



UNIVERSIDADE DO SUL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
ALEXANDRE CARLOS BUFFON

**EFEITO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NA AÇÃO ANTI-HIPERALGÉSICA
DA GABAPENTINA EM MODELO ANIMAL DE DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA
POR LIGADURA PARCIAL DO NERVO ISQUIÁTICO**

Palhoça
2017

ALEXANDRE CARLOS BUFFON

**EFEITO DO SISTEMA ENDOCANABINOIDE NA AÇÃO ANTI-HIPERALGÉSICA
DA GABAPENTINA EM MODELO ANIMAL DE DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA
POR LIGADURA PARCIAL DO NERVO ISQUIÁTICO**

LINHA DE PESQUISA: NEUROCIÊNCIAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde para obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Anna Paula Piovezan, Dra.

Palhoça
2017

B94 Buffon, Alexandre Carlos, 1961-
Efeito do sistema endocanabinoide na ação anti-hiperalgésica da gabapentina em modelo animal de dor neuropática induzida por ligadura parcial do nervo isquiático / Alexandre Carlos Buffon. – 2017.
53 f. : il. color. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Sul de Santa Catarina, Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Orientação: Prof. Dr^a. Anna Paula Piovezan

1. Sistema nervoso - Doenças - Tratamento. 2. Canabinóides. 3. Dor - Tratamento. I. Piovezan, Anna Paula. II. Universidade do Sul de Santa Catarina. III. Título.

CDD (21. ed.) 611.8

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária da Unisul



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - MESTRADO

Título da Dissertação

Efeito do sistema endocanabinoide na ação anti-hiperalgésica da gabapentina em modelo animal de dor neuropática induzida por ligadura parcial do nervo isquiático

ALEXANDRE CARLOS BUFFON
AUTOR

Aprovada pela Banca Avaliadora de Defesa da Dissertação em 05 de dezembro de 2017.

Doutora Anna Paula Piovezan (orientador)

Doutor Ari Ojeda Ocampo More (avaliador externo-UFSC)

Doutora Franciane Bobinski (avaliador interno)

Professor Doutor Jefferson Traibert

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - UNISUL

Dedicatória

Dedico estas linhas, à minhas filhas, meus amores, minha inspiração e motivo para sempre melhorar, crescer espiritual e intelectualmente e ver que sempre podemos mais.

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas merecem meus mais sinceros agradecimentos, neste processo de produção desta redação, bem como no curso do mestrado que hora está chegando ao seu fim. Todos os professores, em maior ou menor participação, foram de fundamental importância para a conclusão desta etapa.

Posso, sem dúvida, afirmar da relevância desta passagem em minha vida, mudando conceitos, maneiras, olhares, metodologias não só na minha vida acadêmica, esta sim, com alterações expressivas, mas na vida comum.

Minha orientadora, Professora Anna Paula Piovezan, incansável, paciente em um momento muito difícil, de uma lucidez e conhecimento que me deixam ao mesmo tempo profundamente impressionado, e absolutamente desejoso de aprender mais, de seguir pesquisando e colaborando com o desenvolvimento científico de nossa instituição.

Me emociona a dedicação de todos, o desprendimento, o desejo de crescimento científico, de cooperar de seguir adiante.

RESUMO

Introdução: A dor neuropática é uma condição importante, cujo tratamento inclui a gabapentina (GABAP). O mecanismo de ação analgésica da GABAP não está totalmente elucidado.

Objetivo: O presente estudo investigou a contribuição de receptores canabinóides periféricos (plantar) e centrais (espinal), sobre o efeito da GABAP no modelo de lesão parcial no nervo isquiático (LPNI).

Métodos: Utilizou-se camundongos Swiss, machos, com 25-35g, alojados em condições controladas, com livre acesso a comida e água e aclimatados ao laboratório antes dos testes. A LPNI foi induzida nos camundongos anestesiados, seguindo-se incisão do membro traseiro direito para exposição do nervo, seguida por sua ligadura (1/3-1/2 da porção medial) com fio de seda 8-0. No grupo controle, o nervo foi exposto e não ligado. A contribuição dos receptores CB1 e CB2 sobre o efeito da GABAP foi avaliada no dia 14º. após LPNI. Os camundongos receberam AM281 ou AM630 por via i.t. (2 µg/5 µL) ou i.pl. (10 µg/20 µL) e 15 min depois GABAP (30 mg/kg, oral), sendo avaliados 1 h após quanto à hiperalgesia mecânica. Dados avaliados por ANOVA de 1 ou 2 vias (Tukey ou Bonferroni, respectivamente, $p < 0,05$). Projeto aprovado pela CEUA-UNISUL (16.027.5.01.IV).

Resultados: O tratamento periférico com AM281 ou AM630, reverteu parcialmente (AM281: $47,5 \pm 10,6\%$ de resposta; AM630: $40,0 \pm 5,3\%$ de resposta) o efeito anti-hiperalgésico da GABAP ($75,0 \pm 11,8\%$ e $67,5 \pm 5,3\%$ de resposta, respectivamente) no 14º. dia após a LPNI. Com o tratamento espinal, apenas o AM281 foi capaz de promover este efeito (GABAP: $47,5 \pm 10,6\%$ e AM281: $82,5 \pm 5,9\%$ de resposta).

Conclusão: Os receptores CB1, em nível espinal e periférico, bem como de receptores CB2 em nível periférico contribuem para o efeito anti-hiperalgésico da GABAP neste modelo, podendo o sistema endocanabinóide (EC) ser estudado como alvo de novos tratamentos para a dor neuropática.

Descritores: Gabapentina. Canabinóides. Neuropatia.

ABSTRACT

Introduction: Neuropathic pain is an important condition whose treatment includes gabapentin (GABAP). The mechanism of analgesic action of GABAP is not fully elucidated.

Objective: The present study investigated the contribution of peripheral (plantar) and central (spinal) cannabinoid receptors on the effect of GABAP on the partial sciatic nerve injury (PSNI) model.

Methods: Swiss male mice weighing 25-35 g were housed under controlled conditions with free access to food and water and acclimated to the laboratory before testing. PSNI was induced in the anesthetized mice, followed by incision of the right hind limb for nerve exposure, followed by its ligation (1 / 3-1 / 2 of the medial portion) with 8-0 silk thread. In the control group, the nerve was exposed and not connected. The contribution of CB1 and CB2 receptors on the effect of GABAP was evaluated on day 14th after PSNI. Mice received AM281 or AM630 by i.t. (2 µg / 5 µl) or i.pl. (10 µg / 20 µL) and 15 min after GABAP (30 mg / kg, oral), being evaluated 1 hour after in relation to mechanical hyperalgesia. Data were evaluated by 1 or 2-way ANOVA (Tukey or Bonferroni, respectively, $p < 0.05$). Project approved by CEUA-UNISUL (16.027.5.01.IV).

Results: The peripheral treatment with AM281 or AM630 partially reversed (AM281: $47.5 \pm 10.6\%$ response; AM630: $40.0 \pm 5.3\%$ response) the anti-hyperalgesic effect of GABAP ($75.0 \pm 11.8\%$ and $67.5 \pm 5.3\%$ response, respectively) on the 14th day after the PSNI. With spinal treatment, only AM281 was able to promote this effect (GABAP: $47.5 \pm 10.6\%$ and AM281: $82.5 \pm 5.9\%$ response).

Conclusion: CB1 receptors, at the spinal and peripheral level, as well as CB2 receptors in peripheral level contribute to the anti-hyperalgesic effect of GABAP in this model, and the (*endocannabinoid) EC system can be studied as a target for new treatments for neuropathic pain.

Keywords: Gabapentin. Cannabinoids. Neuropathy.

LISTAS

Lista de abreviaturas e siglas

AA – ácido araquidônico

AMPc – adenosina monofostato cíclica

AMPA – ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico

ANA - anandamida

BK - bradicinina

COX - ciclooxigenase

EC - endocanabinóide

GLU - glutamato

GABA – ácido gama-aminobutírico

GABAP - gabapentina

GMPc – Guanosina monofostato cíclica

HIV – vírus da imunodeficiência humana

IASP – Associação Internacional para o estudo da dor

Ip – intra-peritoneal

It – intra-tecal

LOX – lipooxigenase

LPNI – ligadura parcial do nervo isquiático

NE –noradrenalina

NMDA – N-metil-D-aspartato

NR – núcleo da rafe

PGs – prostaglandinas

PKC – proteína quinase-C

PMN - polimorfonucleares

PSNL – ligadura parcial do nervo isquiático

SIDA – síndrome da imunodeficiência adquirida

SCP – substância cinzenta periaquedutal

SNC – sistema nervoso central

SNP – sistema nervoso periférico

SP- substância P

TRP – receptor de potencial transiente

VDCD – via descendente de controle da dor

5HT – 5 hidroxitriptamina – serotonina

2AG – 2 araquidonil glicerol

Lista de quadros

Quadro 1 – Variáveis de estudo	36
--------------------------------------	----

Lista de figuras

Figura 1 – Representação da via ascendente nociceptiva	18
Figura 2 – Representação de diferentes classes de substâncias capazes de ativar ou sensibilizar os neurônios aferentes primários	22
Figura 3 – Distribuição de receptores canabinoides no SNC	28
Figura 4 – Delineamento do primeiro protocolo do estudo	33
Figura 5 – Esquema ilustrativo dos grupos de tratamento no estudo	34
Figura 6 – Influência do antagonista CB1, por via i.pl. sobre o efeito anti-hiperalgésico da GABAP no 7º. (painel A) e no 14º. (painel B) dia após a indução da lesão nervosa, no modelo de LPNI em camundongos	38
Figura 7 – Influência do antagonista CB2, por via i.pl. sobre o efeito anti-hiperalgésico da GABAP no 7º. (painel A) e no 14º. (painel B) dia após a indução da lesão nervosa, no modelo de LPNI em camundongos	39
Figura 8 – Influência do antagonista CB1, por via i.t. sobre o efeito anti-hiperalgésico da GABAP no 7º. (painel A) e no 14º. (painel B) dia após a indução da lesão nervosa, no modelo de LPNI em camundongos	40
Figura 9 – Influência do antagonista CB2, por via i.t. sobre o efeito anti-hiperalgésico da GABAP no 7º. (painel A) e no 14º. (painel B) dia após a indução da lesão nervosa, no modelo de LPNI em camundongos	41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO	14
1.1.1 Características da dor	14
1.1.2 Aspectos neurobiológicos da dor: via ascendente da dor	15
1.1.3 Via descendente de controle da dor	18
1.1.4 Dor neuropática	20
1.1.5 Tratamento farmacológico da dor neuropática	23
1.1.6 O sistema EC e a modulação da dor	26
1.1.7 Modelos animais de dor neuropática	27
2. OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3. MÉTODOS	31
3.1 TIPO DE ESTUDO	31
3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	31
3.3 ANIMAIS	31
3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO	32
3.4.1 Indução da dor neuropática	32
3.4.2 Influência da GABAP sobre a hiperalgesia observada no modelo de ligadura parcial do nervo isquiático (LPNI)	32
3.4.3 Influência do tratamento por via i.t. ou i.pl. com antagonistas de receptores CB2 sobre o efeito antineuropático da GABAP	33
3.4.4 Grupos de tratamento	34
3.5 ENSAIOS/TESTES E TÉCNICAS	34
3.5.1 Procedimentos	35
3.5.2 Administrações por via i.t.	35
3.5.3 Resposta à retirada da pata traseira induzida por filamento de Von Frey.	35
3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO	36
3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS	36
3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	36
4. RESULTADOS	37

