dados normalizados eram então plotados num gráfico onde era expresso a variação da $[Ca^{2+}]_i$ induzida por cada concentração anestésica. Os resultados obtidos representam a média de duplicatas, de cinco experimentos realizados de forma independente. Os resultados foram analisados por ANOVA, seguido do teste de Múltipla Comparação Newman-Keuls. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. A quantificação e a análise estatística dos resultados foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prisma, versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

As análises de imagens visualizadas na microscopia confocal foram feitas com auxílio do Software LAS (Leica). A análise consistia em delimitar ROIs (regiões de interesse) correspondentes aos corpos celulares neuronais para quantificação das variações de fluorescência nessas regiões.

As mudanças de fluorescência (F) também eram normalizadas pela fluorescência inicial (F_0) e foram expressas como $(F/F_0) \times 100$. Os valores foram apresentados como a média de fluorescência de células avaliadas em no mínimo três dias distintos de experimentos. Foram consideradas como células responsivas aos estímulos apenas células cuja fluorescência ultrapassava 50% do valor de sua linha de base. Ainda, para não subestimar a amplitude dos picos devido à saturação da escala de fluorescência, células cujo pico de fluorescência alcançavam a saturação (> 200.000 u.a.) eram eliminadas das análises de quantificação.

Os resultados dos experimentos de comportamento foram expressos como média $\pm$ S.E.M. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de múltiplas comparações Newmann-Keuls. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Os dados dos experimentos de western blotting foram normalizados e plotados num gráfico onde era expressa a razão entre anticorpos fosforilados pelos totais para cada grupo experimental. Os resultados obtidos representam a média de cinco experimentos realizados de forma independentes. Os resultados foram analisados por ANOVA, seguido do teste de Múltipla Comparação Newman-Keuls. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. A quantificação e a análise estatística dos resultados foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prisma, versão 5.0 para Windows (GraphPad Software. La Jolla, CA, USA).

IV. RESULTADOS

4.1 EFEITO DA CETAMINA NA $[Ca^{2+}]_i$ EM CÉLULAS HEK-293 TRANSFECTADAS COM O RECEPTOR TRPV-1.

Os resultados apresentados na figura 04 demonstram que a capsaicina (CAPS), substância agonista de TRPV1, não é capaz de promover variação na $[Ca^{2+}]_i$ em células HEK não transfectadas com o TRPV1 (CAPS/NT), enquanto células transfectadas (CAPS/HEK-TRPV1) apresentam intenso aumento na $[Ca^{2+}]_i$ após serem estimuladas com capsaicina. Esse dado valida a eficiência do método de transfecção empregado.

Conforme descrito anteriormente, o TRPV1 é um receptor que pode ser ativado por um grande número de estímulos químicos e físicos tais como calor, prótons, cátions, ácidos graxos inflamatórios, capsaicina, etc (Pingle et al., 2007). Além disso, concentrações clínicas de anestésicos gerais inalatórios são capazes de sensibilizarem o TRPV1 para calor, prótons e para a capsaicina (Cornett et al., 2008). Portanto, era necessário avaliar, inicialmente, se concentrações variadas da cetamina (1, 10, 30 e 100 μ M) seriam capazes de ativar diretamente o receptor TRPV1.

A figura 04 sugere que o tratamento das células HEK-TRPV1 com cetamina (KET) não induziu aumento considerável da $[Ca^{2+}]_i$, portanto, a cetamina não foi capaz de ativar diretamente esse receptor.

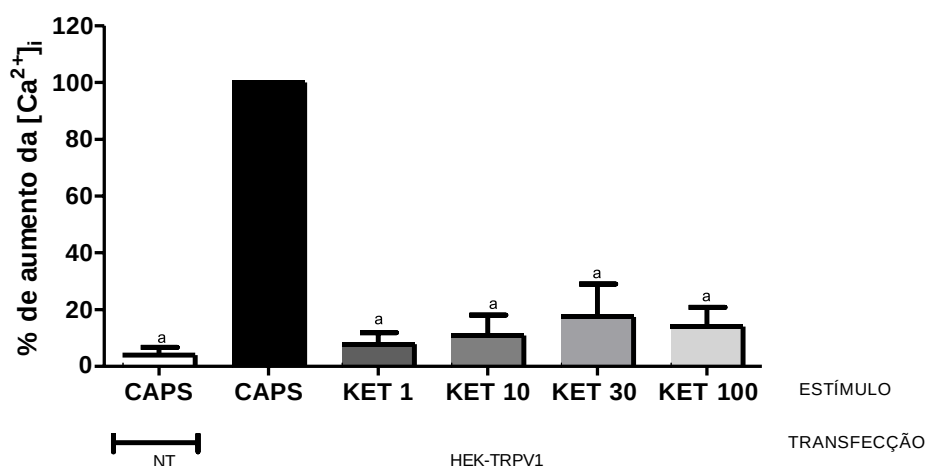


FIGURA 04: Cetamina não é capaz de ativar o TRPV1. Os resultados expressam a média $\pm$ EPM, de pelo menos três lâminulas de cada condição experimental avaliadas em três experimentos independentes. a: estatisticamente diferente de CAPS-HEK-TRPV1; $P < 0,05$.

4.2 EFEITO DA PRÉ-INCUBAÇÃO DA CETAMINA NA $[Ca^{2+}]_i$ EM CÉLULAS HEK-293 TRANSFECTADAS COM O RECEPTOR TRPV-1.

Após avaliar que a cetamina não era capaz de ativar diretamente o TRPV1 investigamos se o anestésico seria capaz de modificar a resposta induzida pelo agonista.

A análise da figura 05 permite concluir que as células HEK não transfectadas (KRH/NT/CAPS) não apresentam variação na $[Ca^{2+}]_i$ enquanto as células HEK transfectadas (KRH/HEK-TRPV1/CAPS) apresentam grande aumento na $[Ca^{2+}]_i$ na presença do agonista. Como pode ser observado, na presença de SB-366791, um antagonista de TRPV1, o aumento na $[Ca^{2+}]_i$ foi reduzido em $80 \pm 4,3\%$.

A pré-incubação, por cinco minutos, com concentrações subclínicas ($1,0 \mu M$) e clínicas (10 e $30 \mu M$) de cetamina foi capaz de intensificar o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzida pela capsaicina no TRPV1 de forma dose dependente. A cetamina $1,0 \mu M$ (KET 1) causou aumento de aproximadamente $33 \pm 2,4\%$ na resposta induzida pela capsaicina quando comparada ao grupo controle KRH/HEK-TRPV1/CAPS. A cetamina $10,0 \mu M$ (KET 10) causou aumento de aproximadamente $71 \pm 2,7\%$ na resposta induzida pela capsaicina quando comparada ao grupo controle KRH/HEK-TRPV1/CAPS. A cetamina $30,0 \mu M$ (KET 30) causou aumento de aproximadamente $122 \pm 4,6\%$ na resposta induzida pela capsaicina quando comparada ao grupo controle KRH/HEK-TRPV1/CAPS.

A pré-incubação com cetamina $100 \mu M$ (KET 100), uma dose supraclínica, provocou aumento aproximado de $23 \pm 2,7\%$ na resposta induzida pela capsaicina, se assemelhando ao resultado gerado pela concentração de $1,0 \mu M$ do anestésico. Sugere-se então que o anestésico tenha efeito máximo sobre o receptor na concentração clínica de $30 \mu M$. Em conjunto, esses dados sugerem que a cetamina, embora não ative diretamente o receptor TRPV1, é capaz de potencializar a resposta desse receptor ao seu agonista, a capsaicina.

Para os demais experimentos realizados neste trabalho foi selecionada, para uso, a concentração anestésica de 10 μM , pois esta dose foi significativamente mais efetiva do que a concentração de 1 μM , sem apresentar diferença estatística em relação à concentração de 30 μM (que representa o efeito máximo da cetamina no receptor TRPV1). Além disso, a concentração de 10 μM está de acordo com as concentrações clínicas empregadas para este agente.

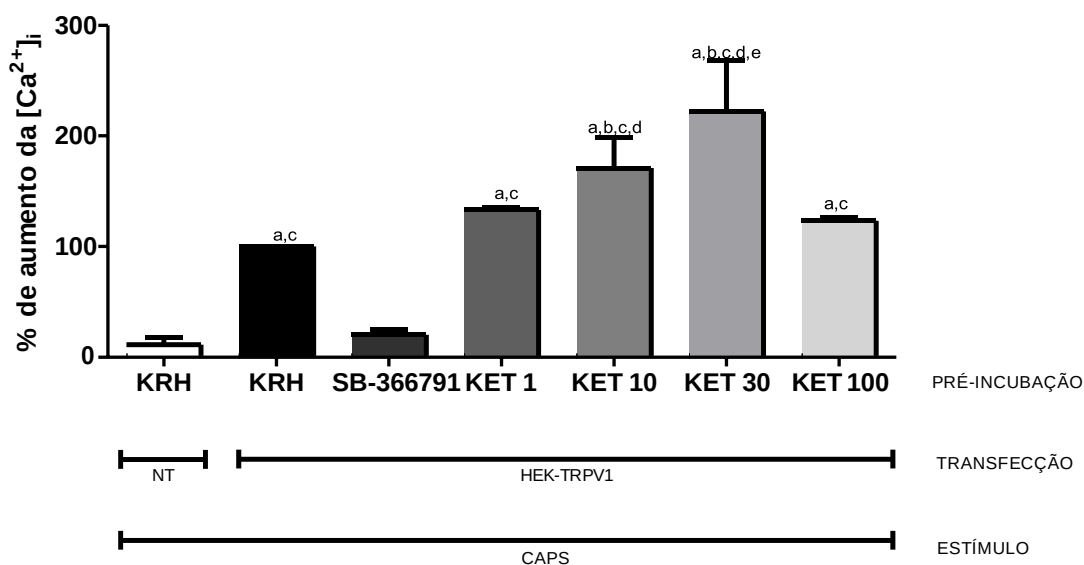


FIGURA 05: A pré-incubação com cetamina potencializa a resposta do receptor induzida pela capsaicina. Os resultados expressam a média $\pm$ EPM, de pelo menos três lamínulas de cada condição experimental avaliadas em três experimentos independentes. a: estatisticamente diferente de KRH-NT na presença de capsaicina. b: estatisticamente diferente de KRH-HEK-TRPV1 na presença de capsaicina. c: estatisticamente diferente de SB-366791 na presença de capsaicina. d: estatisticamente diferente de KET 1 μM na presença de capsaicina. e: estatisticamente diferente de KET 100 μM na presença de capsaicina. $P < 0,05$.

4.3 EFEITO DA CETAMINA NA $[Ca^{2+}]_i$ EM DRGS DE RATOS.

Em seguida, investigamos se os efeitos observados da cetamina em células HEK-TRPV1 podiam ser observados em células do sistema nervoso periférico (DRGs) que nativamente expressam o TRPV1.

A cultura de DRGs também não apresentou variação na $[Ca^{2+}]_i$ quando incubada com cetamina 10 μ M (KET 10) por 15 segundos. Os DRGs em cultura também não apresentaram alteração na $[Ca^{2+}]_i$ quando foram pré-incubados por cinco minutos com o anestésico na ausência de estímulo pela capsaicina – Figura 06.

A fim de comprovar que a cultura preparada era viável, ao final da avaliação experimental do efeito da cetamina 10 μ M nos DRGs foi adicionada ao sistema de perfusão capsaicina 500 nM. A adição de tal substância elevou a fluorescência emitida em aproximadamente 400%, ou seja, aumentou a $[Ca^{2+}]_i$ nos DRGs.

