

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA
ENDOCANABINOIDÉRGICO NO MECANISMO
ANTINOCICEPTIVO DA KETAMINA**

Renata Cristina Mendes Ferreira

Belo Horizonte

2014

Renata Cristina Mendes Ferreira

PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA
ENDOCANABINOIDÉRGICO NO MECANISMO
ANTINOCICEPTIVO DA KETAMINA

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-graduação em Ciências
Biológicas – Fisiologia e Farmacologia como parte dos requisitos
exigidos par a obtenção do grau de Mestre.
Área de Concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero
Co-Orientador: Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte

“Desistir dos sonhos é abrir mão da felicidade. Porque quem não persegue seus objetivos está condenado a fracassar 100% das vezes.”

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos colegas de laboratório: Clarice, Cris, Laís, Amanda, Daniel, Dani Diniz, Dani Pacheco, Giovane, Lú, Marina, David, Carolina, Ágatha, William e Viviane pelo apoio e agradável convivência.

Um agradecimento especial a Bruninha, pela amizade, pela ajuda e pelos finais de semana cedidos, recompensados com boas refeições!

Ao Jorge pelos quebra-galhos, ao Rinaldo pelo carinho e cuidados aos animais e a Dri pela disposição em ajudar.

Ao centro de bioterismo do ICB pelo fornecimento dos animais utilizados nesse estudo.

A todos os professores do departamento de Fisiologia e Farmacologia pelos ensinamentos.

À professora Andréia pela sua contribuição científica e colaboração.

Aos meus pais Francisco e Sônia pelo apoio e pela fé em mim.

Ao meu irmão Leandro pelo apoio e companheirismo,

Ao meu amor Bruno, que me acompanha há tantos anos me apoiando, me incentivando e principalmente me aguentando nos momentos mais difíceis.

Aos meus sogros Vicente e Sílvia pelo carinho.

Ao Igor, que me deu uma oportunidade no laboratório pelo qual tenho muito carinho e que hoje é também um amigo de profissão.

E ao Thiago, que me cativou com o seu brilho nos olhos na primeira aula que assisti. Nos tornamos companheiros de profissão, de laboratório e amigos.

E principalmente agradeço aos animais de experimentação por sacrificarem a vida em prol da pesquisa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tipos de fibras nociceptivas (extraído de Julius & Basbaum, 2001).	21
Figura 2: Representação esquemática da neurotransmissão endocanabinóide. Os endocanabinóides são sintetizados e liberados da membrana dos neurônios pós-sinápticos segundo a demanda, após o influxo de cálcio (1). Eles ativam os receptores pré-sinápticos CB ₁ (2). A anandamida e o 2-AG são removidos da fenda sináptica pela captação através dos transportadores pré- e pós-sinápticos respectivamente (3). Uma vez dentro dos neurônios, a anandamida é degradada pela FAAH, e o 2-AG é degradado pela MGL transformando-se em ácido araquidônico e etanolamina, e ácido graxo e glicerol, respectivamente (4) (extraído de Saito e cols., 2010).	26
Figura 3: Estrutura química da Ketamina.	28
Figura 4: Administração intraplantar subcutânea na pata posterior direita do rato.	38
Figura 5: Administração intratecal entre a quinta e a sexta vértebra lombar de rato.	39
Figura 6: Cirurgia estereotáxica de fixação de cânula para administração intracerebroventricular em rato.	42
Figura 7: Aparelho usado para medir o limiar de resposta ao estímulo mecânico aplicado na pata de ratos.	44
Figura 8: Parte compressora do aparelho usado para medir o limiar de resposta ao estímulo mecânico aplicado na pata de ratos.	45

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Curva temporal do efeito hiperalgésico induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (μg) de prostaglandina E_2 (PGE_2).....51
- Gráfico 2:** Curva temporal do efeito da administração intraplantar de ketamina (80 $\mu\text{g/pata}$) sobre a hiperalgesia induzida por prostaglandina E_2 (PGE_2 2 $\mu\text{g/pata}$)..... 52
- Gráfico 3:** Efeito da administração intraplantar de ketamina (10, 20, 40, 80 e 160 $\mu\text{g/pata}$) sobre a hiperalgesia induzida pela prostaglandina E_2 (PGE_2 2 $\mu\text{g/pata}$).....53
- Gráfico 4:** Exclusão do efeito antinociceptivo não local da ketamina 80 μg55
- Gráfico 5:** Antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da ketamina 80 $\mu\text{g/pata}$ induzido de forma dose-dependente pelo pré-tratamento com AM251 (20, 40 e 80 $\mu\text{g/pata}$).....57
- Gráfico 6:** Efeito do AM630 (100 $\mu\text{g/pata}$) sobre a antinocicepção periférica da Ketamina 80 $\mu\text{g/pata}$58
- Gráfico 7:** Sinergismo no efeito antinociceptivo periférico da Ketamina 20 $\mu\text{g/pata}$ pelo pré-tratamento com MAFP (2 $\mu\text{g/pata}$).....60
- Gráfico 8:** Sinergismo no efeito antinociceptivo periférico da Ketamina 20 $\mu\text{g/pata}$ pelo pré-tratamento com VDM11 (20 $\mu\text{g/pata}$).....61
- Gráfico 9:** Dosagem de endocanabinóides AEA, 2-AG, PEA e OEA em tecido de pata de rato wistar pelo método de cromatografia gasosa e espectrometria de massa.....63
- Gráfico 10:** Curva de tempo x efeito da administração intratecal de ketamina (20, 40 e 80 $\mu\text{g/i.t.}$) sobre a hiperalgesia induzida por prostaglandina E_2 (PGE_2 2 $\mu\text{g/pata}$).....65
- Gráfico 11:** Efeito da administração intratecal de ketamina (20, 40 e 80 $\mu\text{g/i.t.}$) sobre a hiperalgesia induzida por prostaglandina E_2 (PGE_2 2 $\mu\text{g/pata}$).....66
- Gráfico 12:** Antagonismo do efeito antinociceptivo espinhal da Ketamina 80 $\mu\text{g/i.t.}$ induzido de forma dose-dependente pelo pré-tratamento com AM251 (20, 40 e 80 $\mu\text{g/i.t.}$).....68

Gráfico 13: Efeito do AM630 (100 µg/i.t.) sobre a antinocicepção periférica da Ketamina 80 µg/i.t.....	69
Gráfico 14: Sinergismo no efeito antinociceptivo espinhal da Ketamina 40 µg/i.t. pelo pré-tratamento com MAFP (4 µg/i.t.).....	71
Gráfico 15: Sinergismo no efeito antinociceptivo espinhal da Ketamina 40 µg/i.t. pelo pré-tratamento com VDM11 (20 µg/i.t.).....	72
Gráfico 16: Sinergismo no efeito antinociceptivo espinhal da Ketamina 40 µg/i.t. pelo pré-tratamento com JZL184 (14 µg/i.t.).....	73
Gráfico 17: Curva temporal do efeito da administração intracerebroventricular de ketamina (1, 2, 4 e 8 µg/ICV) sobre a hiperalgisia induzida por prostaglandina E ₂ (PGE ₂ 2 µg/pata).....	75
Gráfico 18: Efeito da administração intracerebroventricular de ketamina (1, 2, 4 e 8 µg/ICV) sobre a hiperalgisia induzida por prostaglandina E ₂ (PGE ₂ 2 µg/pata).....	76
Gráfico 19: Antagonismo do efeito antinociceptivo supraespinhal da Ketamina 8 µg/ICV induzido de forma dose-dependente pelo pré-tratamento com AM251 (1, 2 e 4 µg/ICV).....	78
Gráfico 20: Antagonismo do efeito antinociceptivo supraespinhal da Ketamina 8 µg/ICV pelo pré-tratamento com AM630 (1, 2 e 4 µg/ICV).....	79
Gráfico 21: Sinergismo no efeito antinociceptivo supraespinhal da Ketamina 2 µg/ICV pelo pré-tratamento com MAFP (0,2 µg/ICV).....	81
Gráfico 22: Sinergismo no efeito antinociceptivo supraespinhal da Ketamina 2 µg/ICV pelo pré-tratamento com VDM11 (4 µg/ICV).....	82
Gráfico 23: Sinergismo no efeito antinociceptivo supraespinhal da Ketamina 2 µg/ICV pelo pré-tratamento com JZL184 (7 µg/ICV).....	83

SUMÁRIO

RESUMO.....	XIII
ABSTRACT	XV
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Dor e Nocicepção.....	18
1.2 Mecanismos de transmissão ascendente da dor	19
1.3 Mecanismos de controle endógeno da dor	22
1.4 Endocanabinóides e analgesia	23
1.5 Ketamina e analgesia.....	28
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo Geral	33
2.2 Objetivos Específicos	33
2.3 Delineamento Experimental	34
2.3.1 Caracterização da antinocicepção induzida por ketamina	34
2.3.2 Estudo sobre os mecanismos da antinocicepção da ketamina.....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Animais de Experimentação.....	36
3.2 Fármacos e Solventes.....	36
3.3 Administração de Fármacos.....	38
3.4 Teste Algesimétrico.....	43
3.5 Procedimento Experimental	46
3.6 Detecção e quantificação de Endocanabinóides pela Cromatografia Gasosa -Espectrometria de Massa	47
3.7 Análise Estatística dos Resultados	48
4 RESULTADOS	50
4.1 Hiperalgisia induzida pela administração intraplantar de diferentes doses de prostaglandina E ₂ (PGE ₂)	50
4.2 KETAMINA PERIFÉRICA	50
4.2.1 Efeito induzido pela administração intraplantar da ketamina sobre a hiperalgesia induzida por PGE ₂	50
4.2.2 Exclusão do efeito antinociceptivo não local da ketamina na dose de 80 µg	54

4.3	Participação dos receptores canabinoidérgicos no efeito antinociceptivo periférico da ketamina	56
4.3.1	Participação dos endocanabinóides no efeito antinociceptivo periférico da ketamina	59
4.3.2	Dosagem de endocanabinóides anandamida (AEA), 2-araquidonoil glicerol (2-AG), palmitoiletanolamida (PEA) e oleiletanolamida (OEA) em tecido de pata de rato pela cromatografia gasosa e espectrometria de massa	62
4.4	KETAMINA ESPINHAL	64
4.4.1	Efeito induzido pela administração intratecal da ketamina sobre a hiperalgesia induzida por PGE ₂	64
4.4.2	Participação dos receptores canabinoidérgicos no efeito antinociceptivo espinhal da ketamina	67
4.4.3	Participação dos endocanabinóides no efeito antinociceptivo espinhal da ketamina.....	70
4.5	KETAMINA SUPRAESPINHAL.....	74
4.5.1	Efeito induzido pela administração intracerebroventricular (ICV) da ketamina sobre a hiperalgesia induzida por PGE ₂	74
4.5.2	Participação dos receptores canabinoidérgicos no efeito antinociceptivo supraespinhal da ketamina	77
4.5.3	Participação dos endocanabinóides no efeito antinociceptivo supraespinhal da ketamina.....	80
5	DISCUSSÃO	85
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

LISTA DE ABREVIATURAS

AEA - araquidonil etanolamina, anandamida

AMPA - alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazol propiônico

Ca²⁺ - cálcio

CB₁ - receptor canabinóide do tipo 1

CB₂ - receptor canabinóide do tipo 2

CGRP- peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

DAG - diacilglicerol

DAGL - diacilglicerol lipase

DMSO - dimetilsulfóxido

DRG - gânglio da raiz dorsal

E.P.M - erro padrão da média

FAAH - ácido graxo de amida hidrolase

g - gramas

g/s - gramas por segundo

G_{i/o} - forma inibitória da proteína G

GABA - ácido gama-aminobutírico

IASP - associação internacional para o estudo da dor

ICV- intracerebroventricular

i.pl. - intraplantar

i.t. - intratecal

Ket - ketamina

MGL - monoacilglicerol lipase

NAPE - N-araquidonoil fosfatidiletanolamina

NF-κB - fator nuclear-κβ

NMDA - N-metil-D-aspartato

NMR- núcleo magno da rafe

NO/GMPc/KATP - óxido nítrico/GMP cíclico/canais para potássio sensíveis a ATP

OEA - oleiletanolamida

PD - pata posterior direita

PE - pata posterior esquerda

PEA - palmitoiletanolamida

PGE₂ - prostaglandina E₂
PLC - fosfolipase C
PLD - fosfolipase D específica
RNMDA - receptores NMDA
RVM - medula rostroventromedial
Sal - salina
SCP - substância cinzenta periqueductal
SNC - sistema nervoso central
TNF- α - fator de necrose tumoral- α
TS - tocrisolve
vol- volume
2-AG - 2-araquidonoil glicerol
 μ g - micrograma
 μ L - microlitro
 μ m - micrometro
mm - milímetro
 Δ - delta

RESUMO

RESUMO

A capacidade de sentir dor é fundamental para manutenção da vida, sem ela o trauma tecidual não seria detectado, ou mesmo evitado, podendo ocasionar lesões teciduais e nervosas importantes. A descoberta de novos mecanismos analgésicos é objetivo de várias pesquisas, como por exemplo, as pesquisas relacionadas à ketamina, um fármaco descoberto na década de 60 e utilizado originalmente como anestésico geral dissociativo que passou recentemente a ser utilizada também como analgésico em dores crônicas.

O presente estudo avaliou o envolvimento dos endocanabinóides no efeito antinociceptivo periférico, espinal e supraespinal, induzido pela ketamina frente à hiperalgisia evocada pela prostaglandina E₂ (PGE₂) 2 µg/pata. A atividade antinociceptiva foi avaliada através do teste algométrico mecânico de retirada da pata do rato submetida à compressão. A ketamina causou um efeito antinociceptivo dose-dependente nas vias periférica (10, 20, 40 e 80 µg), intratecal (20, 40 e 80 µg) e intracerebroventricular (1, 2, 4 e 8 µg), com pico de ação de cinco minutos. Medidas feitas na pata contralateral revelaram que na dose de 80 µg/pata, a ketamina não altera o limiar nociceptivo da pata não tratada nos experimentos na periferia.

A utilização do antagonista do receptor CB₁ (AM251) reverteu o efeito antinociceptivo dose-dependente da ketamina nas três vias, periférica (20, 40 e 80 µg), espinal (20, 40 e 80 µg) e supraespinal (1, 2 e 4 µg). Entretanto o antagonista de receptor CB₂ (AM630) reverteu o efeito antinociceptivo somente pela via supraespinal de maneira dose-dependente (1, 2 e 4 µg), demonstrando o envolvimento de receptores CB₁ na periferia, na via espinal e na via supraespinal e nesta última via, também se observou o envolvimento do receptor canabinóide do tipo CB₂.

O inibidor da enzima (amida hidrolase de ácido graxo), FAAH, (MAFP) (2, 4 e 0,2 µg) e o inibidor da recaptção de anandamida (VDM11) (20, 20 e 4 µg) para as seguintes vias periférica, intratecal e intracerebroventricular respectivamente, responderam sinergicamente junto à ketamina na sua dose intermediária (20, 40 e 2 µg) na antinocicepção para as respectivas vias.

O inibidor da enzima (monoacilglicerol lipase), MGL (JZL184) foi utilizado somente na via espinhal (14 µg) e supraespinhal (7 µg) e foi capaz de intensificar o efeito antinociceptivo da ketamina (40 e 2 µg), respectivamente.

Além dos experimentos comportamentais, foi também estudada a presença dos endocanabinóides anandamida (AEA), 2-araquidonoil glicerol (2-AG), palmitoiletanolamida (PEA) e o oleiletanolamida (OEA), na pata dos ratos após tratamento com ketamina, através da técnica de cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Foi encontrado um aumento de AEA em patas tratadas com PGE₂ + ketamina, mas não dos outros endocanabinóides.

O efeito antinociceptivo periférico, espinhal e supraespinhal da ketamina possivelmente está relacionado com mecanismos antinociceptivos alternativos que não envolvam o receptor NMDA. Ela poderia mobilizar o sistema canabinóide nas diferentes vias estudadas através das hipóteses: Ligação direta em receptores canabinóides; Liberação direta de endocanabinóides ou mesmo a liberação de peptídeos opióides endógenos que por sua vez, induzem a liberação de endocanabinóides; e finalmente por mecanismos que envolvam a ativação do complexo receptor opióide-canabinóide.

Sendo assim, nosso estudo verificou a participação do sistema canabinóide no evento da antinocicepção periférica, intratecal e intracerebroventricular da ketamina.

Palavras Chaves: Antinocicepção, Ketamina, Sistema Canabinóide, Endocanabinóides, Receptores canabinóides, Antagonista NMDA.

ABSTRACT

The ability to feel pain is essential for maintenance of the life, without her tissue trauma would not be detected or prevented, causing significant tissue and nerve damage. The discovery of new analgesic mechanisms is the goal of several studies, such as researches related to ketamine, a drug discovered in the 60's and originally used as a dissociative general anesthetic that has recently come to be also used as an analgesic in chronic pain.

The present study evaluated the involvement of endocannabinoids in the antinociceptive effect peripheral, spinal and supraspinal, induced by ketamine against the hyperalgesia evoked by prostaglandin E₂ (PGE₂) 2 µg/paw. The antinociceptive activity was evaluated using mechanical paw withdrawal rat test subjected to compression. Ketamine caused a dose-dependent antinociceptive effect in the peripheral (10, 20, 40 and 80 µg), intrathecal (20, 40 and 80 µg) and intracerebroventricular (1, 2, 4 and 8 µg), with peak action in five minutes. Measurements made in the contralateral paw showed that at a dose of 80 µg/paw, ketamine not alter the nociceptive threshold in the untreated paw in peripheral pathway.

CB₁ receptor antagonist (AM251) reversed dose-dependent the antinociceptive effect of ketamine in peripheral (20, 40 and 80 µg), spinal (20, 40 and 80 µg) and supraspinal (1, 2 and 4 µg) pathways. However, the CB₂ receptor antagonist (AM630) reversed the antinociceptive effect only the supraspinal pathway of dose-dependent manner, demonstrating the involvement of CB₁ receptors in the peripheral, spinal and supraspinal pathways, and this last route, involvement with the CB₂ cannabinoid receptor type was also observed.

The fatty acid amide hydrolase enzyme inhibitor, FAAH, (MAFP) (2, 4 and 0,2 µg) and the inhibitor of reuptake of anandamide (VDM11) (20, 20 and 4 µg) for peripheral, intrathecal and intracerebroventricular pathways respectively, responded synergistically with ketamine in the intermediate dose (20, 40 and 2 µg) in the antinociception for the respective routes.

The MGL (monoacylglycerol lipase) enzyme inhibitor (JZL184) was used only in spinal (14 µg) and supraspinal (7 µg) pathways, and was able to enhance the analgesic effect of ketamine (40 and 2 µg), respectively.

In addition to the behavioral experiments, was also studied the presence of the endocannabinoids anandamide (AEA), 2-araquidonoil glicerol (2-AG), palmitoiletanolamida (PEA) and oleiletanolamida (OEA), in the paw of rats after treatment with ketamine through the technique of gas chromatography and mass spectrometry. Was found an increase of AEA in paws treated with PGE₂ + ketamine, but not the other endocannabinoids.

The peripheral, spinal and supraspinal antinociceptive effect of ketamine is possibly related to alternative antinociceptive mechanisms not involving the NMDA receptor. It's can mobilize the cannabinoid system in the different study pathways through the hypotheses: Binding directly in cannabinoid receptors; Direct release of endocannabinoids or even the release of endogenous opioid peptides which in turn, induce the release of endocannabinoids; and finally by mechanisms involving the activation of opioid-cannabinoid receptor complex.

Thus, our study examined the involvement of the cannabinoid system in the peripheral, intrathecal and intracerebroventricular antinociception of ketamine. This study further strengthens the possibility of use of ketamine as an analgesic in clinical practice of pain control, as well as fostering the possibility of further studies that may elucidate how these systems interact in several analgesic pathways studied.

Key Words: Antinociception, Ketamine, Cannabinoid System, Endocannabinoids, Cannabinoid Receptors, NMDA Antagonist.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor e Nocicepção

A dor é uma experiência sensorial comum a quase todos os indivíduos e é essencial à vida (Freitas e cols., 2009). Considerada antigamente apenas como uma reação a um estímulo nociceptivo, funcionando apenas como um mecanismo de proteção do organismo, a dor é atualmente entendida como sendo mais complexa do que um sistema de ação e reação (Bernacchio e cols., 2005). A sensação dolorosa tem um papel fisiológico, alertando o organismo a ameaças e alterações da integridade física (Chapman e cols., 1999) minimizando os possíveis danos aos indivíduos (Millan, 1999; Almeida e cols., 2004).

Tendo em vista a complexidade do estudo da dor John J. Bonica, em 1973, fundou a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), e em 1979, a IASP definiu a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano real ou potencial de tecidos ou descrita em termos de tal dano” (Kopf e Patel, 2010). Através desta definição podemos verificar que o fenômeno da dor envolve também componentes subjetivos, assim a nocicepção seria o mecanismo neuronal pelo qual um indivíduo detecta a presença de um estímulo potencialmente prejudicial ao tecido, entretanto não haveria nenhuma implicação de consciência desse estímulo (Holdcroft e Jaggar, 2005). Dessa maneira, os termos dor e analgesia são melhor aplicados para humanos e os termos nocicepção e antinocicepção para modelos animais (Jones, 1992).

A dor é a causa de perda de, pelo menos, um dia de atividade ao ano, em até 40% dos indivíduos. Nos Estados Unidos, por exemplo, cerca de 89 bilhões

de dólares são gastos para o tratamento, compensações trabalhistas e litígios envolvendo pacientes com dor (Carvalho, 1999). No Brasil, 70% dos pacientes que procuram médicos, se queixam de dor por vários motivos, o que é responsável por um terço dos casos das consultas médicas (Rocha e cols., 2007). Segundo dados do Conselho Federal de Farmácia, o Brasil está entre os dez países que mais consomem medicamentos no mundo (citado pelo Ministério da Saúde, 2005)

Na tentativa de sanar esse problema vários fármacos são lançados no mercado com o objetivo de diminuir ou acabar com a dor, entretanto, além dos altos custos, as terapias convencionais induzem um índice expressivo de efeitos colaterais. Neste contexto, é cada vez mais necessário buscar alternativas para o controle da dor. Dessa forma, entender os mecanismos fisiopatológicos e farmacológicos envolvidos no processo da dor, pode nos fornecer ferramentas importantes para o desenvolvimento de novas terapias para o seu tratamento.

1.2 Mecanismos de transmissão ascendente da dor

No início do século XX, Charles Sherrington (1903) propôs a existência de um conjunto de terminações nervosas, cuja função era ser receptível aos estímulos causados pelas lesões na pele. Posteriormente, foi postulada a existência de nociceptores, receptores que detectariam estímulos potencialmente prejudiciais indutores de danos teciduais (McMahon e Koltzenburg, 1990).

O conhecimento sobre nociceptores teve grande avanço nas décadas de 1960 e 70, com Ed Perl afirmando que a dor é mediada por neurônios sensoriais de alto limiar (Bessou e Perl, 1969). O alto limiar destes transdutores diferencia nociceptores de outros neurônios sensoriais que respondem a estímulos inócuos, em virtude de expressar transdutores de baixos limiares (Woolf e Ma, 2007).

Atualmente, o conhecimento acerca dos nociceptores indica que esses são terminações nervosas livres e estão dispersos nas camadas superficiais da pele, assim como em alguns tecidos internos como periósteo, superfícies articulares, parede dos vasos sanguíneos, vísceras entre outros (Guyton e Hall, 2006), além de seus corpos celulares estarem presentes no gânglio da raiz dorsal [GRD (Holdcroft e Jaggar, 2005)].

Os nociceptores podem ser classificados em dois tipos principais com base no seu diâmetro, estrutura e velocidade de condução (Millan, 1999). As fibras condutoras mais lentas são amielinizadas e designadas por C, enquanto as fibras finas mielinizadas condutoras mais rápidas são designadas por A δ [Figura 1, Fein, 2012].

As fibras A δ são fibras que respondem a estímulos mecânicos de alta intensidade e por isso, são chamadas de mecanoreceptores de alto limiar. Algumas fibras A δ também respondem a estímulos térmicos e nesse caso são chamadas de mecanotermoreceptores (Meyer e cols., 2006).

Já as fibras do tipo C transmitem a informação nociva a partir de uma variedade de estímulos como mecânico, térmico e químico. Por essa razão, elas são chamadas de nociceptores polimodais (Vanderah, 2007). Existem ainda fibras do tipo C, chamadas de nociceptores silenciosos, que não

respondem ao estímulo nocivo em condições normais, porém, são sensibilizadas, tornando-se responsivas, quando ocorre uma lesão persistente ao tecido ou na presença de mediadores químicos (Schmidt e cols., 1995).

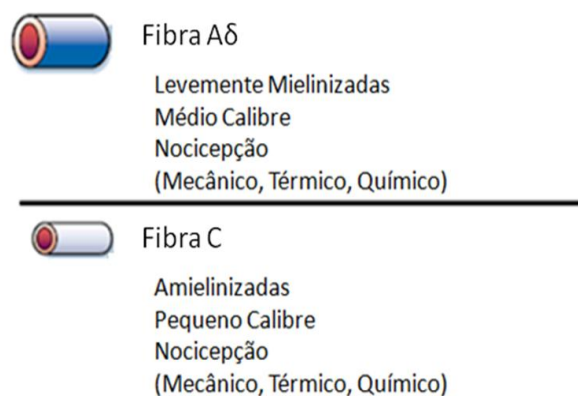


Figura 1: Tipos de fibras nociceptivas (extraído de Julius & Basbaum, 2001).