4.1 CONTRIBUIÇÃO DE RECEPTORES CB1 PERIFÉRICOS PARA O EFEITO ANTI-HIPERALGESICO DA GABAP	37
4.2 CONTRIBUIÇÃO DE RECEPTORES CB2 PERIFÉRICOS PARA O EFEITO ANTI-HIPERALGESICO DA GABAP	37
4.3 CONTRIBUIÇÃO DE RECEPTORES CB1 ESPINAIS PARA O EFEITO ANTI-HIPERALGESICO DA GABAP	38
4.4 CONTRIBUIÇÃO DE RECEPTORES CB2 ESPINAIS PARA O EFEITO ANTI-HIPERALGESICO DA GABAP	39
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÃO	47
6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS	47
REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

Até o meio do século XX, a dor era considerada meramente uma reação inevitável à agressão tecidual. Os componentes afetivos e psicológicos, os fenômenos de ansiedade e reações depressivas frente a dor não tinham qualquer valor; no entanto, o tratamento da dor e de todas as situações que vem a ela atrelados ganharam grande força e muitos esclarecimentos nas últimas décadas¹.

A definição de dor proposta pela IASP (do inglês, *International Association for the Study of Pain*) descreve a dor como uma experiência emocional, com sensação desagradável, associada a lesão tecidual presente, potencial ou descrita como tal². Ainda, a dor em um sentido mais amplo é uma experiência sensorial com quatro dimensões, sensorial-discriminativa, afetivo-emocional, cognitiva e comportamental, onde um estímulo nociceptivo periférico desencadeia uma cascata de eventos fisiológicos que levam a integração da informação encadeada com várias facetas da dor. Alterações nestes eventos podem prolongar o processo de indução da dor, levando ao desenvolvimento da dor crônica, e a dor perde seu significado como um sinal de aviso e passa a ser uma síndrome crônica frequentemente incapacitante³.

Documentos centrados em estudos de dor e comportamento mostraram que a plasticidade ou aprendizado desempenham papel fundamental no processo doloroso. Em casos de dor neuropática por exemplo, ocorre o fenômeno de exacerbação da percepção dolorosa a estímulos nocivos, como consequência de uma perturbação no sistema nociceptivo, com sensibilização periférica, central ou ambas⁴.

A dor neuropática apresenta uma condição epidemiológica importante, sendo que sua incidência pode chegar a 8 casos por 1000 pessoas/ano, sobremaneira nos pacientes portadores de diabetes, do vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *human immunodeficiency virus*) e câncer^{5,6}. Ainda, atualmente registra-se um grande número de casos de dor pós-operatória persistente (cerca de 40%), dos quais 25% têm característica neuropática^{7,8}. A dor com esta característica costuma ser mais grave e está associada a piora das condições de saúde, em todas as dimensões medidas, quando comparada com outros tipos de dor^{5,9}. A qualidade de vida destes pacientes apresenta escores muito baixos, dependente mais da gravidade da dor que de sua causa subjacente⁸. Além disso, os custos de manutenção desta patologia, podem chegar a um custo médio anual de aproximadamente dois mil euros com

medicação como gabapentina (GABAP) ou pregabalina, além de internações hospitalares, consultas, fisioterapia e/ou reabilitação e afastamento do trabalho^{10,11}.

Dentre os fármacos utilizados no tratamento da dor neuropática encontra-se a GABAP que promove ação anti-hiperalgésica por meio de um mecanismo que envolve principalmente sua ação sobre a subunidade $\alpha 2\delta$ dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, diminuindo a sensibilização central¹² por reduzirem a liberação de neurotransmissores excitatórios tais como o glutamato (GLU) e a substância P (SP)⁷. Outros mecanismos registrados para sua ação em quadros de dor dizem respeito a sua atuação em receptores 9– N-metil-D-aspartato (NMDA), em canais do tipo receptor de potencial transiente (TRP, do inglês *transient receptor potential channels*), proteína quinase-C (PKC), citocinas inflamatórias e outras¹³. No entanto este efeito ainda precisa ser melhor elucidado, sobremaneira a contribuição do sistema canabinóide para a atividade anti-hiperalgésica da GABAP.

Com relação a este sistema endógeno que promove analgesia em diferentes situações clínicas e experimentais¹⁴, sabe-se que extratos de *Cannabis sativa* cujos princípios ativos interagem com os receptores para canabinoides endógenos no organismo humano, foram usados por séculos como analgésicos, mas a falta de conhecimento, associada a reservas morais pelo seu abuso como psicotrópico, a levaram a ter seu uso proibido. Entretanto, a identificação do tetraidrocannabinol como componente psicoativo principal da planta, o crescimento da área de estudo em neurociências, com novas abordagens metodológicas e tecnologia disponível nas últimas décadas que permitiram, por exemplo, a identificação dos receptores canabinoides expressos em grande quantidade no tecido nervoso, que levaram a um aumento do interesse das pesquisas nesta área como forma de ampliar os conhecimentos sobre os mecanismos de ação de fármacos já empregados na clínica ou, ainda, sobre novos alvos terapêuticos para o controle da dor.

Diante do exposto, levando-se em consideração a elevada prevalência e incidência da dor neuropática em pacientes ao redor do mundo, seu impacto na qualidade de vida dos portadores e a falta de recursos terapêuticos efetivos para o tratamento desta desordem, a pergunta de pesquisa do presente estudo é: “O sistema endocanabinoide (EC) contribui para o efeito anti-hiperalgésico da GABAP no modelo de ligadura parcial do nervo ciático em camundongos? ”

Estudo recente de nosso grupo de pesquisa demonstrou a contribuição do sistema adenosinérgico para o efeito anti-hiperalgésico da GABAP neste modelo, por

outro lado, estudos avaliando a contribuição do sistema EC neste efeito não foram encontrados na literatura. A grande densidade de receptores canabinoides junto a via descendente serotoninérgica e adrenérgica de controle da dor¹⁵ também reforçam sua possível importância nesta ação antinociceptiva. Os EC também têm mostrado propriedades analgésicas em outros modelos pré-clínicos de nocicepção aguda e estados de dor crônica^{14,16} e, neste sentido, estudos que objetivem ampliar o conhecimento sobre a eficácia dos mesmos em diferentes modelos animais, bem como sobre a participação deste sistema para o mecanismo de ação de outros fármacos analgésicos são importantes para fazer progredir esta área de conhecimento, desenvolvendo melhores estratégias terapêuticas.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 Características da dor

A existência de muitos tipos de dor pode ser compreendida pela identificação da nocicepção, da percepção dolorosa, do sofrimento e do comportamento doloroso. Subjacente a essas situações clínicas, pode-se identificar substrato anatômico, fisiológico e psicológico^{17,18}, organizado na forma das vias neurais de percepção e de controle da dor. Segundo Woolf¹⁹ a partir desta perspectiva neurobiológica, a dor implica em três diferentes situações, sendo que em um primeiro momento a dor serve como um aviso imediato de um sistema de proteção fisiológico contra as agressões. A segunda situação ocorre quando um tipo de dor adaptativa e protetor, em um determinado tecido que está lesado, desestimula a movimentação e o contato, favorecendo um processo de recuperação da lesão. Finalmente, uma terceira situação pode ocorrer, em que a dor não atua mais dentro de um sistema protetor, mas, antes disto, é o resultado de uma má adaptação, ou mal funcionamento do sistema nervoso, sendo esta uma dor patológica que pode se constituir numa doença por si só^{3,20}.

Neste contexto de ativação das vias neurais responsáveis pela percepção da dor, a nocicepção nada mais é do que a detecção de estímulos potencialmente lesivos por transdutores especializados ligados a neurônios dos nervos periféricos²¹, conforme discutido a seguir, enquanto a dor envolve outros aspectos emocionais e psíquicos, como o sofrimento. Este último é uma manifestação negativa induzida por vários fatores, entre os quais estão a dor, o medo, o estresse e as perdas, que aparece

quando a integridade física ou psicológica do indivíduo é ameaçada. Nem todo sofrimento é causado por dor, mas frequentemente ele é descrito nestes termos¹. Então a dor pode ser considerada um fenômeno biopsicossocial que nasce da interação de múltiplos sistemas neuroanatômicos e neuroquímicos que influenciam ou também pode ser influenciada por processos cognitivos e afetivos^{17,18}.

Uma vez que os mecanismos implicados na geração da dor são distintos e complexos, os tratamentos também são diversos e elucidar novos alvos terapêuticos para esta condição torna-se essencial. Isto é particularmente importante no caso da dor neuropática, já que esta é uma condição na qual a dor perde seu caráter de papel protetor uma vez que o estímulo agressor já não está presente e, por esta razão, torna-se uma condição clínica por si só. Nestes quadros, é comum que a dor espontânea ou a hipersensibilidade promova uma enorme gama de sintomas que podem variar de indivíduo para indivíduo e afetar a qualidade de vida dos mesmos²¹. Deve-se levar em conta ainda, trabalhos que sugerem que a frequência de ocorrência destes sintomas esteja aumentando na população, em consequência de novos hábitos de vida, da longevidade e das possíveis afecções a que os seres vivos estão submetidos²², podendo inclusive chegar a causar alterações no encéfalo, como demonstrado por estudos utilizando neuroimagem²³.