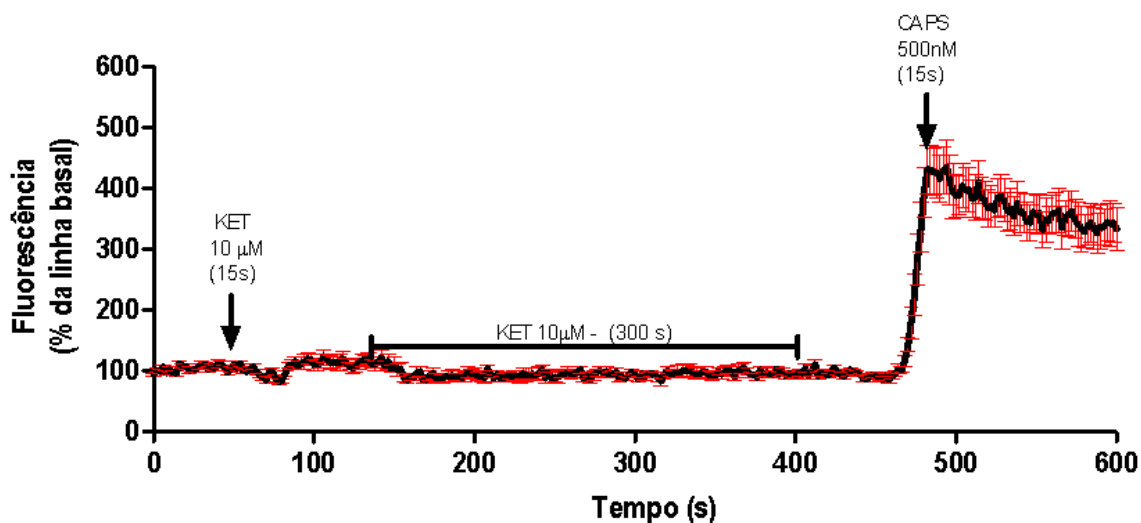


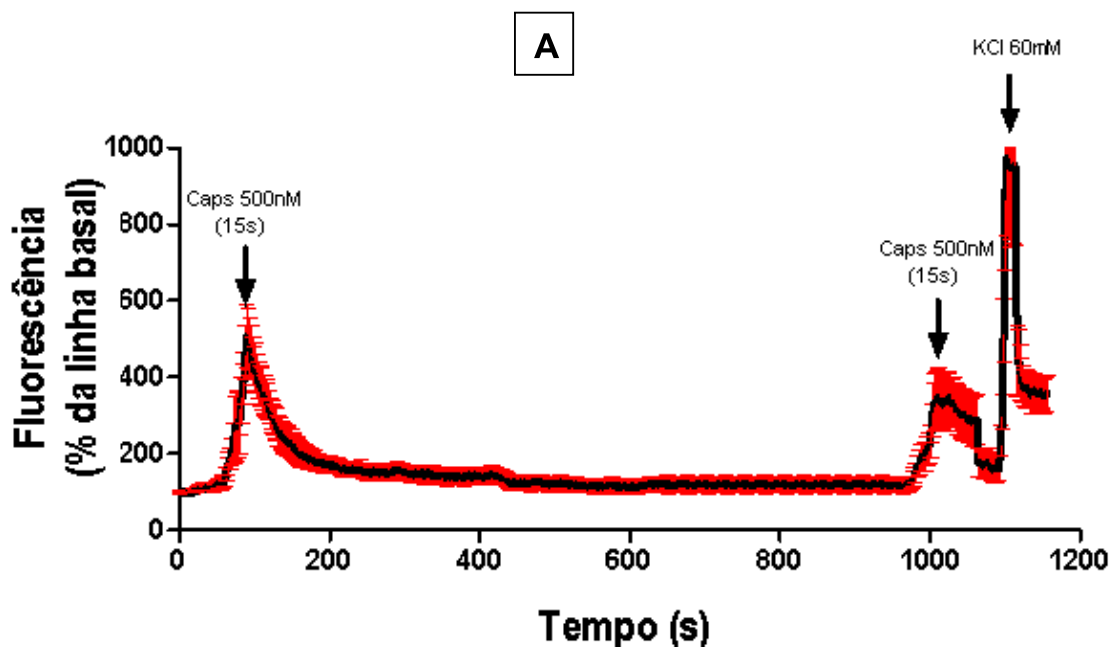
FIGURA 06: Cetamina não é capaz de provocar o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ em DRGs de ratos. O gráfico mostra a variação da fluorescência normalizada pela linha de base de um conjunto de células em unidades arbitrárias (u.a.) x tempo (s). Cada célula presente na análise teve sua fluorescência normalizada pela sua respectiva linha de base. Pontos pretos representam média $\pm$ E.P.M. da fluorescência em células de pelo menos 3 experimentos independentes.

4.4 CETAMINA POTENCIALIZA A RESPOSTA DE $[Ca^{2+}]_i$, INDUZIDA PELA CAPSAICINA, EM DRGs.

A fim de corroborar o dado de que a cetamina era capaz de potencializar a resposta induzida pela capsaicina nas células HEK-293 transfectadas com o TRPV1, pré-incubamos a cultura de DRGs com o anestésico na concentração de 10 μ M. No controle do experimento, a adição de capsaicina (500nM por 15s) aos DRGs induz aumento considerável (aproximadamente 500% da linha de base) na $[Ca^{2+}]_i$. Um segundo estímulo dos DRGs pelo agonista, 15 minutos após o primeiro, induz novo aumento da $[Ca^{2+}]_i$ de amplitude aproximadamente 34% menor (Figura 07-A).

Entretanto, quando o segundo estímulo com capsaicina é aplicado após incubação com cetamina (10 μ M, por 10 minutos e após o primeiro estímulo), a amplitude desse segundo estímulo ultrapassa em aproximadamente 19% a amplitude do 1º estímulo (Figuras 07-B e 07-C).

Esses dados sugerem que semelhantemente ao observado com células HEK-TRPV1, a cetamina foi capaz de potencializar, em DRGs, a resposta dessas células à capsaicina.



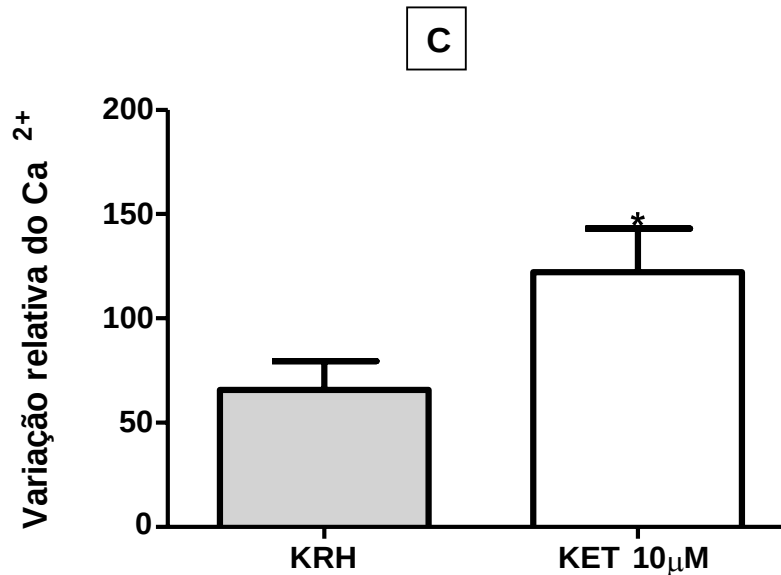
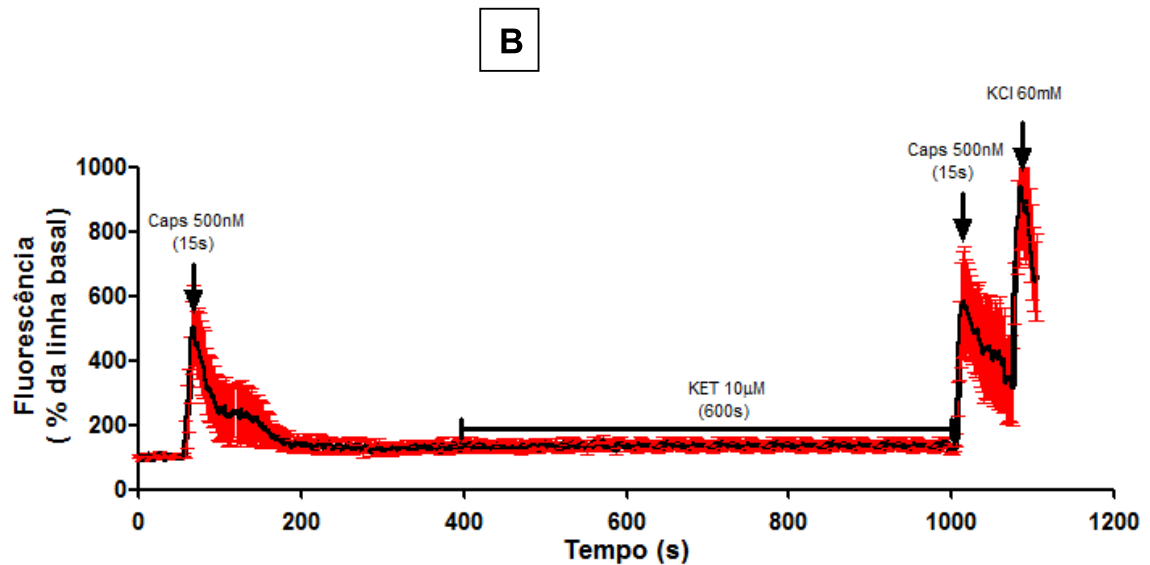


FIGURA 07: A Cetamina restaura e potencializa a segunda resposta induzida por capsaicina no DRG de ratos. Os gráficos (A) e (B) mostram a variação da fluorescência normalizada pela linha de base de um conjunto de células em unidades arbitrárias (u.a.) x tempo (s). (A) Resposta das células a dois estímulos com capsaicina 500 nM com intervalo de 15 minutos entre os estímulos. (B) Resposta das células a dois estímulos com capsaicina 500 nM com intervalo de 15 minutos entre os estímulos. Durante os 15 minutos de intervalo entre as administrações de capsaicina foi adicionado cetamina 10 μ M de maneira ininterrupta por 10 minutos. Pontos pretos representam média $\pm$ E.P.M. da fluorescência em células de pelo menos 3 experimentos independentes. (C) Quantificação das respostas obtidas em “A” e em “B”. O gráfico indica a porcentagem do segundo pico de cada gráfico (“A” e “B”) em relação ao primeiro pico de cada respectivo gráfico. As barras representam média $\pm$ E.P.M. (*P < 0.05).

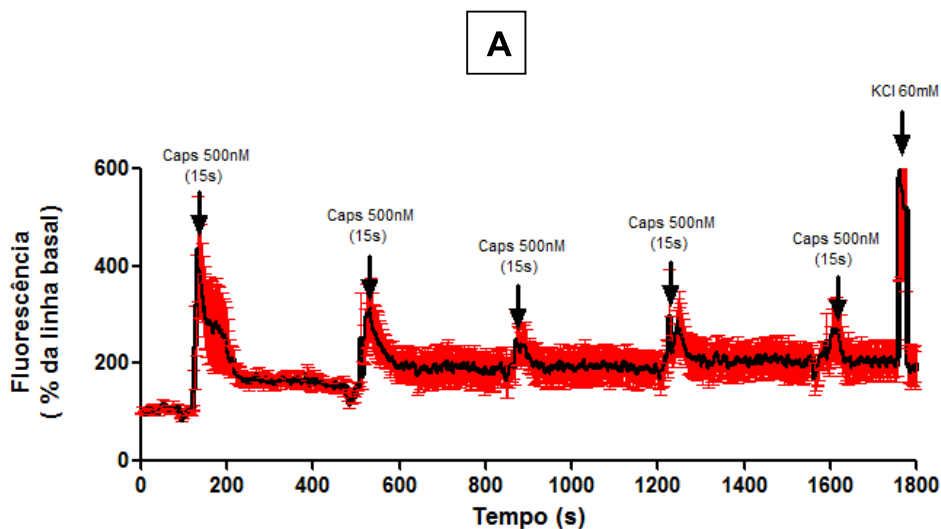
4.5 A CETAMINA PREVINE A DESSENSIBILIZAÇÃO INDUZIDA POR CAPSAICINA EM DRGs.

Após a observação de que a cetamina era capaz de promover a restauração da segunda resposta consecutiva induzida por capsaicina em DRGs, decidiu-se avaliar a capacidade do anestésico intravenoso em promover a resensibilização do TRPV1 após dessensibilização induzida por capsaicina.

A figura 08-A demonstra que a capsaicina induz aumento considerável na $[Ca^{2+}]_i$ nos DRGs. Contudo, após estímulos sucessivos de capsaicina (com intervalos de seis minutos entre os mesmos) observam-se aumentos cada vez menores na $[Ca^{2+}]_i$. A quantificação da intensidade do quinto pico em relação à intensidade do primeiro pico de resposta ao agonista sugere redução de 40,6% da amplitude (Figura 08-A) na $[Ca^{2+}]_i$.

A figura 08-B mostra que a incubação contínua com cetamina 10 μ M durante a estimulação sucessiva dos receptores com a capsaicina é capaz de prevenir a dessensibilização do receptor, pois, a fluorescência emitida no quinto pico não só atinge o valor emitido pelo primeiro pico, como o ultrapassa em aproximadamente 23% (Figura 08- B).

A figura 08-C quantifica as porcentagens de redução e de aumento do quinto pico, quando comparado ao primeiro pico, na ausência e na presença de cetamina 10 μ M, respectivamente.



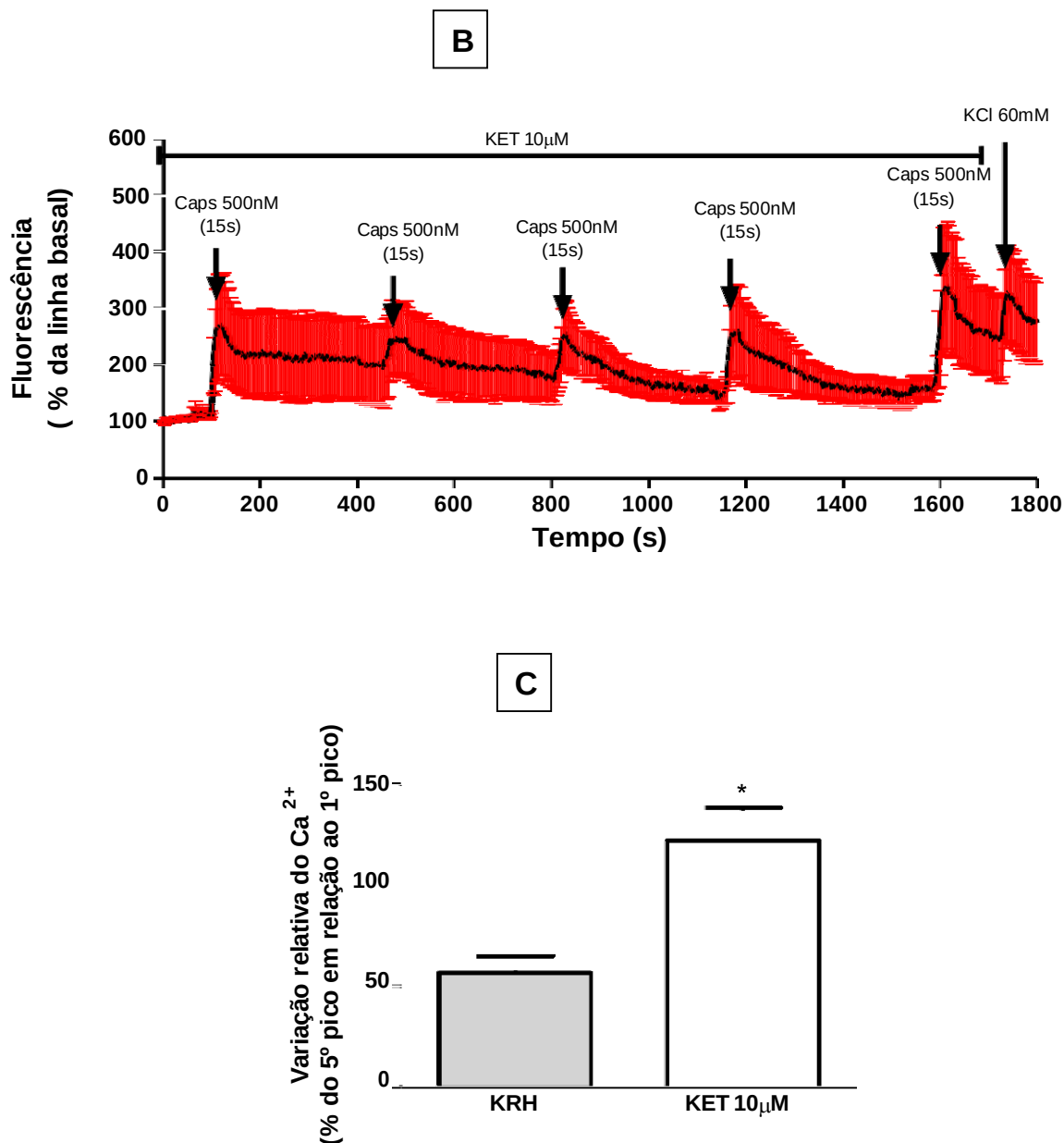


FIGURA 08: A Cetamina reverte a dessensibilização do TRPV1 em DRGs de ratos.