No processo de transmissão ascendente da dor o corno dorsal da medula espinhal é uma área importante para a integração de múltiplas aferências, incluindo neurônios sensoriais primários e interneurônios locais (Holdcroft e Jaggar, 2005). Geralmente, as fibras sensoriais finas, de alto limiar, compostas pelos neurônios sensoriais primários, transmitem as informações nocivas a partir da pele até as camadas mais superficiais do corno dorsal da medula espinhal, como as lâminas I e II, e V. (Sluka, 2009).

As sinapses entre o neurônio sensorial primário e o neurônio secundário no corno dorsal da medula espinhal ocorrem através da liberação de neurotransmissores (Fürst, 1999), dos quais um dos mais importantes é o glutamato, um aminoácido excitatório que pode interagir com ambos os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), e não-NMDA como o cainato e AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazol propiônico). Além disso, outro neurotransmissor importante associado à transmissão da nocicepção é a

substância P (Vanderah, 2007), bem como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (PRGC), entre outros (Fürst, 1999).

A partir daí os neurônios de segunda ordem, ascendem pela medula espinhal e carregam a informação nociceptiva, deslocando-se pelo trato espinotalâmico, até atingirem o tálamo. Finalmente, os neurônios de terceira ordem são ativados e transmitem as informações nociceptivas ao córtex somatossensorial (Vanderah, 2007), onde os estímulos nociceptivos serão processados e interpretados ao nível da consciência (Fürst, 1999).

1.3 Mecanismos de controle endógeno da dor

Em 1965, Melzack e Wall postularam que as informações nociceptivas que chegam ao corno dorsal da medula espinhal, oriundas da pele, vísceras e outros tecidos, não são automaticamente transferidas aos centros superiores, sendo modulado ao nível medular. Essa teoria ficou conhecida como “teoria do portão da dor”.

Além do controle medular, a via descendente possui vias que podem inibir (inibição descendente) ou facilitar (facilitação descendente) a passagem de mensagens nociceptivas para o cérebro (Millan, 2002). Ela tem origem principalmente no tronco cerebral e em outras estruturas como hipotálamo, tálamo, córtex e estruturas adjacentes da medula rostroventromedial (RVM), que exercem importante papel na integração e modulação das mensagens nociceptivas, no corno dorsal da medula espinhal (Millan, 1999; Millan, 2002; Vanegas e Schaible, 2004).

Uma vez ativada pelo córtex cerebral ou outras regiões superiores como hipotálamo ou amígdala, a SCP envia sinais para o núcleo magno da rafe e o

núcleo reticular. Posteriormente, os estímulos descendem ao corno dorsal da medula espinal, alcançando predominantemente a substância gelatinosa (lâmina II) (Russo e Brose, 1998), modulando a nocicepção ao evitar que um excesso de informações nociceptivas ascendam ao tálamo.

Dentre os mediadores dos sistemas acima citados incluem o sistema opioidérgico (Fürst, 1999), noradrenérgico (Haws e cols., 1990), serotoninérgico (Millan, 1995) e o canabinoidérgico (Lichtman e cols., 1996; Sandküler, 1996).

1.4 Endocanabinóides e analgesia

As propriedades medicinais da *Cannabis sativa* são conhecidas desde a antiguidade em várias partes do mundo. Há relatos de que na China, em 2737 a.C., o imperador Shen-Nung a prescrevia para tratamento de beribéri, malária, gota, reumatismo, constipação e fadiga (Bloomquist, 1968; Guy e cols., 2004). Sabe-se que as propriedades terapêuticas da *Cannabis* estão relacionadas à presença de substâncias, dentre elas o delta-9-tetrahidrocanabinol (Δ^9 -THC) que atua em receptores denominados canabinóides. A partir daí foram descobertos canabinóides endógenos denominados endocanabinóides (Di Marzo e De Petrocellis, 2006).

Os endocanabinóides estão envolvidos em diferentes funções fisiológicas e patológicas como, regulação da ingestão de alimentos, imunomodulação, inflamação, analgesia, câncer, comportamento viciante, epilepsia entre outros (Di Marzo e De Petrocellis, 2006; Pacher e cols., 2006). Os canabinóides sinalizam através de receptores que fazem parte da super família de receptores

acoplados à proteína G mais precisamente à proteína $G_{i/o}$, (Howlett e cols., 2002; Rang e cols., 2007) e a sua ativação inibe a atividade da adenilato ciclase como proteína efetora (Howlett, 2005). Dois tipos de receptores canabinóides foram identificados até o momento, o receptor CB_1 , clonado em 1990, e o CB_2 em 1993 (Howlett e cols., 2002).

O receptor CB_1 é encontrado principalmente no sistema nervoso central (SNC), incluindo estruturas que participam da via descendente de controle da dor, como a substância cinzenta periaquedutal (SCP), medula rostroventromedial (RVM) e o corno dorsal da medula espinhal (Herkenham, e cols., 1991; Tsou e cols., 1998). Além disso, ele também é encontrado no sistema nervoso periférico e no gânglio da raiz dorsal (GRD) (Fan e cols., 2011). Já o receptor CB_2 seria mais restrito às células imunes (Pertwee e Ross, 2002), embora pesquisas recentes demonstraram a existência desse subtipo no SNC (Onaivi e cols., 2012), gânglio da raiz dorsal, neurônios sensoriais, micróglia, bem como em tecidos periféricos (Van Sickle e cols., 2005; Jhaveri e cols., 2007).

Na década de 1990, foram descobertos os canabinóides endógenos como o araquidonil etanolamina (anandamida ou AEA) (Devane e cols., 1992) e o 2-araquidonoil glicerol (2-AG) (Mechoulam e cols., 1995).

Os endocanabinóides são moléculas lipídicas sinalizadoras geradas na membrana a partir de precursores de fosfolípídeos (Di Marzo, 1998). Diferentes enzimas estão envolvidas no processo de síntese desses endocanabinóides. A biossíntese da anandamida, por exemplo, ocorre a partir da clivagem enzimática de um precursor fosfolípídico, o N-araquidonoil fosfatidiletanolamina (NAPE) (Jin e cols., 2009), hidrolisado à AEA por uma fosfolipase D específica

(NAPE-PLD) (Egertová e cols, 2008). Por outro lado o 2-AG é sintetizado via diacilglicerol (DAG), formado a partir da clivagem enzimática de precursores de fosfolípidos de membrana pela enzima fosfolipase C (PLC) e então hidrolisado pela diacilglicerol lipase (DAGL) para gerar 2-AG (Citado por Basavarajappa, 2007).

Além da síntese a partir de fosfolípidos de neurônios, há evidências de que os queratinócitos humanos têm um "sistema endocanabinoide" funcional, e que possuem maquinaria bioquímica para AEA se ligar, ser sintetizada, transportada e hidrolisada (Maccarrone e cols., 2003).

A anandamida e o 2-AG são produzidos sob demanda e liberados imediatamente após a sua síntese (Van Sickle e cols., 2005) e possuem propriedades canabimiméticas por se ligarem e ativarem um ou mais subtipos de receptores canabinóides (Di Marzo, 1998). A AEA liga-se preferencialmente aos receptores do tipo CB₁ (Di Marzo, 2001) e o 2-AG é conhecido por ativar ambos os receptores CB₁ e CB₂ (Mechoulam, 1995).

Após a sua produção, os endocanabinóides são liberados e podem regular a transmissão sináptica inibitória (Guindon e Hohmann, 2009). No SNC, eles atuam como neurotransmissores retrógrados e são liberados por neurônios pós-sinápticos despolarizados e atingem os terminais pré-sinápticos, onde ativam os receptores canabinóides através de um mecanismo de sinalização retrógrada (Alger, 2002).

A sinalização dos endocanabinóides é então finalizada por processos de degradação que envolve a hidrólise enzimática mediada por enzimas intracelulares específicas (Di Marzo, 2008), que incluem a amida hidrolase de ácido graxo (FAAH), localizada em neurônios pós-sinápticos (Seierstad e

Breitenbucher, 2008), e a monoacilglicerol lipase (MGL) localizada em neurônios pré-sinápticos (Dinh e cols., 2002). Porém, para serem degradados os endocanabinóides precisam ser interiorizados por um sistema específico facilitado por um transportador na membrana plasmática (Beltramo e cols., 1997; Pacher, 2006), e uma vez dentro dos neurônios, a FAAH e a MGL hidrolizam a AEA (Seierstad e Breitenbucher, 2008) e o 2-AG (Dinh e cols., 2002), liberando ácido araquidônico e etanolamina (Di Marzo, 1994) e ácido graxo e glicerol (Guindon e Hohmann, 2009) respectivamente, como produtos (ver figura 2).

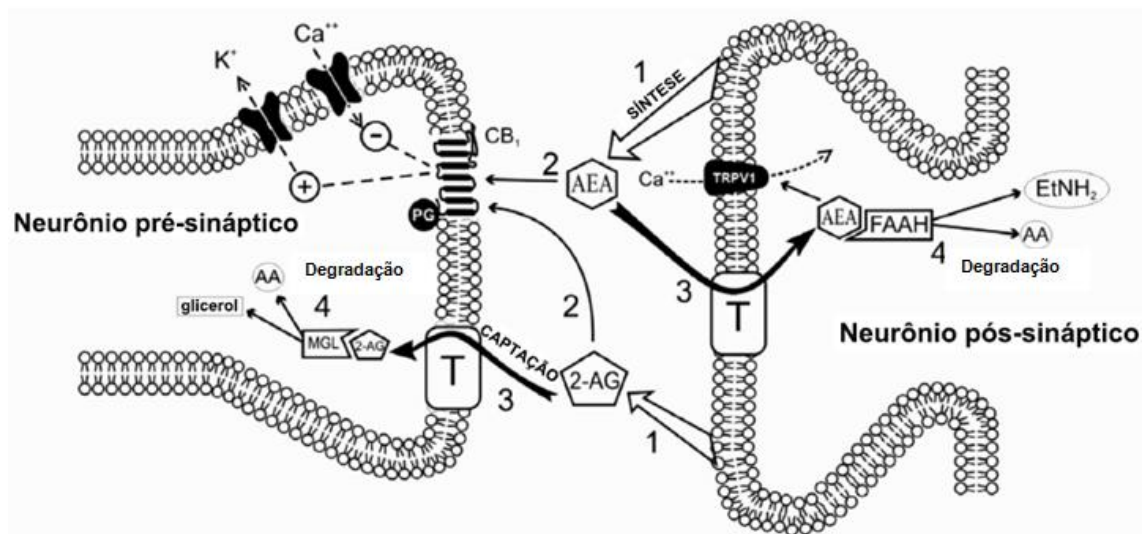


Figura 2: Representação esquemática da neurotransmissão endocanabinóide. Os endocanabinóides são sintetizados e liberados da membrana dos neurônios pós-sinápticos segundo a demanda, após o influxo de cálcio (1). Eles ativam os receptores pré-sinápticos CB₁ (2). A anandamida e o 2-AG são removidos da fenda sináptica pela captação através dos transportadores pré- e pós-sinápticos respectivamente (3). Uma vez dentro dos neurônios, a anandamida é degradada pela FAAH, e o 2-AG é degradado pela MGL se transformando em ácido araquidônico e etanolamina, e ácido graxo e glicerol, respectivamente (4) (extraído de Saito e cols., 2010).

Vários estudos demonstraram o efeito antinociceptivo dos canabinóides, sendo suas ações analgésicas periféricas já descritas em vários modelos animais de dor (Hohmann, 2002). Sabe-se que, periféricamente, os receptores canabinóides são sintetizados e expressados no gânglio da raiz dorsal (GRD) (Hohmann e Herkenham, 1999), além do mais, esses receptores estão envolvidos na modulação do neurônio aferente primário pela inibição da excitação da membrana, diminuição da condutância ao cálcio e também aumentando a condutância ao potássio (Howlett e cols., 2002; Romero e Duarte, 2009; Reis e cols., 2011).

Ao nível espinal, a administração intratecal de canabinóides produziu antinocicepção (Smith e Martin, 1992) e quando administrados sistemicamente, eles foram capazes de suprimir a atividade dos neurônios nociceptivos no corno dorsal da medula espinal (Hohmann e cols., 1995).

A ação analgésica dos canabinóides, na via supraespinal, foi avaliada através da injeção de agonistas canabinóides sintéticos pelas vias intraventricular e localmente em várias regiões do cérebro (Walker e Hohmann, 2005). Uma série de estudos objetivando estruturas alvo que incluíram a substância cinzenta periaquedutal (SCP) (Lichtman e cols., 1996), o tálamo (Martin e cols., 1996), a medula rostroventromedial (RVM) (Martin e cols., 1998), a amígdala (Marsicano e cols., 2002), entre outros, permitiram a identificação de regiões do cérebro responsáveis pelas propriedades antinociceptivas dos canabinóides (Guindon e Hohmann, 2009).

1.5 Ketamina e analgesia

A ketamina é um derivado da fenciclidina (Oduntan e Gool, 1970) sintetizada pela primeira vez em 1962 pelo farmacêutico americano Calvin Stevens e nomeada inicialmente de “CI581” (revisado por da Silva e cols., 2010), testada clinicamente por Domino e cols., em 1965 e aprovada para uso clínico em 1970 (Wilson, 2013).

Desde então, ela tem sido extensivamente utilizada como medicação pré-anestésica, analgesia pós-operatória, sedação, indução e manutenção da anestesia geral (Sinner e Graf, 2008). Há relatos de sua utilização para o tratamento das dores aguda (Elia e Tramer, 2005), cancerosa (Okon, 2007), neuropática (Bell, 2009), bem como para o de queimaduras (Wilson e cols., 1967; White e cols., 1982) e até mesmo em dores do membro fantasma (Eichenberger e cols., 2008).

Sua estrutura molecular *2-(2-Clorofenil)-2-(metilamino)-ciclohexanona* contém um núcleo quiral no carbono C-2 do anel de ciclohexanona.

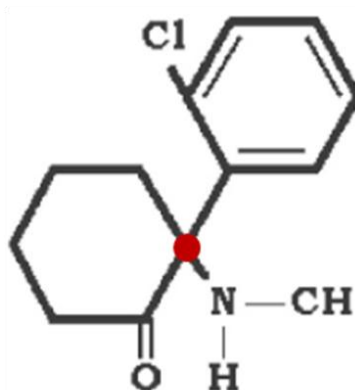


Figura 3: Estrutura química da Ketamina.

Farmacologicamente, sua ação envolve o glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do SNC. Ela é classificada como antagonista não

competitivo de um dos três receptores para glutamato: o receptor N-metil D-Aspartato (NMDA) (Morgan e Curran, 2012). Este receptor é um canal catiônico que, na transmissão nociceptiva, está envolvido na despolarização de neurônios do corno dorsal (Richens, 1991). O bloqueio desses canais parece ser o mecanismo primário da ação anestésica e analgésica da ketamina envolvendo receptores supraespinhais e da medula espinhal (Pai e Heining, 2007).

Além do mecanismo de ação clássico da ketamina, através dos receptores NMDA para glutamato, outros possíveis mecanismos são propostos, incluindo os que envolvem ação anestésica local, bloqueio dos canais para cálcio, sistemas colinérgico (Kohrs e Durieux, 1998), serotoninérgico (Martin e cols., 1982), além do opioidérgico (Baumieter e Advokat, 1991; Bai e Zhao, 1997) e canais para cálcio voltagem dependentes (Baum e Tecson, 1991; Yamakage e cols., 1995). Além disso, nosso grupo demonstrou a participação da via óxido nítrico/GMP cíclico/canais para potássio sensíveis a ATP (NO/GMPc/KATP) na antinocicepção periférica induzida pela ketamina (Romero e Duarte, 2013). Ela pode intensificar os efeitos inibitórios do ácido gama-aminobutírico (GABA) e bloquear o processo de transporte neuronal de serotonina, dopamina e noradrenalina, potencializando os efeitos dessas catecolaminas por bloquear a recaptção desses neurotransmissores (Lundy e cols., 1986; Bergman, 1999).

Estudos já comprovaram que a ketamina administrada de maneira intratecal e/ou sistêmica reduz a hiperalgesia, o comportamento relacionado a dor espontânea, e as respostas neuronais do corno dorsal (Haley e cols., 1990;

Ren e cols., 1992; Yamamoto e Yaksh, 1992; Mao e cols., 1993; Qian e cols., 1996; Klimscha e cols., 1998).

Usualmente, ela é administrada sistemicamente para induzir analgesia, pelo recrutamento de mecanismos centrais ainda não completamente elucidados (Visser e Sching, 2006). Na experimentação animal, foi verificada sua eficácia analgésica nos testes de formalina (Davidson e Carlton, 1998) e de hiperalgesia térmica em ratos (Oatway e cols., 2003). Em estudos clínicos, a ketamina tópica foi capaz de produzir analgesia em indivíduos com câncer e dor neuropática (Crowley, 1998; Wood, 2000).

Estudos já relataram que as subunidades do receptor NMDA para glutamato são expressas em uma variedade de células tumorais, como em gliomas, câncer gástrico, carcinoma espinocelular oral, câncer de próstata, melanoma e osteossarcoma (Stepulak e cols., 2009). Além disso, o glutamato e os seus receptores podem regular o crescimento de tumores, e o uso de antagonistas de receptor NMDA, como por exemplo a ketamina, podem inibir essa proliferação (Rzeski e cols., 2002).

Recentemente, estudos demonstraram que os efeitos anti-inflamatórios da ketamina poderiam estar parcialmente envolvidos na dor, devido à inibição da transcrição do fator ativador de proteína-1 e do fator nuclear- $\kappa\beta$ (NF- κ B), os quais regulam a produção de mediadores inflamatórios, como as citocinas pró-inflamatórias, interleucinas 8 e 6, e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (Welters e cols., 2010).

Além da analgesia, a ketamina é responsável por vários efeitos clínicos como broncodilatação (Fantoni e Cortopassi, 2010), aumento da pressão arterial (Tweed e cols., 1972), frequência cardíaca e débito cardíaco (da Silva e

cols., 2010), além de causar uma anestesia dissociativa, caracterizada pela dissociação entre os sistemas talamocortical e límbico (Bergman, 1999). A ketamina pode ser administrada por diferentes vias, como intravenosa, intramuscular, oral, retal, subcutânea, epidural, intranasal (Craven, 2007) e tópica (Finch, 2009).

Sabe-se que embora a ketamina tenha sido amplamente utilizada na prática clínica humana e veterinária como um analgésico e anestésico dissociativo (Reich e Silvey, 1989), o envolvimento de canabinóides no efeito antinociceptivo do fármaco não tem sido bem descrito. Estudos recentes realizados com portadores da síndrome da dor regional crônica descreveram que a combinação de PEA (palmitoiletanolamida), um endocanabinóide CB₂ seletivo, e ketamina 10% em creme, reduziu a dor dos pacientes em mais de 50%, após um mês de tratamento, além da redução acentuada do inchaço da pele (Hesselink e Kopsky, 2013).

No presente trabalho, algumas hipóteses foram levantadas a fim de justificar essa ação antinociceptiva periférica, espinal e supraespinal da ketamina, envolvendo mecanismos alternativos. Sugerimos que esses mecanismos possam estar relacionados com o envolvimento indireto através da ativação ou liberação de opióides, que por sua vez, estariam liberando canabinóides; ou a ketamina estaria atuando como agonista ativando diretamente os receptores canabinóides; e finalmente por mecanismos que envolvam a ativação do complexo receptor opióide-canabinóide.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Assim, considerando a ampla utilização da ketamina na medicina veterinária como anestésico geral em várias espécies bem como na medicina humana como anestésico geral e recentemente como analgésico na terapia contra dores crônicas, o presente trabalho investiga o envolvimento do sistema canabinóide na antinocicepção periférica, espinhal e supraespinhal induzida pela ketamina, no modelo de hiperalgesia por prostaglandina E₂ (PGE₂) exógena em ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- Detectar a ação antinociceptiva da ketamina nos níveis: Periférico, Espinhal e Supraespinhal;
- Estudar a participação dos receptores CB₁ e CB₂ na antinocicepção da ketamina, nos níveis acima citados.
- Investigar o envolvimento de endocanabinóides na atividade da ketamina através da:
 - inibição da recaptção,
 - inibição da degradação
 - dosagem dos endocanabinóides (anandamida (AEA), 2-araquidonoilglicerol (2-AG), palmitoiletanolamida (PEA) e oleiletanolamida (OEA)) na pata.

2.3 Delineamento Experimental

2.3.1 Caracterização da antinocicepção induzida por ketamina

A- Curvas tempo-efeito e dose-resposta da antinocicepção periférica, espinhal e supraespinhal da ketamina no modelo de compressão da pata do rato, frente ao modelo de hiperalgesia induzida por PGE₂.

B- Exclusão da ação não local da ketamina quando administrada perifericamente.

2.3.2 Estudo sobre os mecanismos da antinocicepção da ketamina

2.3.2.1 SISTEMA CANABINÓIDE

A- Efeito dos antagonistas de receptores CB₁ e CB₂ canabinóide AM251 e AM630, respectivamente, sobre a antinocicepção periférica, espinhal e supraespinhal induzida pela ketamina.

B- Efeito do bloqueador do captador de anandamida VDM11 sobre a antinocicepção periférica, espinhal e supraespinhal induzida pela ketamina.

C- Efeito do inibidor da degradação de anandamida, MAFP, sobre a antinocicepção periférica, espinhal e supraespinhal induzida pela ketamina.

D- Efeito do inibidor da degradação de 2-AG (2-araquidonoilglicerol), JZL 184, sobre a antinocicepção espinhal e supraespinhal induzida pela ketamina.

E- Detecção e quantificação de endocanabinóides por cromatografia gasosa espectrometria de massa ao nível periférico.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais de Experimentação

Foram utilizados ratos wistar machos, pesando entre 160 e 200 g. Os animais foram acondicionados em caixas plásticas com forragem de maravalha, com livre acesso a água e ração, e mantidos na sala de experimentação, dois dias antes dos experimentos, para ambientalização. A sala de experimentos é controlada termicamente (23 a 25°C), com alternância de ciclo claro-escuro de 12 em 12 horas.

Todos os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações para avaliação de dor experimental em animais acordados (Zimmermann, 1983).

3.2 Fármacos e Solventes

I- Agente Hiperalgésico

Prostaglandina E₂ (PGE₂, Sigma, EUA) - Mantida em *freezer*, em solução estoque, dissolvida em etanol. Antes das injeções, a PGE₂ era diluída em salina fisiológica e mantida a baixa temperatura em gelo.

II- Agente Antinociceptivo

Ketamina (Vetbrands, BRA) solução a 10%, Mantida em *freezer*, em solução estoque, dissolvida em salina.

III- Fármacos Envolvidos no Sistema Canabinoide

A) Antagonista CB₁ canabinoide

AM251 (1-(2,4-diclorofenil)-5-(iodofenil)-4-metil-N-(1-piperidil)pirazole-3-carboxamida) (Tocris, EUA). Mantida no *freezer*, em solução-estoque,

dissolvida em DMSO 100%, na concentração de 40 µg/µL. Imediatamente antes das injeções, a solução era diluída em salina.

B) Antagonista CB₂ canabinóide

AM630 ([6-iodo-2-metil-1-[2-(4-morfolinil)etil]-1H-indol-3-il](4etoxifenil)metanona) (Tocris, EUA). Mantida no *freezer*, em solução-estoque, dissolvida em DMSO 100%, na concentração de 50 µg/µL. Imediatamente antes das injeções, a solução era diluída em salina.

C) Inibidor da degradação de anandamida (AEA)

MAFP (metil araquidonil fluorofosfonato) (ácido (5Z,8Z,11Z,14Z)-eicosatetraenil- fosfonofluorídrico metil éster) (Tocris, EUA). Mantida no *freezer*, em solução-estoque, dissolvida em Tocrisolve 100%, na concentração de 5 µg/µL. Imediatamente antes das injeções, a solução era diluída em salina.

D) Inibidor da degradação de 2-araquidonilglicerol (2-AG)

JZL184 (ácido 4-[Bis(1,3-benzodioxo-5-il)hidroximetil]-1-piperidinocarboxílico 4-nitrofenil éster) (Tocris, EUA). Mantido no *freezer* em solução-estoque, dissolvido em DMSO 100%, na concentração de 25 µg/µL. Imediatamente antes das injeções, a solução era diluída em salina.

E) Bloqueador do recaptador de anandamida (AEA)

VDM11 [(5Z,8Z,11Z,14Z)-N-(4-Hidroxi-2-metilfenil)-5,8,11,14-eicosatetraenamida] (Tocris, EUA) Mantida no *freezer*, em solução-estoque, dissolvida em Tocrisolve 100%, na concentração de 10 µg/µL. Imediatamente antes das injeções, a solução era diluída em salina.