1.1.2 Aspectos neurobiológicos da dor: via ascende da dor

Os estímulos dolorosos são inicialmente detectados por estruturas do tipo de terminações nervosas livres, encontradas nos tecidos superficiais, profundos e vísceras, que capazes de detectar os estímulos de alta intensidade que, após transdução do sinal promoverão a condução do estímulo pelo neurônio aferente sensorial e a transmissão da informação nociceptiva até as estruturas supraespinais responsáveis pela percepção da dor²⁴. A principal característica eletrofisiológica das terminações nervosas livres e dos neurônios aos quais estão associados, ambos podem ser denominados de nociceptores, é o alto limiar de excitabilidade, ou seja, quando um estímulo mecânico, térmico ou químico intenso, potencialmente lesivo é aplicado ao organismo, estas estruturas são ativadas e um potencial de ação é encaminhada ao Sistema Nervoso Central (SNC)²⁴.

Desta forma, três classes de neurônios nociceptores são identificados, sendo estes os mecanonociceptores, que são sensíveis a estímulos mecânicos, os

termonociceptores, sensíveis aos estímulos térmicos, e os nociceptores polimodais, que respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos²⁵. Estes podem ser sensibilizados por substâncias ditas algogênicas, provenientes das próprias células lesadas, sintetizadas por enzimas provindas daquelas células ou secundariamente oriundas do extravasamento plasmático ou da migração linfocitária ou ainda da própria atividade do nociceptor; entre estas substâncias estão os íons potássio (K^+) e hidrogênio (H^+), a histamina, a SP, a serotonina (5-HT), a bradicinina (BK), as catecolaminas, as prostaglandinas (PGs) e os leucotrienos (LTs), sendo estes dois últimos derivados do ácido araquidônico (AA)²⁶. Deste modo, o nociceptor aferente primário não apenas sinaliza a presença ou a possibilidade de dano tissular como também participa, diretamente, no mecanismo local de defesa e de restauração tecidual²⁷.

A detecção destes estímulos de alta intensidade pelos nociceptores finalizará na percepção da dor no córtex somatossensorial, seguindo uma sequência de eventos que ativam a via ascendente nociceptiva que é ilustrada na Figura 1. Após a detecção o estímulo foi conduzido pelos nociceptores na forma de potencial de ação. Com relação a isto, outra característica importante dos nociceptores diz respeito à sua velocidade de condução. Enquanto as fibras A δ , mielinizadas e de pequeno calibre, apresentam-se como de transporte rápido, as fibras C, não-mielinizadas e de maior calibre, apresentam transporte lento^{4,25}.

Para os neurônios de primeira ordem, seus axônios se projetam para a periferia e para o corno dorsal da medula espinal, estando seus corpos celulares localizados no gânglio da raiz dorsal da medula espinal e, ao entrarem no corno dorsal da medula espinal se ramificam, percorrendo curtas distâncias em sentido rostral e caudal, em uma região chamada trato de Lissauer. A partir daí fazem, sinapse com neurônios aferentes secundários cujos corpos celulares localizam-se no corno dorsal, em uma região conhecida como substância gelatinosa^{4,25}.

O principal neurotransmissor dos aferentes nociceptivos é o GLU, além da SP, localizada em grânulos de secreção nas terminações axonais, e que podem ser liberados durante potenciais de ação de alta frequência. Na dor aguda, após a estimulação de receptores para GLU, ocorre restauração da função eletrofisiológica, de maneira que na ausência do estímulo nociceptivo a dor cesse^{27,28}.

Embora existam outras vias de ascensão do estímulo doloroso como a via espinoreticular límbica e a via espinomesencefálica, a transmissão do estímulo

doloroso ocorrerá, principalmente, na medida em que estes sinais ascendem pela medula seguindo principalmente a via do trato espinotalâmico, por onde os neurônios de segunda ordem transitam após decussarem na medula espinal. Estes impulsos passam pelo bulbo, pela ponte e pelo mesencéfalo, sem fazer sinapse, até alcançarem o tálamo^{27,28}.

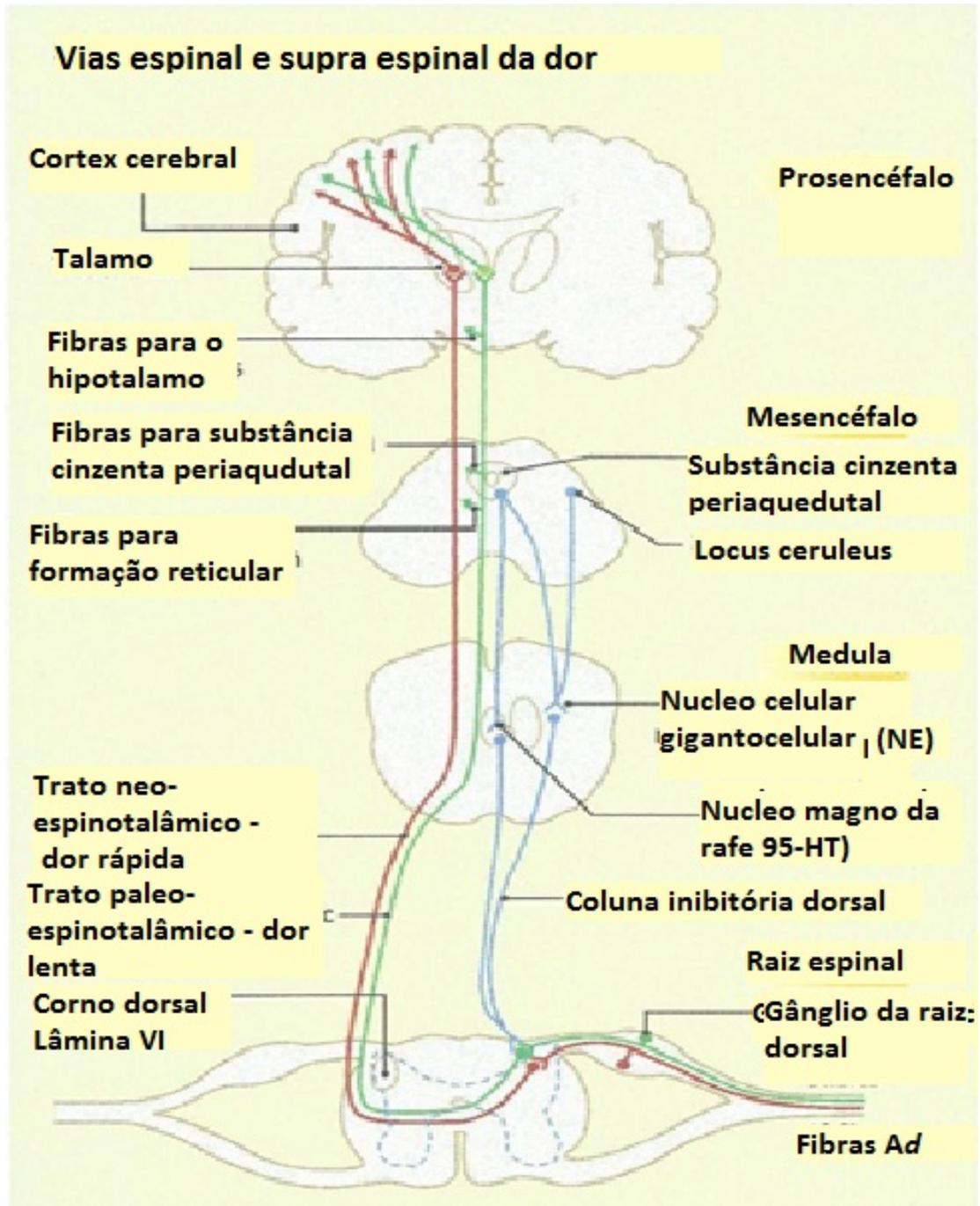
Finalmente, na medida em que os axônios espinotalâmicos percorrem o tronco encefálico estes posicionam-se ao longo do lemnisco medial, mas permanecem como um grupo axonal distinto da via mecanossensorial e, deste local, vão ao córtex somatossensorial primário onde passam a ser conscientes²⁹. A percepção final da dor envolve leva em consideração suas múltiplas dimensões, tais como a sensorial-discriminativa, a afetivo-motivacional e a cognitivo-avaliativa, sendo que a conexão das vias ascendentes com o sistema límbico e lobo frontal, atribuem ainda um componente afetivo à dor, podendo esta ser modulada positiva ou negativamente por estímulos advindos destas regiões²⁷.

Além disso, estímulos advindos da periferia também podem promover sensibilização central. Uma modulação positiva em nível central na medula espinal é gerenciada pelo GLU via receptores AMPA (ácido alfa amino 3 hidroxil-5-metil-4-isoxazolepropionico) ou NMDA²⁸. No corno dorsal da medula espinal o aumento de estímulos aferentes provenientes da sensibilização primária determina a liberação de íons magnésio (Mg^{2+}), ativando receptores NMDA para este neurotransmissor, os quais determinarão aumento do íons cálcio (Ca^{2+}) intracelular elevando a responsividade do neurônio de segunda ordem; além disso, o aumento de Ca^{2+} intracelular estimula a atividade e/ou expressão das enzimas ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) a produzirem mediadores inflamatórios^{30,31}.

1.1.3 Via descendente de controle da dor

Ainda de acordo com o que nos mostra a Figura 1, é importante ressaltar, que neste caminho até a córtex a os neurônios fazem contato com outros tipos de neurônios que transmitem informações não nociceptivas, que podem modular estes sinais, e cada um deles pode agir como um integrador do conjunto de informações captadas; a resultante dos impulsos elétricos registrados pode determinar uma ativação ou uma inibição da transmissão até o seu caminho final, sendo que os mecanismos inibitórios podem ocorrer desde os centros descendentes superiores até

Figura 1 - Representação da via ascendente nociceptiva.



Legenda: Representação do percurso de ascensão do estímulo doloroso desde a ativação dos nociceptores na periferia (Fibras Ad) até alcançar as estruturas supraespinais (córtex cerebral) pela via ascendente nociceptiva para estímulos de condução rápida (vermelho) ou lenta (verde). Representação das estruturas formadoras da via descendente de controle da dor (azul).