Os gráficos (A) e (B) mostram a variação da fluorescência normalizada pela linha de base de um conjunto de células em unidades arbitrárias (u.a.) x tempo (s). (A) Resposta das células a cinco estímulos com capsaicina 500 nM com intervalo de seis minutos entre os estímulos. (B) Resposta das células a cinco estímulos com capsaicina 500 nM com intervalos de seis minutos entre os estímulos. Durante todo o experimento foi adicionado cetamina 10 μ M de maneira ininterrupta. Pontos pretos representam média $\pm$ E.P.M. da fluorescência em células de pelo menos três experimentos independentes. (C) Quantificação das respostas obtidas em "A" e em "B". O gráfico indica a porcentagem do quinto pico de cada gráfico ("A" e "B") em relação ao primeiro pico de cada respectivo gráfico. As barras representam média $\pm$ E.P.M. (* P < 0.05).

4.6 O MECANISMO DE AÇÃO DA CETAMINA É DEPENDENTE DA PKC ϵ .

A fim de avaliar se o mecanismo através do qual a cetamina previne a dessensibilização induzida por capsaicina em DRGs de ratos é dependente da PKC ϵ realizamos pré-tratamentos dos gânglios mantidos em cultura, por 10 minutos, com ψ e RACK (0,5 μ M) e com ϵ V1-2 (0,5 μ M), respectivamente, ativador e inibidor de PKC ϵ .

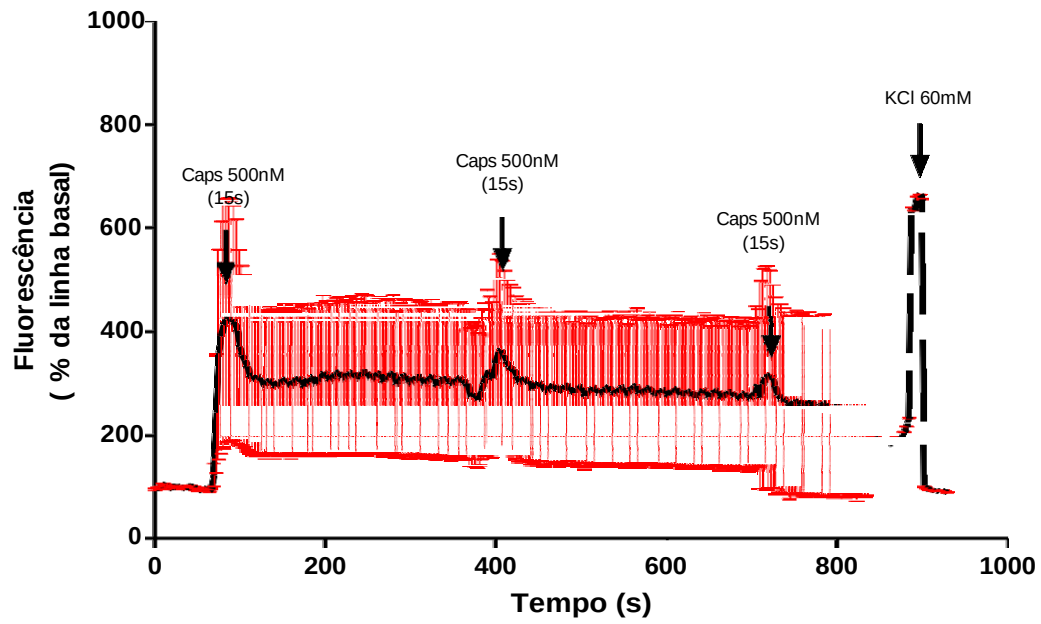
A realização de três estímulos consecutivos, com capsaicina em intervalos de 6 minutos entre cada um deles, foram suficientes para provocar dessensibilização nos receptores, conforme representado na figura 09-A (redução de 30% da fluorescência). Na presença de cetamina 10 μ M, conforme demonstrado na figura 09-B, a dessensibilização dos receptores é revertida e potencializada em, aproximadamente, 30%.

A figura 09 – C demonstra que estímulos sucessivos de capsaicina, na presença de ψ e RACK (0,5 μ M), apresentam resultados análogos aos encontrados na incubação das culturas de DRG com cetamina 10 μ M, pois, a fluorescência emitida pelo terceiro pico não só atinge o valor emitido pelo primeiro, como o supera em 89%, sugerindo prevenção da dessensibilização do receptor.

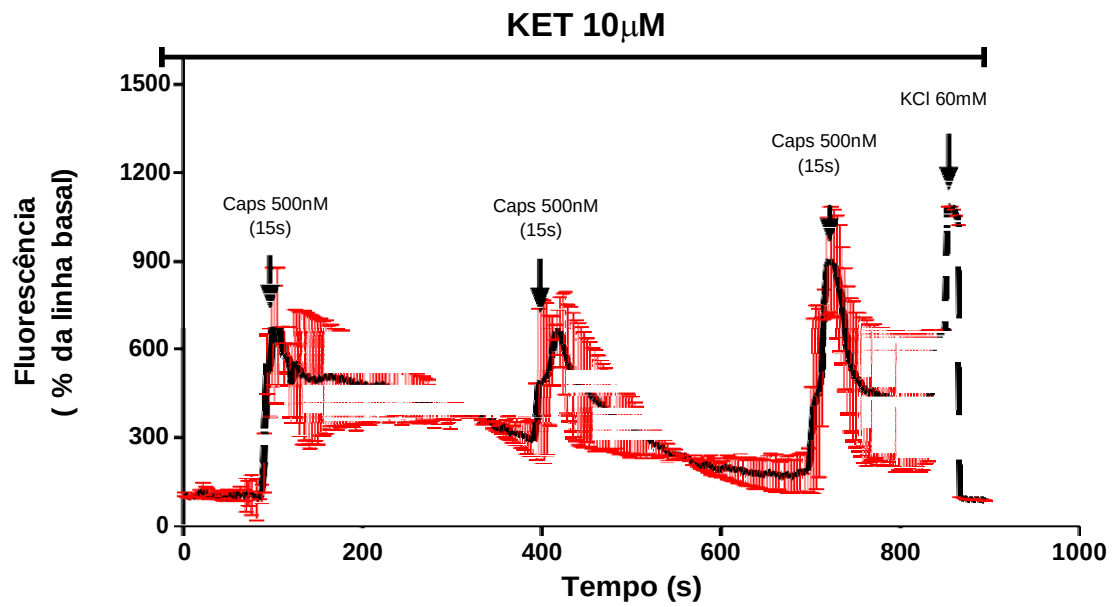
A figura 09-D indica que a fluorescência emitida pela cultura de DRG é menor a cada estímulo sucessivo realizado pela capsaicina, na presença de ϵ V1-2 (0,5 μ M) e de cetamina 10 μ M. Tal dado indica que na presença de inibidor de PKC ϵ o efeito da cetamina em reverter os quadros de dessensibilização dos receptores é anulado, sugerindo-se assim que o mecanismo de ação da cetamina 10 μ M é dependente da PKC ϵ . A fluorescência emitida pelo terceiro pico é 43% menor do que a emitida pelo pico inicial.

A figura 09-E quantifica as porcentagens de variação relativa do Ca²⁺, entre o terceiro e o primeiro pico de estimulação pela capsaicina, na ausência e na presença do anestésico, na presença do ativador de PKC ϵ e na presença de cetamina 10 μ M associada ao inibidor de PKC ϵ .

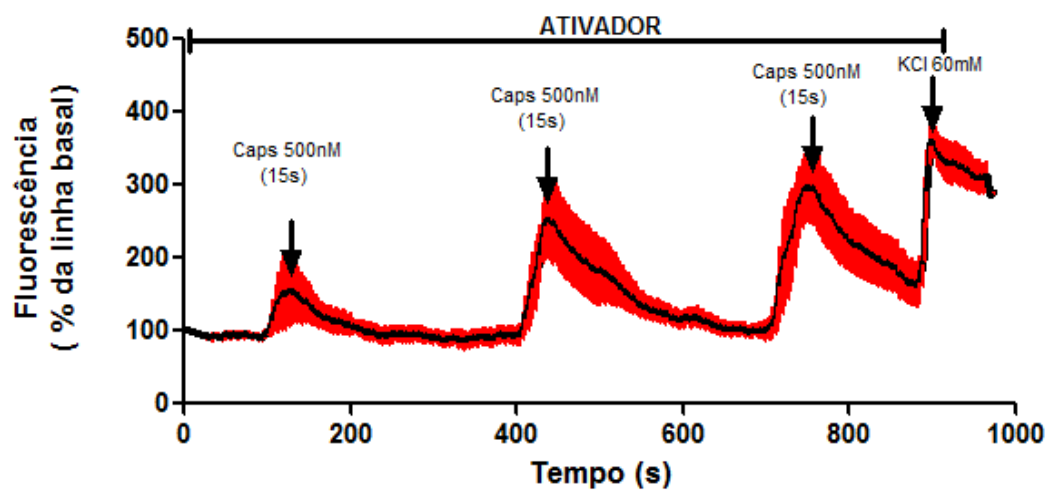
A



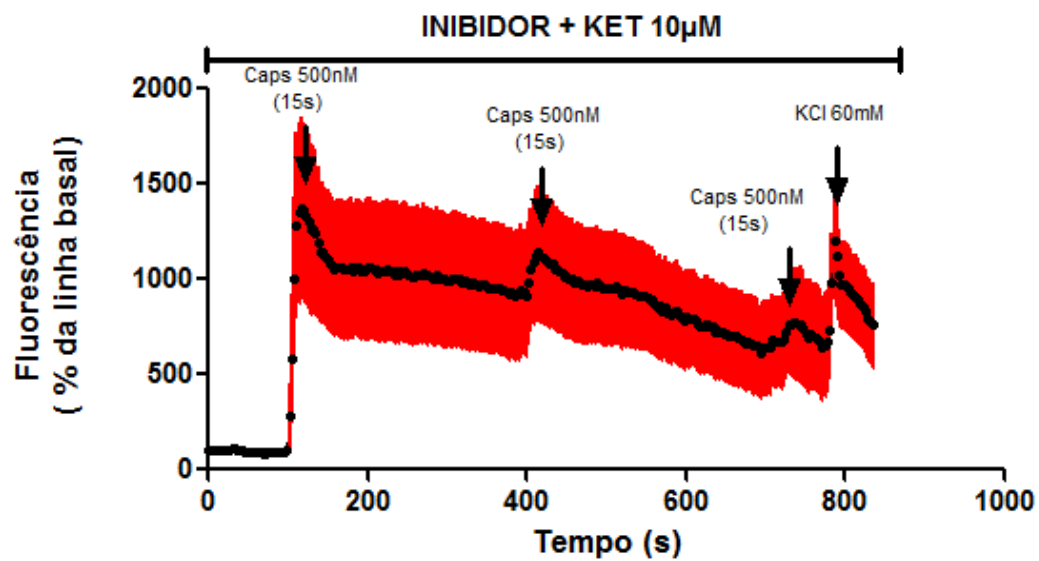
B



C



D



E

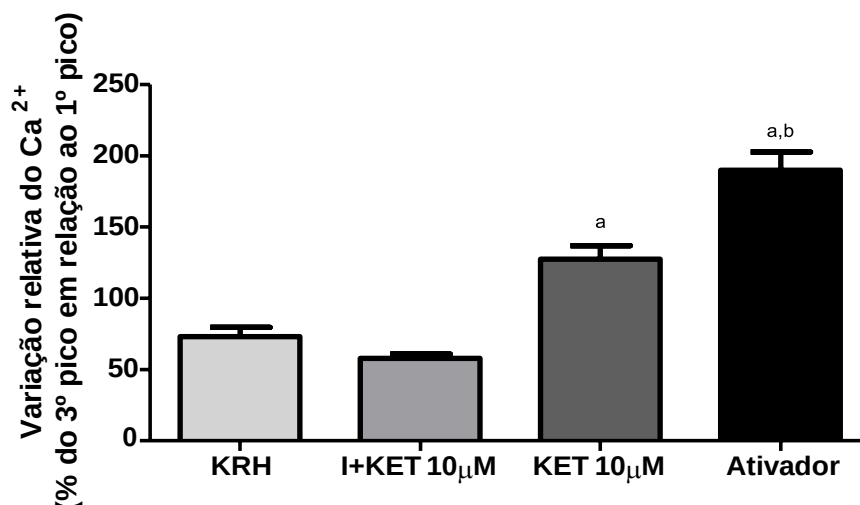


FIGURA 09: A ação da cetamina é dependente da PKC ϵ . Os gráficos (A), (B), (C) e (D) mostram a variação da fluorescência normalizada pela linha de base de um conjunto de células em unidades arbitrárias (u.a.) x tempo (s). (A) Resposta das células a três estímulos com capsaicina 500 nM com intervalo de seis minutos entre os estímulos. (B) Resposta das células a três estímulos com capsaicina 500 nM com intervalos de seis minutos entre os estímulos. Durante todo o experimento foi adicionado cetamina 10 µM de maneira ininterrupta. (C) Resposta das células a três estímulos com capsaicina 500 nM com intervalo de seis minutos entre os estímulos, na presença de ativador de PKC ϵ . (D) Resposta das células a três estímulos com capsaicina 500 nM com intervalo de seis minutos entre os estímulos, na presença de cetamina 10 µM + inibidor de PKC ϵ . No final dos experimentos (A), (B), (C) e (D) foi adicionado KCl 60 mM para comprovar a viabilidade celular após os ensaios. Pontos pretos representam média $\pm$ E.P.M. da fluorescência em células de pelo menos três experimentos independentes. (E) Quantificação das respostas obtidas em (A), (B), (C) e (D). O gráfico indica a porcentagem do terceiro pico de cada gráfico (A, B, C e D) em relação ao primeiro pico de cada respectivo gráfico. As barras representam média $\pm$ E.P.M. ($P < 0.05$). a: estatisticamente diferente de KRH. b: estatisticamente diferente de I+KET 10µM.