3.3 Administração de Fármacos

I- Intraplantar

As drogas foram administradas através de injeção subcutânea na superfície plantar da pata posterior do rato (via intraplantar, i.pl.), num volume de 100 μ L para PGE₂ e 50 μ L para as outras drogas. Em todos os experimentos foi utilizada a pata posterior direita dos animais, com exceção do protocolo experimental utilizado para excluir a possibilidade de um efeito não local, no qual foram utilizadas ambas as patas.



Figura 4: Administração intraplantar subcutânea na pata posterior direita do rato.

II- Intratecal

A utilização da via intratecal objetivou avaliar o possível envolvimento de endocanabinóides na antinocicepção induzida pela ketamina a nível medular. Previamente à administração das drogas, os ratos foram tricotomizados na região dorsal (lombar). Desse modo, a palpação dos espaços intervertebrais é facilitada e, após a sedação dos animais, por inalação de isoflurano (3,5%) (CRISTÁLIA[®], Brasil), uma injeção foi realizada, no volume de 20 μ L, utilizando-se uma agulha 13 x 0,3 mm acoplada a uma seringa hipodérmica (BD[®], Brasil) diretamente no espaço subaracnóide, entre a quinta e a sexta vértebra lombar (Mestre e cols., 1994). Esse volume é o mesmo administrado, tanto para as drogas quanto para seus respectivos veículos diluentes.

A paralisia temporária dos membros posteriores, pela administração de lidocaína 4% (20 μ L) foi utilizada para confirmar a eficácia da padronização técnica de injeção intratecal.

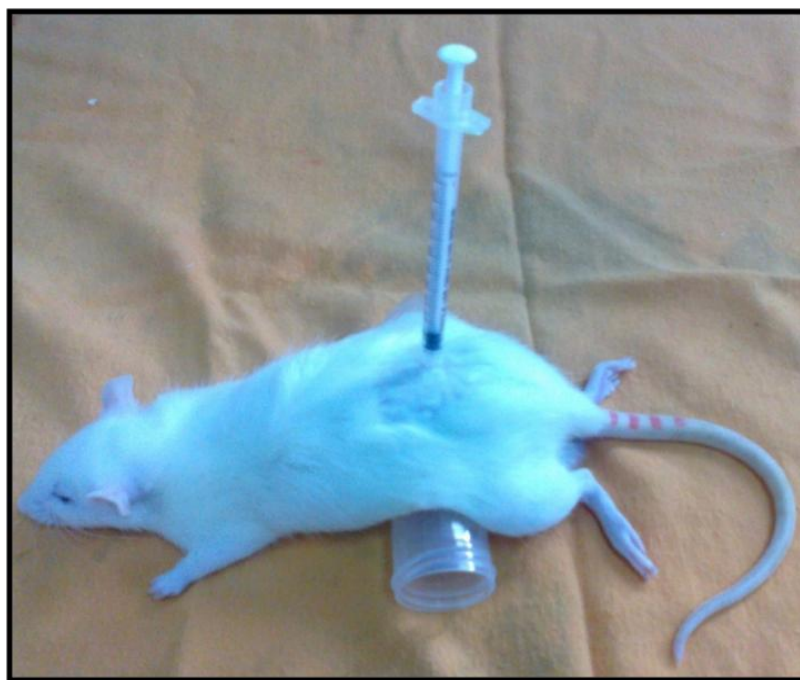


Figura 5: Administração intratecal entre a quinta e a sexta vértebra lombar de rato.

III- Intracerebroventricular

A escolha dessa via (ICV) teve como intuito investigar o envolvimento supra medular de endocanabinóides na antinocicepção induzida pela ketamina. Para tanto, foi previamente realizada a cirurgia estereotáxica descrita a seguir.

Essa cirurgia é utilizada quando se deseja atuar especificamente sobre uma determinada estrutura encefálica. Para isso, a cirurgia foi realizada com auxílio de um aparelho estereotáxico (STOELTING[®], EUA).

Os ratos foram previamente anestesiados com uma solução contendo Tribromo (2,5%), injetada intraperitonealmente (i.p.). Imediatamente após estarem anestesiados, foi realizada uma tricotomia da região superior da cabeça, a qual foi posicionada e fixada no estereotáxico por meio de duas barras auriculares. Após a assepsia da pele com solução contendo álcool iodado, o anestésico local, lidocaína, contendo vasoconstritor, foi injetado subcutaneamente na região do escalpo a ser aberta, a fim de evitar dor e reduzir possível sangramento. Em seguida, foi realizada uma incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo, expondo-se, assim, a região da calota craniana. A torre do estereotáxico foi colocada em posição vertical (angulação zero) e a cabeça do animal ajustada até que os pontos bregma e lâmbda da calota ficassem nivelados. O ponto de introdução da cânula-guia (16 mm, confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas de aço inoxidável (25 x 6 mm BD[®], Brasil), direcionadas para o ventrículo lateral direito), foi determinado a partir do bregma levando em consideração as coordenadas estereotáxicas obtidas com o atlas de Paxinos e Watson (1986), as quais são: -1,5 mm posterior ao bregma; -2,5 mm lateral ao bregma; e -3,3 mm inferior ao topo do crânio. Após a localização do ponto de inserção, foi realizada a trepanação da

calota craniana com o auxílio de uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação. Por esse orifício, foi introduzida a cânula-guia e, então, fixada ao crânio do animal através de resina acrílica de uso odontológico e de pequenos parafusos de aço inox, os quais foram fixados na calota craniana previamente às leituras das coordenadas estereotáxicas.

Após a completa fixação da cânula-guia, a torre do estereotáxico foi removida e, com o objetivo de evitar a obstrução da cânula, foi introduzido na mesma um mandril de aço inoxidável (15 mm). Como medida profilática, após a cirurgia todos os animais receberam Pentabiótico® (associação de antibióticos de uso veterinário, 0,2 mL/Kg) por via intramuscular no músculo gastrocnêmio e também receberam injeção do analgésico/antitérmico/ antiinflamatório Banamine® (flunixinina meglumina, 1 mL/Kg). Esses animais foram mantidos em sala com temperatura de 23 a 25°C e luminosidade controladas (ciclo claro-escuro 12 horas), por um período de 7 dias anterior ao experimento.

As drogas e seus respectivos veículos diluentes foram injetados no ventrículo lateral direito, em um volume de 5 µL. Para a administração foi utilizada uma seringa de precisão (HAMILTON®, EUA) de 10 µL, conectada a um tubo polietileno PE-10 (10 cm) e a uma agulha injetora (11 cm).



Figura 6: Cirurgia estereotáxica de fixação de cânula para administração intracerebroventricular em rato.

Análise Histológica para Confirmação das Injeções

O posicionamento correto da cânula para a injeção intracerebroventricular no ventrículo lateral direito foi verificado após todos os experimentos. Os animais foram profundamente anestesiados com xilazina 2% (0,2 mL / rato) e hidrato de cloral 1,5% (0,1 mL / rato). Em seguida, e após a perda completa dos reflexos palpebral, corneal e interdigital, os animais foram perfundidos intracardialmente com solução de salina NaCl (0,9%) seguida por solução de formaldeído (10%). Após a rigidez muscular, os ratos foram decapitados e os cérebros removidos e armazenados, primeiramente em solução de formaldeído a 10% por 24 horas, e, em seguida, em solução de sacarose a 30% por mais 24 horas. Após esse período, os cérebros foram seccionados (cortes de 50 μ m) no criostato (Minotome PlusTM, EUA), colocados em lâminas gelatinizadas e a localização

dos sítios das injeções foi feita através de microscopia, comparando-se a incisão à região contralateral. Somente os animais que apresentarem o correto posicionamento da cânula, tiveram seus dados incorporados aos resultados.

3.4 Teste Algesimétrico

Teste de compressão da pata

Para a medida de hiperalgesia foi utilizado o método descrito por Randall e Selitto (1957). Esses autores descreveram uma técnica para medir o limiar mecânico, baseado no princípio de que a inflamação aumenta a sensibilidade ao estímulo doloroso (hiperalgesia) e que essa sensibilidade aumentada é susceptível de ser modificada por drogas.

Para medir a hiperalgesia, foi utilizado o aparelho algesimétrico da Ugo Basile (Itália).

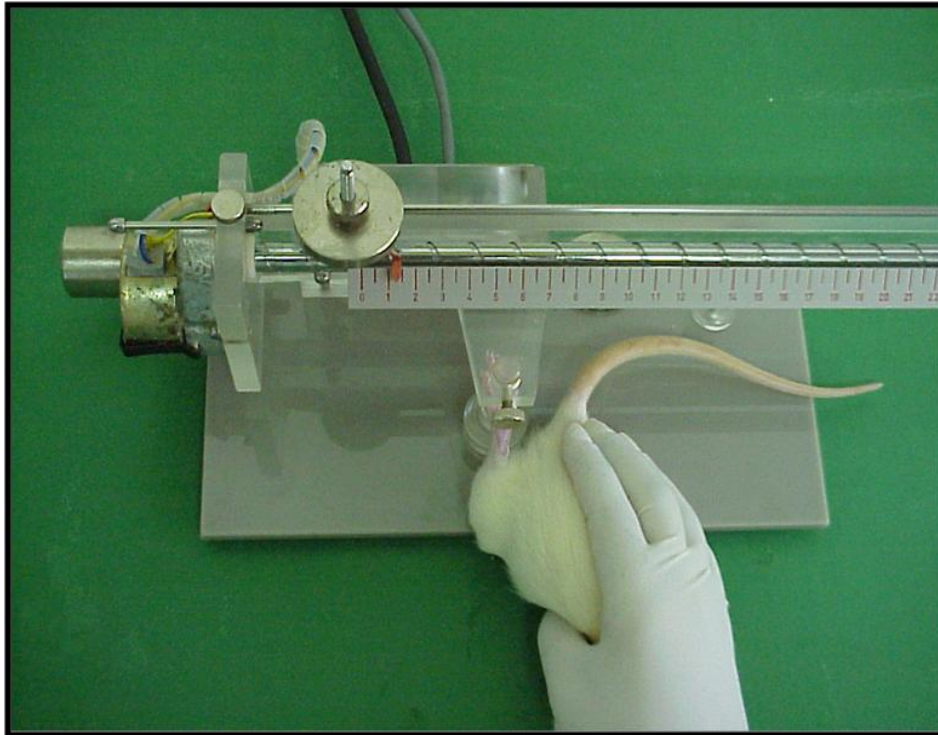


Figura 7: Aparelho usado para medir o limiar de resposta ao estímulo mecânico aplicado na pata de ratos.

Descrição do teste

No teste, o animal é cuidadosamente mantido em posição horizontal sobre a bancada, por uma das mãos do experimentador, enquanto a pata sob teste é colocada, com a sua superfície plantar, à parte compressora do aparelho (Figura 8). Esta consiste em duas superfícies, sendo uma plana, sobre a qual se coloca a pata do animal, e outra cônica, com uma área de $1,75 \text{ mm}^2$ na extremidade, por meio da qual é aplicada uma pressão na superfície plantar da pata do rato. A intensidade da pressão aplicada aumenta, a uma taxa constante de 32 g/s ou 20 g por centímetro marcado na escala numérica do aparelho, mediante o acionamento de um pedal pelo experimentador.

Ao observar a resposta nociceptiva do animal, o experimentador desaciona o pedal, interrompendo assim o aumento da pressão imposta à pata,

sendo que o último valor, que corresponde ao limiar nociceptivo, fica indicado na escala do aparelho e expresso em gramas (g).

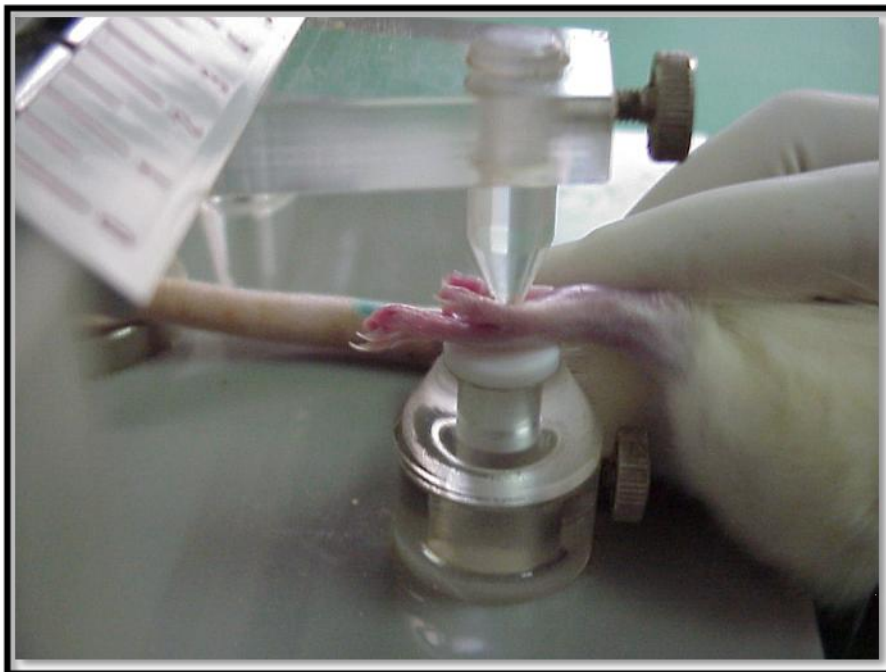


Figura 8: Parte compressora do aparelho usado para medir o limiar de resposta ao estímulo mecânico aplicado na pata de ratos.

Resposta do Animal

O aprendizado para a medida da hiperalgesia na pata do rato consiste no treinamento do experimentador para detectar o momento em que o animal percebe o estímulo doloroso e desenvolve uma reação de reflexo de retirada da pata. É importante ressaltar que o animal é ambientalizado ao aparelho no dia que antecede o teste. Essa ambientalização consiste em submeter o animal a medidas sucessivas no aparelho algosimétrico mimetizando a situação a ser vivenciada no dia do experimento. Esse procedimento é muito importante, pois permite uma melhor observação da resposta nociceptiva do animal, que

durante o teste deve permanecer quieto, evitando que este desenvolva uma reação aversiva simplesmente devido a situação estranha imposta a ele.

Medida de Hiperalgisia

O limiar nociceptivo é definido como a pressão aplicada à pata do animal, sob a qual o mesmo apresenta o reflexo de retirada da pata submetida à compressão. Considerando hiperalgisia como a diminuição do limiar nociceptivo, sua intensidade é avaliada pela diferença (Δ) do limiar nociceptivo medido na terceira hora após a injeção de PGE₂ em relação ao valor basal obtido no início do experimento, antes de qualquer injeção (zero hora).

Se antes ou durante do desenvolvimento da hiperalgisia induzida pela PGE₂ for administrado um fármaco com ação antinociceptiva, será verificada uma redução da intensidade de hiperalgisia, ou seja, uma diminuição do Δ do limiar nociceptivo. Do mesmo modo, fármacos com capacidade de interferir com a ação desses agentes antinociceptivos tendem a reverter esse efeito, ou seja, restaurar o Δ a valores próximos àqueles obtidos quando se administra somente o agente hiperalgésico.

3.5 Procedimento Experimental

Em todos os experimentos o limiar basal de cada animal foi determinado antes da administração do agente hiperalgésico e o limiar nociceptivo, também, foi aferido três horas após a mesma e nos tempos 180, 190, 200, 210, 220, 230 e 240 minutos para a curva de tempo. Os limiares foram sempre medidos três

vezes, observando um intervalo mínimo de 10 segundos entre cada medida, sendo o resultado final de limiar a média simples dessas três medidas.

A ketamina (Ket) ou seu veículo foram sempre administrados 5 minutos antes do pico hiperalgésico (terceira hora) da PGE₂.

O antagonista dos receptores de canabinóide CB₁ e CB₂ e seus veículos, bem como o inibidor da enzima que degrada anandamida, MAFP, o inibidor da enzima que degrada 2-AG, JZL 184, e do inibidor da recaptção de anandamida, VDM11, e seus respectivos veículos, foram administrados 10 minutos antes da ketamina, ou seja, quinze minutos antes do pico hiperalgésico de PGE₂.

EXCLUSÃO DO EFEITO NÃO LOCAL (SISTÊMICO) NO ESTUDO PERIFÉRICO

Para a exclusão do efeito não local, o agente hiperalgésico foi administrado em ambas as patas posteriores dos animais. Os animais também receberam na pata direita a droga testada (grupo avaliado) ou salina (grupo controle). As medidas foram realizadas em ambas as patas.

3.6 Detecção e quantificação de Endocanabinóides pela Cromatografia Gasosa -Espectrometria de Massa

Foram detectados e quantificados a os endocanabinóides anandamida (AEA), 2-araquidonoilglicerol (2-AG), palmitoiletanolamida (PEA) e oleiletanolamida (OEA).

Os tecidos da pata de ratos foram retirados na terceira hora após a injeção do agente hiperalgésico (PGE₂) independente dos tratamentos dos grupos experimentais ao longo desse período.

As amostras teciduais foram congeladas, extraídas e lavadas com clorofórmio/etanol (2:1, vol.) por três vezes e então purificadas pela cromatografia de sequência aberta em câmara de sílica e pela cromatografia líquida normal feita em fase alta descrita por De Petrocellis e cols. (1999). Em sequência as amostras foram submetidas à cromatografia gasosa-espectrometria de massa por impacto de elétrons e tiveram os endocanabinóides (anandamida (AEA), 2-araquidonoilglicerol (2-AG), palmitoiletanolamida (PEA) e oleiletanolamida (OEA)) quantificados pelo processo de diluição isotópica descrito inicialmente por De Petrocellis e cols., (1999).

Esta etapa do trabalho foi realizada em parceria com o professor Vincenzo Di Marzo (Di Marzo, V.) no “*Istituto di Chimica Biomolecolare*” em Nápoles - Itália.

3.7 Análise Estatística dos Resultados

Os resultados foram apresentados como a média ± EPM da intensidade de hiperalgesia e a análise de variância one-way e two-way, seguidas pelo teste de Bonferroni, utilizado para verificar a significância das diferenças entre as médias (comparações múltiplas), sendo consideradas significantes quando os valores de *P* forem menores que 0,05.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Hiperalgesia induzida pela administração intraplantar de diferentes doses de prostaglandina E₂ (PGE₂)

A administração intraplantar de prostaglandina E₂ (PGE₂; 0,5, 1 e 2 µg) induziu diminuição do limiar nociceptivo de maneira dose-dependente em relação ao grupo controle (veículo: etanol 2%), como pode ser observado no gráfico 1. O pico de ação da PGE₂ foi observado na terceira hora, sendo o efeito máximo de hiperalgesia verificado na concentração de 2 µg. Portanto, esta foi a dose utilizada para os demais experimentos.

4.2 KETAMINA PERIFÉRICA

4.2.1 Efeito induzido pela administração intraplantar da ketamina sobre a hiperalgesia induzida por PGE₂

A administração intraplantar (i.pl.) de ketamina foi capaz de induzir efeito antinociceptivo frente ao estímulo hiperalgésico causado pela PGE₂ (2 µg/pata). O pico de ação ocorreu após 5 minutos da administração da droga (Gráfico 2) e esse efeito foi observado de maneira dose-dependente (10, 20, 40, 80 e 160 µg), de forma que nas concentrações de 80 e 160 µg houve reversão máxima do efeito nociceptivo da PGE₂ como mostrado no gráfico 3. A ketamina, mesmo na maior dose testada, não alterou o limiar nociceptivo por si só.

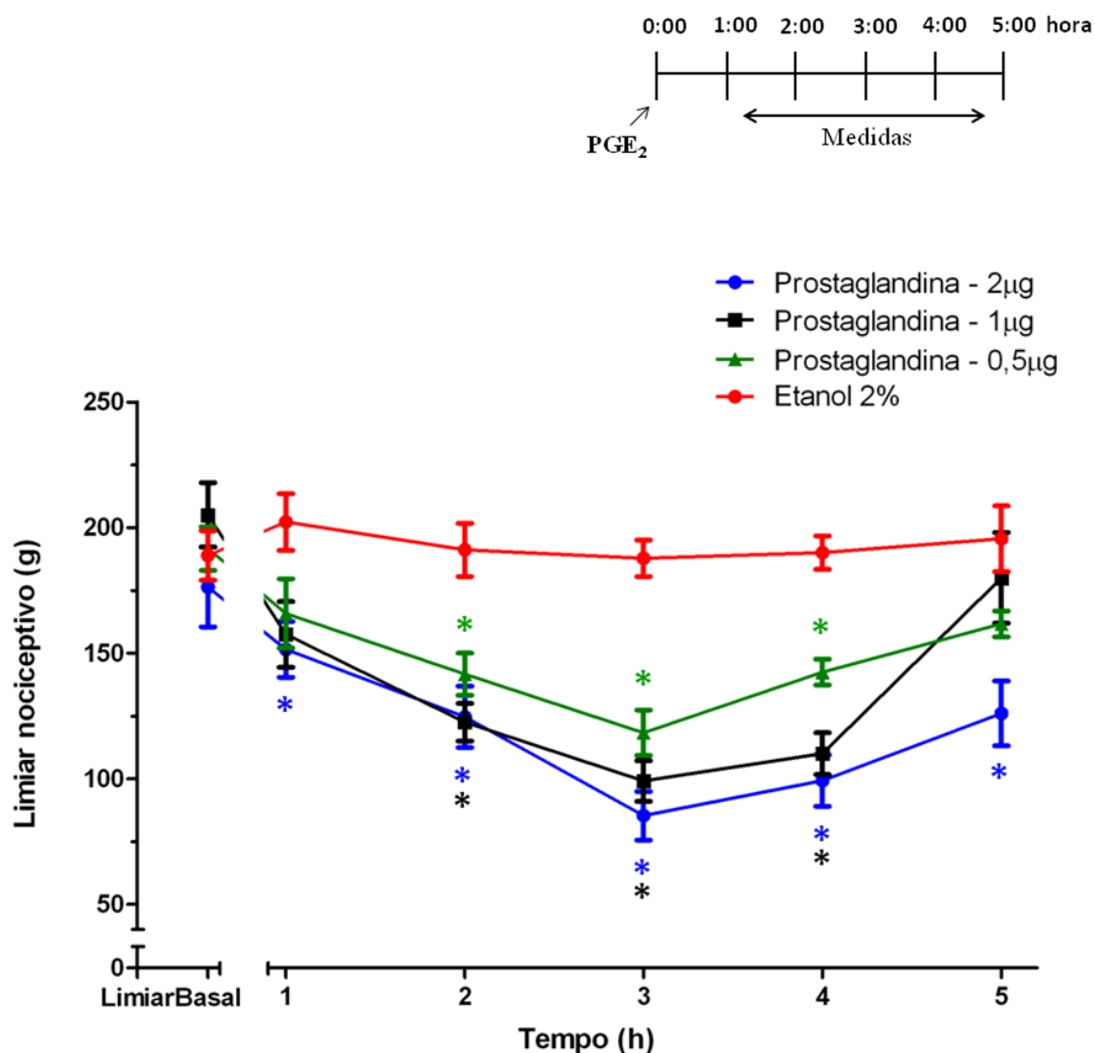


Gráfico 1: Curva temporal do efeito hiperalgésico induzido pela injeção intraplantar de diferentes doses (µg) de prostaglandina E₂ (PGE₂). PGE₂ foi administrada no tempo 0. O momento das injeções está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo expresso em gramas (g), referente ao N=4 animais. * P < 0,05 em relação ao grupo controle veículo (etanol 2% em salina).

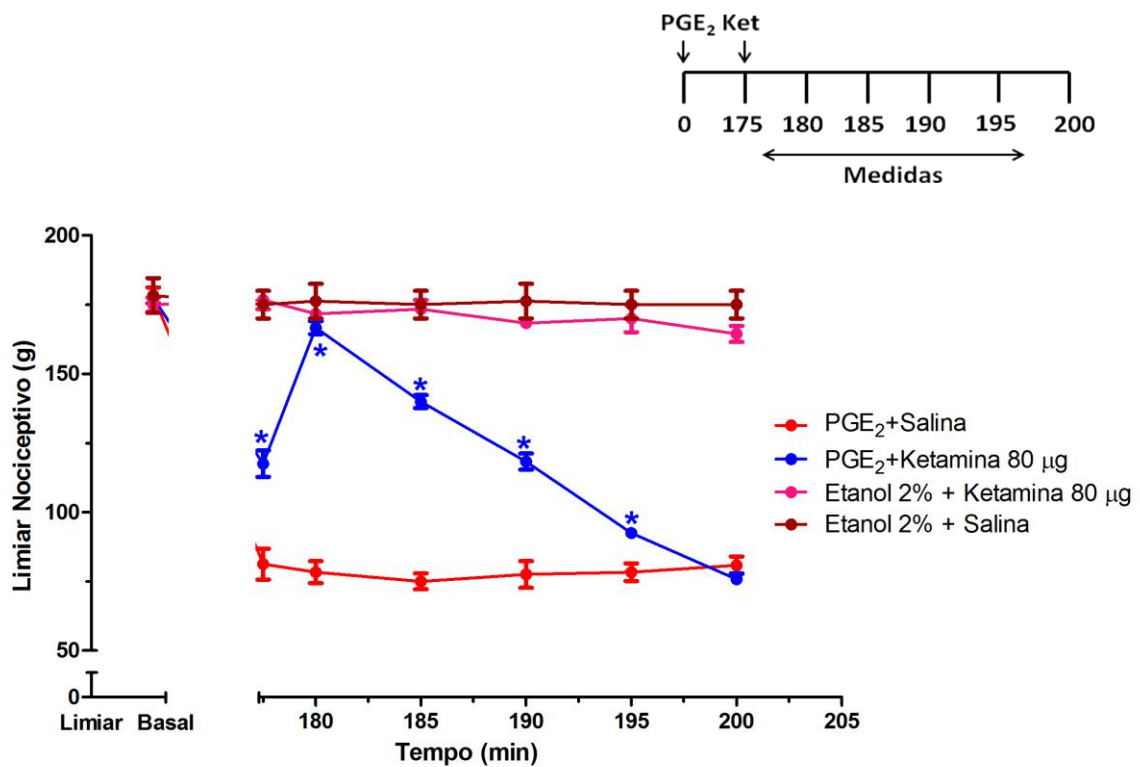


Gráfico 2: Curva temporal do efeito da administração intraplantar de ketamina (80 µg/pata) sobre a hiperalgesia induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂ 2 µg/pata). O momento das injeções está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. Cada símbolo representa a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N=4 animais. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo PGE₂+Salina.