Fonte: Farquhar-Smith, 2007²⁷.

a medula espinal, pelo que chamamos de via descendente de controle da dor (VDCD)⁴. Esta, ao nível da medula, envolve a liberação de neurotransmissores endógenos como a 5-HT, a noradrenalina (NA), a somatostatina e os peptídeos opioides; por ação destas substâncias, os neurônios na medula são modulados e sofrem analgesia opioide, com ativação de interneurônios inibitórios e consequente supressão da informação nociceptiva³².

A modulação descendente é constituída por diferentes regiões supraespinais e espinais, tais como os sistemas diencefálico e cortical, a substância cinzenta periaquedutal (SCP) e a substância periventricular, que são ricas em receptores opioides, além do núcleo da rafe (NR), do núcleo adjacente, do *locus coeruleus* (LC) e dos cornos posteriores bulbar e medular⁴. Estes centros são responsáveis por ação inibitória por estimulação, sobretudo da SCP e, podem, ainda, determinar a excitação descendente, com persistência de sensação dolorosa mesmo depois de cessado o estímulo, por mecanismo de retroalimentação positivo medula-bulbo-medula²⁹. Então, como discutido a seguir, a modulação pode significar não somente inibição da dor, mas também a facilitação da mesma.

A modulação da dor é o processo pelo qual o corpo altera o sinal doloroso durante seu caminho pela via de transmissão do sinal, explicando o porquê das respostas individuais ao mesmo estímulo serem diferentes e explica também porque a ativação de neurônios da dor e a experiência sensorial experimentada nem sempre coincide, além de justificar como muitos mecanismos de analgesia clínica funcionam^{17,32}.

De acordo com Braz e colaboradores²⁸ a modulação pode ser periférica, ou primária, quando a plasticidade determinada por sensibilização periférica é mediada pela liberação local de agentes liberados durante a inflamação que podem estimular nociceptores diretamente, como exemplo pode-se citar o H⁺, o trifosfato de adenosina (ATP, do inglês *adenosine triphosphate*) e a 5-HT. Além disso, pode ocorrer aumento da sensibilidade neuronal a estímulos subsequentes, ambos via mediação de segundos-mensageiros como o monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), a proteína-quinase A (PKA) ou a PKC²⁸. Estes segundos mensageiros determinam ainda alterações em canais iônicos, principalmente os de sódio (Na⁺) voltagem dependentes³³.

Com relação ao sistema de controle da dor, a partir da ativação da VDCD, na região da SCP e área rostroventral da medula, um mecanismo endógeno contribui

para a modulação negativa desta sensibilização central, sendo que durante processos persistentes de inflamação ou dor crônica, uma influência descendente mediada por opioide emana destas áreas⁴. Também, os neurotransmissores 5-HT e NA espinais têm sido postulados com mediadores deste mecanismo de controle, explicando a ação dos antidepressivos tricíclicos ou inibidores da recaptação de monoaminas no tratamento da dor neuropática³¹. São observadas também alterações induzidas pela nocicepção no processamento cortical em áreas como o córtex singulado anterior, insula e córtex sensorial primário e secundário, sendo que pacientes com dor crônica demonstram alterações no processamento da informação dolorosa nesta “matriz” de dor^{4,27}.

Dentre os mecanismos de modulação, a Teoria do Portão postulada em 1965 por Wall e Melzack³⁴, apesar de enfrentar alguns comentários contraditórios, ainda colabora na explicação de fenômenos como os descritos no parágrafo anterior, onde os nervos compostos de fibras nervosas de maior calibre carregam informação não nociceptiva, enquanto os de calibre mais finos carregam a informação nociceptiva até a substância gelatinosa da medula espinal, sendo que sua inter-relação, somada a atuação de fibras descendentes nesta mesma região podem modular os sinais de dor inibindo-os³⁵.

1.1.4 Dor neuropática

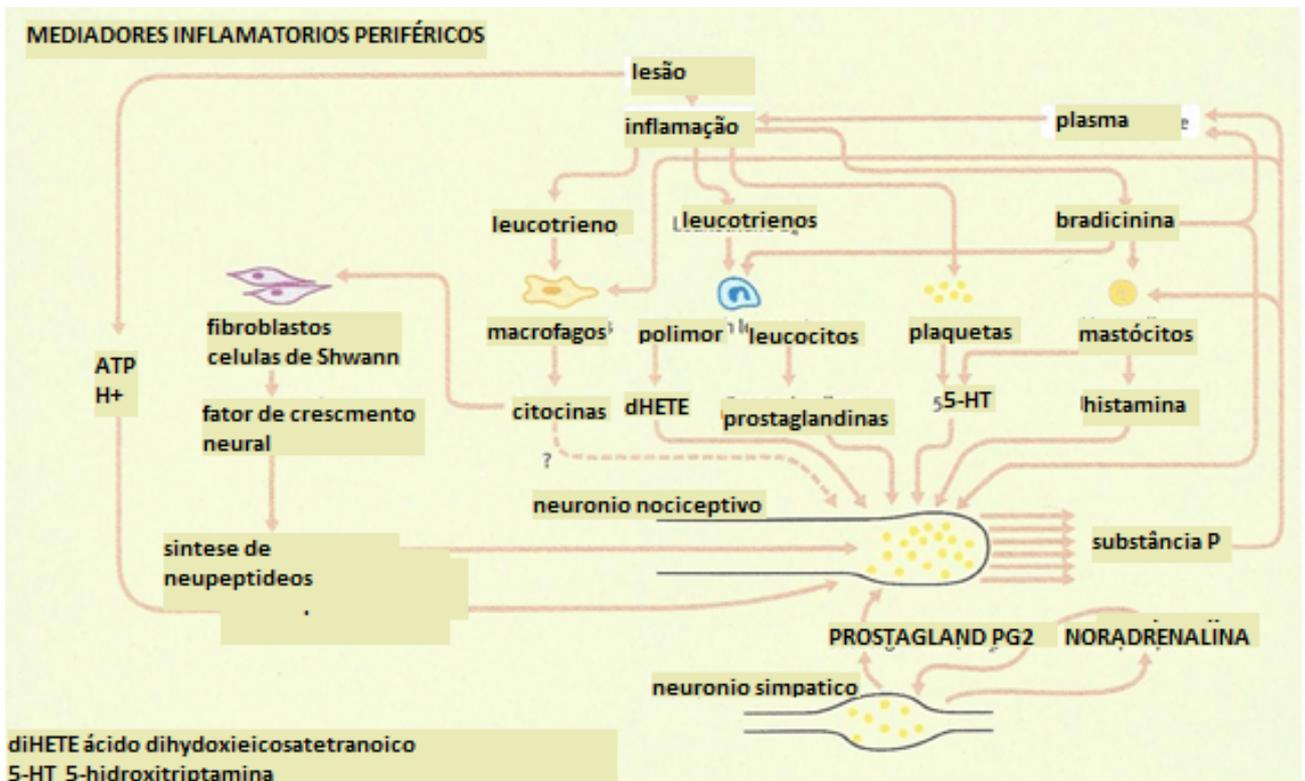
A dor neuropática pode ser periférica, que ocorre quando a lesão ou disfunção afeta o sistema nervoso periférico (SNP), já quando a disfunção ou lesão afeta o SNC, pode ser chamada de dor central, medular ou encefálica^{1,27}. Assim, a dor neuropática é definida como dor iniciada ou causada por lesão primária ou disfunção no sistema nervoso central ou periférico². Pode ser causada por trauma, como na síndrome dolorosa complexa regional e na dor crônica pós-operatória; por infecção, como na neuralgia pós-herpética ou neuropatia induzida por síndrome da imunodeficiência adquirida; por isquemia, como na neuropatia diabética ou na dor central pós acidente vascular cerebral; por câncer, quando ocorre invasão ou compressão de nervos, ou, ainda, quimicamente, como na neuropatia induzida pela quimioterapia¹².

No caso das neuropatias a dor é decorrente de mecanismos centrais e periféricos que resultam em transmissão facilitada, sendo que os mecanismos periféricos que aumentam a estimulação de neurônios incluem a ação de mediadores

sobre as terminações nervosas e o efeito da lesão do nervo e, novamente, diversas substâncias são responsáveis pela ativação ou sensibilização dos nociceptores, tais como cininas, PGs, 5-HT, histamina, H^+ , K^+ , ATP, interleucinas (ILs) e SP^{12,36}.

Na medula espinal, a inter-relação entre neurônio aferente primário e os fenômenos de excitabilidade e inibição determinam a mensagem que é transmitida para centros supraespinais tais como o tálamo, formação reticular, sistema límbico e córtex e, neste processo, estão envolvidos diversos neurotransmissores excitatórios como o GLU, a SP, as neurocininas e o aspartato, além dos inibitórios como as encefalinas, a 5-HT, a NA, o ácido gama-aminobutírico (GABA), a glicina e a acetilcolina^{4,28}. Os neurotransmissores excitatórios ativam os receptores de neurocininas, além do AMPA e do NMDA, com aumento da entrada de Ca^{2+} para dentro da célula, o que desencadeia uma série de eventos responsáveis pela sensibilização central²⁷. Estes eventos são ilustrados na Figura 2, a seguir.

Figura 2 – Representação de diferentes classes de substâncias capazes de ativar ou sensibilizar os neurônios aferentes primários.



Mediadores inflamatórios periféricos que promovem ativação de nociceptores, direta ou indiretamente e células ou tecidos que são fontes dos mesmos.

Fonte: Farquhar-Smith, 2007²⁷.

Após lesão de sistema nervoso, periférico ou central, pode ocorrer uma cascata de eventos que incluem alterações biológicas importantes, na periferia e no SNC. A interrupção parcial ou total de fibras aferentes causa degeneração de terminações pré-sinápticas da célula nervosa com alterações funcionais e morfológicas denominadas de neuroplasticidade¹². Após lesão de axônio o neurônio torna-se mais sensível a estímulos mecânicos e despolarização espontânea e inúmeras alterações são observadas em diversos outros locais do sistema nervoso, podendo ocorrer efases, ou seja, conexão entre fibras grossas e axônios nociceptivos e, como consequência, um impulso eferente motor pode ativar um axônio nociceptivo no local da lesão; assim os neurônios do SNC têm sua resposta modificada, de maneira que estímulos que antes eram inócuos passam a causar dor^{4,27}.