4.7 EFEITOS DA CETAMINA NA VIABILIDADE CELULAR EM DRGS.

A população dos neurônios nas culturas de DRGs preparadas era sempre heterogênea em muitos aspectos, tais como viabilidade celular (medida através da responsividade ao KCl), responsividade dos mesmos à capsaicina e em relação ao diâmetro dos neurônios. Eram considerados viáveis os neurônios que, após a adição de KCl, tinham seus níveis de fluorescência aumentados, no mínimo, em 50% acima da linha de base (Figura 7-A e figura 10-A).

Em relação à responsividade à capsaicina podemos classificar os neurônios em “CAPS +” e em “CAPS -” de acordo com a capacidade de responderem ou não ao agonista de TRPV1, respectivamente. A responsividade à capsaicina é a principal característica de um nociceptor. Já em relação ao diâmetro podemos classificá-los em neurônios pequenos (<15 µm de diâmetro), médios (entre 15 e 30 µm de diâmetro) e grandes (> 30µm de diâmetro) (Lu et al., 2006).

Avaliamos em seguida se o tratamento com cetamina altera a proporção de neurônios responsivos à capsaicina. Inicialmente avaliamos se a presença do anestésico influenciava na responsividade da população total de neurônios à capsaicina. Dentre as células viáveis (responsivas a um estímulo final com KCl) quantificamos o percentual de células responsivas à capsaicina (“CAPS +”) e as não responsivas (“CAPS -”) na ausência e na presença de cetamina. Os dados desse experimento estão apresentados na figura 10.

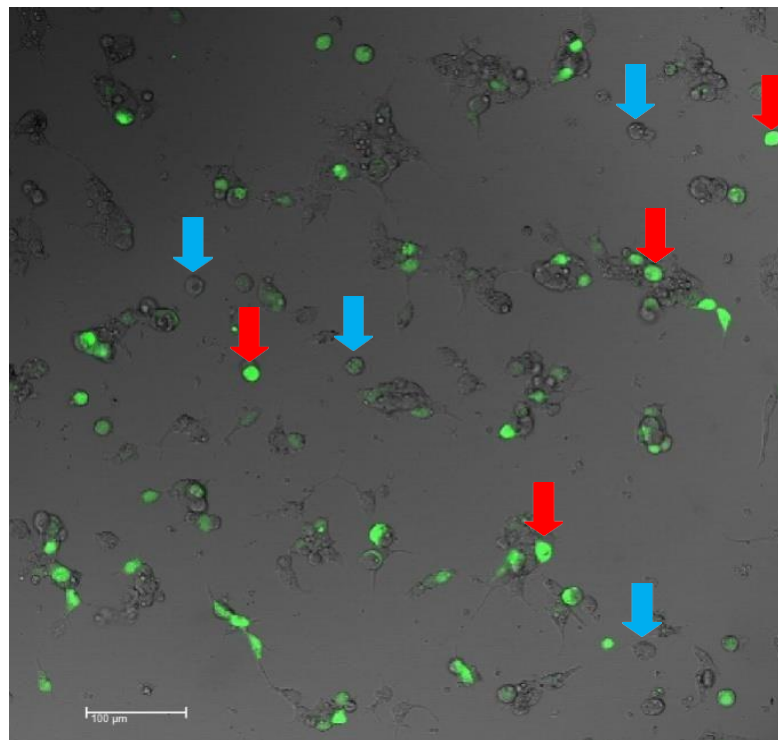
Na ausência do anestésico, $58,6 \pm 5,2\%$ das células mostraram responsividade à capsaicina. A incubação das células com a presença do anestésico (KET 10µM, por 15 minutos) reduz a quantidade de células responsivas à capsaicina a $27,3 \pm 6,0\%$ ($p < 0.05$ em relação ao controle) - Figura 10-B.

É bem relatado na literatura que a responsividade à capsaicina em DRGs é mais prevalente em neurônios de pequeno diâmetro do que em neurônios de grande diâmetro (Cardenas et al., 1995; Lu et al., 2006). Após

observar que a cetamina causou redução no percentual total de neurônios “CAPS +”, decidimos então avaliar se essa redução estava associada ao tamanho dos neurônios. A figura 10-C mostra que a população de células “CAPS +” segue uma distribuição normal quanto ao diâmetro do corpo celular apresentando média de 25 μm . O tratamento com cetamina não alterou a distribuição das células “CAPS +”, sugerindo que a redução da responsividade provocada pela cetamina independe do tamanho neuronal, ou seja, não é restrita a neurônios de pequeno diâmetro.

Para confirmar o efeito da cetamina em reduzir a viabilidade celular – figura 10 B- realizamos o ensaio de MTT, que avalia a quantidade de células viáveis de maneira indiscriminada. A análise da figura 11 indica que doses diferenciadas da cetamina (1 μM , 10 μM , 30 μM e 100 μM) são capazes de reduzir significativamente a viabilidade celular na cultura de DRGs. As concentrações de 10 e 30 μM foram as que induziram maior percentual de morte celular (25 $\pm$ 4,9 e 28,3 $\pm$ 1,7% de morte, respectivamente) comparado ao controle com H_2O_2 .

A



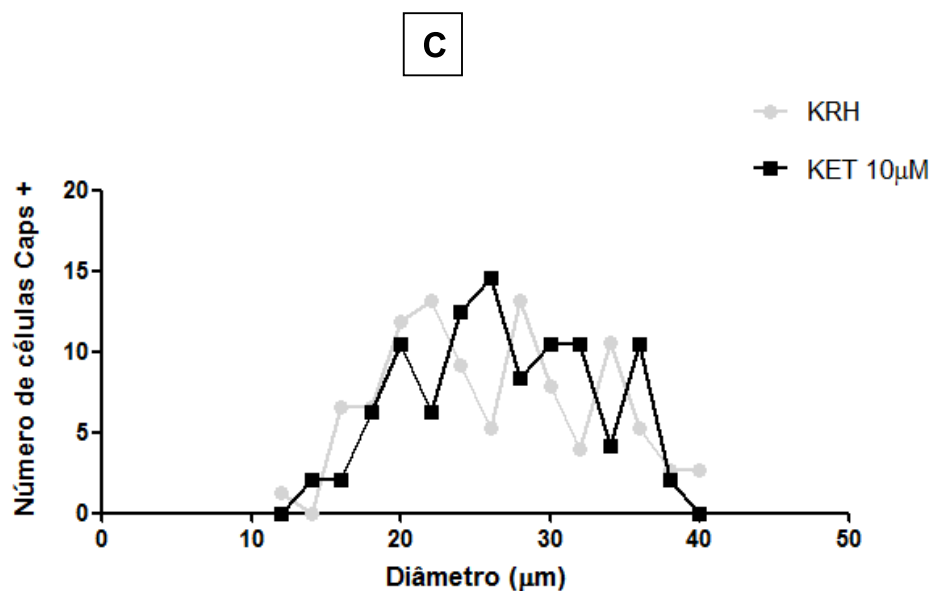
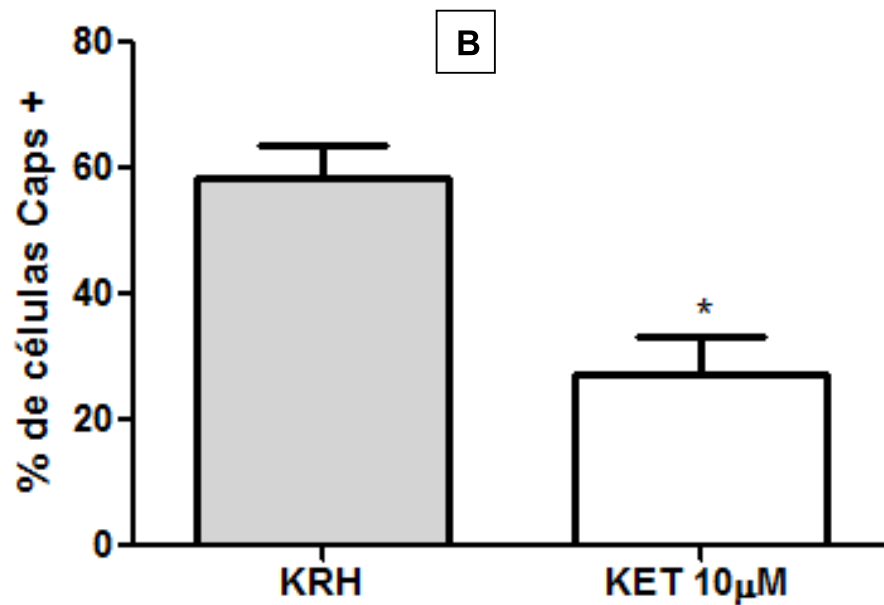


FIGURA 10: A cetamina reduz a quantidade de células responsivas à capsaicina. (A) Variação da $[Ca^{2+}]_i$ em cultura de DRGs em resposta ao KCl. Imagem de luz transmitida sobreposta à imagem de luz de fluorescência de DRGs marcados com fluo 4-AM. As setas vermelhas indicam células responsivas ao KCl enquanto as células azuis indicam células não responsivas ao KCl. Barra de escala 100µM. (B) Quantificação das células responsivas à capsaicina (“CAPS +”) na ausência e na presença de cetamina 10µM (KET 10µM). As barras representam média $\pm$ E.P.M. (* $P < 0.05$) de pelo menos 3 experimentos independentes. (C) Histograma relacionando o diâmetro dos DRGs com a responsividade à capsaicina.

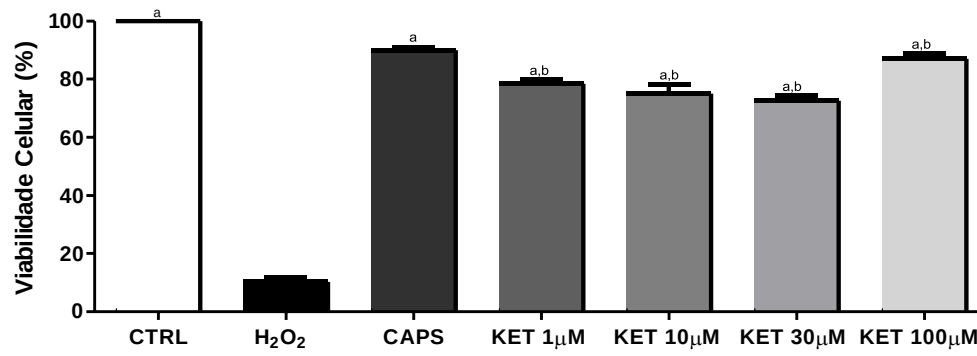


FIGURA 11: A cetamina apresenta efeitos citotóxicos em DRGs. Dados representativos de três experimentos independentes a: estatisticamente diferente de H₂O₂ 1.000µM. b: estatisticamente diferente de CTRL. P <0,05.

4.8 CETAMINA SENSIBILIZA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR CAPSAICINA.

A fim de reproduzir os resultados experimentais encontrados *in vitro* realizamos teste nociceptivos em animais.

Aplicações intraplantares de cetamina, 20, 40, 80 e 160 µg/pata, nos ratos não foi capaz de evocar estímulos nociceptivos nos animais, sugerindo, novamente que o anestésico não é capaz de ativar diretamente as vias de dor- Figura 12-A.

A administração intraplantar de capsaicina 1nmol/pata (Castro-Junior et al., 2013), produziu efeito nociceptivo nos animais, caracterizado pela intensa lambertura das patas e reflexo de retirada das mesmas do assoalho das caixas de acrílico em que os animais foram inseridos para observação (Grupo “CT” – Figura 12-B). Após observação dos animais por 5 minutos, foi percebido comportamento nociceptivo, nos animais que receberam aplicações de salina (Grupo “Veículo” – Figura 12-B) e de capsaicina, respectivamente, por $19 \pm 4,2$ segundos e por $53 \pm 7,1$ segundos (Figura 12-B).

A injeção de SB 3 nmol/pata (Castro-Junior et al., 2013) um antagonista de TRPV1, previamente à aplicação intraplantar de capsaicina nos animais, reduziu em 47% o comportamento nociceptivo dos animais para $28 \pm 5,3$ segundos (Figura 12-B).

Aplicações intraplantares de cetamina, previamente à capsaicina, nas concentrações de 20, 40, 80 e 160 µg/pata (Romero, Duarte, 2013) aumentaram o comportamento nociceptivo dos animais, respectivamente, para $79 \pm 2,6$ segundos (aumento de 49%), $93 \pm 6,0$ segundos (aumento de 75%), $143 \pm 9,3$ segundos (aumento de 170%) e $124 \pm 9,2$ segundos (aumento de 133%) - Figura 12-B. Tal dado corrobora os resultados encontrados, *in vitro*, (Figuras 05 e 07) de que o anestésico é capaz de potencializar a resposta induzida pela capsaicina nos receptores TRPV1.