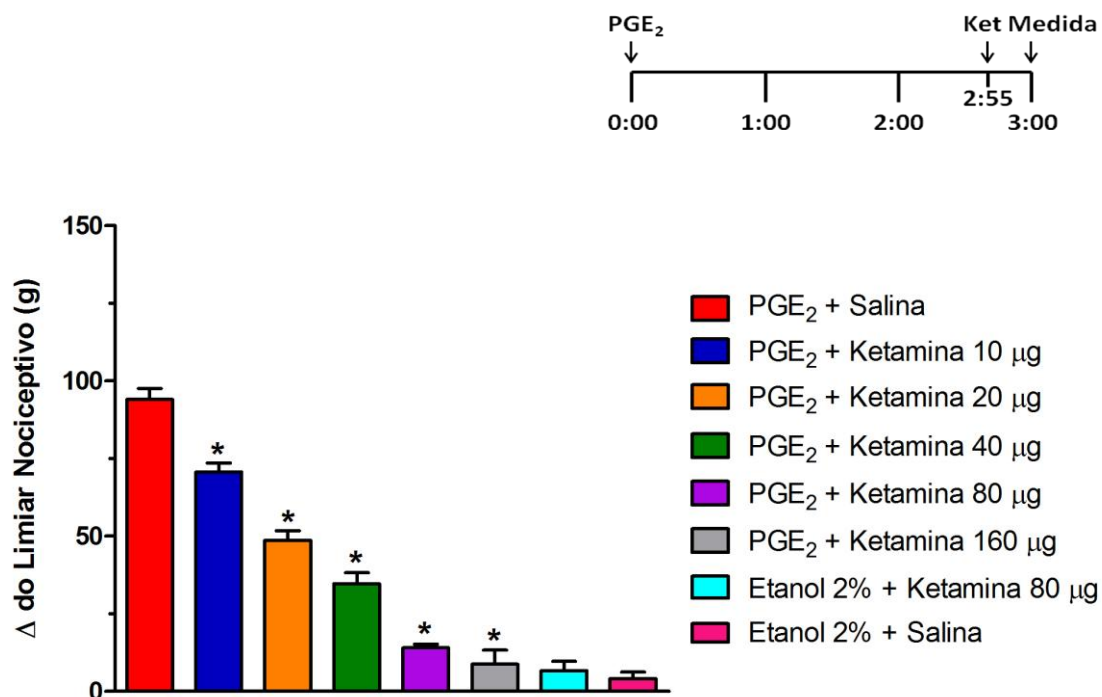


Gráfico 3: Efeito da administração intraplantar de ketamina (10, 20, 40, 80 e 160 µg/pata) sobre a hiperalgesia induzida pela prostaglandina E₂ (PGE₂ 2 µg/pata). O momento das injeções está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N=4 animais. * indica significância estatística (p < 0,05) em relação ao grupo PGE₂+Salina.

4.2.2 Exclusão do efeito antinociceptivo não local da ketamina na dose de 80 µg

Para exclusão do efeito antinociceptivo não local da ketamina, foi injetado PGE₂ (2 µg) nas patas posteriores direita (PD) e esquerda (PE). A ketamina nas doses de 80 e 160 µg foram, então, administradas na PD e seu veículo (salina) foi administrado na pata PE e as medidas foram realizadas em ambas as patas.

A administração da ketamina 160 µg na PD foi capaz de reverter o efeito nociceptivo induzido pela PGE₂, entretanto, na PE, também foi possível observar um aumento desse limiar. Como o objetivo era obter uma dose com efeito somente periférico, a mesma foi descartada para futuros experimentos. Por outro lado, na dose de 80 µg, houve diminuição do efeito hiperalgésico causado pela PGE₂ na pata direita, mas o mesmo não foi observado na pata contralateral, dessa forma, nessa dose, o efeito antinociceptivo da ketamina foi apenas local, e por isso, essa dose foi a escolhida para os demais experimentos como a dose máxima antinociceptiva de efeito restritamente periférico (Gráfico 4).

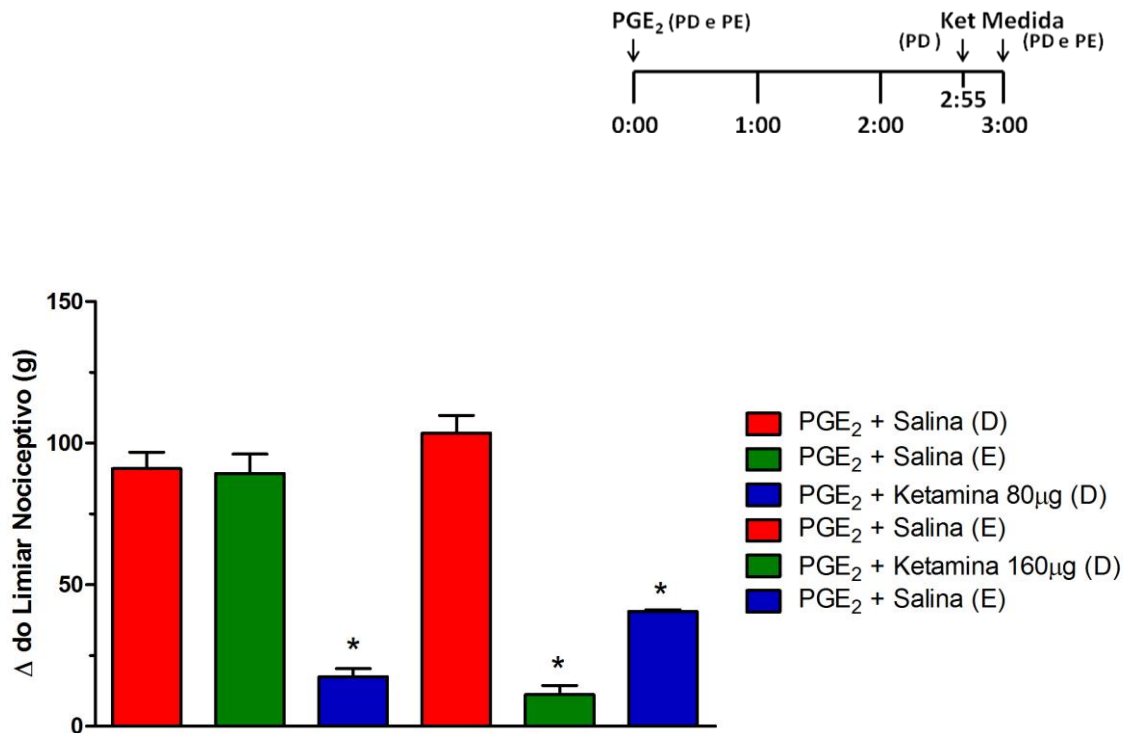


Gráfico 4: Exclusão do efeito antinociceptivo não local da ketamina 80 µg. PGE₂ foi injetada na pata posterior direita (PD) e na pata posterior esquerda (PE) e a ketamina 80 e 160 µg foi injetada na pata posterior direita (PD). O momento das injeções está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N=4 animais. * indicam significância estatística (p< 0,05) em relação ao grupo PGE₂+Sal (PD e PE).

4.3 Participação dos receptores canabinoidérgicos no efeito antinociceptivo periférico da ketamina

Buscando avaliar o envolvimento dos receptores CB₁ e CB₂ canabinóides no efeito antinociceptivo induzido pela ketamina (80 µg/pata), utilizou-se os antagonistas seletivos AM251 e AM630, respectivamente. Observou-se que o pré-tratamento com AM251 (20, 40 e 80 µg/pata) reverteu o efeito antinociceptivo da ketamina de maneira dose-dependente, com reversão máxima na dose de 80 µg/pata. O AM251 na ausência da ketamina ou na presença de PGE₂ não induziu efeito por si só ou alterou a ação hiperalgésica da PGE₂ (Gráfico 5). Já o pré-tratamento com AM630 100 µg/pata, dose padronizada em experimentos anteriores no nosso laboratório como tendo efeito máximo (Romero e cols., 2012), não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo da ketamina (Gráfico 6).

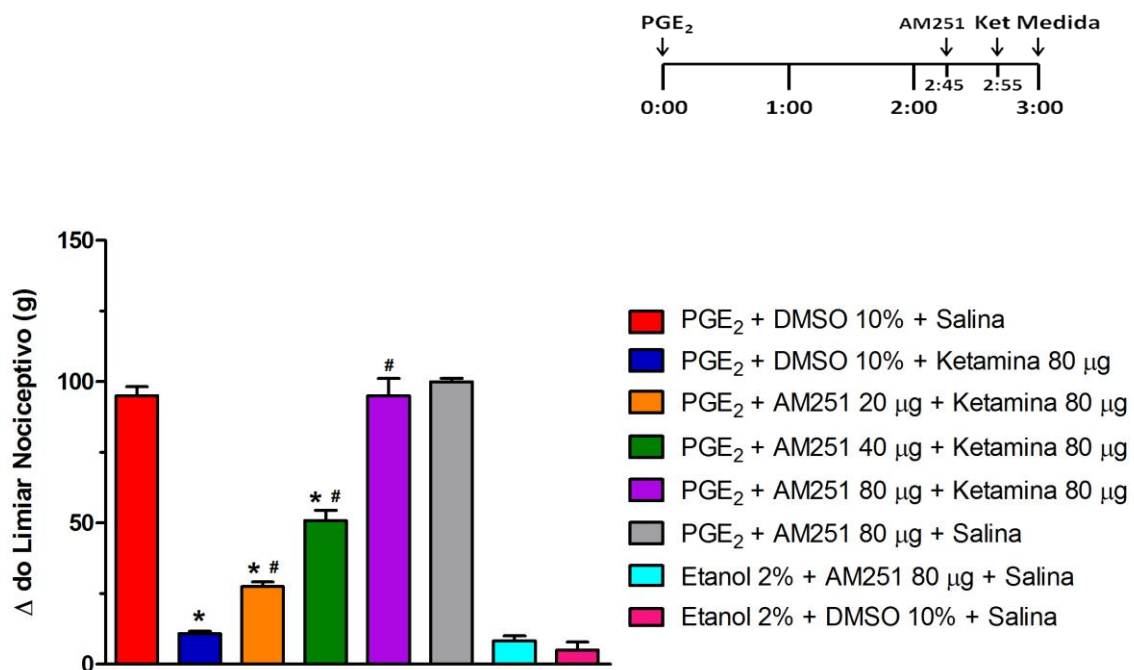


Gráfico 5. Antagonismo do efeito antinociceptivo periférico da ketamina 80 µg/pata induzido de forma dose-dependente pelo pré-tratamento com AM251 (20, 40 e 80 µg/pata). O momento da administração das drogas está representado no diagrama na parte superior do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N=4 animais. * e # indicam significância estatística (p< 0,05) em relação aos grupos (PGE₂+DMSO10%+Salina) e (PGE₂+DMSO10%+Ketamina 80 µg), respectivamente.

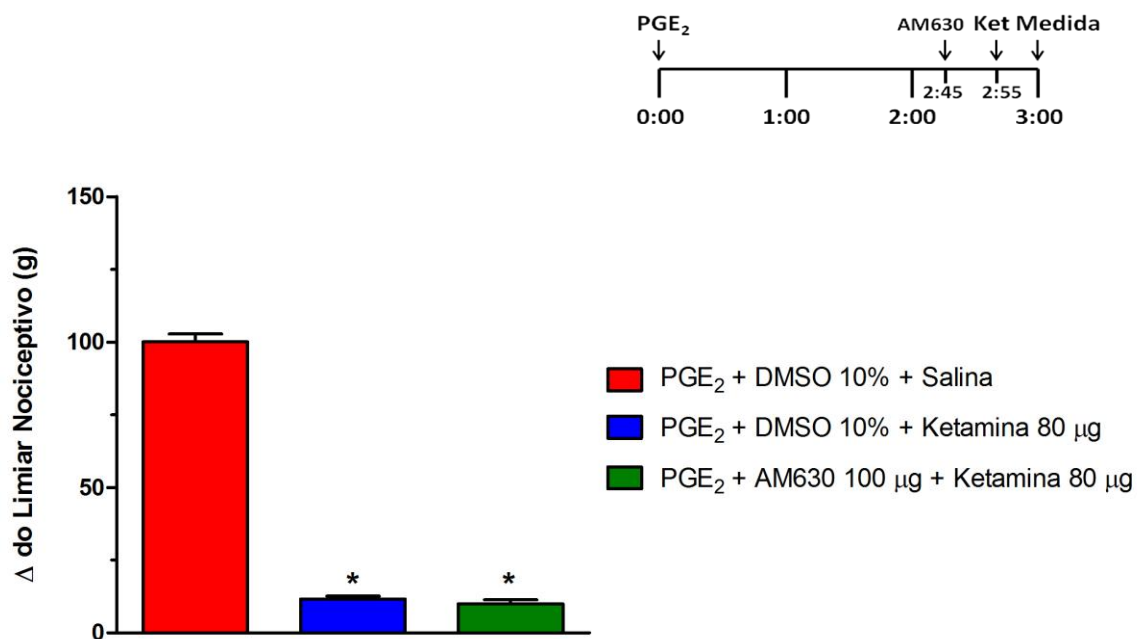


Gráfico 6. Efeito do AM630 (100 µg/pata) sobre a antinociceção periférica da Ketamina 80 µg/pata. O momento da administração das drogas está representado no diagrama na parte superior do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N = 4 animais. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo (PGE₂+DMSO10%+Sal). Não houve diferença estatística entre os grupos (PGE₂+DMSO10%+Ketamina 80 µg) e (PGE₂+AM630 100 µg+Ketamina 80 µg).

4.3.1 Participação dos endocanabinóides no efeito antinociceptivo periférico da ketamina

Para avaliar a participação dos canabinóides endógenos, utilizou-se o MAFP, substância que inibe a enzima FAAH (ácido graxo de amida hidrolase), responsável pela degradação dos endocanabinóides. Além disso, também utilizamos o VDM11, inibidor da recaptção dos endocanabinóides.

Como mostrado no gráfico 7 e 8, o MAFP e o VDM11, respectivamente, não induziram efeito por si só, entretanto na presença de PGE₂ foi observado um efeito antinociceptivo mediano induzido pelo MAFP e pelo VDM11. Além disto, quando administrado a ketamina na dose submáxima 20 µg/pata juntamente com o MAFP (2 µg/pata) ou com o VDM11 (20 µg/pata), foi observado um sinergismo no efeito antinociceptivo.

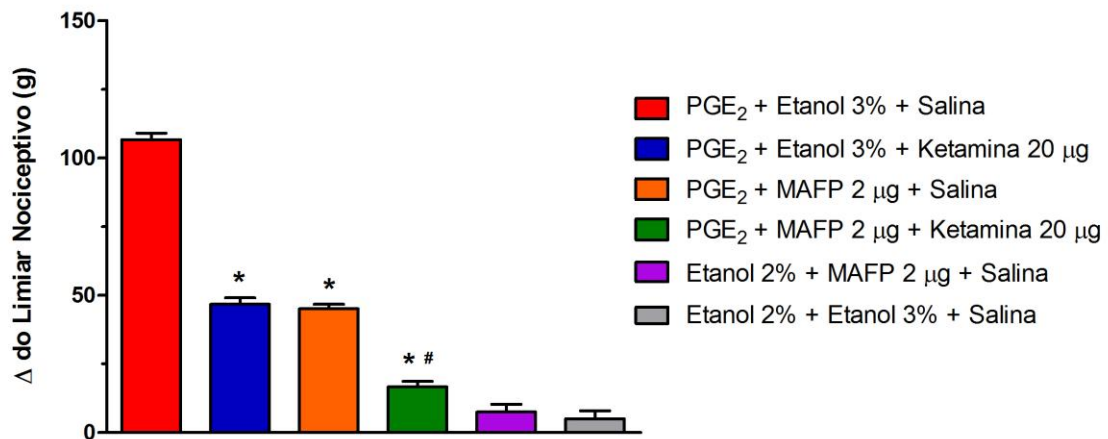
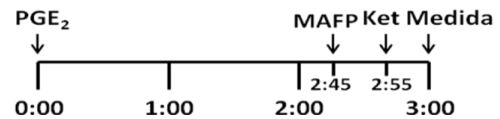


Gráfico 7. Sinergismo no efeito antinociceptivo periférico da Ketamina 20 μg/pata pelo pré-tratamento com MAFP (2 μg/pata). O momento da administração das drogas está representado no diagrama na parte superior do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N=4 animais. * e # indicam significância estatística (p< 0,05) em relação aos grupos (PGE₂+Etanol 3%+Salina) e (PGE₂+Etanol 3%+Ketamina 20 μg), respectivamente.

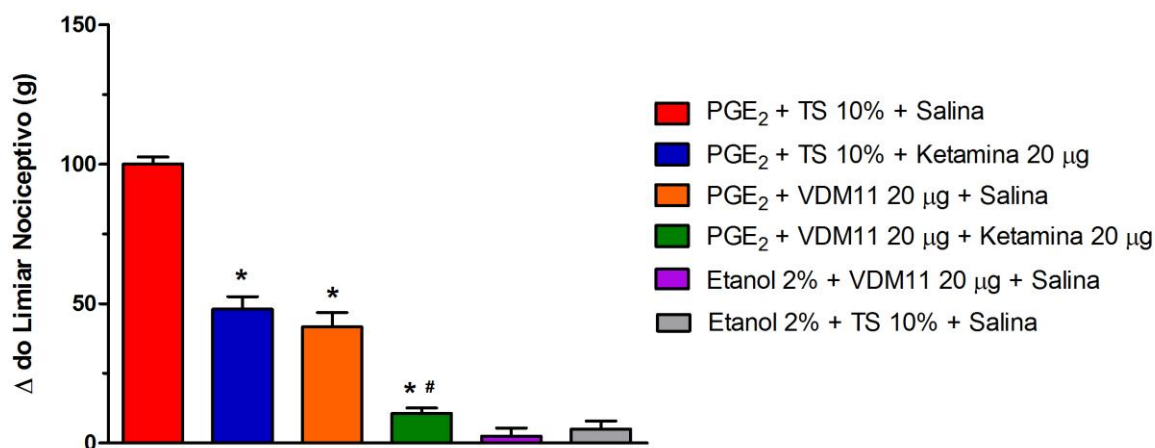
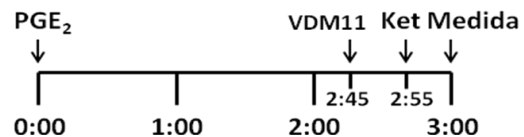


Gráfico 8. Sinergismo no efeito antinociceptivo periférico da Ketamina 20 µg/pata pelo pré-tratamento com VDM11 (20 µg/pata). O momento da administração das drogas está representado no diagrama na parte superior do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N=4 animais. * e # indicam significância estatística (p< 0,05) em relação aos grupos (PGE₂+TS10%+Salina) e (PGE₂+TS10%+Ketamina 20 µg), respectivamente. TS (tocrisolve).

4.3.2 Dosagem de endocanabinóides anandamida (AEA), 2-araquidonoil glicerol (2-AG), palmitoiletanolamida (PEA) e oleiletanolamida (OEA) em tecido de pata de rato pela cromatografia gasosa e espectrometria de massa

Através da técnica de cromatografia gasosa e espectrometria de massa, analisamos a liberação dos endocanabinóides anandamida (AEA), 2-araquidonoil glicerol (2-AG), palmitoiletanolamida (PEA) e oleiletanolamida (OEA) após o tratamento com ketamina. Parece haver um efeito sinérgico entre a PGE₂ e a Ketamina, de forma a aumentar o aporte de AEA. Entretanto, esse efeito não foi observado para o 2-AG, o PEA e o OEA, demonstrando uma seletividade para a presença de AEA no evento antinociceptivo analisado (Gráfico 9).

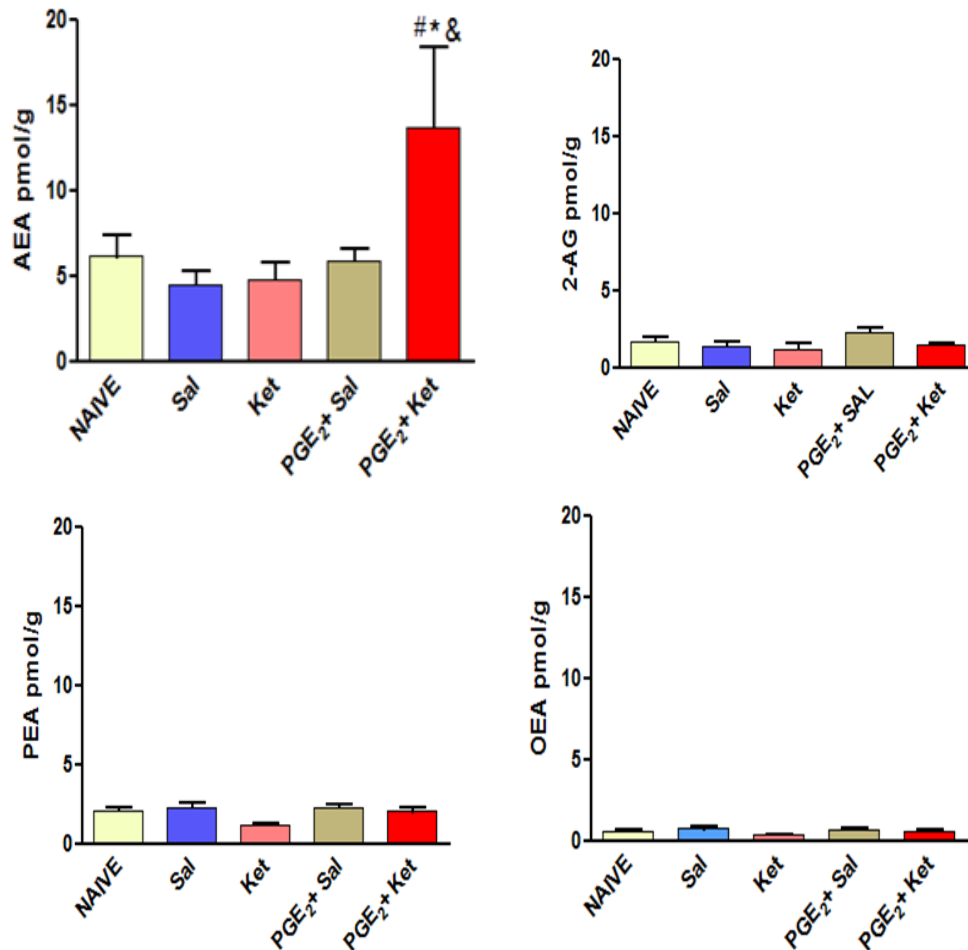


Gráfico 9. Dosagem de endocanabinóides AEA, 2-AG, PEA e OEA em tecido de pata de rato wistar pelo método de cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Cada símbolo representa a média \pm E.P.M. para a dosagem de endocanabinóides. N=4 animais. #, * e & indicam significância estatística ($p < 0,05$) em relação aos grupos (Sal), (Ket) e (PGE₂+Sal). Não houve diferença estatística para as dosagens dos endocanabinóides 2-AG, PEA e OEA.

4.4 KETAMINA ESPINHAL

4.4.1 Efeito induzido pela administração intratecal da ketamina sobre a hiperalgesia induzida por PGE₂

A administração intratecal da ketamina foi capaz de induzir efeito antinociceptivo frente ao estímulo hiperalgésico causado pela PGE₂ (2 µg/pata). O pico de ação ocorreu após 5 minutos da administração da droga (Gráfico 10), e esse efeito foi observado de maneira dose-dependente (20, 40 e 80 µg/i.t.), de forma que na concentração de 80 µg/i.t. houve reversão máxima do efeito nociceptivo da PGE₂ como mostrado no gráfico 11. A ketamina, mesmo na maior dose, não foi capaz de induzir efeito na ausência de hiperalgesia.