Já nas fibras aferentes ocorrem alterações como atividade espontânea anormal, formação de broto e liberação de fatores tais como interleucinas e fator de crescimento neural, sendo que o broto se torna sensível a estímulos como a NA, os prostanóides e as citocinas³⁶. Já no gânglio da raiz dorsal, observa-se atividade espontânea, maior atividade evocada e aumento da inervação de fibras A por fibras do sistema simpático e, por sua vez na medula espinal, as terminações de fibras grossas fazem conexões com fibras finas, ocorrendo expansão de campo receptivo e redução dos mecanismos inibitórios, com reorganização do corno dorsal e sensibilização central^{12,27}.

A partir deste conhecimento, podem ser introduzidos os conceitos de alodinia e hiperalgesia, sendo que a primeira é a dor devida a um estímulo que habitualmente não a provoca, envolvendo alteração na qualidade de uma sensação, seja tátil, térmica ou de qualquer outra espécie². Clinicamente a alodinia mecânica é testada com pincel ou bola de algodão, ou por estímulo pontual de monofilamentos de *nylon* denominados de alças de von Frey, ou estímulos térmicos, não nócicos, como calor ou frio³¹. Por sua vez a hiperalgesia é uma resposta exacerbada a um estímulo habitualmente doloroso, resposta aumentada em um limiar elevado¹². Em paciente com neuropatia, é consequência de uma perturbação no sistema nociceptivo, com sensibilização periférica, central ou ambas. A hiperalgesia mecânica também é avaliada na clínica com monofilamentos de von Frey, aplicados com intensidade suficiente para prover um estímulo pontual doloroso, bem como com a aplicação de estímulos térmicos dolorosos²¹.

1.1.5 Tratamento farmacológico da dor neuropática

Segundo revisão recente da Sociedade Canadense Da Dor⁷, o tratamento da dor neuropática pode ser feito por uma ampla série de diferentes fármacos, que passamos a descrever. Os primeiros são pertencentes a classe de fármacos que atuam inibindo a recaptação da noradrenalina e da serotonina para a terminação nervosa pré-sináptica, aumentando a concentração destes neurotransmissores na fenda sináptica³⁷. Esta classe inclui os antidepressivos, que apesar de sua importância clínica tem efeitos indesejáveis que incluem fadiga, sonolência, náusea e tonturas³⁸.

Outra classe de fármacos empregada é a dos anticonvulsivantes, como a carbamazepina, que parecem atuar ativando as vias inibitórias descendentes e parecem interagir com receptores opioides apresentando efeitos sinérgicos com estes últimos, enquanto outro benefício desta classe é sua ação ansiolítica que pode auxiliar na analgesia, e tem efeito relaxante muscular; além disso, seus principais efeitos colaterais parecem incluir alterações do sono, anorexia, náusea, vômitos, irritabilidade, ataxia e diplopia³⁹.

Já os ansiolíticos, benzodiazepínicos (tais como o diazepam e o clonazepam) que agem através da ligação a receptores específicos que fazem complexo com receptor GABA-A, aumentando o efeito deste neurotransmissor, o que provoca abertura de canais de cloreto, com diminuição do potencial da membrana e da condução neural, bem como facilitam a ação inibitória do GABA⁴⁰. Estes fármacos são empregados em condições dolorosas com o objetivo de diminuir perturbações do sono causadas por tais condições. Porém, podem determinar dependência física, causam sedação, amnésia, disfunção intelectual e depressão, além de alteração da coordenação motora e do sono⁴⁰.

Os fármacos opioides, como a fentanila e a meperidina, por sua vez agem através da ligação a receptores opioidérgicos, presentes em todo o SNC e também periférico, produzindo inibição da atividade de enzimas efetoras como a adenilato-ciclase neuronal e reduzindo, conseqüentemente o transporte trans-membrana de Ca^{2+} , interferindo na liberação pré-sináptica de neurotransmissor³⁷. Aumentam, ainda, a passagem do íon K^+ , com hiperpolarização da membrana axonal e redução da neurotransmissão⁴¹ bem como agem também no sistema límbico, com alteração da reação emocional à dor e sobre vias inibitórias descendentes, provenientes do encéfalo à medula espinal, envolvendo a liberação de neurotransmissores como 5-HT

e NA e, em nível espinal, diminui a excitabilidade de aferentes nociceptivos, pela inibição da liberação de SP⁴². No entanto, existe a precaução quanto ao seu uso na clínica, no sentido de evitar *overdose*, abuso e até mesmo morte¹².

Outra classe de medicamentos usada para a dor neuropática inclui os corticosteroides que possuem ação anti-inflamatória, diminuindo a síntese e os níveis periféricos de mediadores que ativam e/ou sensibilizam os nociceptores, além de diminuírem a atividade ectópica em locais de lesão neural e o edema; contudo, dentre seus importantes efeitos indesejáveis encontram-se hiperglicemia, retenção de líquidos, hipertensão arterial, dispepsia, úlcera péptica, insônia, distúrbio de percepção, *delirium*, osteoporose, miopatia e necrose asséptica de cabeça de fêmur³⁷.

A clonidina, um agonista α_2 -adrenérgico parcial, também possui ação analgésica após interagir com seus receptores por diminuir a atividade simpática, a secreção de NA, e a liberação de SP de fibras aferentes e promover liberação de endorfinas no corno dorsal da medula espinal¹². Por outro lado, pode causar diminuição da pressão arterial e da frequência cardíaca, sedação, diminuição da ansiedade, anorexia, sonolência, *rush* cutâneo, prurido, cefaleia, obstrução nasal, alopecia, urticária e xerostomia³⁷.

De acordo com De Moulin e colaboradores⁷, os anestésicos locais são utilizados nos bloqueios analgésicos de gânglio estrelado, regionais, simpático, lombar e periféricos em geral, sendo que as infiltrações com anestésico local bloqueiam os canais de íons Na^+ dos neurônios, impedindo a transmissão nervosa em procedimentos de curta duração, mas que podem determinar resultados importantes por atenuar os efeitos da dor contínua prolongada. Por outro lado, os efeitos colaterais são virtualmente inexistentes.

Finalmente a classe dos anticonvulsivantes inclui a carbamazepina, que parece atuar ativando as vias inibitórias descendentes e interagindo com receptores opióides apresentando efeitos sinérgicos com estes últimos, associando ainda ação ansiolítica, que pode auxiliar na analgesia, além de efeito relaxante muscular.

No entanto, como principais representantes desta classe de fármacos, para o tratamento da dor neuropática estão os gabapentinóides GABAP e pré-gabalina⁴³. Os gabapentinóides determinam grande efeito antinociceptivo em animais, com grande variação de doses⁴⁴. A GABAP, um aminoácido, análogo ao GABA, muito efetivo contra crises convulsivas parciais, originalmente um espasmolítico, que a despeito de

sua analogia com o GABA, não atuam nestes receptores mas, apesar disto, pode modificar a liberação sináptica do GABA.

Possui grande relevância clínica e a principal hipótese para seu mecanismo de ação analgésica é de que ela age sobre a subunidade $\alpha 2\delta$ dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, diminuindo a sensibilização central¹² por reduzirem a liberação de neurotransmissores excitatórios tais como o GLU e a SP⁷. As subunidades $\alpha 2\delta$ dos canais de Ca^{2+} estão suprarreguladas em neurônios sensoriais lesados, explicando, portanto, a eficiência destes agentes em uma gama de dor associada a lesão neurológica que em comparação a outros estados dolorosos¹². Por outro lado, outros mecanismos de ação para este fármaco são implicados, tais como a ativação de um sistema noradrenérgico descendente inibitório da dor associado com receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos na medula espinal e que, supraespalmente, envolveria mecanismos que incluem a ativação da sinapse inibidora do GABA no LC; além disso menciona-se também sua capacidade de modular os canais iônicos receptores de potencial transitório (TRPs) e o receptor NMDA, entre outros¹³.

A ativação de vias descendentes como um importante sistema de controle da dor promove um mecanismo biológico de proteção durante situações de emergência, como os ferimentos de batalha, acidentes graves, estresse por atividade desportiva, e outros⁴⁵. Importante ressaltar que a atividade analgésica dos opioides, anti-inflamatórios não-esteroidais, alguns antidepressivos, canabinoides, agonistas colinérgicos entre outros, envolvem, ou mimetizam, em parte, a ativação de vias descendentes inibitórias, que parecem ser um alvo importante das terapias de controle da dor^{4,7,12}.

1.1.6 O sistema EC e a modulação da dor

Extratos de *Cannabis sativa* veem sendo utilizados por longa data como analgésicos, mas a falta de conhecimento de sua farmacologia molecular, associada a reservas morais sobre seu uso como psicotrópico com propósitos recreativos levaram à sua proibição desde o início do século XX⁴⁶.