O efeito nociceptivo consequente da aplicação da cetamina previamente à capsaicina foi dose dependente nas concentrações de 20, 40 e 80 µg de cetamina/pata. A dose de 160 µg/pata apresentou efeito nociceptivo considerável,

porém, menor do que a dose de 80 µg/pata, sugerindo que o anestésico tenha efeito máximo na concentração de 80 µg/pata. Esse dado está de acordo com os resultados encontrados, *in vitro* (Figura 05).

As doses de capsaicina, SB e cetamina empregadas no experimento de comportamento animal foram determinadas através da literatura (Castro-Junior et al., 2013; Romero, Duarte, 2013) e de curvas doses respostas (Figura 12-A para a cetamina). As curvas dose-resposta para Capsaicina e para o SB não foram apresentadas.

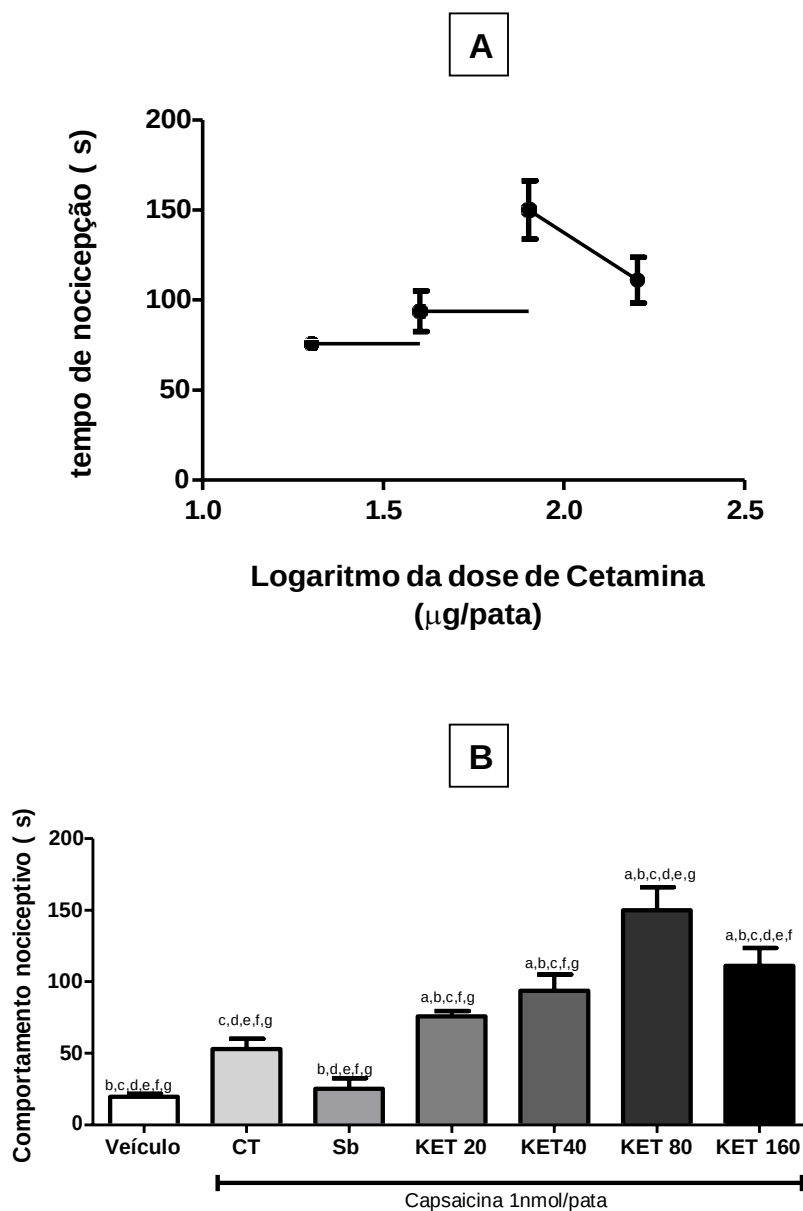


FIGURA 12: A cetamina aumenta o tempo de nocicepção em ratos, de forma dose-dependente nas concentrações de 20, 40 e 80 µg/pata. (A): Curva dose resposta de cetamina. (B) Dados representativos de cinco experimentos independentes. a: estatisticamente diferente de Veículo; b: estatisticamente diferente de controle (CT); c: estatisticamente diferente de SB; d: estatisticamente diferente de KET 20; e: estatisticamente diferente de KET 40; f: estatisticamente diferente de KET 80; g: estatisticamente diferente de KET 160 na $P < 0,05$.

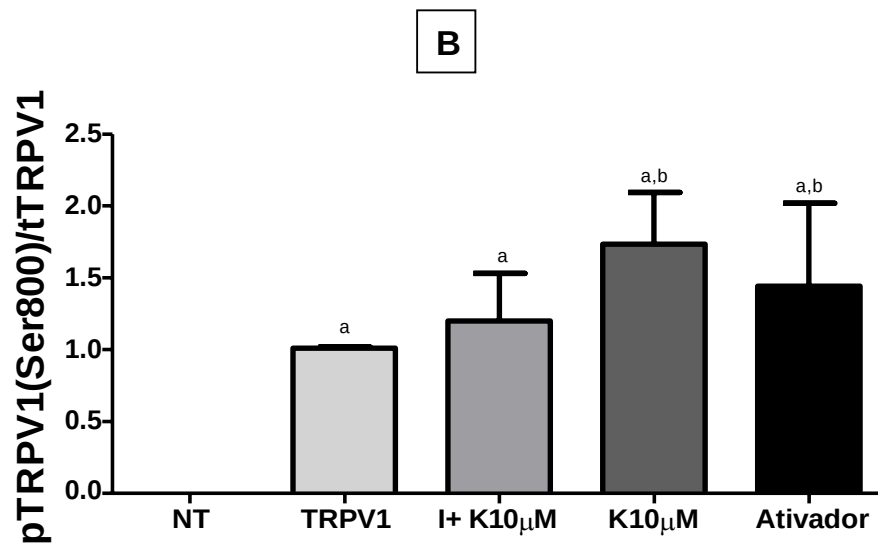
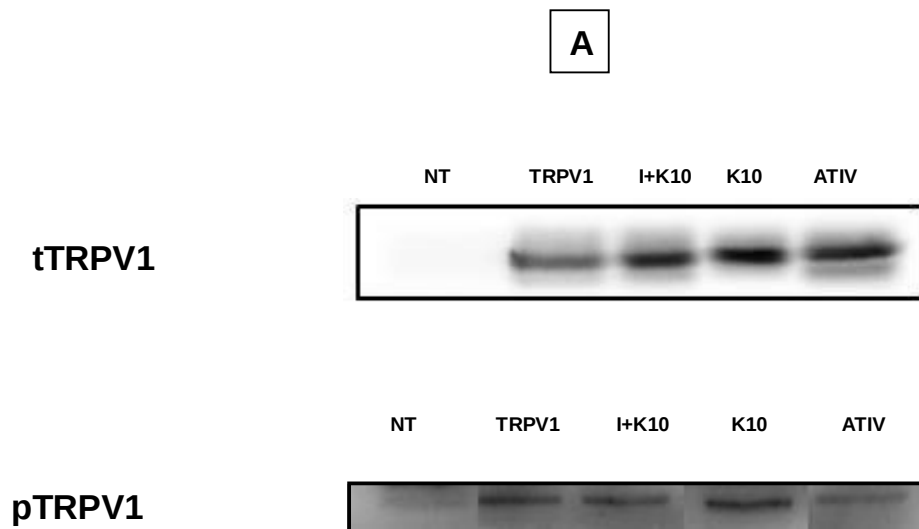
4.9 CETAMINA FOSFORILA TRPV1-S800 VIA PKCε.

Para confirmar, bioquimicamente, se o mecanismo de ação da cetamina envolve a fosforilação do TRPV1, foram realizados experimentos de western blotting em culturas de células HEK transfectadas com TRPV1. As células foram divididas em 5 grupos (descritos no item 3.9.1) e incubadas, por 30 minutos, com distintos reagentes.

Experimentos de western blotting foram realizados para avaliar os níveis de expressão proteica de TRPV1 fosforilado (pTRPV1) e de TRPV1 total (tTRPV1) nas células HEK transfectadas. A imagem da figura 13-A e o gráfico da figura 13-B demonstram que na presença da cetamina (grupo “K10 µM”) a relação pTRPV1/tTRPV1 aumentou em $71 \pm 2,1\%$ quando comparada ao grupo TRPV1; enquanto os grupos “inibidor+ cetamina 10µM” (grupo “I+K10µM”); e “ativador de PKCε” (grupo “Ativador”) aumentaram, a mesma relação, em $18 \pm 2,8\%$ e em $42 \pm 4,0\%$, respectivamente. Tal dado sugere que a presença do anestésico contribui para o aumento da fosforilação e, portanto, da ativação do receptor.

Dados prévios da literatura sugerem que a fosforilação do TRPV1 pode ocorrer via PKCε. Para avaliar se o aumento de pTRPV1 induzido por cetamina estava associado à ativação da PKCε, foi realizada uma nova série de experimentos avaliando os níveis de expressão proteica de PKC fosforilada (pPKC) e de PKC total (tPKC) nas células HEK transfectadas com o receptor TRPV1. As imagens da figura 13-C e o gráfico da figura 13-D demonstram que a cetamina, na concentração de 10µM, aumentou em $61 \pm 1,6\%$ a relação pPKC/tPKC quando comparado ao grupo TRPV1 enquanto o grupo “inibidor + cetamina 10µM” reduziu em $4 \pm 3,6\%$ a mesma relação. O grupo “ativador de

PKC ϵ ” promoveu intenso aumento (aumento de $406 \pm 2,9\%$) nos níveis de expressão de pPKC quando comparada à tPKC (Figura 13-D). Tal dado sugere que a presença do anestésico contribui para o aumento da fosforilação da PKC ϵ .



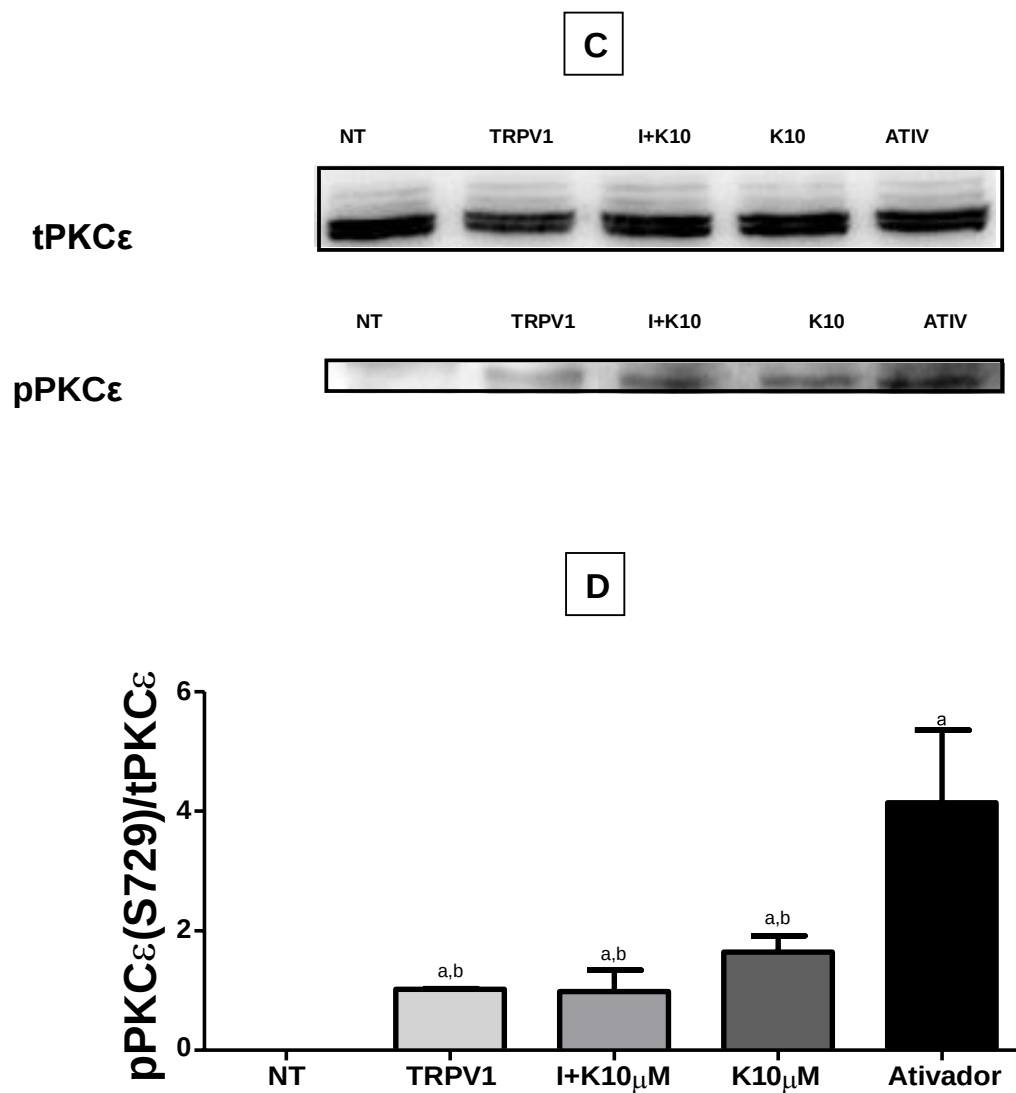


FIGURA 13: Níveis de expressão de TRPV1 e de PKC ϵ , fosforilados e totais, em células HEK na presença e na ausência de cetamina 10 μ M. As imagens (A) e (C) representam corridas de géis para TRPV1 e para PKC ϵ , total e fosforilado. Os gráficos (B) e (D) quantificam as respostas obtidas em (A) e (C). (B) Dados representativos de cinco experimentos independentes. “I” indica a presença do inibidor de PKC ϵ (eV1-2), na concentração de 0,5 μ M e “Ativador” ou “ATIV” indicam a presença de ψ e RACK na concentração de 0,5 μ M. a: estatisticamente diferente de controle não transfectado (NT); b: estatisticamente diferente de TRPV1. (D) Dados representativos de cinco experimentos independentes a: estatisticamente diferente de controle não transfectado (NT); b: estatisticamente diferente de ativador. As barras representam média $\pm$ E.P.M. ($P < 0.05$).

V. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou de forma inédita a ação da cetamina diretamente em receptores TRPV1. Diversos trabalhos avaliaram as ações fisiológicas deste anestésico que pudessem justificar seu notável efeito analgésico, mas em nenhum deles avaliou-se a atuação da cetamina no SNP.

O TRPV1 é um receptor expresso nos neurônios sensoriais periféricos atuando como detector da dor induzida por diversos estímulos tais como químicos e térmicos. Tal receptor pode ser ativado diretamente pelo isoflurano, um anestésico geral inalatório, através de um mecanismo dependente de PKC ϵ (Cornett et al., 2008). Experimentos de aplicação concomitante em neurônios sensoriais de isoflurano e de bradicinina, um importante mediador da resposta tecidual inflamatória, sugerem que na presença de bradicinina, o isoflurano ativa o TRPV1 reforçando a hipótese de que os anestésicos inalatórios podem contribuir para o aumento da resposta nociceptiva pós-cirúrgica (Cornett, 2008). Concentrações clínicas de isoflurano, sevoflurano, enflurano e de desflurano podem sensibilizar o TRPV1 para capsaicina e prótons e podem ainda diminuir o limiar térmico de ativação do receptor (Cornett, 2008).

Assim, a primeira avaliação realizada neste estudo foi analisar a capacidade da cetamina *per se*, nas concentrações de 1, 10, 30 e 100 μ M, em ativar diretamente o TRPV1- figura 04. A incapacidade da cetamina em ativar diretamente o TRPV1 corrobora o dado de Wickley e colaboradores (2010) de que o propofol, outro anestésico geral intravenoso, não exerce efeito direto nesse receptor, embora o propofol não tenha ação analgésica.

Após avaliar que a cetamina não era capaz de ativar diretamente o TRPV1 investigamos se o anestésico seria capaz de modificar a resposta induzida pela capsaicina no TRPV1 tal qual o PMA, o ATP, a temperatura (Mandadi et al., 2004) e o propofol (Wickley et al., 2010) são capazes de fazer. O experimento realizado sugeriu que a cetamina seria capaz de potencializar a resposta induzida pela capsaicina de forma dose dependente em concentrações subclínicas (1,0 μ M) e clínicas (10 μ M e 30 μ M) do anestésico – figura 05.

Apesar da capsaicina ativar os receptores TRPV1 presentes nos DRGs evocando respostas sensoriais dolorosas, estimulações repetitivas dos receptores pela capsaicina causam quadros conhecidos por dessensibilização, ou seja, provocam inativação temporária do receptor (Wickley et al., 2010) e silenciamento temporário dos terminais aferentes. Em 1994, Zhang e Li Wan Po demonstraram que o uso de capsaicina na forma de creme era eficaz para a retirada da dor em certas condições clínicas, tais como a osteoartrite, a neuropatia diabética e a psoríase.

Para observar se a cetamina seria capaz de ressensibilizar o TRPV1 a variação da $[Ca^{2+}]_i$ foi monitorada, em microscopia confocal, após exposições sequenciais dos DRGs à capsaicina (15 s), a fim de induzir a dessensibilização do canal. Quando o processo de dessensibilização é induzido experimentalmente observa-se respostas induzidas pela capsaicina cada vez menos intensas em relação ao aumento da $[Ca^{2+}]_i$ (Mandadi et al., 2004). Em 2010, Wickley e colaboradores demonstraram que o propofol era capaz de restaurar os quadros de dessensibilização do TRPV1, ou seja, de ressensibilizar o receptor. Nossos dados demonstram que após a dessensibilização induzida pela capsaicina no TRPV1, a cultura de DRGs se manteve viável, pois, estava responsiva ao estímulo fisiológico de KCl -figura 08 A. A dessensibilização realizada durante exposição contínua dos neurônios DRGs ao anestésico (10 μ M) restaurou a potência de resposta do receptor às sucessivas estimulações induzidas pela capsaicina, o que pode ser percebido pela manutenção e aumento da $[Ca^{2+}]_i$ em cada pico de estimulação e pela manutenção da resposta da cultura aos estímulos fisiológicos de KCl. Assim, pode-se dizer que a cetamina restaura e potencializa a sensibilidade do receptor TRPV1 em DRGs. Cabe ressaltar que o efeito de ressensibilização do receptor encontrado neste experimento não pode ser atribuído ao tempo de recuperação da dessensibilização, pois a incubação dos DRGs com solução fisiológica (KRH - figura 08A) pelo mesmo tempo de incubação com o anestésico (cetamina 10 μ M - figura 08B) não foi capaz de promover a restauração nem a potencialização da sensibilidade do TRPV1. Isso pode ser evidenciado na figura 08-A em que entre os picos de resposta decorrentes das aplicações do agonista não foi observado aumento na $[Ca^{2+}]_i$.

Estudos prévios sugerem que os mecanismos moleculares que medeiam a sensibilização, a dessensibilização e a ressensibilização do TRPV1 envolvem fosforilações e desfosforilações deste receptor em diversos locais regulados pela PKC e pela PKA (Mandadi et al., 2004; Mohapatra, Nau, 2005; Novakova et al., 2007; Vyklický et al., 2008). Cabe ressaltar que a compreensão dos sistemas de segundos mensageiros envolvidos na regulação da dessensibilização do TRPV1 à capsaicina é de suma importância, pois pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas para controlar a dor.

Estudos nessa linha de pesquisa demonstram que os domínios citoplasmáticos do TRPV1 apresentam sítios que podem ser regulados pela PKC e pela PKA mediante fosforilação (Bhave et al., 2002; Numazaki et al., 2002). Dentre esses sítios, destacam-se alguns resíduos de serina, tais como o S502 e o S800, que já foram associados como essenciais para a potenciação, por PMA, ATP e calor, e para a ativação do TRPV1 induzida por capsaicina (Numazaki et al., 2002). O resíduo S502 foi identificado como possível de ser fosforilado pela PKC e pela PKA (Mandadi et al., 2004); o S800 pode ser especificamente fosforilado pela PKC ϵ (Zhou et al., 2001; Mandadi et al., 2004; Mandadi et al., 2006) e o S116 é fosforilado pela PKA e já foi identificado como essencial para inibir a dessensibilização do TRPV1 induzida por estimulações sucessivas pela capsaicina (Bhave et al., 2002). Como a fosforilação do resíduo S502 pela PKA não inibe a dessensibilização do receptor induzida por estimulações consecutivas de capsaicina acredita-se que a fosforilação, pela PKC, nos resíduos S800 e no S502 sejam os mais prováveis de regularem a dessensibilização do TRPV1.

Em 2010, Wickley e colaboradores demonstraram que o propofol é capaz de induzir a ativação da PKC ϵ e a subsequente fosforilação do receptor no resíduo S 800 e sugeriram que esse mecanismo seria o responsável pela restauração da sensibilidade do TRPV1 à capsaicina e também pela atenuação da capacidade da capsaicina em dessensibilizar o TRPV1. Assim, constituiu grande interesse neste trabalho avaliar a participação da PKC ϵ nos mecanismos de fosforilação, de potencialização da resposta induzida pela capsaicina no receptor e de recuperação dos quadros de dessensibilização no receptor TRPV1, especificamente no resíduo S800 do TRPV1.

Para tanto, realizamos, inicialmente, experimentos em microscopia confocal avaliando os efeitos de ψ e RACK e de ϵ V1-2, respectivamente, ativador e inibidor de PKC ϵ . A presença de ψ e RACK aumentou, consideravelmente (aproximadamente 89%), a fluorescência emitida pelo 3º pico de resposta, em relação ao 1º pico, pelos DRGs estimulados sucessivamente pela capsaicina. A estimulação dos DRGs com capsaicina na presença de ϵ V1-2 e de cetamina inibiu em 43%, o 3º pico de resposta da cultura em comparação a 1º pico figura 09- C-D-E. Tal dado nos sugeriu que os mecanismos de modulação da sensibilização do TRPV1 pela cetamina envolvem a participação da PKC ϵ . Os resultados encontrados durante a realização deste protocolo experimental estão em consonância com os dados obtidos em 2010, para o anestésico propofol. Wickley e colaboradores demonstraram que o pré-tratamento das culturas de DRG com propofol e com ϵ V1-2 (0,5 μ M), simultaneamente, inibiram a restauração da dessensibilização do TRPV1 induzida pelo tratamento feito unicamente com o anestésico. Além disso, o tratamento das culturas de DRGs com ψ e RACK (0,5 μ M), assim como em nossos dados, restaurou a sensibilidade do receptor TRPV1.

A fim de avaliar melhor tal resultado foram realizados experimentos de western blotting visando analisar os níveis de expressão do TRPV1 fosforilado, quando comparado ao TRPV1 total na presença e na ausência de cetamina (figura 13 A-B). Os resultados nos sugerem que a cetamina aumenta em 71% os níveis de expressão do TRPV1 fosforilado comparado ao total enquanto o ativador (ψ e RACK) aumenta apenas em 42% a fosforilação do receptor. Nossos dados são corroborados por Wickley e colaboradores (2010) que demonstraram que DRGs de camundongos selvagens tratados com propofol apresentam aumento de 100% nos níveis de expressão do TRPV1 fosforilado quando comparado ao TRPV1 total e que na presença de ψ e RACK (0,5 μ M) os níveis de fosforilação do receptor se elevaram em 150%.

Sabendo que o ψ e RACK é uma substância que atua especificamente em PKC ϵ e que na presença do ativador os níveis de fosforilação do receptor foram aumentados, tivemos o indício de que, provavelmente, as PKC ϵ presentes nas células HEK transfectadas com o receptor estavam sendo

ativadas pelo ψ RACK e, conseqüentemente, atuando no TRPV1, fosforilando-o e ativando-o ainda mais.

Para verificar se tal situação ocorria realizamos experimentos de western blotting visando analisar os níveis de expressão de PKC ϵ fosforilada, no resíduo S 729, em comparação com a quantidade de PKC ϵ total na presença e na ausência do anestésico. Cetamina 10 μ M aumentou em 61% a quantidade de PKC ϵ fosforilada em comparação à quantidade de PKC ϵ total enquanto o ativador de PKC ϵ aumentou em, aproximadamente, 400% os níveis de expressão de PKC ϵ fosforilada (figura 13 C-D). Este dado está de acordo com a literatura, que sugere que o propofol aumenta em 50% a proporção de PKC ϵ fosforilada, no resíduo S 729, em cardiomiócitos (Wickley et al., 2006) e que indica que a PKC fosforila o TRPV1 reduzindo a auto dessensibilização do receptor e causando aumento da $[Ca^{2+}]_i$ (Hagenacker et al., 2008). Em 2010, Wickley e seu grupo de pesquisa ainda sugeriram que camundongos knockout para PKC ϵ não apresentaram aumento nos níveis de fosforilação do TRPV1 no resíduo S800 quando comparado ao TRPV1 total, na presença do anestésico, reforçando os indícios de que os quadros de recuperação da dessensibilização do TRPV1, induzidos pelos anestésicos gerais intravenosos envolvem a participação da PKC ϵ .

Uma análise detalhada das figuras 8A e 8B evidencia que a presença do anestésico influi no formato do registro de fluorescência captado, ou seja, é perceptível que na presença de cetamina - figura 8B- é necessário mais tempo para que ocorra a recuperação dos valores de Ca^{2+} para valores próximos ao basal após estímulo com capsaicina. Tal achado é consistente com os dados publicados por Wickley em colaboradores (2010), em que o propofol prolonga o decaimento da $[Ca^{2+}]$ durante a restauração da sensibilidade do TRPV1. Para Wickley tal fato sugere que o propofol poderia de alguma forma regular a habilidade do TRPV1 em se dessensibilizar e dessa forma alterar a via de sinalização da dor.

Além de modificar o padrão de registro de fluorescência foi perceptível durante a realização dos experimentos que na presença do anestésico havia uma menor quantidade de células em cultura responsáveis à capsaicina (Figura

10-B) em decorrência de possível ação citotóxica da cetamina nos DRGs. De fato, Cheng-Huang Shen e colaboradores (2015) demonstraram que a incubação de células uroteliais humanas com cetamina por 24 horas em concentrações variáveis entre 0,01 e 8 mM apresentou efeito citotóxico dose dependente. Corroborando este achado, os dados do presente estudo sugerem que a incubação com cetamina por apenas 30 minutos nas concentrações experimentais utilizadas (1,10, 30 e 100 μ M) também apresentou efeito citotóxico o que poderia justificar a menor quantidade de células responsivas à capsaicina nas culturas incubadas com o anestésico em aproximadamente 20%.

Foi observado também que as respostas fisiológicas das culturas de DRG ao estímulo final com KCl na ausência (figura 08-A) e na presença do anestésico (figura 08-B) eram diferentes no que diz respeito à amplitude do pico de fluorescência induzido pelo KCl. Na ausência da cetamina percebe-se que a fluorescência induzida pelo estímulo com KCl é, aproximadamente, 80% maior do que a fluorescência induzida pelo KCl, na cultura de DRGs, na presença da cetamina. Tal fato também pode ser atribuído à ação citotóxica do anestésico que reduzindo a quantidade de DRGs viáveis poderia ocasionar menor amplitude de resposta da cultura frente ao estímulo induzido pelo KCl.