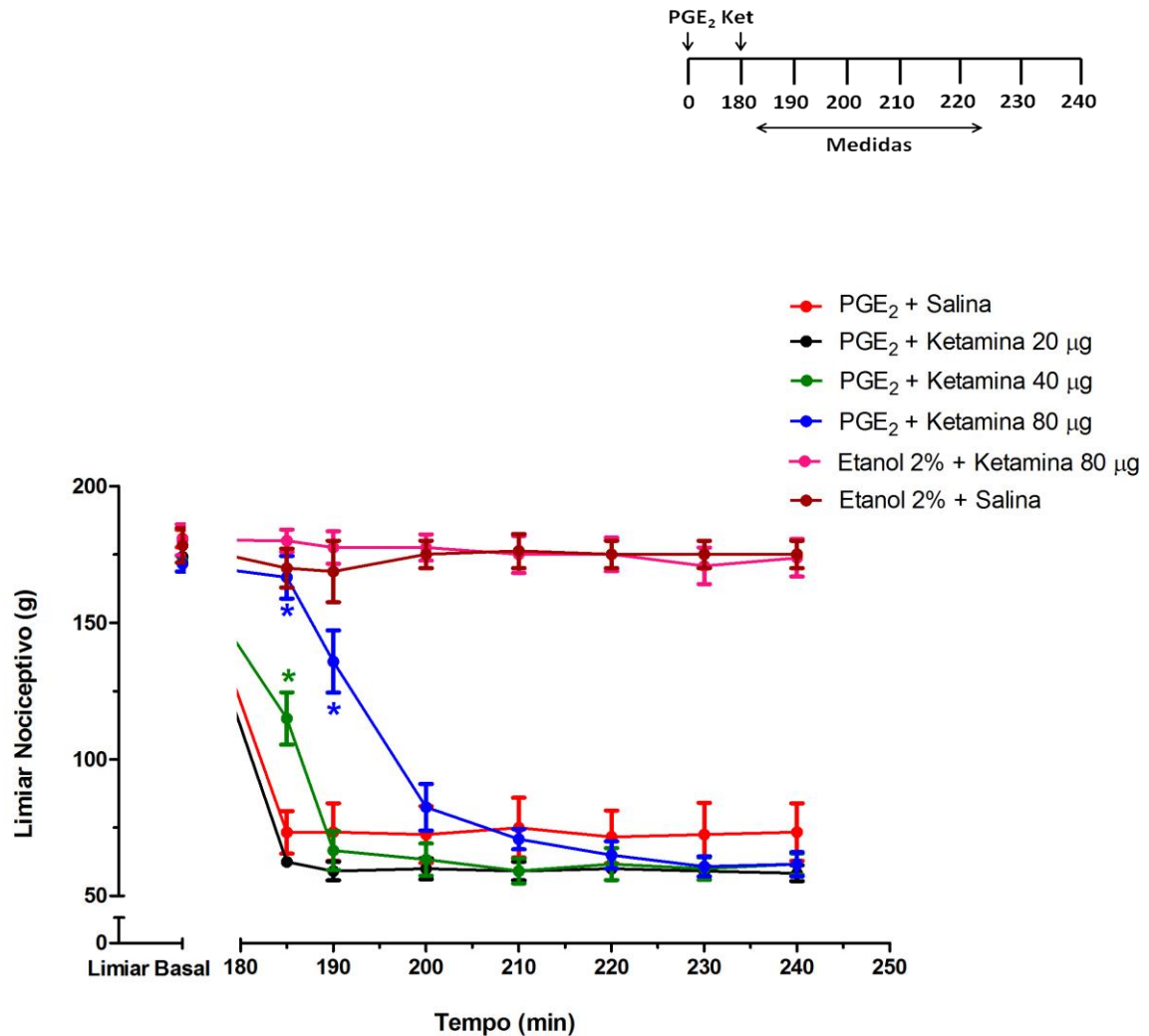


Gráfico 10: Curva temporal do efeito da administração intratecal de ketamina (20, 40 e 80 µg/i.t.) sobre a hiperalgisia induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂ 2 µg/pata). O momento das injeções está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N=4 animais. * indicam significância estatística (P< 0,05) em relação ao grupo PGE₂+Salina.

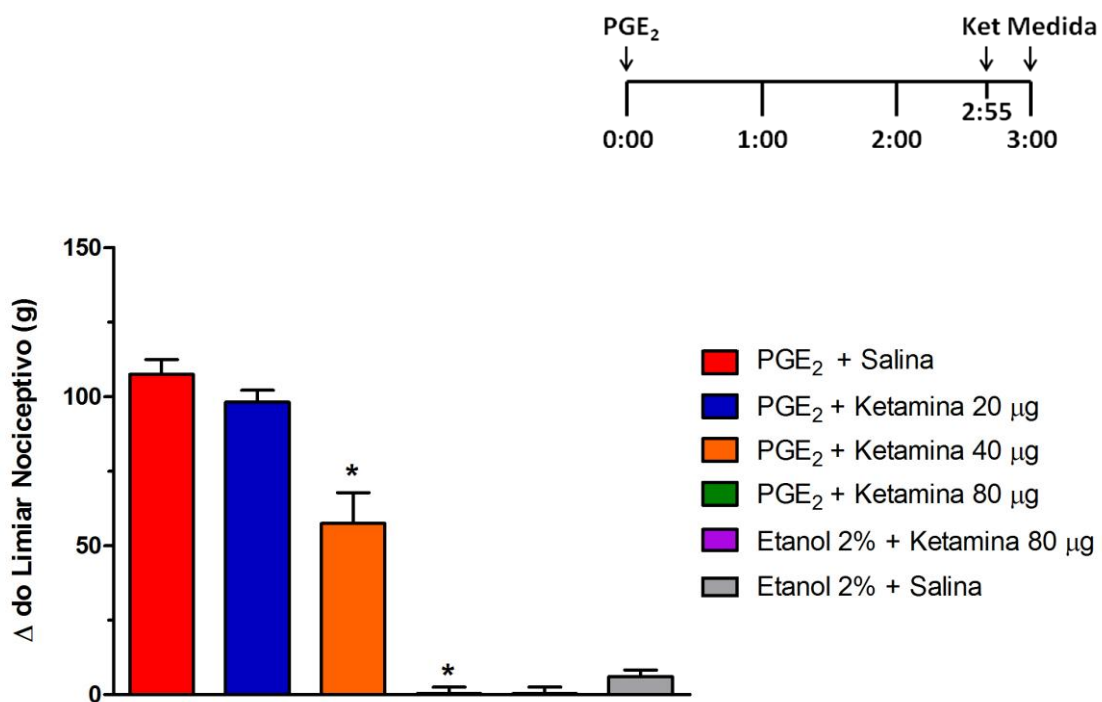


Gráfico 11: Efeito da administração intratecal de ketamina (20, 40 e 80 µg/i.t.) sobre a hiperalgesia induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂ 2 µg/pata). O momento das injeções está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N=4 animais. * indica significância estatística (p< 0,05) em relação ao grupo PGE₂+Salina.

4.4.2 Participação dos receptores canabinoidérgicos no efeito antinociceptivo espinhal da ketamina

Observou-se que o pré-tratamento com AM251 (20, 40 e 80 µg/i.t.) reverteu o efeito antinociceptivo da ketamina 80 µg/i.t. de maneira dose-dependente, de forma que na concentração de 80 µg/i.t. de AM251 essa reversão foi máxima (Gráfico 12). O AM251 na ausência da ketamina ou na presença de PGE₂ não induziu efeito por si só ou alterou a ação hiperalgésica da PGE₂. Já o pré-tratamento com AM630 100 µg/i.t., dose padronizada por experimentos anteriores no laboratório como tendo efeito máximo, não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo da ketamina 80 µg/i.t. (Gráfico 13).

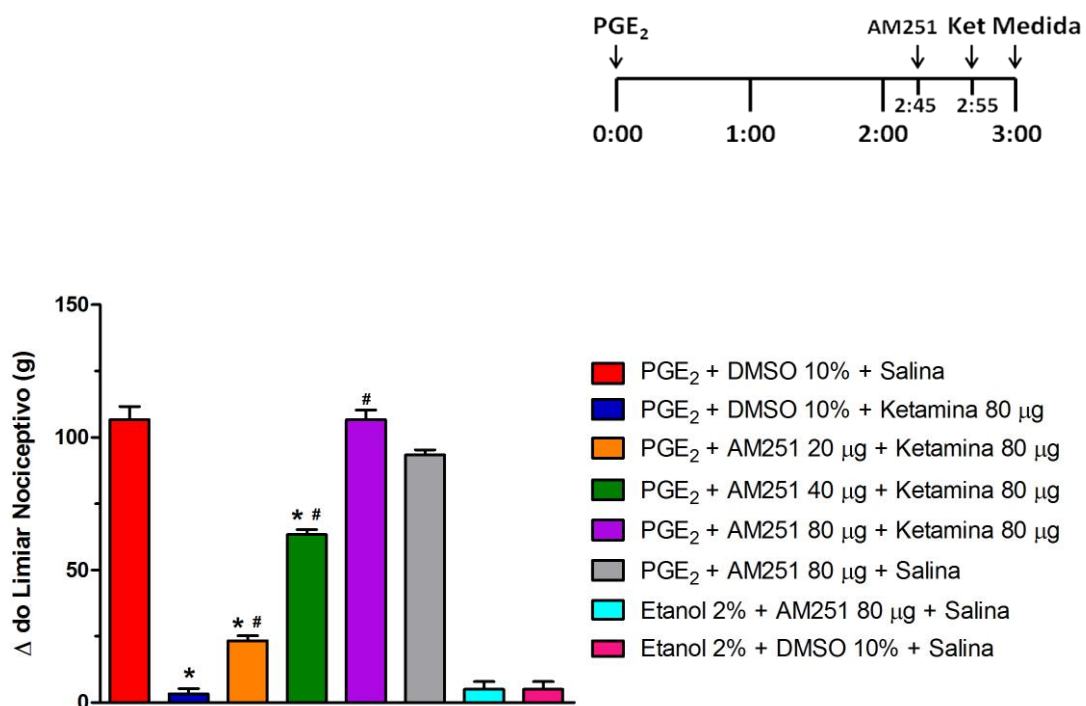


Gráfico 12. Antagonismo do efeito antinociceptivo espinhal da Ketamina 80 µg/i.t. induzido de forma dose-dependente pelo pré-tratamento com AM251 (20, 40 e 80 µg/i.t.).

O momento da administração das drogas está representado no diagrama na parte superior do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N=4 animais. * e # indicam significância estatística ($p < 0,05$) em relação aos grupos (PGE₂+DMSO 10%+Salina) e (PGE₂+DMSO 10%+Ketamina 80 µg), respectivamente.

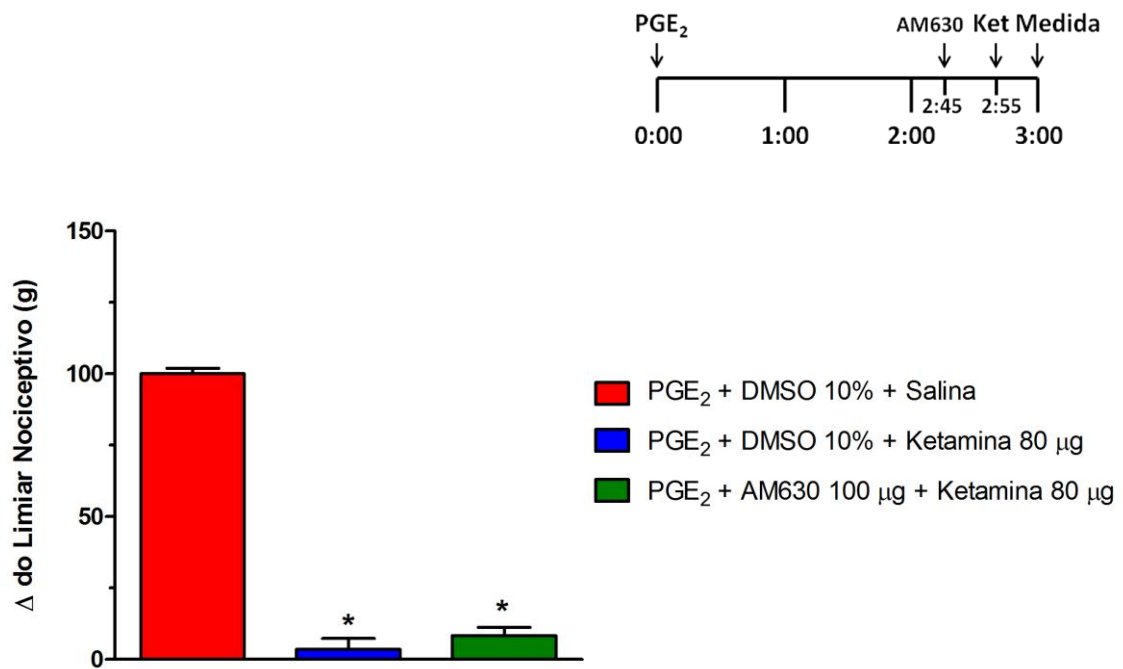


Gráfico 13. Efeito do AM630 (100 µg/i.t.) sobre a antinociceção periférica da Ketamina 80 µg/i.t. O momento da administração das drogas está representado no diagrama na parte superior do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N=4 animais. * indica significância estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo (PGE₂+DMSO10%+Salina). Não houve diferença estatística entre os grupos (PGE₂+DMSO10%+Ketamina 80 µg) e (PGE₂+AM630+Ketamina 80 µg).

4.4.3 Participação dos endocanabinóides no efeito antinociceptivo espinhal da ketamina

Tanto o MAFP, o VDM11 quanto o JZL184 não induziram efeito por si só, entretanto na presença de PGE₂ foi observado um efeito antinociceptivo mediano. Quando administrado a ketamina na dose submáxima 40 µg/i.t. juntamente com o MAFP (4 µg/i.t.), ou com o VDM11 (20 µg/ i.t.) ou com o JZL184 (14 µg/i.t.), foi observado um sinergismo no efeito antinociceptivo (Gráficos 14, 15 e 16, respectivamente).

O JZL 184 inibe a enzima MGL (monoacilglicerol lipase).

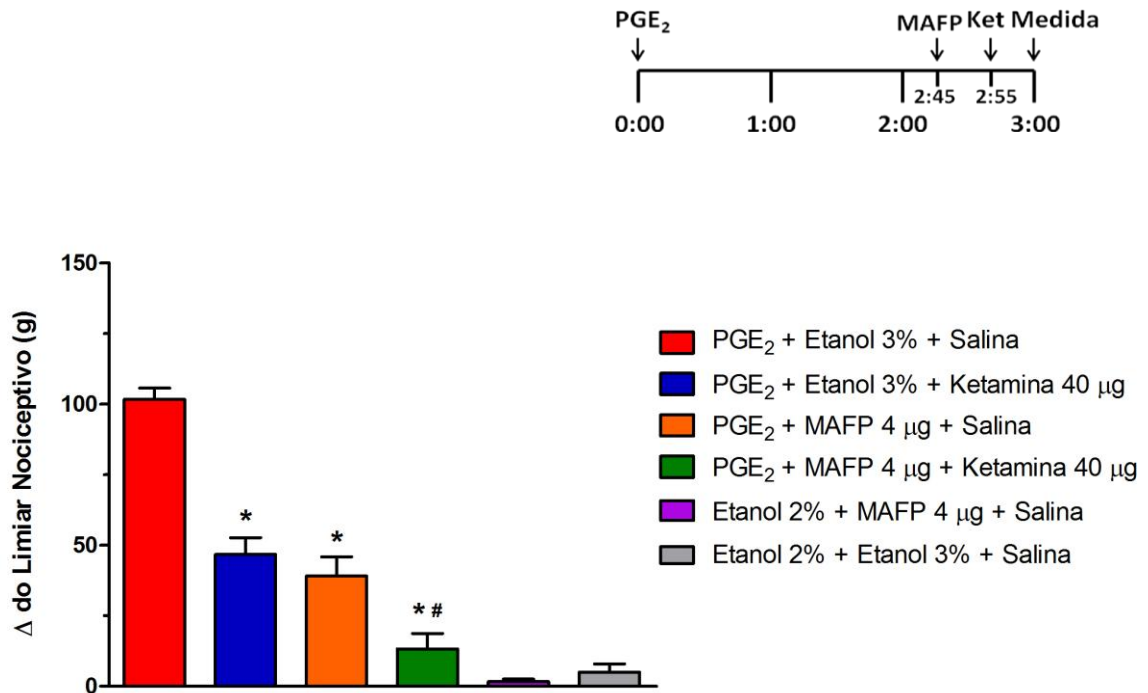


Gráfico 14. Sinergismo no efeito antinociceptivo espinal da Ketamina 40 µg/i.t. pelo pré-tratamento com MAFP (4 µg/i.t.). O momento da administração das drogas está representado no diagrama na parte superior do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N=4 animais. * e # indicam significância estatística ($p < 0,05$) em relação aos grupos (PGE₂+Etanol 3%+Salina) e (PGE₂+Etanol 3%+Ketamina 40 µg), respectivamente.

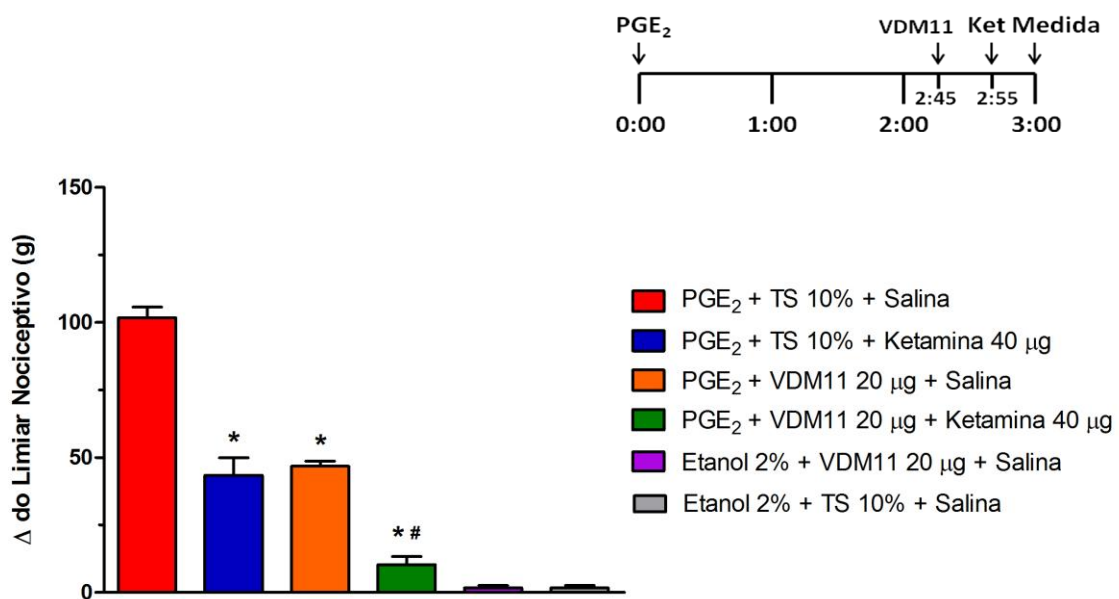


Gráfico 15. Sinergismo no efeito antinociceptivo espinhal da Ketamina 40 µg/i.t. pelo pré-tratamento com VDM11 (20 µg/i.t.). O momento da administração das drogas está representado no diagrama na parte superior do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N=4 animais. * e # indicam significância estatística (p< 0,05) em relação aos grupos (PGE₂+TS10%+Salina) e (PGE₂+TS10%+Ketamina 40µg), respectivamente.

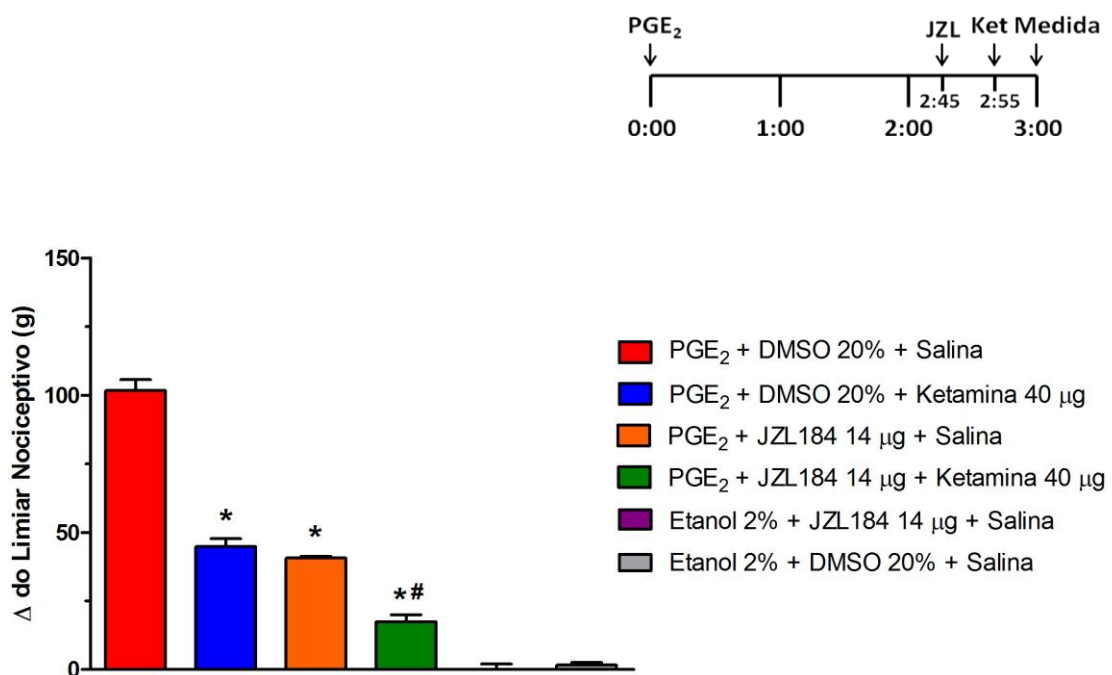


Gráfico 16. Sinergismo no efeito antinociceptivo espinal da Ketamina 40 µg/i.t. pelo pré-tratamento com JZL184 (14 µg/i.t.). O momento da administração das drogas está representado no diagrama na parte superior do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N=4 animais. * e # indicam significância estatística (p < 0,05) em relação aos grupos (PGE₂+DMSO 20%+Salina) e (PGE₂+ DMSO 20%+Ketamina 40 µg), respectivamente.

4.5 KETAMINA SUPRAESPINAL

4.5.1 Efeito induzido pela administração intracerebroventricular (ICV) da ketamina sobre a hiperalgesia induzida por PGE₂

A administração intracerebroventricular da ketamina foi capaz de induzir efeito antinociceptivo frente ao estímulo hiperalgésico causado pela PGE₂ (2 µg/pata). O pico de ação ocorreu após 5 minutos da administração da droga (Gráfico 17) e esse efeito foi observado de maneira dose-dependente (1, 2, 4 e 8 µg/ICV), de forma que na dose de 8 µg/ICV houve reversão máxima do efeito nociceptivo da PGE₂ como mostrado na gráfico 18. Assim como nos experimentos anteriores, a ketamina, mesmo na maior dose, não foi capaz de induzir efeito na ausência de hiperalgesia.

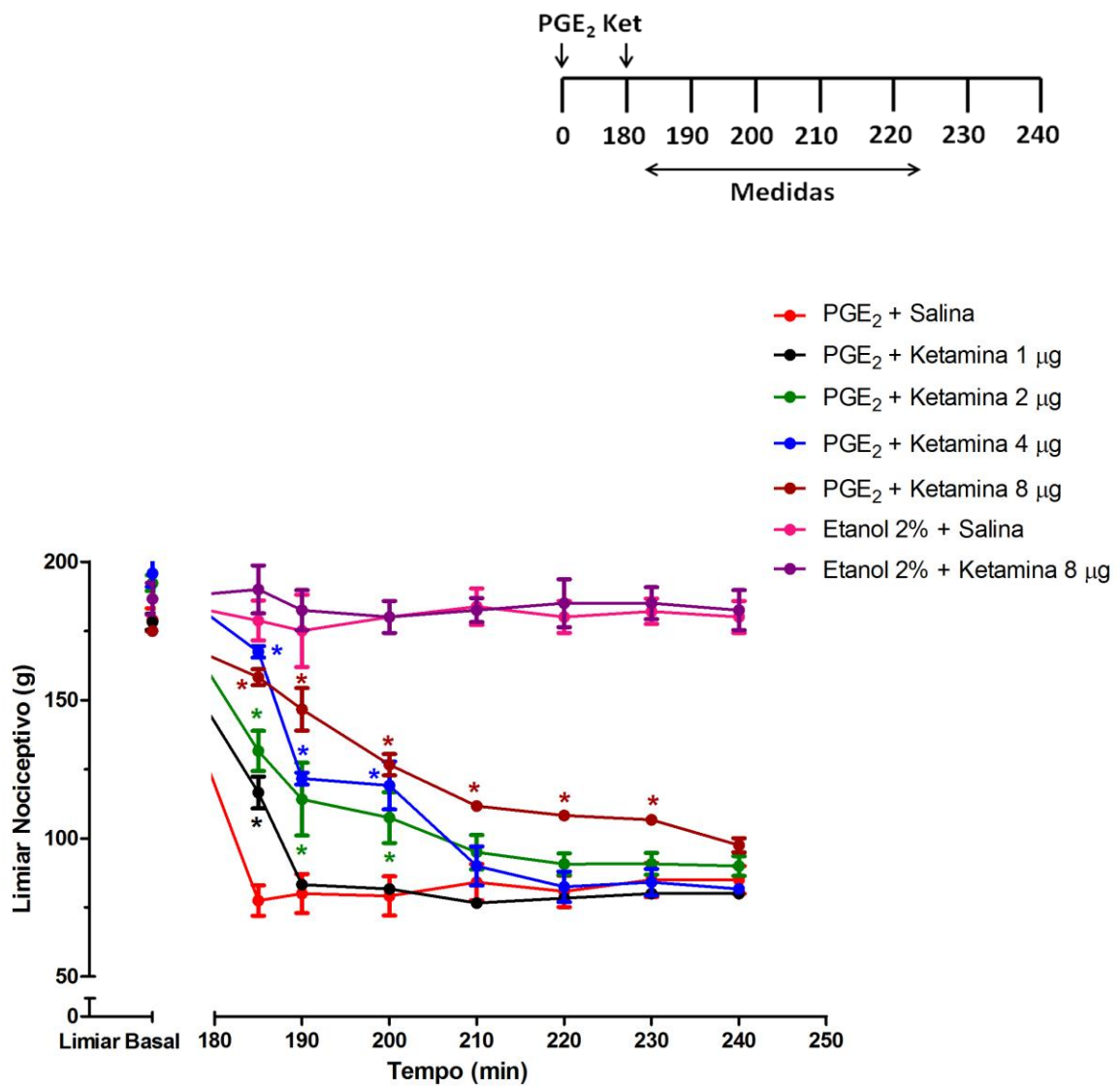


Gráfico 17: Curva temporal do efeito da administração intracerebroventricular de ketamina (1, 2, 4 e 8 μg/ICV) sobre a hiperalgesia induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂ 2 μg/pata). O momento das injeções está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N=4 animais. * indicam significância estatística (p< 0,05) em relação ao grupo PGE₂+Salina.