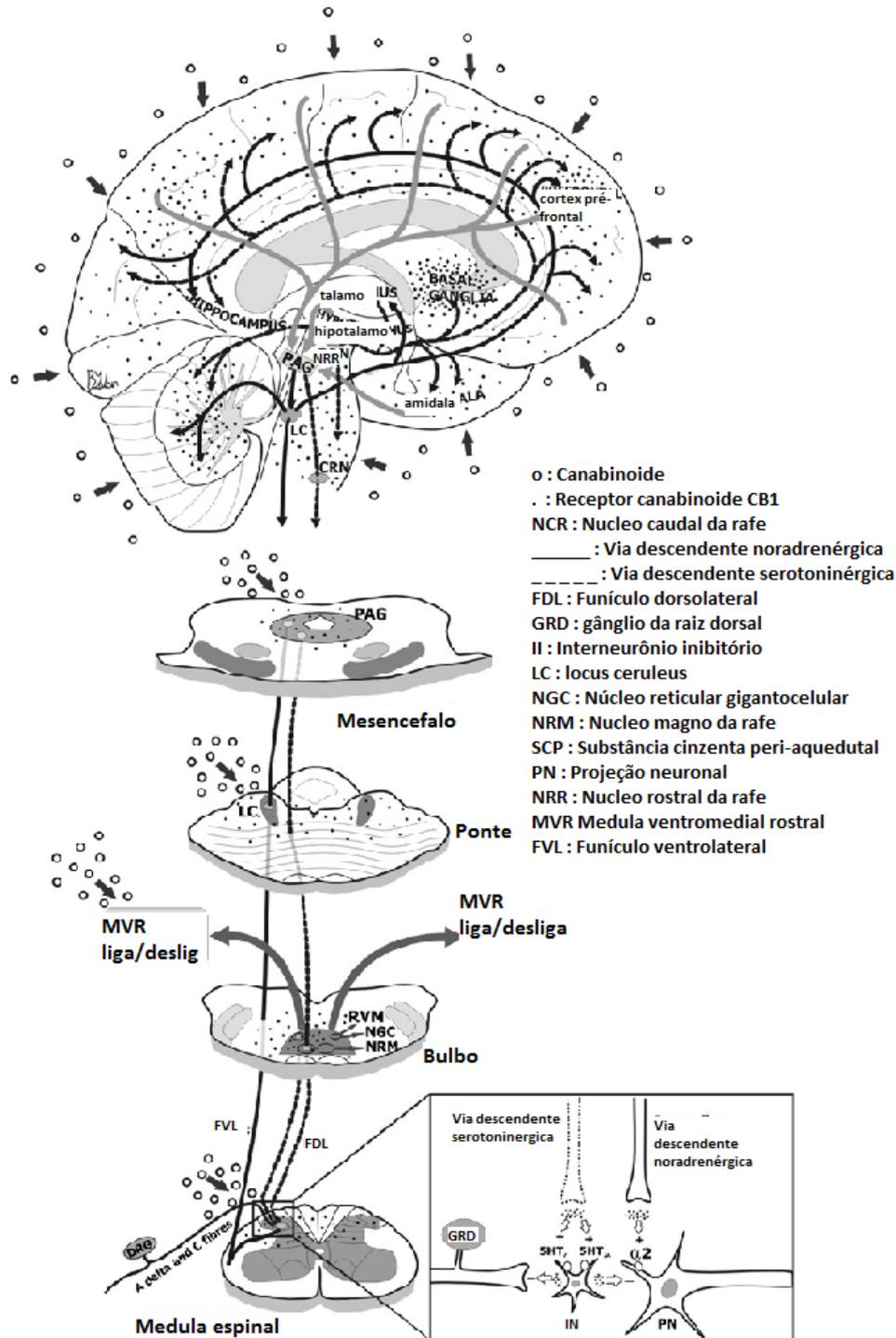
O sistema EC apresenta, para interação com os neurotransmissores endógenos, dois receptores principais que são denominados de CB1 e CB2; enquanto o primeiro tipo é predominantemente encontrado no SNC e periférico (Figura 3), o segundo tipo é principalmente encontrado no sistema imune e, em menor escala no

SNC¹⁶. Os receptores CB1 estão amplamente espalhados e distribuídos no encéfalo, particularmente muito expressos em córtex, cerebelo, gânglio estriado e hipocampo, correlacionando-se, desta forma, com a multiplicidade de efeitos dos agonistas canabinoides. Tais efeitos incluem o controle da atividade motora, a hipotermia, o aumento da fome e os distúrbios na consolidação da memória, além de efeitos psicotrópicos¹⁵. Enquanto isto, a expressão de receptores CB2 foi observada em células astrogliais e microgliais no SNC¹⁶, sendo que esta localização foi comprovada por meio do uso de técnicas distintas como autorradiografia, hibridização *in situ* ou imunocitoquímica⁴⁷.

Os efeitos antinociceptivos e anti-hiperálgicos dos canabinoides são principalmente decorrentes da ativação de receptores CB1, sendo que os dois neurotransmissores endógenos responsáveis pela interação com estes receptores são o N-araquidoniletanolamina, ou anandamina (ANA), além do 2-araquidonil glicerol (2-AG); ambos produzidos após influxo de Ca^{2+} na célula neuronal, o que ativa as enzimas responsáveis por sua síntese⁴⁸. Assim, as várias etapas do processo de neurotransmissão destes EC, incluindo suas vias de síntese, interação com receptores e degradação por enzimas de degradação veem sendo amplamente estudadas, como forma de elucidar qual o seu potencial para a produção de analgesia, desde a periferia, como nos nervos periféricos e células imunes, até a integração central na medula espinal, e nas regiões supraespinais como a SCP e o bulbo rostral ventrolateral, que são associadas com o controle descendente da dor¹⁴.

Além disso, a Figura 3 apresenta esquematicamente a grande densidade de receptores canabinóides, relacionadas à neurônios serotoninérgicos e adrenérgicos pertencentes a via descendentes de controle da dor, que medeiam a ação antinociceptiva induzida pelos canabinóides. O mecanismo analgésico dos canabinoides é complexo e múltiplos sítios de ação parecem contribuir para seu efeito analgésico. Os canabinóides têm modo de ação dual na inibição monoaminérgica descendente e os canabinóides administrados sistemicamente produzem antinocicepção mediada por mecanismos CB1 por meio da ativação de vias descendentes serotoninérgicas e noradrenérgicas, que agem sobre receptores serotoninérgicos espinais do tipo 5-HT₇ e 5-HT_{2A}, além de receptores adrenérgicos α_2 , respectivamente¹⁴.

Figura 3 - Distribuição de receptores canabinoides no SNC.



Legenda: Presença de receptores CB1 em diferentes estruturas da via descendente de controle da dor. o: canabinoide; .: receptor canabinoide CB1; NCR: núcleo caudal da rafe; _____: via descendente noradrenérgica; - - - : via descendente serotoninérgica; FDL: funículo dorsolateral; GRD: gânglio da raiz dorsal; II: interneurônio inibitório; LC: *locus coeruleus*; NGC: núcleo reticular gigantocelular; NRM: núcleo magno da rafe; SCP: substância cinzenta periaquedutal; PN: projeção neuronal; NRR: núcleo rostral da rafe; MVR: bulbo ventromedial rostral; FVL: funículo ventrolateral.

Fonte: Dogrul, 2012¹⁵.

1.1.7 Modelos animais de dor neuropática

A dor neuropática tem sido descrita como a mais terrível de todas as torturas que uma ferida em nervo pode infligir¹². A dor neuropática periférica é frequentemente observada no paciente com câncer, AIDS, diabetes de longa data, síndrome discal lombar, herpes, lesão traumática da coluna vertebral, esclerose múltipla e acidente vascular cerebral³. Para uma melhor compreensão de todos estes fenômenos, estudos têm sido procedidos em várias escalas, mas sobremaneira utilizado modelos animais, que são validados para mimetizar etiologias diversas de neuropatias, que inclui lesão nervosa periférica, como o modelo que foi utilizado neste estudo, o de ligadura parcial do nervo isquiático (LPNI)⁴⁹.

De acordo com uma importante revisão sobre o assunto⁵⁰, até o fim dos anos 70, a ciência básica da dor era concentrada quase que somente no comportamento agudo e reações eletrofisiológicas a estímulo nócico transitório, térmico ou mecânico. O pinçamento da cauda ou a placa quente eram os únicos testes empregados para triagem pré-clínica de fármacos analgésicos na área farmacêutica. Entretanto em muitas situações clínicas de dor, esta ocorre espontaneamente, ou por hipersensibilidade nociva ou ainda por estímulos inócuos. Assim, os antigos modelos de estudo eram relevantes unicamente para testar dor aguda nociceptiva, e de valor limitado para acessar as alterações de hipersensibilidade associadas à dor crônica.

Segundo Burma e colaboradores⁵¹, o modelo de dor neuropática produzido pela LPNI é um dos mais frequentemente utilizados atualmente, sendo que neste modelo a pata traseira esquerda do rato é depilada para a dissecação cirúrgica que expõe o nervo isquiático no nível superior da coxa, realizando-se uma ligadura do mesmo, com fio de seda 8-0 imediatamente distal ao ponto em que emerge o ramo bíceps-semi-tendinoso posterior. Ainda, alterações de comportamento com dor espontânea, como alodinia pelo frio, hiper-reatividade química e hiperalgesia mecânica podem ser notadas em uma semana após a cirurgia, e persistem por até seis semanas⁵¹. Nos camundongos o modelo tem sido empregado notando-se que a LPNI produz também uma alodinia e plasticidade neuroquímica comparável à do rato, porém com uma magnitude e duração de resposta dolorosa que pode variar de acordo com o material de sutura e a linhagem do animal utilizado. Este modelo é relevante por permitir a compreensão da fisiopatologia da dor neuropática, já que a lesão

nervosa parcial é a maior causa de dor neuropática em humanos, tendo início imediato e longo tempo de duração, além de causar a alodinia evocada pelo toque e a hiperalgesia⁵⁰.

A partir do acima exposto o presente estudo pretende avançar no conhecimento sobre o mecanismo de ação envolvido na ação anti-hiperalgésica promovida pela GABAP no modelo de LPNI a partir de estudos recentes do nosso grupo de pesquisa, verificando se além do sistema adenosinérgico⁵², o sistema EC também contribui para esta ação do fármaco. Esses dados ajudarão a conhecer melhor o perfil de resposta analgésica aos fármacos empregados no tratamento da dor neuropática induzida por lesões do tipo causalgias em humanos. Resultados como estes podem subsidiar futuros estudos clínicos de avaliação da ação destes fármacos em paciente com este tipo de dor. Além disso, para a academia, esses dados são importantes para a formação de recursos humanos e de áreas afins interessadas no tema.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a contribuição do sistema EC na modulação do efeito anti-hiperalgésico produzida pela GABAP em um modelo animal de dor neuropática induzida pela LPNI.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a contribuição de receptores CB1 e CB2 periféricos, em nível plantar, sobre o efeito da GABAP na dor neuropática induzida pelo modelo de LPNI;
- Verificar a contribuição de receptores CB1 e CB2 centrais, em nível espinal, sobre o efeito da GABAP na dor neuropática induzida pelo modelo de LPNI.

3. MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo experimental, pré-clínico. O projeto foi realizado no laboratório de Neurociência (LANEX), no Bloco I2 da Unidade Pedra Branca do Campus da UNISUL.