A fim de correlacionar os resultados encontrados *in vitro* com o observado em sistemas vivos, foram realizados experimentos de comportamento animal. Nestes testes avaliamos e comprovamos a capacidade da cetamina em potencializar a resposta do TRPV1 induzida pela capsaicina (Figura12-B).

As doses de cetamina selecionadas para o experimento e inicialmente empregadas para os testes foram extraídas da literatura. De acordo com a bula do CETAMIM (cloridrato de cetamina 10% - de uso veterinário) a dose recomendada do anestésico, para uso em ratos de laboratório, é de 10 mg/kg do animal por via endovenosa. Assim interessados em avaliar o efeito de doses subanestésicas, anestésicas e supra-anestésicas nos animais preparamos soluções de cetamina nas concentrações de 1mg/kg; 5mg/kg; 10mg/kg e 25mg/kg. Ao injetar as 3 primeiras doses em diferentes ratos, de forma intraplantar, foi observado, rapidamente após a injeção, o aparecimento de

intensos efeitos adversos nos animais, assemelhando-se a movimento involuntário dos membros, tremores musculares, aumento do tônus muscular, tonturas, tombamentos e fraqueza. Esses efeitos, apesar de relatados na bula do medicamento como possíveis de ocorrerem, eram inesperados e impossibilitaram o uso das doses selecionadas.

Assim foram realizados experimentos com doses menores do anestésico nas concentrações de 20, 40, 80 e 160 µg/pata (Romero, Duarte, 2013). As doses empregadas eram de 10 a 1,25 vezes menores do que a dose de 1 mg/kg, respectivamente. Apesar das doses em questão terem seu uso indicado como analgésico foi possível perceber, que potencializaram, de forma progressiva, nas concentrações de 20, 40, 80 µg/pata a resposta induzida pela capsaicina nos animais. A dose de 160 µg/pata também potencializou a resposta da capsaicina, porém de maneira menos intensa do que a dose de 80 µg/pata. Tal fato se assemelha aos resultados encontrados nos experimentos *in vitro* (Figura 05).

VI. CONCLUSÃO

Esse estudo demonstra por análise da variação da $[Ca^{2+}]_i$ medida por análises fluorimétricas e por microscopia confocal, por análises bioquímicas e por experimentos comportamentais que o anestésico venoso cetamina modula a sensibilidade à capsaicina do receptor TRPV1 em neurônios sensoriais nociceptivos. Esse trabalho também sugere que:

- A cetamina não é capaz de ativar diretamente o TRPV1.
- A cetamina, em doses subclínicas e clínicas potencializa a resposta do TRPV1 induzida pela capsaicina de maneira dose dependente.
- A cetamina, em concentrações clínicas (10 μ M), restaura a sensibilidade do receptor TRPV1 à capsaicina.
- A cetamina modula a sensibilidade do TRPV1 através de um mecanismo de ação dependente de PKC ϵ .
- A cetamina reduz a quantidade de células viáveis responsivas à capsaicina.
- O diâmetro dos DRGs não influencia na responsividade dos mesmos à presença do anestésico.
- A cetamina apresenta efeitos citotóxicos em DRGs.

VII. REFERÊNCIAS

- 1- ALMEIDA, ROIZENBLATT, TUFIK. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. Brain research.1000 40–56.2004.
- 2- ALTIER, KHOSRAVANI, EVANS, HAMEED, PELOQUIN, VARTIAN, CHEN,BEEDLE, FERGUSON, MEZGHRANI, DUBEL, BOURINET,MCRORY,ZAMPONI. ORL1receptor-mediated internalization of N-type calcium channels. Nat Neurosci 9:31-40. 2006.
- 3- AMERICAN SOCIETY OF ANESTHESIOLOGISTS. Acesso em 2015. <https://www.asahq.org>
- 4- ANTOGNINI, CARSTENS. In vivo characterization of clinical anaesthesia and its components. Br J Anaesth. Jul;89(1):156-66.2002.
- 5- BARASH, CULLEN, STOELLING. - Manual de Anestesiologia Clínica. Barueri: Manole, 1991.
- 6- BAR-JOSEPH, GUILBURD, TAMIR, GUILBURD. Effectiveness of ketamine in decreasing intracranial pressure in children with intracranial hypertension. J Neurosurg Pediatr. 4(1):40-46.2009.
- 7- BAUTISTA, JORDT, NIKAI, TSURUDA, READ, POBLETE, YAMOA, BASBAUM, JULIUS. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. Cell; 124:1269–1282, 2006.
- 8- BECKER, PETERS, SCHROEDER, MANN, HUETHER, GRECKSCH. Ketamine-induced changes in rat behavior: A possible animal model of schizophrenia. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. Jun; 27(4):687-700.1978.
- 9- BHAVE, ZHU, WANG, BRASIER, OXFORD, GEREAU. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. Neuron. 35:721–31.2002.
- 10- BHAVE, HU, GLAUNER, ZHU, WANG, BRASIER, et al. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). Proc Natl Acad Sci USA.100:12480–5. 2003.

- 11- BOURGOIN, ALBANÈSE, WERESZCZYNSKI, CHARBIT, VIALET, MARTIN. Safety of sedation with ketamine in severe head injury patients: comparison with sufentanil. *Crit Care Med.* 31(3):711-717.2003.
- 12- BOWLES, GOLD. Rethinking the paradigm: Evaluation of Ketamine as a neurosurgical anesthetic. *AANA Journal.* 80(6): 445-452. 2012.
- 13- BRADFORD. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, p. 248-54, 7 maio 1976.
- 14- BRÄU, SANDER, VOGEL, HEMPELMANN. Blocking mechanisms of ketamine and its enantiomers in enzymatically demyelinated peripheral nerve as revealed by single-channel experiments. *Anesthesiology.* Feb; 86(2):394-404.1997.
- 15- CARDENAS, EL MAR, SCROGGS. Variation in serotonergic inhibition of calcium channel currents in four types of rat sensory neurons. differentiated by membrane properties. *J Neurophysiol* 74:1870-1879.1995.
- 16- CASTRO-JÚNIOR, MILANO, SOUZA, SILVA, RIGO, DALMOLIN, CORDEIRO, RICHARDSON, BARROS, GOMEZ, SILVA, KUSHMERICK, FERREIRA, GOMEZ. Ph α 1 β toxin prevents capsaicin-induced nociceptive behavior and mechanical hypersensitivity without acting on TRPV1 channels. *Neuropharmacology.* 71: 237-246.2013.
- 17- CESARE, DEKKER, SARDINI, PARKER, MCNAUGHTON. Specific Involvement of PKC-e in Sensitization of the Neuronal Response to Painful Heat. *Neuron*, Vol. 23, 617–624, 1999.
- 18- CATERINA, SCHUMACHER, TOMINAGA, ROSEN, LEVINE, JULIUS. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824.1997.
- 19- CORNETT, MATTA, GERARD. General anesthetics sensitize the capsaicin receptot transient potential V1. *Molecular Pharmacology.* 74 (5) 1261-1268. 2008.
- 20- COSTA, MONTEIRO, BINDA, GOMEZ, GOMEZ. Effect of propofol on the release oh [^{3} H] acethylcoline from rat hippocampal synaptosomes. *Internacional journal of pharmacology.* 10: 494-500.2014.

- 21- CRAVEN. Ketamine. *Anaesthesia*. Dec;62 Suppl 1:48-53. 2007.
- 22- CRISP, PERROTTI, SMITH, STAFINSKY, SMITH. The local monoaminergic dependency of spinal ketamine. *Eur J Pharmacol*. 194:167-72.1991.
- 23- DAI, MORIYAMA, HIGASHI, TOGASHI, KOBAYASHI, YAMANAKA, et al. Proteinase-activated receptor 2-mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. *J Neurosci* 4293–9.2004.
- 24- DAVIDSON, MHA. The evolution of anaesthesia. Altrincham:John Sherratt and Sons.99, 1965.
- 25- DE PETROCELLIS, HARRISON, BISOGNO, TOGNETTO, BRANDI , SMITH, et al. The vanilloid receptor (VR1)-mediated effects of anandamide are potently enhanced by the cAMP-dependent protein kinase. *J Neurochem* 77:1660–3.2001.
- 26- DUARTE, FERREIRA. The molecular mechanism of central analgesia induced by morphine or carbachol and the L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. *Eur J Pharmacol*. 321:171–4.1992.
- 27- DUARTE, LORENZETTI, FERREIRA. Acetylcholine induces peripheral analgesia by the release of nitric oxide. *Eur J Pharmacol* 1186:289–93.1990.
- 28- ECKERT, TADDESE, MCCLESKEY. Isolation and culture of rat sensory neurons having distinct sensory modalities. *J Neurosci Methods* 77:183-190.1997.
- 29- ENGELHARD, WERNER, MÖLLENBURG, KOCHS. S(+)-ketamine/propofol maintain dynamic cerebrovascular autoregulation in humans. *Can J Anaesth*. 48(10):1034-1039.2001.
- 30- FIRESTONE, SAUTER, BRASWELL, MILLER. Actions of general anesthetics on acetylcholine receptor-rich membranes from *Torpedo californica*. *Anesthesiology*, v. 64, p. 694-702, 1986.
- 31- FLOOD, ROLE. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor modulation by general anesthetics. *Toxicol. Lett*, v. 100-101, p. 149-153, 1998.

- 32- FRANKS, WAMIL, JANICKI, HORN, FRANKS, JANSON, VANAMAN, BRANDT. Anesthetic-induced alteration of Ca^{2+} homeostasis in neural cells: a temperature-sensitive process that is enhanced by blockade of plasmamembrane Ca^{2+} -ATPase isoforms. *Anesthesiology*, v. 89, p.149-164, 1998.
- 33- FRANKS, LIEB. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature*. 367:607-614.1994.
- 34-FRANKS. General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat Rev Neurosci* 9:370–386.2008.
- 35- GARTHWAITE. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci*. 14:60-7.1991.
- 36- GOMES, GUATIMOSIM, GOMEZ, LEITE, VIEIRA, PRADO, ROMANO-SILVA, GOMEZ. Effect of halothane on the release of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in dorsal root ganglion neurons. *Neuroreport* 15:1187-1190.2004.
- 37- GONZALES, LOEB, REICHARD, IRVINE. Ketamine inhibits glutamate-, N-methyl-D-aspartate- and quisqualate-stimulated cGMP production in cultured cerebral neurons. *Anesthesiology*. 82:205513.1995.
- 38- GORDH, KARLSTEN, KRISTENSEN. Intervention with spinal MDA, adenosine and NO systems for pain modulation. *Ann Med*. 27:229-34.1995.
- 39- GRAY, WINEGAR, LEONOUKAKIS, FORSAYETH, YOST. TOK1 is a volatile anesthetic stimulated K^+ channel. *Anesthesiology*. Apr; 88(4):1076-84.1998.
- 40- GRYNKIEWICZ, POENIE, TSIEN. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*; 260:3440-3450, 1985.
- 41- GUDERMANN, FLOCKERZI. TRP channels as new pharmacological targets. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 371:241-244.2005.
- 42- HAAS, HARPER. Ketamine: a review of its pharmacologic properties and use in ambulatory anesthesia. *Anesth Prog* 39: 61-8,1992.
- 43- HAESELER, TETZLAFF, BUFLER, DENGLER, MÜNTE, HECKER, LEUWER. Blockade of voltage-operated neuronal and skeletal

muscle sodium channels by S(+)- and R(-)-ketamine. *Anesth Analg*. Apr;96(4):1019-26.2003.

44- HAGENACKER, LEDWIG, BUSSELBERG. Feedback mechanisms in the regulation of intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) in the peripheral nociceptive system: Role of TRPV-1 and pain related receptors. *Cell Calcium*. 43- 215-227. 2008.

45- HEMMINGS, AKABAS, GOLDSTEIN, TRUDELL, ORSER, HARRISON. Emerging molecular mechanisms of general anesthetic action. *Trends in Pharmacological Sciences*. Vol 26(10) 2005.

46- HEMMINGS, YAN, WESTPHALEN, RYAN. The general anesthetic isoflurane depresses synaptic vesicle exocytosis. *Mol Pharmacol*. 2005 May;67(5):1591-9. Epub Feb 22.2005.

47- HIROTA, LAMBERT. I.v. anaesthetic agents do not interact with the verapamil binding site on L-type voltage-sensitive Ca^{2+} channels. *BrJ Anaesth*. Sep; 77(3):385-6.1996.

48- HOFFMAN, TAYLOR, GOODMAN, GILMAN'S. The pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill, New York 2001.

49- HONORÉ. The neuronal background K_2p channels: focus on TREK-1. *Nature Reviews*. April: v.8p251-261. 2007.

50- HU, BHAVE, GEREAU. Prostaglandin and protein kinase A dependent modulation of vanilloid receptor function by metabotropic glutamate receptor5: potential mechanism for thermal hyperalgesia. *J Neurosci* 22:7444–52.2002.

51- INOUE, SHIBUYA, KABASHIMA, NOGUCHI, HARAYAMA, UETA, et al. The mechanism of inhibitory actions of propofol on rat supraoptic neurons. *Anesthesiology*. 91: 167-78.1999.

52- JUNG, SHIN, LEE, HWANG, KOO, CHO, et al. Phosphorylation of vanilloid receptor1 by Ca^{2+} /calmodulin dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J Biol Chem*. 279:7048–54. 2004.

53- KHASAR, LIN, MARTIN, DADGAR, MCMAHON, WANG, HUNDLE, ALEY, ISENBERG, MCCARTER, GREEN, HODGE, LEVINE, MESSING. A Novel Nociceptor Signaling Pathway Revealed in Protein Kinase C e Mutant Mice. *Neuron*, Vol. 24, 253–260, September, 1999.