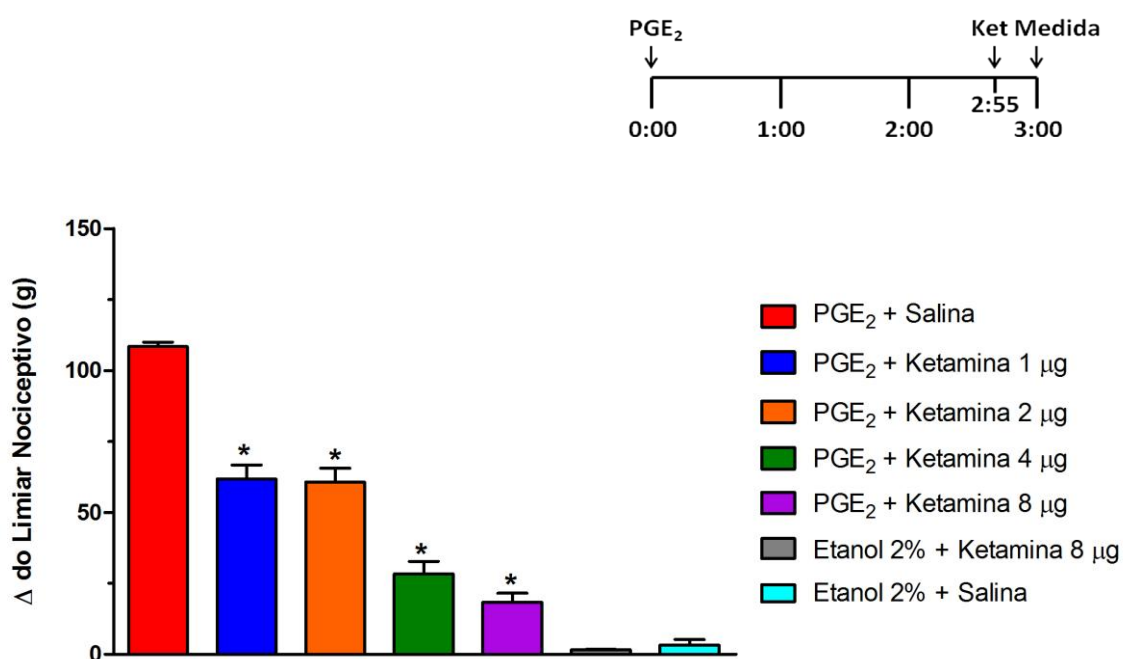


Gráfico 18: Efeito da administração intracerebroventricular de ketamina (1, 2, 4 e 8 µg/ICV) sobre a hiperalgesia induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂ 2 µg/pata). O momento das injeções está representado no diagrama localizado na parte superior do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N=4 animais. * indica significância estatística (p< 0,05) em relação ao grupo PGE₂+Salina.

4.5.2 Participação dos receptores canabinoidérgicos no efeito antinociceptivo supraespinal da ketamina

Observou-se que o pré-tratamento com AM251 (1, 2 e 4 µg/ICV) e o AM630 (1, 2 e 4 µg/ICV) reverteu o efeito antinociceptivo da ketamina 8 µg/ICV. A reversão foi máxima na dose de 4 µg/ICV para ambos os fármacos (Gráfico 19 e 20, respectivamente).

Tanto o AM251 quanto o AM630, na ausência da ketamina ou na presença de PGE₂ não induziram efeito por si só ou alteraram a ação hiperalgésica da PGE₂.

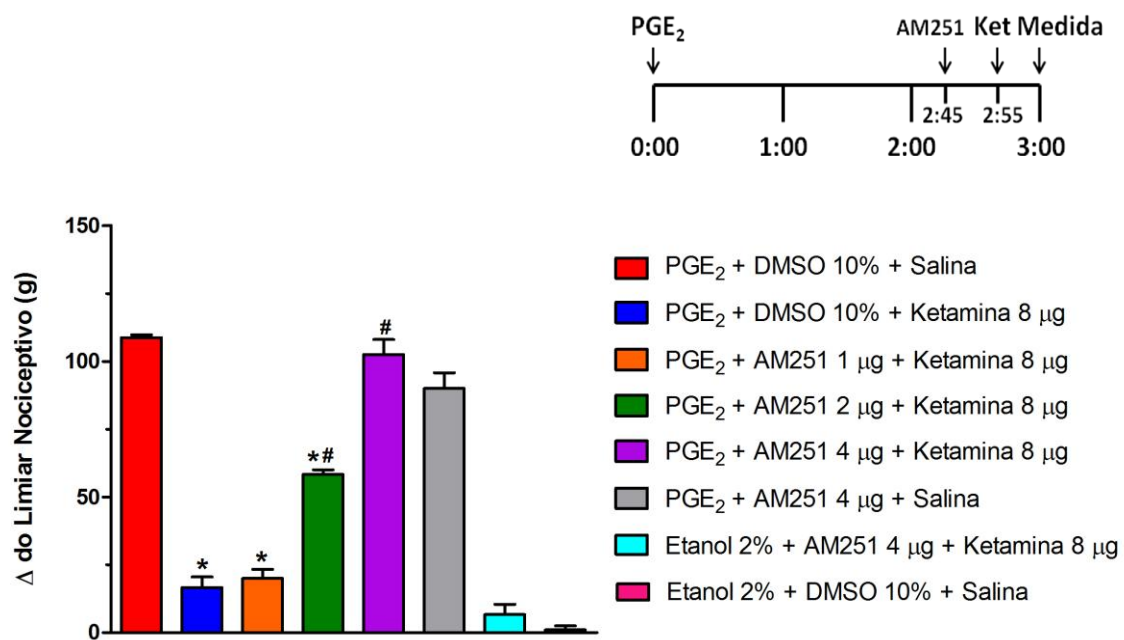


Gráfico 19. Antagonismo do efeito antinociceptivo supraespinhal da Ketamina 8 µg/ICV induzido de forma dose-dependente pelo pré-tratamento com AM251 (1, 2 e 4 µg/ ICV). O momento da administração das drogas está representado no diagrama na parte superior do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N=4 animais. * e # indicam significância estatística (p< 0,05) em relação aos grupos (PGE₂+DMSO 10%+Salina) e (PGE₂+DMSO 10%+Ketamina 8 µg), respectivamente.

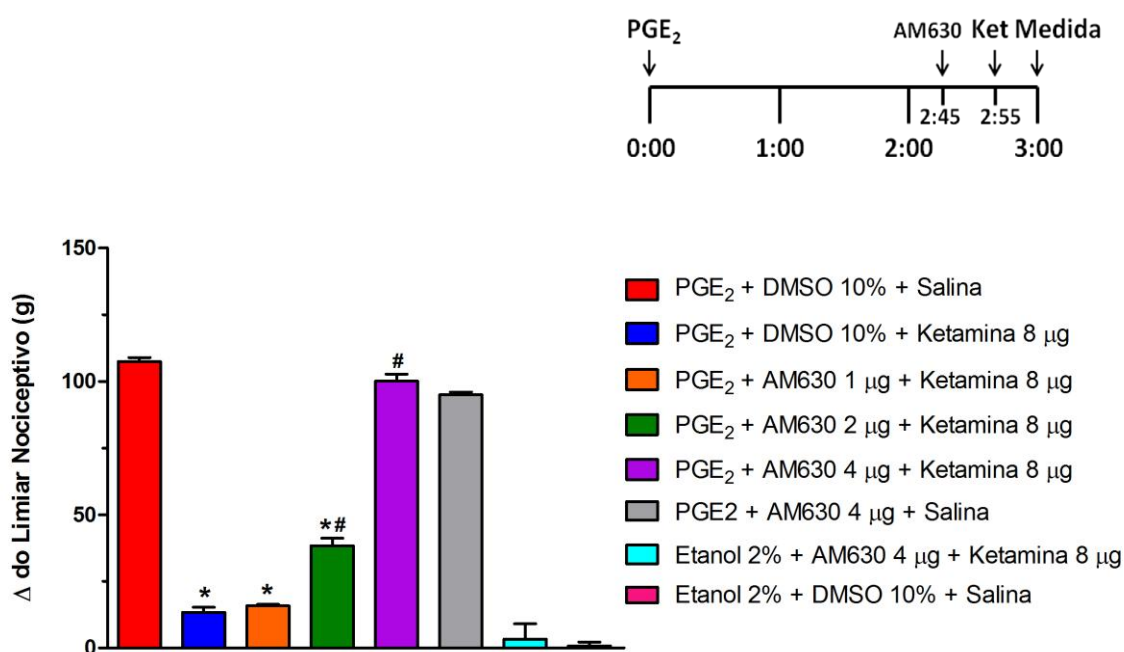


Gráfico 20. Antagonismo do efeito antinociceptivo supraespinal da Ketamina 8 μg/ICV pelo pré-tratamento com AM630 (1, 2 e 4 μg/ICV). O momento da administração das drogas está representado no diagrama na parte superior do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N=4 animais. * e # indicam significância estatística (p < 0,05) em relação aos grupos (PGE₂+ DMSO 10%+Salina) e (PGE₂+DMSO 10%+Ketamina 8 μg), respectivamente.

4.5.3 Participação dos endocanabinóides no efeito antinociceptivo supraespinal da ketamina

Tanto o MAFP, VDM11 quanto o JZL184 não induziram efeito por si só, entretanto na presença de PGE₂ foi observado um efeito antinociceptivo mediano. Quando administrado a ketamina na dose submáxima 2 µg/ICV juntamente com o MAFP (0,2 µg/ICV), ou com o (VDM11 4 µg/ICV) ou com o JZL184 (7 µg/ICV), foi observado um sinergismo no efeito antinociceptivo (Gráficos 21, 22 e 23, respectivamente).

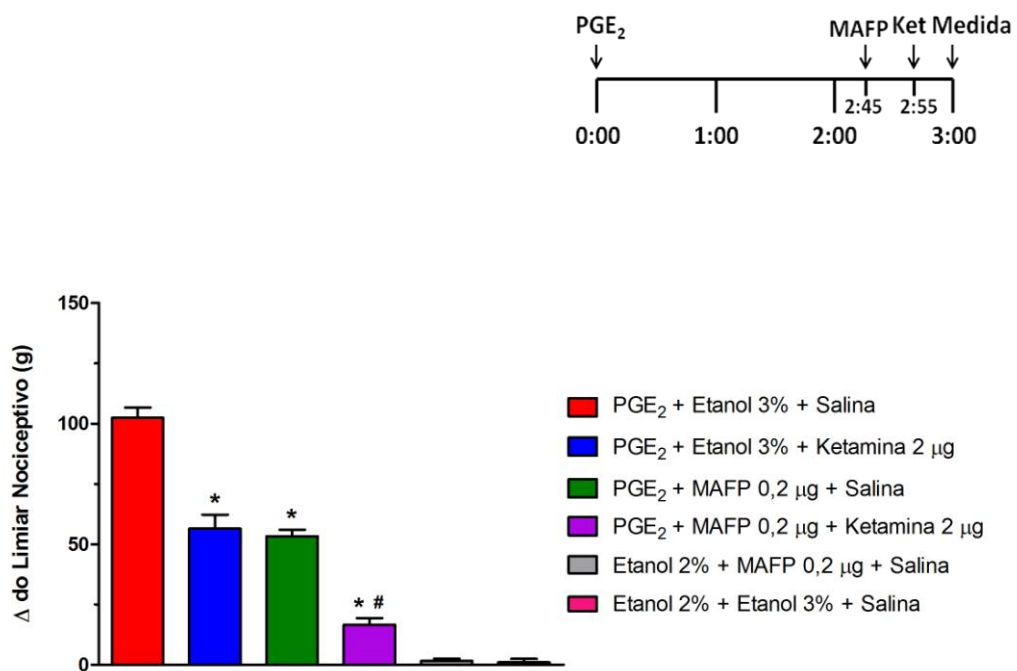


Gráfico 21. Sinergismo no efeito antinociceptivo supraespinal da Ketamina 2 µg/ICV pelo pré-tratamento com MAFP (0,2 µg/ICV). O momento da administração das drogas está representado no diagrama na parte superior do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N=4 animais. * e # indicam significância estatística (p< 0,05) em relação aos grupos (PGE₂+Etanol 3%+Salina) e (PGE₂+Etanol 3%+Ketamina 2 µg), respectivamente.

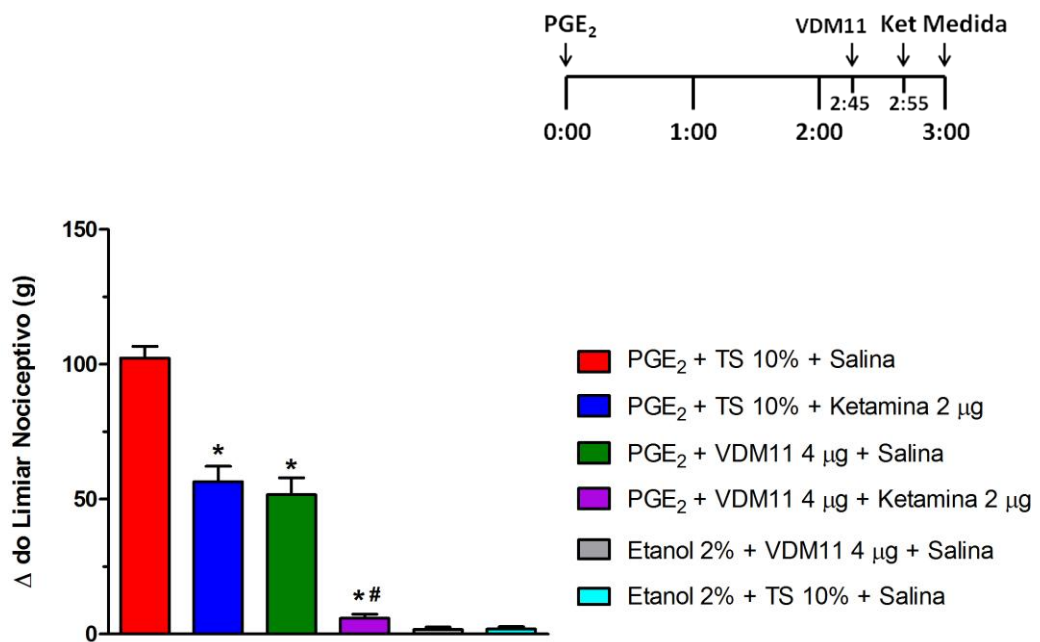


Gráfico 22. Sinergismo no efeito antinociceptivo supraespinhal da Ketamina 2 µg/ICV pelo pré-tratamento com VDM11 (4 µg/ICV). O momento da administração das drogas está representado no diagrama na parte superior do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N=4 animais. * e # indicam significância estatística ($p < 0,05$) em relação aos grupos (PGE₂+TS10%+Salina) e (PGE₂+TS10%+Ketamina 2 µg), respectivamente.

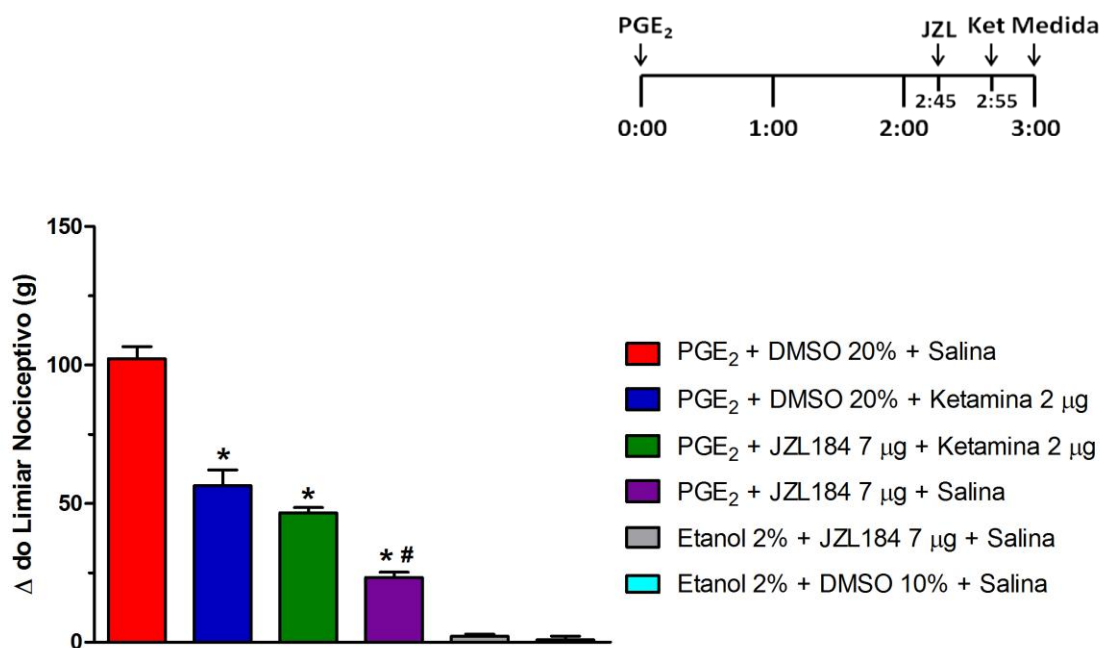


Gráfico 23. Sinergismo no efeito antinociceptivo supraespinal da Ketamina 2 µg/ICV pelo pré-tratamento com JZL184 (7 µg/ICV). O momento da administração das drogas está representado no diagrama na parte superior do gráfico. Cada barra representa a média ± E.P.M. da medida do Δ do limiar nociceptivo em gramas (g) referente ao N=4 animais. * e # indicam significância estatística ($p < 0,05$) em relação aos grupos (PGE₂+DMSO 20%+Salina) e (PGE₂+DMSO 20%+Ketamina 2 µg), respectivamente.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A ketamina durante muitos anos foi utilizada somente como anestésico geral dissociativo (Haas e Harper, 1992). Posteriormente, foi observado que em concentrações muito baixas, além da diminuição dos seus efeitos colaterais, era possível detectar a ação analgésica sem anestesia (Schmid e cols., 1999). A partir desse momento a ketamina também passou a ser usada com esta finalidade, além da sua utilização em terapias multimodais, como um complemento à analgesia (Rasmussen e cols., 2010).

Com o objetivo de estudar os mecanismos antinociceptivos da ketamina, utilizamos o modelo de hiperalgisia induzido pela PGE₂ exógena em ratos com base em dados encontrados na literatura, que demonstram que a PGE₂ é capaz de sensibilizar neurônios aferentes primários a estímulos químicos, térmicos e mecânicos (Bevan, 1999; Raja e cols., 1999) com a vantagem, sobre outros métodos de hiperalgisia como a carragenina, de eliminar a possibilidade de o efeito periférico do fármaco estudado ser resultante de um bloqueio da liberação ou ação de mediadores produzidos durante o processo inflamatório (Vinegar e cols., 1987). Em nosso estudo, a injeção intraplantar de PGE₂ (2 µg) induziu hiperalgisia no teste de compressão da pata do rato, e esses resultados, estão de acordo com dados obtidos anteriormente em nosso laboratório que demonstraram que nessa mesma dose, administrada periféricamente, ela foi capaz de induzir nocicepção, e a mesma teve seu pico de ação de três horas após o início do tratamento (Soares e cols., 2000; Soares e Duarte, 2001; Alves e cols., 2004).

No presente trabalho, a ketamina foi capaz de induzir antinocicepção frente a hiperalgisia pelas diferentes vias: periférica, espinhal e supraespinhal.

Houve reversão da hiperalgesia com uma latência de apenas cinco minutos para as diferentes vias. Além disso, a atividade antinociceptiva da ketamina foi dose-dependente, e decaiu no decorrer do tempo, demonstrando ser este efeito reversível.

Periféricamente, para excluir a possibilidade de um efeito não local da ketamina (80 µg/pata) ambas as patas posteriores foram injetadas com PGE₂ (2 µg) criando assim uma igualdade de condições farmacocinéticas em ambos os sítios (patas) a serem observados. A ketamina 80 µg foi administrada somente na pata direita (PD) induzindo efeito antinociceptivo restrito a pata tratada, uma vez que a administração dessa dose não afetou a hiperalgesia induzida pela PGE₂ na pata contralateral. Salientamos que a ketamina na dose de 160 µg/pata administrada nas mesmas condições acima citadas, induziu antinocicepção na PD e na pata esquerda (PE), demonstrando um efeito não local nesta dose. Uma vez que nosso objetivo ao nível periférico era verificar o mecanismo antinociceptivo da ketamina sem a interferência de mecanismos centrais, foi escolhida a dose de 80 µg para a condução do restante do estudo periférico.

Trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que a ketamina é capaz de produzir analgesia por mecanismos alternativos como a ativação da via NO/GMPc/KATP periféricamente (Romero e Duarte, 2012). Outros trabalhos do mesmo grupo demonstraram que endocanabinóides podem ativar esta via, como a anandamida (AEA) (Reis e cols., 2009, 2011) e o palmitoiletanolamida (PEA) (Romero e cols., 2012). Uma vez demonstrado o envolvimento da via NO/GMPc/KATP nos mecanismos analgésicos induzidos pela ketamina, e que a antinocicepção induzida pelos

endocanabinóides (PEA e AEA) também parecem estar relacionados com essa via, seria possível haver relação entre ketamina e liberação de canabinóides endógenos?

Para avaliar essa hipótese, analisamos o envolvimento dos receptores canabinóides (CB₁ e CB₂) no efeito antinociceptivo induzido por este fármaco. Sabe-se que os canabinóides estão relacionados à antinocicepção via ligação a esses receptores (Di Marzo e cols., 2004), e que esta analgesia pode ser revertida através do uso de antagonistas. No presente trabalho, utilizamos os antagonistas de receptor CB₁ (AM251) e CB₂ (AM630).

O pré-tratamento com o antagonista do receptor canabinóide CB₁, preveniu a ação antinociceptiva periférica, espinhal e supraespinhal induzida pela ketamina, de maneira dose-dependente. Trabalhos anteriores, já haviam utilizado esse antagonista na reversão da ação analgésica dos canabinóides (Walker e cols., 1999), entretanto a participação da ketamina nesse mecanismo é pouco conhecida.

Segundo Callén e colaboradores (2012), os receptores CB₁ são densamente expressos nas lâminas superficiais do corno dorsal da medula espinhal, no gânglio da raiz dorsal, nos terminais periféricos dos neurônios aferentes primários e na via descendente da dor, embasando anatomicamente a reversão da antinocicepção da ketamina via antagonistas CB₁ canabinóides observada em nosso estudo.

Segundo Pacheco e colaboradores (2008; 2009) a administração intraplantar e intracerebroventricular de AM251 foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo da morfina de maneira dose-dependente. Além disso, para Hasanein e colaboradores (2007) e Ebrahimzadeh e Haghparast (2011),

através do teste de tail-flick e formalina verificaram que administração de AM251 via núcleo cuneiforme e núcleo basolateral da amígdala, antagonizava o efeito antinociceptivo do agonista canabinóide WIN55,212-2.

Quando utilizado o antagonista do receptor CB₂ (AM630), observamos que este não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo da ketamina nas vias periférica e espinhal, mesmo na dose mais alta padronizada em outros estudos utilizando este agonista (Romero e cols., 2013). Entretanto, na via supraespinhal, ele foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo induzido pela ketamina de maneira dose-dependente. Trabalhos publicados já demonstraram a participação do AM630 administrado por via supraespinhal na reversão do efeito antinociceptivo induzido pelo exercício aeróbico e pela morfina (Pacheco e cols., 2009; Galdino e cols., 2014).