3.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Para indução da LPNI foi empregado material cirúrgico incluindo lâminas de bisturi número 11, pinças, afastadores fio de seda para sutura número 8-0 (Ethicon®, Edimburg, UK). Para anestesia, inicialmente os animais foram sedados com administração de uma solução de cetamina (100 mg/kg) + xilazina (20 mg/kg), por via intramuscular (volume total de 30 μ L), seguida de manutenção com isoflurano a 2%, diluído em oxigênio a 100%. As administrações dos tratamentos nos animais foram feitas com agulha de gavagem acoplada a seringa de 1 mL ou seringas de Hamilton de 25 μ L para os sítios oral ou intratecal (i.t.), respectivamente. A dissolução das drogas foi feita em solução salina estéril (0,9% NaCl), a partir de solução estoque, imediatamente antes do uso. A resposta hipernociceptiva após indução da LPNI foi realizada com monofilamento de Von Frey, de *nylon* na força de 0,6g (VFH®, Stoelting, Chicago, IL, USA). A resposta anti-hiperalgésica foi registrada após tratamento com GABAP (Pfizer®, São Paulo, Brasil), sob influência dos antagonistas de receptores AM281 e AM630 (Tocris®, Bristol, UK), utilizando-se solução salina estéril (0,9% NaCl) como veículo.

3.3 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos *Mus musculus Swiss*, machos, pesando entre 25 e 35g, cerca de 2,5 meses de idade que não possuíam qualquer anormalidade anatômica, funcional e/ou doenças, lesões, bem como apresentem no período de avaliação basal (antes da indução da LPNI), frequência de resposta ao estímulo nociceptivo igual ou inferior a 20%. Os animais foram alojados a temperatura de 22 \pm

2 °C, sob regime cíclico de 12 horas de luz e 12 horas de escuro (luzes ligadas às 6h00min e desligadas às 18h00min por *timer*) e com livre acesso a comida e água. Os animais foram aclimatados ao laboratório por pelo menos 1 h antes dos testes comportamentais, que foram procedidos entre 8h00min e 12h00min. Foram excluídos do estudo os animais que após o procedimento de indução da LPNI apresentarem hiperalgesia mecânica, ou seja, frequência de resposta inferior a 80%.

O número de animais por grupo foi calculado em $n=8$. A fórmula empregada para o cálculo foi a equação $n/\text{grupo} = 2[(Z\alpha/2 + Z\beta) \times d/\Delta]^2$, para comparação de duas médias, entre amostras independentes, considerando-se o poder do teste de 80%, o nível de significância de 5%, o desvio-padrão de 12,5% para a resposta hiperalgésica a partir de registros de estudos anteriores no nosso laboratório⁵² e o valor da diferença a ser detectada igual a 18%.

3.4 DELINEAMENTO DO ESTUDO

3.4.1 Indução da dor neuropática

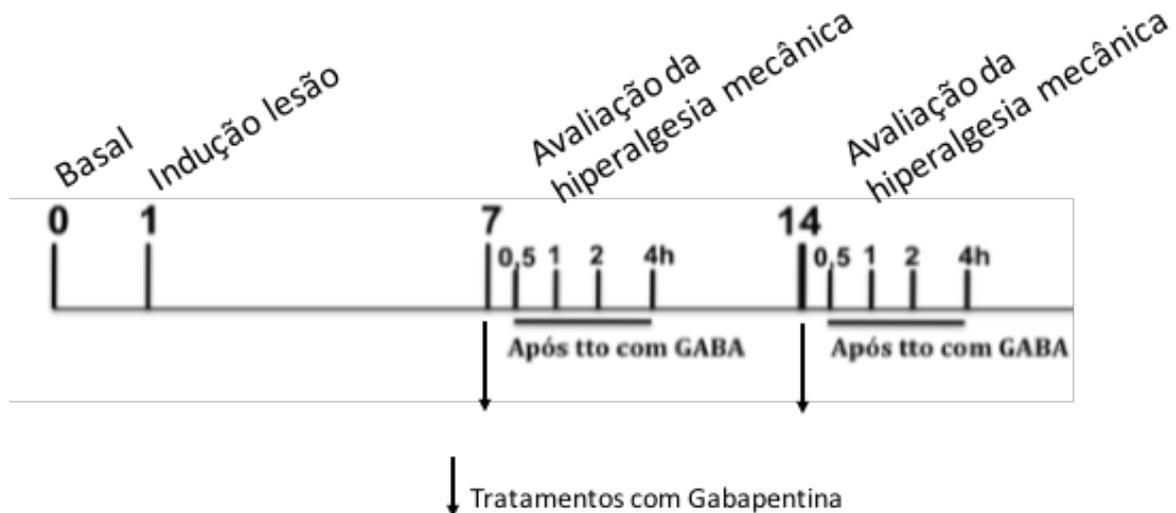
Para avaliar o comportamento neuropático de dor, o procedimento foi similar ao descrito em estudo prévio⁵². Brevemente, os camundongos foram anestesiados com isoflurano a 2% em oxigênio a 100%, com a cirurgia procedida por ligadura 1/3-1/2 da porção medial do nervo isquiático com fio de seda 8-0. No grupo controle, o nervo foi exposto e não ligado.

3.4.2. Influência da GABAP sobre a hiperalgesia observada no modelo de ligadura parcial do nervo isquiático (LPNI)

Para confirmar o efeito anti-hiperalgésico da GABAP neste modelo, diferentes animais foram submetidos ao procedimento de LPNI como descrito acima e tratados nos dias 7 e 14 após o procedimento de LPNI com administração intraperitoneal (i.p.) de veículo (solução salina, 10 ml/kg) ou GABAP na dose de 30 mg/kg via oral, sendo esta a dose que apresentou melhor efeito anti-hiperalgésico no modelo em estudo anterior realizado em nosso laboratório, sendo que estes períodos de observação foram escolhidos por considerar o tempo mínimo necessário para a instalação do processo neuropático no modelo, também em acordo com estudo anterior⁵². Nestes

dias, os animais foram avaliados em relação à hiperalgesia mecânica em diferentes períodos de tempo após a sua administração (0,5 até 4 h após), para seleção do melhor tempo de tratamento com este fármaco. O fluxograma apresentado na Figura 4 representa o delineamento deste primeiro protocolo do estudo.

Figura 4 - Delineamento do primeiro protocolo do estudo.



Esquema ilustrativo representando a avaliação basal, realizada antes (0) e em diferentes tempos (7, 14 ou 21 dias) após a indução da LPNI em camundongos.

Após confirmação do melhor tempo de pré-tratamento com a GABAP para a observação do seu efeito antineuropático no modelo, foi investigada a contribuição do sistema EC para esta ação em acordo com protocolos descritos em seguida.

3.4.2 Influência do tratamento i.t. ou intraplantar (i.pl.) com antagonistas de receptores CB1 sobre o efeito antineuropático da GABAP

Para avaliar a contribuição dos receptores CB1 em nível central ou periférico sobre o efeito da GABAP, os camundongos foram submetidos ao procedimento de LPNI e no dia 14^o. após, foram tratados com AM281 por via i.t. (2 µg/5 µL) ou i.pl. (10 µg/20 µL) e 15 min depois receberam GABAP por via oral (30 mg/kg). Após 1 h deste último tratamento, os animais foram avaliados quanto à hiperalgesia mecânica. Estas doses de antagonistas foram selecionadas a partir do estudo de Martins e colaboradores⁵³.

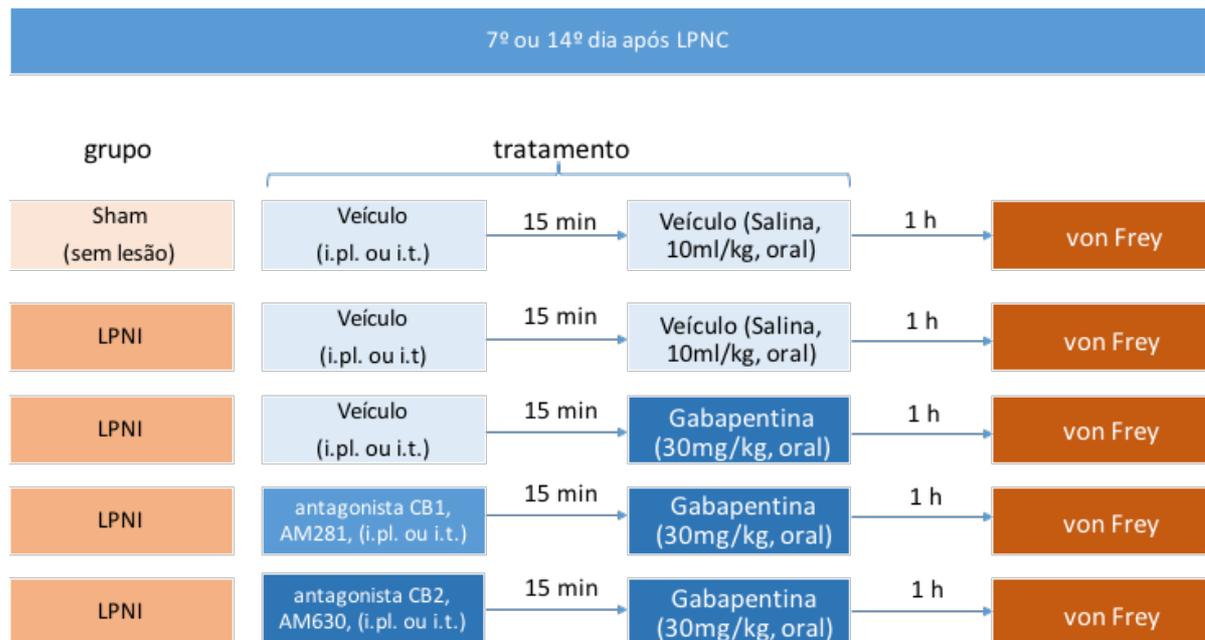
3.4.3 Influência do tratamento por via i.t. ou i.pl. com antagonistas de receptores CB2 sobre o efeito antineuropático da GABAP

Para avaliar a contribuição dos receptores CB2 em nível central ou periférico sobre o efeito da GABAP, os camundongos foram submetidos ao procedimento de LPNI e no dia 14^o. após, foram tratados por via i.t. (5 µL) ou i.pl. (20 µL) com AM630 e 15 min depois receberam GABAP por via oral (30 mg/kg). Após 1 h deste último tratamento, os animais foram avaliados quanto à hiperalgesia mecânica. Estas doses de antagonistas foram selecionadas a partir do estudo de Martins e colaboradores⁵³.