54- KIKUCHI, WANG, SATO, OKUMURA. In vivo effects of propofol on acetylcholine release from the frontal cortex, hippocampus and striatum studied by intracerebral microdialysis in freely moving rats. *British journal of Anaesthesia*, 80: 644-648. 1998.

55- KOBAYASHI, SUZUKI, INOUE, ITAI, TAKAHASHI, MORI, NISHIZAWA. Expression of iron acquisition related genes in iron deficient rice is co-ordinately induced by partially conserved iron deficiency responsive elements. *J. Exp. Bot.* 56: 1305-1316. 2005.

56- KOESLING, FRIEBE. Soluble guanylyl cyclase: structure and regulation. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 135:41–65. 1999.

57- KOHRS, DURIEUX. Ketamine: Teaching and old drug new tricks. *Anesthesia and Analgesia*. 87:1186-93, 1998.

58- KWAK. Capsaicin Blocks the Hyperpolarization-Activated Inward Currents via TRPV1 in the Rat Dorsal Root Ganglion Neurons. *Exp Neurobiol.*; 21:75-82, 2012.

59- LAMONT. Adjunctive analgesic therapy in veterinary medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2008 Nov;38(6):1187-203. 2008.

60- LEE , LEE , OH. Painful channels in sensory neurons. *Mol Cells* 20:315-324. 2005.

61- LU, ZHANG, GOLD. Intracellular calcium regulation among subpopulations of rat dorsal root ganglion neurons. *J Physiol* 577:169-190. 2006.

62- MACKAY, TWELVES. Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nature*, v. 7, p. 554-567. 2007.

63- MALEQUE; WARNICK; ALBUQUERQUE. The mechanism and site of action of ketamine on skeletal muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 219 (3): 638-645. 1981.

64- MANDADI, NUMAZAKI, TOMINAGA, BHAT, ARMATI, ROUFOGALIS. Activation of protein kinase C reverses capsaicin-induced calcium-dependent desensitization of TRPV1 ion channels. *Cell Calcium.* 35:471– 8. 2004.

65- MANDADI, TOMINAGA, NUMAZAKI, MURAYAMA, SAITO, ARMATI, ROUFOGALIS, TOMINAGA. Increased sensitivity of desensitized

TRPV1 by PMA occurs through PKCepsilon-mediated phosphorylation at S800. *Pain*. 123:106–16. 2006.

66- MARIN, QUIGNARD, LAFON-CAZAL, BOCKAERT. Non-classical glutamate receptors, blocked by both NMDA and non-NMDA antagonists, stimulate nitric oxide production in neurones. *Neuropharmacology*.32:29-36.1993.

67- MARTELLA, DE PERSIS, BONSI, NATOLI, CUOMO, BERNARDI et al. Inhibition of persistent sodium current fraction and voltage-gated L-type calcium current by propofol in cortical neurons: implications for its antiepileptic activity. *Epilepsia*; 46: 624–35.2005.

68- MICALLEF, TARDIEU, GENTILE, et al. Évaluation psychocomportementale de l'administration de faible dose de kétamine chez le sujet sain. *Neurophysiologie Clinique* 33: 138-47, 2003.

69- MILLAN. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57:1-164.1999.

70- MINKE, COOK. TRP channel proteins and signal transduction. *PhysiolRev* 82:429-472.2002.

71- MOHAPATRA, NAU. Regulation of Ca^{2+} dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 280:13424-32.2005.

72- MONCADA, PALMER, HIGGS. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*.43:109–42.1991.

73- MONTELL. The TRP Superfamily of Cation Channels. *Science Signaling* (272) 1-24, re3. 2005.

74- MORGAN, MOFEEZ, BRANDNER. Acute effects of ketamine on memory systems and psychotic symptoms in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* 29:208-18,2004.

75- MOSMAN. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63.1983.

76- MUTOH, TSUBONE, NISHIMURA, SASAKI. Responses of laryngeal capsaicin-sensitive receptors to volatile anesthetics in anesthetized dogs. *Respir Physiol* 111:113–125.1998.

77- MUTOH, TSUBONE. Hypersensitivity of laryngeal C-fibers induced by volatile anesthetics in young guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med* 167:557–562. 2003.

78- NAGASE, IIDA, OHATA, DOHI. Ketamine, not propofol, attenuates cerebrovascular response to carbon dioxide in humans with isoflurane anesthesia. *J Clin Anesth.* 13(8):551-555. 2001.

79- NAGY, DUDEK, RASH . Update on connexins and gap junctions in neurons and in glia in the mammalian nervous system. *Brain Res Rev.* 47:191-215. 2004.

80- NAKAHIRO, ARAKAWA, NARAHASHI. Modulation of aminobutyric acid receptor-channel complex by alcohols. *J Pharmacol Exp Ther* 259:235–240. 1991.

81- NAKAMURA, NAKA, IZUMI. Use of Fura-2/AM to Measure Intracellular Free Calcium in *Selenomonas ruminantium*. *Tohoku J. Exp. med.* 179, 291-294. 1996.

82- NILIUS, OWSIANIK, VOETS, PETERS. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev*; 87:165–217, 2007.

83- NOVAKOVA-TOUSOVA, VYKLYCKY, SUSANKOVA, BENEDIKT, SAMAD, TEISINGER, VLACHOVA. Functional changes in the vanilloid receptor subtype 1 channel during and after acute desensitization. *Neuroscience.* 149:144 –54. 2007.

84- NUMAZAKI, TOMINAGA, TOYOOKA, TOMINAGA. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VRI by protein kinase C epsilon and identification of two targets serine residues. *J Biol Chem* 277: 13375-8. 2002.

85- NUMAZAKI, TOMINAGA, TAKEUCHI, MURAYAMA, TOYOOKA, TOMINAGA. Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:8002-6. 2003.

86- O'NEILL, BROCK, OLESEN, ANDRESEN, NILSSON, DICKENSON. Unravelling the mystery of capsaicin: a tool to understand and treat pain. *Pharmacol Rev.*; 64:939–971, 2012.

87- OLAH, SZABO, KARAI, HOUGH, FIELDS, CAUDLE, BLUMBERG, IADAROLA. Ligand-induced dynamic membrane changes and

cell deletion conferred by vanilloid receptor 1. J Biol Chem; 276:11021-11030, 2001.

88- PINGLE, MATTA, AHERN. Capsaicin receptor: TRPV1 a promiscuous TRP channel. Handb Exp Pharmacol 179:155–171. 2007.

89- PREMKUMAR, AHERN. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. Nature. 408:985–90. 2000.

90- RADA, THARAKAN, FLOOD. Volatile anesthetics reduce agonist affinity at nicotinic acetylcholine receptors in the brain. Anesth. Analg., v. 96, p. 108-11. 2003.

91- RADRESA, PARÉ, ALBERT. Multiple Roles of Transient Receptor Potential (TRP) channels in Inflammatory Conditions and Current Status of Drug Development. Current Topics in Medicinal Chemistry; 13:367-385, 2013.

92- RAINES, CLAYCOMB, FORMAN. Modulation of GABA(A) receptor function by nonhalogenated alkane anesthetics: the effects on agonist enhancement, direct activation, and inhibition. Anesth. Analg., v. 96, p. 112-8. 2003.

93- RAINES, CLAYCOMB, FORMAN. Nonhalogenated anesthetic alkanes and perhalogenated nonimmobilizing alkanes inhibit $\alpha(4)\beta(2)$ neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Anesth. Analg., v. 95, p. 573-7, table, 2002.

94- RANG, DALE, RITTER. - *Farmacologia*. 5^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

95- RATHEE, DISTLER, OBREJA, NEUHUBER, WANG, WANG, et al. PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. J Neurosci. 22: 4740–4745. 2002.

96- RATNAKUMARI, HEMMINGS. Effects of propofol on sodium channel-dependent sodium influx and glutamate release in rat cerebrocortical synaptosomes. Anesthesiology. Feb; 86(2):428-39. 1997.

97- RECKZIEGEL, FRIEDERICH, URBAN. Ketamine effects on human neuronal Na⁺ channels. Eur J Anaesthesiol. Sep; 19(9):634-40. 2002.

98- ROMERO, DUARTE. Involvement of ATP-sensitive K⁺ channels in the peripheral antinociceptive effect induced by ketamine. Veterinary

Anaesthesia and Analgesia. 40,419-424. 2013.

99- ROSENBAUM, GORDON-SHAAG, MUNARI, GORDON. Ca²⁺/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. J Gen Physiol 123:53–62.2004.

100- SAKAI, CHO, FUKUSAKI, SHIBATA, SUMIKAWA. The effects of propofol with and without ketamine on human cerebral blood flow velocity and CO₂ response. Anesth Analg. 90(2):377-382.2000.

101- SANDÍN, GARCÍA, ALONSO, SANCHO. The endoplasmic reticulum of dorsal root ganglion neurons contains functional TRPV1 channels. J Biol Chem.; 284:32591-32601, 2009.

102- SCHNOEBEL, WOLFF, PETERS, BRÄU, SCHOLZ, HEMPELMANN, OLSCHESKI, OLSCHESKI. Ketamine impairs excitability in superficial dorsal horn neurones by blocking sodium and voltage-gated potassium currents. Br J Pharmacol. Nov;146(6):826-33. 2005.

103- SILVA; HORTA; ALENCASTRO; PINTO. Kinase protein: structural features and chemical inhibitors. Químca. Nova. 32(2). 453-462. 2009.

104- SCOTT, ZUKER. TRP, TRPL and trouble in photoreceptor cells. Curr OpinNeurobiol 8:383-388.1998.

105- SHEN, WANG, LEE, LIU, LI, WU , CHEN and LIU. Biological effect of ketamine in urothelial cell lines and global gene expression analysis in the bladders of ketamine-injected mice. Molecular medicine reports 11: 887-895, 2015.

106- SHIRASAKA, YOSHIMURA, QIU, TAKASAKI. The effects of propofol on hypothalamic paraventricular nucleus neurons in the rat. Anesth Analg; 98:1017–23.2004.

107- SILVA, DANTAS, CITÓ, SILVA, VASCONCELOS, FONTELES, VIANA, SOUSA. Ketamina da anestesia ao uso abusivo: artigo de revisão. Rev Neurocienc 18(2):227-237.2010.

108- SONNER, ANTOGNINI, DUTTON, FLOOD, GRAY, HARRIS, HOMANICS, KENDIG, ORSER, RAINES, TRUDELL, VISSEL, EGER. Inhaled anesthetics and immobility: mechanisms, mysteries, and minimum alveolar anesthetic concentration. September vol. 97 no. 3 718-740. 2003.

- 109- SUGIURA, TOMINAGA, KATSUYA, MIZUMURA. Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J Neurophysiol* 88:544–8.2002.
- 110- TOMINAGA, WADA, MASU. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA*.98:6951–6.2001.
- 111- TSAI, SHEN KOU; LEE CHINGMUH. Ketamine Potentiates Nondepolarizing Neuromuscular Relaxants in a Primate. *Anesthesia & Analgesia*. 68(1)5-8.1989.
- 112- URWIN, MENON. Comparative tolerability of sedative agents in - head-injured adults. *Drug Saf*.27(2):107-133.2004.
- 113- VAN SWINDEREN, SAIFEE, SHEBESTER, ROBERSON, NONET, AND CROWDER. A neomorphic syntaxin mutation blocks volatile-anesthetic action in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 96, 2479–2484. 1999.
- 114- VASCONCELOS, ANDRADE, SOARES, CHAVES, PATROCÍNIO, SOUSA, et al. Cetamina: aspectos gerais e relação com a esquizofrenia. *Rev Psiqu Clín* 32:10-6.2005.
- 115- VIOLET, DOWNIE, NAKISA, LIEB, FRANKS. Differential sensitivities of mammalian neuronal and muscle nicotinic acetylcholine receptors to general anesthetics. *Anesthesiology*, v. 86, p. 866-874, 1997.
- 116- VYKLIČKY, NOVAČKOVA-TOUSOVA, BENEDIK, SAMAD, TOUSKA, VLACHOVA. Calcium-dependent desensitization of vanilloid receptor TRPV1: A mechanism possibly involved in analgesia induced by topical application of capsaicin. *Physiol Res*. 57:S59 – 68. 2008.
- 117- WAKAMORI, IKEMOTO, AKAIKE. Effects of two volatile anesthetics and a volatile convulsant on the excitatory and inhibitory amino acid responses in dissociated CNS neurons of the rat. *J Neurophysiol* 66:2014–2021.1991.
- 118- WICKLEY, DING, MURRAY, DAMRON. Propofol-induced Activation of Protein Kinase C Isoforms in Adult Rat Ventricular Myocytes. *Anesthesiology*. 104:970–7.2006.

- 119- WICKLEY RUSSELL, ZHANG, SULAK, DEREK, DAMRON. Propofol Modulates Agonist-induced Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype-1 Receptor Desensitization *via* a Protein Kinase C- dependent Pathway in Mouse Dorsal Root Ganglion Sensory Neurons. *Anesthesiology* 2010; 113:833– 44. 2010.
- 120- WOOD, EMMETT, RAO , et al. Inhibition of nitric oxide synthase blocks N-methyl-D-aspartate-, quisqualate-, kainate-, harmaline-, and pentylene-tetrazole-dependent increases in cerebellar cyclic GMP in 7k~. *J Neurochem.*55:346-8.1990.
- 121- WOOLF, MA. Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron* 55:353-364.2007.
- 122- YAMAKURA, CHAVEZ –NORIEGA, HARRIS. Subunit-dependent inhibition of human neuronal nicotinic acetylcholine receptors and other ligand-gated ion channels by dissociative anesthetics ketamine and dizocilpine. *Anesthesiology.* 92:1144–1153.2000.
- 123- ZHANG, LI WAN. The effectiveness of topically applied capsaicin. A meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol* 46:517-522.1994.
- 124- ZHOU, ZHOU, ZHAO. PKC regulates capsaicin induced currents of dorsal root ganglion neurons in rats. *Neuropharmacology.* 41:601– 8. 2001.