Segundo Van Sickle e colaboradores (2005) apesar de os receptores CB₂ estarem localizados principalmente no sistema imunológico, trabalhos recentes relatam a presença desses receptores no SNC, como por exemplo, na substância cinzenta periaquedutal (SCP), tálamo, córtex, amígdala, hipocampo (Gong e cols., 2006) entre outros. Outros trabalhos realizados, não identificaram a presença de CB₂ no gânglio da raiz dorsal (GRD) (Hohmann e Herkenham, 1999), o que poderia explicar a ausência da resposta do AM630 na periferia. Além disso, o 2-AG (2-araquidonoil glicerol), agonista de receptor CB₂, está presente no SNC em quantidades 170 vezes maiores do que a anandamida (Stella e cols., 1997) e, portanto, estes argumentos poderiam ajudar a compreender por que o antagonismo do AM630 ocorreu somente quando o fármaco foi administrado via intracerebroventricular, numa aplicação direta no SNC.

Uma vez observado o envolvimento de receptores canabinóides na ação antinociceptiva induzida pela ketamina, resolvemos avaliar a participação dos endocanabinóides nesse mecanismo. Para isso, utilizamos o MAFP, um inibidor da FAAH (amida hidrolase de ácido graxo), enzima que degrada a anandamida e libera ácido araquidônico e etanolamina, como produtos, dessa forma, os inibidores da FAAH são capazes de aumentar significativamente os níveis de anandamida em tecidos nervosos e parecem exibir uma atividade analgésica em roedores (Di Marzo e cols., 1994).

Além disso, embora a existência de um transportador de endocanabinóides seja ainda controversa, parte da ação dos canabinóides endógenos termina, em decorrência da recaptção dos mesmos para dentro dos neurônios (Beltramo e Piomelli, 2000) por esse motivo, sabe-se que os inibidores da recaptção são úteis para a manipulação dos níveis de endocanabinóides tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (de Lago e cols., 2004). Dessa forma, resolvemos também utilizar o VDM11, um dos fármacos responsáveis por essa inibição da recaptção, visando analisar o efeito de sinergismo da ação antinociceptiva dos endocanabinóides.

No presente trabalho, o efeito antinociceptivo da dose submáxima da ketamina, nas vias periférica, espinhal e supraespinhal na presença do MAFP e do VDM11 teve efeito sinérgico.

O MAFP e o VDM11 nas doses utilizadas, por si só já induziram antinocicepção mediana uma vez que a PGE₂ libera endocanabinóides como visto em experimentos preliminares em nosso laboratório. Entretanto, quando ambos foram administrados juntamente com a ketamina na sua dose

submáxima, foi verificado um sinergismo entre a ação deste, que se assemelhou a uma dose antinociceptiva de efeito máximo (80 µg).

Pacheco e colaboradores (2008; 2009) utilizaram o MAFP por via periférica e supraespinal e demonstraram que ele foi capaz de intensificar a antinocicepção gerada por baixas doses de morfina, além disso, para Galdino e colaboradores (2014), a administração de MAFP por via intratecal prolongou o efeito antinociceptivo induzido por exercício no teste de compressão de pata em rato. Já o pré-tratamento com VDM11 administrado por via subcutânea, intratecal e supraespinal, prolongou o efeito antinociceptivo evocado por exercício no teste de compressão da pata e tail-flick (Galdino e cols., 2014). Em outro trabalho, a administração sistêmica de inibidores da recaptação ou degradação, de canabinóides aumentaram os níveis de AEA e/ou 2-AG no cérebro (de Lago e cols., 2005).

Pela via supraespinal, embora não tenha sido observada a reversão do efeito antinociceptivo induzido pela ketamina, quando utilizado o AM630 pela via intratecal, indicando que não houve envolvimento de receptores do tipo CB₂, resolvemos avaliar a participação de outro endocanabinóide como o 2-AG nesse mecanismo. Sabemos que o 2-AG pode se ligar tanto em receptores do tipo CB₁ quanto do tipo CB₂ canabinóide (Suigiura e Waku, 2000), por este motivo, resolvemos utilizar o fármaco JZL184, inibidor da enzima monoacilglicerol lipase (MGL) responsável pela hidrólise do 2-AG, sem alterarmos a degradação da anandamida (Guindon e Hohmann, 2009), e observamos que com a administração deste inibidor o efeito antinociceptivo da ketamina na sua dose submáxima (40 µg/i.t.) teve um efeito sinérgico. O

JZL184 por si só foi capaz de induzir antinocicepção mediana na presença da PGE₂.

Embora o 2-AG seja capaz de se ligar nos dois receptores (Suigiura e Waku, 2000), ele apresenta uma menor afinidade para receptores do tipo CB₁ quando comparado à anandamida (Mechoulam e cols., 1995; Childers e Breivogel, 1998).

Segundo Suplita e colaboradores (2006), a administração intratecal do URB602, inibidor de MGL (monoacilglicerol lipase), inibiu a degradação de 2-AG e aumentou a analgesia induzida por estresse, através de mecanismos dependentes de receptor CB₁. Nossos resultados com o JZL184, e com o AM630, sugerem que, pela via espinhal, é possível haver o envolvimento do 2-AG, que por sua vez, estaria se ligando seletivamente em receptores do tipo CB₁ canabinóides como discutido anteriormente.

Pela via supraespinhal também foi observado um sinergismo do efeito antinociceptivo da ketamina na sua dose submáxima de (2 µg/ICV), quando administrado o JZL184. Juntamente com a PGE₂, ele também foi capaz de induzir antinocicepção mediana. Como já discutido, tanto os receptores CB₂ canabinóides (Gong e cols., 2006) quanto o 2-AG foram descritos no SNC, e neste local, o 2-AG está presente em maiores quantidades do que a anandamida (Stella e cols., 1997), o que justificaria a resposta do JZL184 atuando via receptor CB₂ canabinóide. Trabalhos anteriores já relacionaram o JZL184 administrado por via supraespinhal na intensificação do efeito antinociceptivo, como visto por Galdino e colaboradores (2014).

Nos últimos anos, o interesse sobre os canabinóides endógenos, principalmente a anandamida e o 2-AG, aumentou significativamente, e a

quantificação destes compostos em amostras biológicas passou a ser uma ferramenta de estudo (Stella e Piomelli, 2001). Os endocanabinóides podem ser quantificados por isótopos de ensaios de diluição, utilizando espectrometria de massa juntamente com a cromatografia gasosa, ou cromatografia líquida de alta eficiência (Hardison e cols., 2006).

De acordo com os dados, anteriormente discutidos, demonstramos o envolvimento dos endocanabinóides no efeito antinociceptivo periférico da ketamina. Por isso, resolvemos avaliar a presença destes endocanabinóides, utilizando a técnica de cromatografia gasosa e espectrometria de massa.

Ao realizar as dosagens dos endocanabinóides, anandamida (AEA), 2-araquidonoilglicerol (2-AG), palmitoiletanolamida (PEA) e oleiletanolamida (OEA) foi constatado que houve um sinergismo entre a ketamina e a PGE₂ na liberação da AEA. Nossos dados cromatográficos não conseguiram verificar se a ketamina é responsável pela síntese ou liberação de AEA, mais indica que de alguma forma na presença de um insulto nociceptivo (PGE₂) a ketamina participa do evento de liberação de endocanabinóides. Uma vez que não há dados na literatura que expliquem como a ketamina possa liberar endocanabinóides, sugerimos algumas hipóteses passíveis de serem testadas futuramente.

Segundo a literatura, durante o processo de formação dos endocanabinóides a presença de cálcio é necessária para que o evento aconteça. Para a síntese de anandamida, que ocorre a partir da clivagem enzimática de um precursor fosfolipídico, o N-araquidonoil fosfatidiletanolamina (NAPE) (Jin e cols., 2009), o cálcio é responsável pela ativação da enzima NAFE-PLD (fosfolipase D específica da N-acil-fosfatidiletanolamina), que

hidrolisa a NAPE para formar a AEA (Egertová e cols, 2008). Já o 2-AG que é sintetizado em dois processos, onde em primeiro lugar, o diacilglicerol (DAG) é formado a partir da clivagem enzimática de precursores de fosfolípidos de membrana pela enzima fosfolipase C (PLC), e posteriormente o DAG, é hidrolisado pela diacilglicerol lipase (DAGL), gerando 2-AG (Basavarajappa, 2007), o cálcio será necessário para a ativação da enzima DAGL (Mechoulam e cols., 1998; Rang e cols., 2007).

Também é sabido que o mecanismo clássico da ketamina envolve o bloqueio físico dos receptores NMDA (RNMDA). Estes receptores pertencem a uma família de receptores ionotrópicos que são ativados pelo glutamato, o principal neurotransmissor excitatório (Carlton e Coggeshall, 1999). Sua distribuição é bastante ampla e vários trabalhos já descreveram a sua localização. Estes estão presentes no córtex, sistema límbico, gânglios basais, tálamo e cerebelo, com localização pré e pós-sináptica (Fantoni, 2011), e expressos no corno dorsal da medula espinhal (Liu e cols., 1994). Além disso, outros trabalhos também encontraram este receptor expresso nos neurônios do gânglio da raiz dorsal (DRG), e nos terminais periféricos dos nervos aferentes primários (Sato e cols., 1993; Carlton e Coggeshall, 1999; McRoberts e cols., 2001).

Os RNMDA possuem uma elevada permeabilidade ao cálcio e durante a despolarização o canal se abre para a entrada deste íon, portanto, uma vez bloqueados esses receptores, não ocorre a despolarização celular e consequente liberação de Ca^{2+} .

Dados da literatura relacionam o bloqueio dos receptores NMDA à ação antinociceptiva dos canabinóides. Palazzo e colaboradores (2010)

demonstraram que o pré-tratamento com o antagonista seletivo para RNMDA, DL-AP5 (DL-2-Amino-5-fosfonovalerato), bloqueou o efeito analgésico do agonista canabinóide, WIN 55,212-2. Por outro lado, Ohno-Shosaku e colaboradores (2007) demonstraram que o aumento da concentração de Ca^{2+} causado pelo influxo de cálcio através dos receptores NMDA induziu a liberação de endocanabinóides em neurônios do hipocampo.

Analisando os nossos dados, provavelmente a ketamina não libera endocanabinóides pelo mecanismo clássico via bloqueio dos RNMDA, sendo assim, sugerimos o envolvimento de mecanismos alternativos para tal evento.

A antinocicepção evocada pela ketamina também pode envolver mecanismos alternativos que podem estar associados com o sistema opioidérgico ao nível periférico, espinal e supraespinal (Crisp e cols., 1991; Sarton e cols., 2001; Romero e cols., em fase de publicação).

Smith e colaboradores (1985) relataram que a ketamina pode ativar o sistema monoaminérgico através de receptores opióides, em experimentos utilizando a naloxona no teste de tail-flick. Posteriormente, Baumeister e Advokat (1991) associaram o sistema opióide à analgesia induzida pela ketamina, ao administrar naloxona no ventrículo lateral, e verificaram o antagonismo da antinocicepção supraespinal produzida pela ketamina. Esta ação central da ketamina parece ser seletiva para os receptores do tipo μ opióide (Sarton e cols., 2001), e o envolvimento opióide supraespinal também foi observado ao nível espinal (Crisp e colaboradores 1991). Dados do nosso laboratório, também demonstraram a participação dos receptores μ e δ , mas não do receptor κ na liberação de β -endorfina estimulada pela administração de ketamina, via periférica, através do teste de compressão da pata de rato,

utilizando antagonistas específicos de receptores opioidérgicos. A presença de β -endorfina foi confirmada através de ensaio imunohistoquímico. (Romero e cols., em fase de publicação).

Ademais, a ketamina pode ativar diretamente os receptores opióides (Spinosa e cols., 2011) sendo assim, devido a essa capacidade, acreditamos que a ketamina também possa agir diretamente em receptores canabinóides.

Além disso, outros trabalhos já relacionaram a ativação do sistema opióide como responsável pela liberação de canabinóides endógenos (Pacheco e cols., 2008; 2009). Analisando a via periférica e supraespinhal, foi avaliado o envolvimento dos endocanabinóides no efeito antinociceptivo induzido pelos agonistas específicos de receptores opióides μ , δ e κ . Segundo os autores o efeito antinociceptivo do agonista μ , mas não do δ e κ , foram bloqueados pelo antagonista de receptor CB_1 e pelo menos parcialmente, pelo antagonista do receptor CB_2 periféricamente e demonstraram centralmente a participação do receptor μ -opióide, mas não do δ e κ . Mostrando que o efeito antinociceptivo periférico e central da morfina pode ser mediado por um sistema endocanabinóide.

Além dos trabalhos discutindo que a ketamina pode liberar opióides, e dos relatos de que os opióides podem liberar endocanabinóides, também há trabalhos demonstrando que canabinóides podem liberar opióides, por mecanismos celulares e moleculares não totalmente compreendidos (Baumeister e Advokat, 1991; Houser e cols., 2000, Pacheco e cols., 2008). E finalmente, Rios e colaboradores (2006), utilizando a técnica de transferência de energia de ressonância de bioluminescência, evidenciaram a associação entre os receptores μ -opióide/ CB_1 a partir de clonagem, e estes formariam um

heterodímero μ /CB₁. Para Christie (2006), os dois receptores interagem diretamente quando co-expressos nas mesmas células. Segundo o autor a formação de um heterodímero μ /CB₁ explicaria essas interações, corroborando os achados de Rios e colaboradores (2006). Também foi demonstrado que os receptores CB₁ e μ -opioides se co-expressam em interneurônios da lâmina II do corno dorsal da medula espinhal (Salio e cols., 2001), reforçando a ideia da formação de heterodímero entre os receptores opióide e canabinóide.

Dessa maneira acreditamos que a ação antinociceptiva periférica, espinhal e supraespinhal da ketamina pode estar relacionada a mecanismos alternativos. Sugerimos que esses mecanismos possam estar relacionados com o envolvimento indireto através da ativação ou liberação de opioides, que por sua vez, estariam liberando canabinóides; ou a ketamina estaria atuando como agonista ativando diretamente os receptores canabinóides; e finalmente por mecanismos que envolvam a ativação do complexo receptor opióide-canabinóide.

O presente trabalho demonstra a ação canabinóide no evento antinociceptivo da ketamina ao nível central e periférico, mas não trás dados suficientes para elucidar o mecanismo farmacológico pelo qual a ketamina libera endocanabinóides e, portanto, mais estudos farmacológicos e bioquímicos precisam ser realizados para a confirmação das hipóteses levantadas neste trabalho a respeito do mecanismo induzido pela ketamina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alger, B. E. **Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids.** Progress in Neurobiology. 68:247-86, 2002.
- Almeida, T.F.; Roizenblatt, S.; Tufik, S. **Afferent pain pathways: a neuroanatomical review.** Brain Research, 1000(1-2):40-56, 2004.
- Alves, D. P.; Soares, A. C.; Francischi, J. N.; Castro, M. S. A.; Perez, A. C.; Duarte, I. D. G. **Additive antinociceptive-effect of combination of diazoxide, an activator of ATP-sensitive K⁺ channels, and sodium nitroprusside and Dibutyryl-cGMP.** The European Journal of Pharmacology. 489:59-65, 2004.
- Bai, L.; Zhao, Z. Q. **Ketamine-induced peripheral analgesia in rats.** Zhongguo Yao Li Xue Bao. 118:377-9, 1997.
- Basavarajappa, B. S. **Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism.** Protein & Peptide Letters. 14(3):237-46, 2007.
- Baumeister, A.; Advokat, C. **Evidence for a supraspinal mechanism in the opioid-mediated antinociceptive effect of ketamine.** Brain Research. 6;566(1-2):351-3, 1991.
- Baum, V. C.; Tecson, M. E. **Ketamine Inhibits Transsarcolemmal Calcium Entry in Guinea Pig Myocardium: Direct Evidence by Single Cell Voltage Clamp.** Anesthesia e Analgesia. 73:8047, 1991.
- Bell, F. B. **Ketamine for chronic non - cancer pain.** Pain. 141:210-4, 2009.
- Beltramo, M.; Stella, N.; Calignano, A.; Lin, S. Y.; Makriyannis, A.; Piomelli, D. **Functional role of high affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition.** Science. 277:1094-97, 1997.
- Beltramo, M.; Piomelli, D. **Carrier-mediated transport and enzymatic hydrolysis of the endogenous cannabinoid 2-arachidonylglycerol.** Neuro Report. 11:1231-35, 2000.
- Bergman, S. A. **Ketamine review of its Pharmacology and its use in Pediatric Anesthesia.** Anesthesia Progress. 46:10-20, 1999.
- Bernacchio, R. M. G.; Contin, I.; Mori, M. **Fatores modificadores da percepção da dor.** Revista Dor. 6(3):621-33, 2005.
- Bessou, P.; Perl, E. R. **Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli.** Journal of Neurophysiology. 32:1025-1043, 1969

Bevan, S. Nociceptive peripheral neurons: cellular properties. In: Melzack, R., Wall, D., (Eds.) **Textbook of pain**. 4.ed. London: Churchill Livingstone, Cap.3, 1999, p. 85-103.

Bloomquist, E. R. **Marijuana**. Beverly Hills, California: Glencoe Press, 1968. 216p.

Brasil. Ministério da Saúde. Consumo de medicamentos: um autocuidado perigoso. Disponível em:
<http://www.conselho.saude.gov.br/ultimas_noticias/2005/medicamentos.htm>. Acesso em fev 2014.

Callén, L.; Moreno, E.; Barroso-Chinea, P.; Moreno-Delgado, D.; Cortés, A.; Mallol, J.; Casadó, V.; Lanciego, J. L.; Franco, R.; Lluís, C.; Canela, E. I.; McCormick, P. J. **Cannabinoid Receptors CB₁ and CB₂ Form Functional Heteromers in Brain**. The Journal of Biological Chemistry. 287(25):20851-20865, 2012.

Carlton, S. M.; Coggeshall, R. E. **Inflammation-induced changes in peripheral glutamate receptor populations**. Brain Research. 820(1-2):63-70, 1999.

Carvalho, M. M. M. J. **Dor – Um estudo multidisciplinar**. 2ªed. São Paulo. Editora Summus. 1999. 345p.

Chapman, C. R.; Gavrin, J. **Suffering: the contributions of persistent pain**. The Lancet. 353:2233-7, 1999.

Childers, S. R.; Breivogel, C. S. **Cannabis and endogenous cannabinoid systems**. Drug and Alcohol Dependence. 51:173-87, 1998.

Christie, M. J. **Opioid and cannabinoid receptors: friends with benefits or just close friends?**. British Journal of Pharmacology. 148:385-386, 2006.

Craven, R. **Ketamine**. Anaesthesia. 1:48-53, 2007.

Crisp, T.; Perrotti, J. M.; Smith, D. L.; Stafinsky, J. L.; Smith, D. J. **The local monoaminergic dependency of spinal ketamine**. The European Journal of Pharmacology. 194(2-3):167-72, 1991.

Crowley, K. L. **Clinical application of ketamine ointment in the treatment of sympathetically maintained pain**. International Journal of Pharmaceutical Compounding. 2:122-7, 1998.

da Silva, F. C. C.; Dantas, R. T.; Citó, M. do C. de O.; Silva, M. I. G.; de Vasconcelos, S. M. M.; Fonteles, M. M. de F.; Viana, G. S. de B.; de Sousa, F. C. F. **Ketamina, da anestesia ao uso abusivo: artigo de revisão**. Revista Neurociências. 18:227-237, 2010.

Davidson, E. M.; Carlton, S. M. **Intraplantar injection of dextrorphan, ketamine or memantine attenuates formalin-induced behaviors.** Brain Research. 785:136-42, 1998.

de Lago, E.; Ligresti, A.; Ortar, G.; Morera, E.; Cabranes, A.; Pryce, G.; Bifulco, M.; Baker D.; Fernandez-Ruiz, J.; Di Marzo V. **In vivo pharmacological actions of two novel inhibitors of anandamide cellular uptake.** The European Journal of Pharmacology. 484(2-3):249-57, 2004.

de Lago, E.; Petrosino, S.; Valenti, M.; Morera, E.; Ortega-Gutierrez, S.; Fernandez-Ruiz, J.; Di Marzo, V. **Effect of repeated systemic administration of selective inhibitors of endocannabinoid inactivation on rat brain endocannabinoid levels.** Biochemical Pharmacology. 70:446-452, 2005.

De Petrocellis L.; Melck, D.; Bisogno, T.; Milone, A.; Di Marzo, V. **Finding of the endocannabinoid signalling system in Hydra, a very primitive organism: role in the feeding response.** Neuroscience. 92:377-387, 1999.

Devane, W. A.; Hanus, L.; Breuer, A.; Pertwee, R. G.; Stevenson, L. A.; Griffin, G.; Gibson, D.; Mandelbaum, A.; Etinger, A.; Mechoulam, R. **Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor.** Science. 258:1946-9, 1992.

Di Marzo, V.; Fontana, A.; Cadas, H.; Schinelli, S.; Cimino, G.; Schwartz, J. C.; Piomelli, D. **Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons.** Nature. 372(6507):686-91, 1994.

Di Marzo V. **'Endocannabinoids' and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance.** Biochimica et Biophysica Acta. 1392:153-175, 1998.

Di Marzo, V.; Bisogno, T.; De Petrocellis, L. **Anandamide: some like it hot.** Trends in pharmacological sciences. 22:346-9, 2001.

Di Marzo, V.; Bifulco, M.; De Petrocellis, L. **The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation.** Nature Reviews Drug Discovery. 3:771-784, 2004.

Di Marzo, V.; De Petrocellis, L. **Plant, Synthetic, And Endogenous Cannabinoids In Medicine.** The Annual Review of Medicine. 57:553-74, 2006.

Di Marzo, V. **Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce?** Nature Reviews Drug Discovery. 7:438-55, 2008.

Dinh, T. P.; Carpenter, D.; Leslie, F. M.; Freund, T. F.; Katona, I.; Sensi, S. L.; Kathuria, S.; Piomelli, D. **Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation.** Proceedings of the National Academy of Sciences. 99:10819-24, 2002.

Egertová, M.; Simon, G. M.; Cravatt, B. F.; Elphick, M. R. **Localization of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD) expression in mouse brain: A new perspective on N-acylethanolamines as neural signaling molecules.** *Journal of Comparative Neurology.* 506:604-15, 2008.

Ebrahimzadeh, M.; Haghparast, A. **Analgesic effects of cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2 in the nucleus cuneiformis in animal models of acute and inflammatory pain in rats.** *Brain Research.* 1420:19-28, 2011.

Eichenberger, U.; Neff, F.; Svetcic, G.; Björger, S.; Petersen-Felix, S.; Arendt-Nielsen, L.; Curatolo, M. **Chronic phantom limb pain: the effects of calcitonin, ketamine, and their combination on pain and sensory thresholds.** *Anesthesia & Analgesia.* 106(4):1265-73, 2008.

Elia, N.; Tramer, M. R. **Ketamine and postoperative pain - a quantitative systematic review of randomised trials.** *Pain.* 113:61-70, 2005.

Fan, Y.; Hooker, B. A.; Garrison, T.R.; El-Kouhen, O. F.; Idler, K. B.; Holley-Shanks, R. R.; Meyer, M. D.; Yao, B. B. **Pharmacological and molecular characterization of a dorsal root ganglion cell line expressing cannabinoid CB(1) and CB(2) receptors.** *The European Journal of Pharmacology.* 659:161-168, 2011.

Fantoni, D. T.; Cortopassi, S. R. G. **Anestesia em Cães e Gatos.** 2ª ed. São Paulo: Rocca, 2010. 632p.

Fantoni, D. **Tratamento da Dor na Clínica de Pequenos Animais.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 538p.

Fein, A. **Nociceptors and the Perception of Pain.** 2012. 153p.

Finch, P. M.; Knudsen, L.; Drummond, P. D. **Reduction of allodynia in patients with complex regional pain syndrome: A double-blind placebo-controlled trial of topical ketamine.** *Pain.* 146(1-2):18-25, 2009.

Freitas, C. C. Vieira, P. R.; Torres, G. V. B.; Pereira, C. R. A. **Avaliação da dor com o uso das escalas unidimensionais.** *Revista Dor.* 10(1):56-62, 2009.

Fürst, S. **Transmitters involved in antinociception in the spinal cord.** *The Brain Research Bulletin.* 48:129-141, 1999.

Galdino, G.; Romero, T. R.; Silva, J. F.; Aguiar, D. C.; de Paula, A. M.; Cruz, J. S.; Parrella, C.; Piscitelli, F.; Duarte, I. D.; Di Marzo, V.; Perez, A. C. **The endocannabinoid system mediates aerobic exercise-induced antinociception in rats.** *Neuropharmacology.* 77:313-24, 2014.

Gong, J. P.; Onaivi, E. S.; Ishiguro, H.; Liu, Q. R.; Tagliaferro, P. A.; Brusco, A.; Uhl, G. R. **Cannabinoid CB₂ receptors: immunohistochemical localization in rat brain.** *Brain Research.* 1071(1):10-23, 2006.

Guindon, J.; Hohmann, A. G. **The endocannabinoid system and pain.** CNS & Neurological Disorders - Drug Targets. 8:403-21, 2009.

Guy, G. W.; Whittle, B. A.; Robson, P. J. **The Medicinal Uses of Cannabis and Cannabinoids.** London: Pharmaceutical Press, 2004. 448p.

Guyton, A. C.; Hall, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica.** 11. ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2006. 1115p.

Haas, D.A.; Harper, D. G. **Ketamine: A Review of Its Pharmacological Properties and Use in Ambulatory Anesthesia.** Anesthesia Progress. 39(3):61-68, 1992.

Haley, J. E.; Sullivan, A. F.; Dickenson, A. H. **Evidence for spinal N methyl-D-aspartate receptor involvement in prolonged chemical nociception in the rat.** Brain Research. 518:218-26, 1990.

Hardison, S.; Weintraub, S. T.; Giuffrida, A. **Quantification of endocannabinoids in rat biological samples by GC/MS: technical and theoretical considerations.** Prostaglandins and Other Lipid Mediators. 81(3-4):106-12, 2006.

Hasanein, P.; Parviz, M.; Keshavarz, M.; Javanmardi, K. **CB1 receptor activation in the basolateral amygdala produces antinociception in animal models of acute and tonic nociception.** Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 34(5-6):439-49, 2007.

Haws, C. M.; Heinricher, M. M.; Fields, H. L. **Alpha-adrenergic receptor agonists, but not antagonists, alter the tail-flick latency when microinjected into the rostral ventromedial medulla of the lightly anesthetized rat.** Brain Research. 533(2):192-195, 1990.

Herkenham, M.; Lynn, A. B.; Johnson, M. R.; Melvin, L. S.; de Costa B. R.; Rice, K. C. **Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study.** The Journal of Neuroscience. 11:563-83, 1991.

Hesselink, J. M. K.; Kopsky, D. J. **Treatment of chronic regional pain syndrome type 1 with palmitoylethanolamide and topical ketamine cream: modulation of nonneuronal cells.** Journal of Pain Research. 6:239-245, 2013.

Hohmann, A. G.; Martin, W. J.; Tsou, K.; Walker, J. M. **Inhibition of Noxious Stimulus-evoked Activity of Spinal Cord Dorsal Horn Neurons by the Cannabinoid WIN 55,212-2.** Life Sciences. 56:2111-2118, 1995.

Hohmann, A. G.; Herkenham, M. **Localization of central cannabinoid CB1 receptor messenger RNA in neuronal subpopulations of rat dorsal root ganglia: a double-label in situ hybridization study.** Neuroscience. 90(3):923-31, 1999.

Hohmann, A. G.; Herkenham, M. **Cannabinoid receptors undergo axonal flow in sensory nerves.** *Neuroscience*. 92:1171-5, 1999.

Hohmann, A. G. **Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: behavioural, neurophysiological and neuroanatomical perspectives.** *Chemistry and Physics of Lipids*. 121:173-190, 2002.

Holdcroft, A.; Jaggar, S. **Core Topics in Pain.** New York: Cambridge University Press, 2005. 345p.

Houser, S. J.; Eads, M.; Embrey, J. P.; Welch, S. P. **Dynorphin B and spinal analgesia: induction of antinociception by the cannabinoids CP55,940, Delta(9)-THC and anandamide.** *Brain Research*. 857:337-342, 2000.

Howlett, A. C.; Barth, F.; Bonner, T. I.; Cabral, G.; Casellas, P.; Devane, W. A.; Felder, C. C.; Herkenham, M.; Mackie, K.; Martin, B. R.; Mechoulam, R.; Pertwee, R. G. **International Union of Pharmacology. XXII. Classification of Cannabinoid Receptors.** *Pharmacological Reviews*. 54:161-202, 2002.

Howlett, A. C. **Cannabinoid receptor signaling.** *Handbook of Experimental Pharmacology*. 168:53-79, 2005.

Jhaveri, M. D.; Sagar, D. R.; Elmes, S. J.; Kendall, D. A.; Chapman, V. **Cannabinoid CB₂ receptor-mediated anti-nociception in models of acute and chronic pain.** *Molecular Neurobiology*. 36(1):26-35, 2007.

Jin, X. H.; Uyama, T.; Wang, J.; Okamoto, Y.; Tonai, T.; Ueda, N. **cDNA cloning and characterization of human and mouse Ca(2+)-independent phosphatidylethanolamine N-acyltransferases.** *Biochimica et Biophysica Acta*. 1791:32-8, 2009.

Jones, S. L. Anatomy of pain. In: Sinatra, R. S.; Hord, A. H.; Ginsberg, B.; Preble, L. **Acute Pain: Mechanisms & Management.** St. Louis: Mosby-Year Book, 1992.

Julius, D.; Basbaum, A. I. **Molecular mechanisms of nociception.** *Nature*. 413, 2001.

Klimscha, W.; Horváth, G.; Szikszay, M.; Dobos, I.; Benedek, G. **Antinociceptive effect of the S(+)-enantiomer of ketamine on carrageenan hyperalgesia after intrathecal administration in rats.** *Anesthesia e Analgesia*. 86:561-5, 1998.

Kopf, A.; Patel, N. B. **Guide to Pain Management in Low-Resource Settings international association of study of pain.** 2010. 371p.

Kohrs, R.; Durieux, M. E. **Ketamine: teaching an old drug new tricks.** *Anesthesia and Analgesia*. 87:1186-93, 1998.

Lichtman, A. H.; Cook, S. A.; Martin, B. R. **Investigation of brain sites mediating cannabinoid-induced antinociception in rats: evidence**

supporting periaqueductal gray involvement. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 276:585-93, 1996.

Liu, H.; Wang, H.; Sheng, M.; Jan, L. Y.; Jan, Y. N.; Basbaum, A. I. **Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsal horn.** Proceedings of the National Academy of Sciences. 91(18):8383-7, 1994.

Lundy, P. M.; Lockwood, P. A.; Thompson, G.; Frew, R. **Differential effects of ketamine isomers on neuronal and extraneuronal catecholamine uptake mechanisms.** Anesthesiology. 64:359-63, 1986.

Maccarrone, M.; Di Rienzo, M.; Battista, N.; Gasperi, V.; Guerrieri, P.; Rossi, A.; Finazzi-Agrò, A. **The endocannabinoid system in human keratinocytes. Evidence that anandamide inhibits epidermal differentiation through CB1 receptor-dependent inhibition of protein kinase C, activation protein-1, and transglutaminase.** The Journal of Biological Chemistry. 278:33896-903, 2003.

Melzack, R.; Wall, P. D. **Pain mechanisms: a new theory.** Science. 150(3699):971-9, 1965.

Mao, J.; Price, D. D.; Hayes, R. L.; Lu, J.; Mayer, D. J.; Frenk, H. **Intrathecal treatment with dextrophan or ketamine potently reduces pain-related behaviors in a rat model of peripheral mononeuropathy.** Brain Research. 605:164-8, 1993.

Martin, L. L.; Bouchal, R. L.; Smith, D. J. **Ketamine inhibits serotonin uptake in vivo.** Neuropharmacology. 21:113-8, 1982.

Martin, W. J.; Hohmann, A. G.; Walker, J. M. **Suppression of noxious stimulus-evoked activity in the ventral posterolateral nucleus of the thalamus by a cannabinoid agonist: correlation between electrophysiological and antinociceptive effects.** The Journal of Neuroscience. 16:6601-6611, 1996.

Martin, W. J.; Tsou, K.; Walker, J. M. **Cannabinoid receptor-mediated inhibition of the rat tail-flick reflex after microinjection into the rostral ventromedial medulla.** Neuroscience Letters. 242:33-6, 1998.

Marsicano, G.; Wotjak, C. T.; Azad, S. C.; Bisogno, T.; Rammes, G.; Cascio, M. G.; Hermann, H.; Tang, J.; Hofmann, C.; Zieglgänsberger, W.; Di Marzo, V.; Lutz, B. **The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories.** Nature. 418:530-534, 2002.

McMahon, S. B.; Koltzenburg, M. **Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington.** Trends in Neurosciences. 13(6):199-201, 1990.

McRoberts, J. A.; Coutinho, S. V.; Marvizón, J. C.; Grady, E. F.; Tognetto, M.; Sengupta, J. N.; Ennes, H. S.; Chaban, V. V.; Amadesi, S.; Creminon, C.;

Lanthorn, T.; Geppetti, P.; Bunnett, N. W.; Mayer, E. A. **Role of peripheral N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in visceral nociception in rats.** *Gastroenterology*. 120(7):1737-48, 2001.

Mechoulam, R.; Fride, E.; Di Marzo, V. **Endocannabinoids.** *European Journal of Pharmacology*. 359:1-18, 1998.

Mechoulam, R.; Ben-Shabat, S.; Hanus, L.; Ligumsky, M.; Kaminski, N. E.; Schatz, A. R.; Gopher, A.; Almog, S.; Martin, B. R.; Compton, D. R.; Pertwee, R. G.; Griffin, G.; Bayewitch, M.; Barg, J.; Vogel, Z. **Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors.** *Biochemical Pharmacology*. 50:83-90, 1995.

Melzack, R.; Wall, P. D. **Pain mechanisms: a new theory.** *Science*. 150(3699):971-979, 1965.

Mestre, C.; Pelissier, T.; Fialip, J.; Wilcox, G.; Eschalier, A. **A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats.** *J Pharmacol Toxicol Methods*. 32:197-200, 1994.

Meyer, R. A.; Matthias, R.; Campbell, J. N.; et al. **Peripheral mechanisms of cutaneous nociception.** In: Wall, P. D, Melzack, R. editors. *Textbook of pain*. 5th edition. Edinburgh, UK: Elsevier Churchill Livingstone; 2006. p. 3-34.

Millan, M. J. **Serotonin (5-HT) and pain: a reappraisal of its role in the light of receptor multiplicity.** *Seminars In The Neurosciences*. 7(6):409-419, 1995.

Millan, M. J. **The induction of pain: an integrative review.** *Progress in Neurobiology*. 57:1-164, 1999.

Millan, M. J. **Descending control of pain.** *Progress in Neurobiology*. 66:3474-555, 2002.

Morgan, C. J.; Curran, H. V; Independent Scientific Committee on Drugs. **Ketamine use: a review.** *Clinical Psychopharmacology Unit, Clinical Health Psychology*. 107:27-38, 2012.

Niesters, M.; Dahan, A.; Swartjes, M.; Noppers, I.; Fillingim, R. B.; Aarts, L.; Sarton, EY. **Effect of ketamine on endogenous pain modulation in healthy volunteers.** *Pain*. 152:656-63, 2011.

Oatway, M.; Reid, A.; Sawynok, J. **Peripheral antyperalgesic and analgesic actions of ketamine and amitriptyline in a model of mild thermal injury in the rat.** *Anesthesia and Analgesia*. 97:168-73, 2003.

Oduntan, S. A.; Gool, R. Y. **Trial Of Ketamine (Ci-581): A Preliminary Report.** *Canadian Journal of Anesthesia*. 17:411-6, 1970.

Ohno-Shosaku, T.; Hashimotodani, Y.; Ano, M.; Takeda, S.; Tsubokawa, H.; Kano, M. **Endocannabinoid signalling triggered by NMDA receptor-**

mediated calcium entry into rat hippocampal neurons. The Journal of Physiology. 584(2):407-18, 2007.

Okon, T. **Ketamine: an introduction for the pain and palliative medicine physician.** Pain Physician. 10(3):493-500, 2007.

Onaivi, E. S.; Ishiguro, H.; Gu, S.; Liu, Q. R. **CNS effects of CB₂ cannabinoid receptors: beyond neuro-immuno-cannabinoid activity.** Journal of Psychopharmacology. 26:92-103, 2012.

Pacheco, D. da F.; Klein, A.; Perez, A. de C.; Pacheco, C. M. da F.; de Francischi, J. N.; I. D. G. Duarte. **The μ -opioid receptor agonist morphine, but not agonists at δ - or κ -opioid receptors, induces peripheral antinociception mediated by cannabinoid receptors.** British Journal of Pharmacology. 154:1143-1149, 2008.

Pacheco, D. da F.; Klein, A.; Perez, A. C.; Pacheco, C. M. da F.; de Francischi, J. N.; Reis, G. M. L.; Duarte, I. D. G. **Central antinociception induced by μ -opioid receptor agonist morphine, but not δ - or κ -, is mediated by cannabinoid CB₁ receptor.** British Journal of Pharmacology. 158:225-231, 2009.

Pacher, P.; Batkai, S.; Kunos, G. **The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy.** Pharmacological Reviews. 58:389-462, 2006.

Pai, A.; Heining, M. **Ketamine.** Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain. 7 (2):59-63, 2007.

Palazzo, E.; Luongo L.; de Novellis, V.; Rossi, F.; Maione, S. **The Role of Cannabinoid Receptors in the Descending Modulation of Pain. Pharmaceuticals.** 3(8):2661-2673, 2010.

Paxinos, G.; Watson, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates.** Vol.1, Academic Press, New York. 1986.

Pertwee, R. G.; Ross, R. A. **Cannabinoid receptors and their ligands.** Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids. 66:101-121, 2002.

Qian, J.; Brown, S. D.; Carlton, S. M. **Systemic ketamine attenuates nociceptive behaviors in a rat model of peripheral neuropathy.** Brain Research. 715:51-62, 1996.

Raja, S. N.; Meyer, R. A.; Ringkamp, M.; Campbell, J.N. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: Melzack, R., Wall, D., (Eds.) **Textbook of pain.** 4.ed. London: Churchill Livingstone. 1999.

Randall, L. O. & Selitto, J. J. **A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissues.** Archives Internationales de Pharmacodynamie. 111:409-419, 1957.

Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J. **Farmacologia.** Ed. 6^a. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 829p.

Rasmussen, M. L.; Mathiesen, O.; Dierking, G.; Christensen, B. V.; Hilsted, K. L.; Larsen, T. K.; Dahl, J. B. **Multimodal analgesia with gabapentin, ketamine and dexamethasone in combination with paracetamol and ketorolac after hip arthroplasty: a preliminary study.** European Journal of Anaesthesiology. 27(4):324-30, 2010.

Reich, D. L.; Silvey, G. **Ketamine: an update on the first twenty-five years of clinical experience.** Canadian Journal of Anaesthesia. 36:186-97, 1989.

Reis, G. M.; Pacheco, D.; Perez, A. C.; Klein, A.; Ramos, M. A.; Duarte, I. D. **Opioid receptor and NO/cGMP pathway as a mechanism of peripheral antinociceptive action of the cannabinoid receptor agonist anandamide.** Life Sciences. 85(9-10):351-6, 2009.

Reis, G. M.; Ramos, M. A.; Pacheco, D. da F.; Klein, A.; Perez, A. C.; Duarte, I. D. **Endogenous cannabinoid receptor agonist anandamide induces peripheral antinociception by activation of ATP-sensitive K⁺ channels.** Life Sciences. 88(15-16):653-7, 2011.

Ren, K.; Williams, G. M.; Hylden, J. L. K.; Ruda, M. A.; Dubner, R. **The intrathecal administration of excitatory amino acid receptor antagonists selectively attenuated carrageenan-induced behavioral hyperalgesia in rats.** The European Journal of Pharmacology. 219:235-43, 1992.

Richens, A. **The basis of the treatment of epilepsy: neuropharmacology.** In: Dam M, ed. A practical approach to epilepsy. Oxford: Pergamon Press. 75-85, 1991.

Rios, C.; Gomes, I.; Devi, L. A. **μ -opioid and CB₁ cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis.** British Journal of Pharmacology. 148:387-395, 2006.

Rocha, A. P. C.; Kraychete, D. C.; Lemonica, L.; de Carvalho, L. R.; de Barros, G. A. M.; Garcia, J. B. dos S.; Sakata, R. K. **Dor: Aspectos atuais da sensibilização periférica e central.** Revista Brasileira de Anestesiologia. 57(1):94-105, 2007.

Romero, T. R.; Duarte, I. D. **Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by the alpha(2)-adrenoceptor agonist xylazine.** Journal of Pharmacological Sciences. 111(4):323-7, 2009.

Romero, T. R.; Galdino, G. S.; Silva, G. C.; Resende, L. C.; Perez, A. C.; Cortes, S. F.; Duarte, I. D. **Involvement of the L-arginine/nitric oxide/cyclic**

guanosine monophosphate pathway in peripheral antinociception induced by N-palmitoyl-ethanolamine in rats. *Journal of Neuroscience Research.* 90(7):1474-9, 2012.

Romero, T. R. L.; Pacheco, D. Da F.; Duarte, I. D. G. **Probable involvement of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels (CaCCs) in the activation of CB1 cannabinoid receptors.** *Life Sciences.* 45:240-246, 2012.

Romero, T. R. L.; Duarte, I. D. G. **Involvement of ATP-sensitive K⁺ channels in the peripheral antinociceptive effect induced by ketamine.** *Veterinary Anaesthesia and Analgesia.* 40:419-424, 2013.

Romero, T. R.; Resende, L. C.; Guzzo, L. S.; Duarte, I. D. **CB1 and CB2 cannabinoid receptor agonists induce peripheral antinociception by activation of the endogenous noradrenergic system.** *Anesthesia & Analgesia.* 116(2):463-72, 2013.

Russo, C. M.; Brose, W. G. **Chronic pain.** *Annual Review of Medicine,* 49:123-133, 1998.

Rzeski, W.; Ikonomidou, C.; Turski, L. **Glutamate antagonists limit tumor growth.** *Biochemical Pharmacology.* 64:1195-200, 2002.

Saito, V. M.; Wotjak, C. T.; Moreira, F. A. **Exploração farmacológica do sistema endocanabinoide: novas perspectivas para o tratamento de transtornos de ansiedade e depressão?.** *Revista Brasileira de Psiquiatria.* 32:7-14, 2010.

Salio, C.; Fischer, J.; Franzoni, M. F.; Mackie, K.; Kaneko, T.; Conrath, M. **CB₁-cannabinoid and μ-opioid receptor colocalization on postsynaptic target in the rat dorsal horn.** *NeuroReport.* 12:3689-92, 2001.

Sandkühler, J. **The organization and function of endogenous antinociceptive systems.** *Progress in Neurobiology.* 50:49-81, 1996.

Sarton, E.; Teppema, L. J.; Olievier, C.; Nieuwenhuijs, D.; Matthes H. W.; Kieffer, B. L.; Dahan, A. **The involvement of the mu-opioid receptor in ketamine-induced respiratory depression and antinociception.** *Anesthesia & Analgesia.* 93(6):1495-500, 2001.

Sato, K.; Kiyama, H.; Park, H. T.; Tohyama, M. **AMPA, KA and NMDA receptors are expressed in the rat DRG neurones.** *NeuroReport.* 4(11):1263-5, 1993.

Schmid, R. L.; Sandler, A. N.; Katz, J. **Use and efficacy of low-dose ketamine in the management of acute postoperative pain: a review of current techniques and outcomes.** *Pain.* 82(2):111-25, 1999.

Schmidt, R.; Schmelz, M.; forster, C.; Ringkamp, M.; Torebjörk, E.; Handwerker, H. **Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin.** Journal of Neuroscience. 15:333-341, 1995.

Seierstad, M.; Breitenbucher, J. G. **Discovery and development of fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors.** Journal of Medicinal Chemistry. 51:7327-43, 2008.

Shanthanna, H.; Huilgol, M.; Manivackam, V. K. **Early and effective use of ketamine for treatment of phantom limb pain.** Indian Journal of Anaesthesia. 54(2):157-159, 2010.

Sherrington, C.S. **Qualitative differences of spinal reflex corresponding with qualitative difference of cutaneous stimulus.** The Journal of Physiology. 30:39-46, 1903.

Sinner, B.; Graf, B. M. **Ketamine.** The Handbook of Experimental Pharmacology. 182:313-33, 2008.

Sluka, K. A. **Mechanisms and Management of Pain for the Physical Therapist.** Seattle: International Association of Study of Pain, 2009. 394p.

Smith, D. J.; Perrotti, J. M.; Mansell, A. L.; Monroe, P. J. **Ketamine analgesia is not related to an opiate action in the periaqueductal gray region of the rat brain.** Pain. 21(3):253-65, 1985.

Smith, P. B.; Martin, B. R. **Spinal mechanisms of $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol-induced analgesia.** Brain Research. 578:8-12, 1992.

Soares, A. C.; Leite, R.; Tatsuo, M. A. K. F.; Duarte, I. D. G. **Activation of ATP-sensitive K^+ channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside.** The European Journal of Pharmacology. 400, 67-71, 2000.

Soares, A. C.; Duarte, I. D. G. **Dibutyryl-cyclic GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K^+ channels in the rat PGE_2 -induced hyperalgesic paw.** British Journal of Pharmacology. 134(1),127-131, 2001.

Spinosa, H. S.; Gorniak, S. L.; Bernardi, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária.** 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 848p.

Stella, N.; Schweitzer, P.; Piomelli, D. **A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation.** Nature. 388:773-778, 1997.

Stella, N.; Piomelli, D. **Receptor-dependent formation of endogenous cannabinoids in cortical neurons.** The European Journal of Pharmacology 425(3):189-96, 2001.

Stepulak, A.; Luksch, H.; Gebhardt, C.; Uckermann, O.; Marzahn, J.; Sifringer, M.; Rzeski, W.; Staufner, C.; Brocke, K. S.; Turski, L.; Ikonomidou, C. **Expression of glutamate receptor subunits in human cancers.** *Histochemistry and Cell Biology*. 132(4):435-45, 2009.

Suigiura, T.; Waku, K. **2-Arachidonoylglycerol and cannabinoid receptors.** *Chemistry and Physics of Lipids*. 108:89-106, 2000.

Suplita, R. L.; Gutierrez, T.; Fegley, D.; Piomelli, D.; Hohmann, A. G. **Endocannabinoids at the spinal level regulate, but do not mediate, nonopioid stress-induced analgesia.** *Neuropharmacology*. 50(3):372-9, 2006.

Tsou, K.; Brown, S.; Sanudo-Pena, M. C.; Mackie, K.; Walker, J. M. **Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB₁ receptors in the rat central nervous system.** *Neuroscience* 83:393-411, 1998.

Tweed, W. A.; Minuck, M.; Mymin, D. **Circulatory responses to ketamine anesthesia.** *Anesthesiology*. 37:613-9, 1972.

Van Sickle, M. D.; Duncan, M.; Kingsley, P. J.; Mouihate, A.; Urbani, P.; Mackie, K.; Stella, N.; Makriyannis, A.; Piomelli, D.; Davison, J. S.; Marnett, L. J.; Di Marzo, V.; Pittman, Q. J.; Patel, K. D.; Sharkey, K. A. **Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB₂ receptors.** *Science*. 310:329-332, 2005.

Vanderah, T. W.; **Pathophysiology of Pain.** *Medical Clinics of North America*. 91:1-12, 2007.

Vanegas, H.; Schaible, H. G. **Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory?.** *Brain Research*. 46:295-309, 2004.

Vinegar, R.; Truax, J. F.; Selph, J. L.; Johnston, P. R.; Veneable, A. L.; McKenzie, K. K. **Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat.** *Federation proceedings*. 46:118-126, 1987.

Visser, E.; Sching, S. A. **The role of ketamine in pain management.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 60:341-8, 2006.

Walker, J. M.; Huang, S. M.; Strangman, N. M.; Tsou, K.; Sañudo-Peña, M. C. **Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96:12198-12203, 1999.

Walker, J. M.; Hohmann, A. G. **Cannabinoid mechanisms of pain suppression.** *Handbook of Experimental Pharmacology*. 168:509-54, 2005.

Welters, I. D.; Hafer, G.; Menzebach, A.; Mühlhng, J.; Neuhäuser, C.; Browning, P.; Goumon, Y. **Ketamine inhibits transcription factors activator protein 1 and nuclear factor-kB, interleukin-8 production, as well as CD11b and CD16 expression: studies in human leukocytes and leukocytic cell lines.** *Anesthesia and Analgesia*. 110(3):934-41, 2010.

White, P. F.; Way, W. L.; Trevor, A. J. **Ketamine - its pharmacology and therapeutic uses.** Anesthesiology. 56:119-36, 1982.

Wilson, G. S. **Ketamine: old dogs, new tricks.** Southern African Journal Of Anaesthesia And Analgesia. 19(1):24-26, 2013.

Wilson, R. D.; Nichols, R. J.; McCoy, N. R. **Dissociative anesthesia with CI-581 in burned children.** Anesthesia and Analgesia. 46(6):719-24, 1967.

Wood, R. **Ketamine for pain in hospice patients.** International Journal of Pharmaceutical Compounding. 4:258-9, 2000.

Woolf, C. J.; Ma, Q. **Nociceptors – Noxious Stimulus Detectors.** Neuroscience journal. 55(3):353-64, 2007.

Yamakage. M.; Hirshman, C. A.; Croxton, T. L. **Inhibitory effects of thiopental, ketamine, and propofol on voltage-dependent Ca²⁺ channels in porcine tracheal smooth muscle cells.** Anesthesiology. 83:1274-82, 1995.

Yamamoto, T.; Yaksh, T. L. **Spinal pharmacology of thermal hyperesthesia induced by constriction injury of sciatic nerve: Excitatory amino acids antagonists.** Pain. 49:121-8, 1992.

Zimmermann, M. **Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals.** Pain. Amsterdam, v.16. n.2. p. 109-110. Jun 1983.