3.4.4 Grupos de tratamento

De acordo com o exposto anteriormente, os seguintes grupos de tratamento foram formados no presente estudo: 1) sham+veículo+veículo, 2) LPNI+veículo+veículo, 3) LPNI+veículo+GABAP, 4) LPNI+AM282+GABAP e 5) LPNI+AM630+GABAP. Um esquema destes grupos de tratamento pode ser observado na Figura 5 a seguir.

Figura 5 - Esquema ilustrativo dos grupos de tratamento no estudo.



Diferentes grupos que sofreram ou não lesão nervosa (LPNI) e respectivos tratamentos com antagonistas de receptores CB1 ou CB2, antes da administração oral com veículo ou GABAP em camundongos.

3.5 ENSAIOS/TESTES E TÉCNICAS

3.5.1 Procedimentos

Anteriormente ao procedimento de LPNI todos os animais foram avaliados quanto ao comportamento de dor ao estímulo de von Frey usado no estudo (0,6 g) e estes dados serviram como a medida basal para os experimentos seguintes. Depois do procedimento os animais foram randomicamente distribuídos em dois grupos: operados (LPNI) e não operados (*sham*), para verificação posterior da possível influência dos antagonistas de receptores do sistema canabinoide sobre o efeito anti-hiperalgésico da GABAP, nos dias 7 e 14 após a LPNI⁵².

3.5.2 Administrações por via i.t.

As administrações i.t. foram realizadas nos camundongos totalmente conscientes, contidos manualmente após terem sido depilados na região do dorso, expondo-se a coluna espinal arqueada e usando uma agulha calibre 30G, que foi inserida no espaço subaracnóideo entre as vértebras L4 e L5. O correto posicionamento da agulha foi confirmado pelo movimento da cauda do animal. Um volume de 5 µL contendo veículo ou a solução do agente teste foi lentamente injetada com uma micro-seringa de Hamilton de 25 µL, com as administrações realizadas lentamente, em um período total de 5 s⁵².

3.5.3 Resposta à retirada da pata traseira induzida por filamento de Von Frey

Para avaliação da hiperalgesia mecânica, os camundongos foram individualmente colocados em caixas de acrílico transparentes (9 X 7 X 11 cm) sobre uma tela em malha de arame, elevadas a 30 cm da bancada, para permitir acesso à superfície ventral da pata traseira direita. A resposta hiperalgésica foi registrada como a frequência de retirada da pata para 10 aplicações do filamento de Von Frey⁵². Os dados foram apresentados como uma percentagem da resposta de cada animal a 10 aplicações do estímulo. Um aumento significativo no número desta resposta nos animais com LPNI em relação aos animais do grupo *sham*, nos diferentes períodos

de tempo mencionados anteriormente, foi interpretado como resposta de hiperalgesia mecânica.

3.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO

Quadro 1 – Variáveis de estudo.

Variáveis	Tipo	Natureza	Proposta de utilização
Tratamento	independente	Qualitativa nominal	Nome do grupo de tratamento
Nocicepção	dependente	Quantitativa contínua de razão	Frequência de resposta ao estímulo doloroso (em %) Média ± E.P.M.

3.7 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados são apresentados como média ± erro padrão da média (E.P.M.). Os dados de amostras independentes foram analisados no programa Graphpad (GraphPad® software, San Diego, CA, USA) versão 6.0 e, primeiramente, foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk. Para comparação entre diferentes grupos de estudo com dados de natureza paramétrica, foram empregados os testes de Análise Ordinal de Variâncias (ANOVA) de 1 ou 2 vias, seguidos, respectivamente dos testes de Tukey e Bonferroni. Diferenças com valor de $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

3.8 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Os animais foram utilizados somente uma vez durante o experimento. Os cuidados com os animais e os experimentos foram procedidos em concordância com os preceitos de Institutos Nacionais de Cuidados com Saúde Animal (publicações NIH 80-23) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para uso Animal CEUA-UNISUL, sob protocolo número 16.027.5.01.IV. O número de animais e a intensidade do estímulo nócico utilizado foi o mínimo necessário para demonstrar consistência dos tratamentos.

Posteriormente aos experimentos, os animais foram submetidos a procedimento de morte indolor assistida, recebendo injeção de uma dose excessiva

de anestésico, de acordo com a resolução 1000, de 12/05/2012 – Conselho Federal de Medicina Veterinária CFMV, sob a supervisão de médico veterinário responsável.

4. RESULTADOS

O tratamento dos animais com GABAP (30 mg/Kg, por via oral) no 7º. e no 14º. dia após a LPNI promoveu efeito anti-hiperalgésico de acordo com o que foi registrado em estudos anteriores do nosso grupo⁵², sendo que o melhor tempo de pré-tratamento para a observação deste efeito foi o de 1 h antes da avaliação do comportamento de retirada da pata ao estímulo de von Frey (dados não mostrados). Os resultados encontrados com a utilização dos demais protocolos do estudo são descritos a seguir.

4.1 CONTRIBUIÇÃO DE RECEPTORES CB1 PERIFÉRICOS PARA O EFEITO ANTI-HIPERALGESICO DA GABAP

Os resultados apresentados na Figura 6 demonstram que os receptores periféricos CB1 são importantes para a atividade anti-hiperalgésica da GABAP, uma vez que o tratamento por via i.pl. com o antagonista destes receptores, o AM281 (10 µg/20 µL, 15 min antes), reverteu parcialmente este efeito do fármaco sobre a hiperalgesia mecânica promovida pela LPNI.

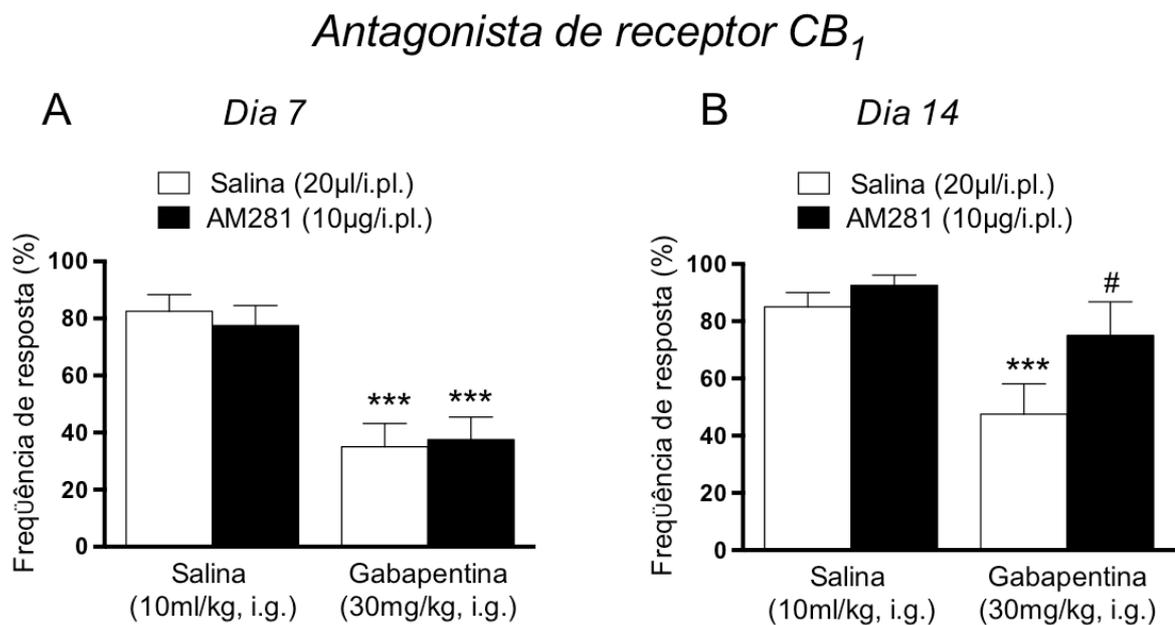
Embora este efeito não tenha sido observado no 7º. após o procedimento de lesão nervosa, quando utilizada esta via de administração o AM281, que não causou efeito isoladamente ($92,5 \pm 3,7\%$ de resposta) sobre a hiperalgesia decorrente da LPNI ($85,0 \pm 5,0\%$ de resposta), reverteu o efeito anti-hiperalgésico para a GABAP ($75,0 \pm 11,8\%$ de resposta) no 14º. dia após este procedimento ($47,5 \pm 10,6\%$ de resposta).

4.2 CONTRIBUIÇÃO DE RECEPTORES CB2 PERIFÉRICOS PARA O EFEITO ANTI-HIPERALGESICO DA GABAP

Resultado igual ao observado para os receptores CB1 foram observados para os receptores CB2 avaliados periféricamente. Os dados apresentados na Figura 7 mostram que o tratamento por via i.pl. com o antagonista destes receptores, o AM630 (4 µg/20 µL, 15 min antes), apenas no 14º. após a LPNI reverteu parcialmente este efeito da GABAP ($67,5 \pm 5,3\%$ de resposta) sobre a hiperalgesia mecânica promovida

pelo procedimento ($40,0 \pm 5,3\%$ de resposta). Ainda, o AM630 também não causou efeito isoladamente ($95,0 \pm 3,3\%$ de resposta) sobre a hiperalgisia decorrente da LPNI ($88,7 \pm 4,4\%$ de resposta).

Figura 6 – Influência do antagonista CB1, por via i.pl. sobre o efeito anti-hiperalgésico da GABAP no 7º. (painel A) e no 14º. (painel B) dia após a indução da lesão nervosa, no modelo de LPNI em camundongos.



Os dados são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), N = 8 animais. (*) representa a comparação com o grupo salina-salina; (#) denota a comparação com o grupo salina-GABAP. Análise de variância de uma via (one-way-ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

4.3 CONTRIBUIÇÃO DE RECEPTORES CB1 ESPINAIS PARA O EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA GABAP

Diferentemente do que ocorreu com o tratamento por via i.pl., os resultados apresentados na Figura 8 demonstram que os receptores espinais CB1 já contribuem para a atividade anti-hiperalgésica da GABAP desde o primeiro período de observação deste estudo.

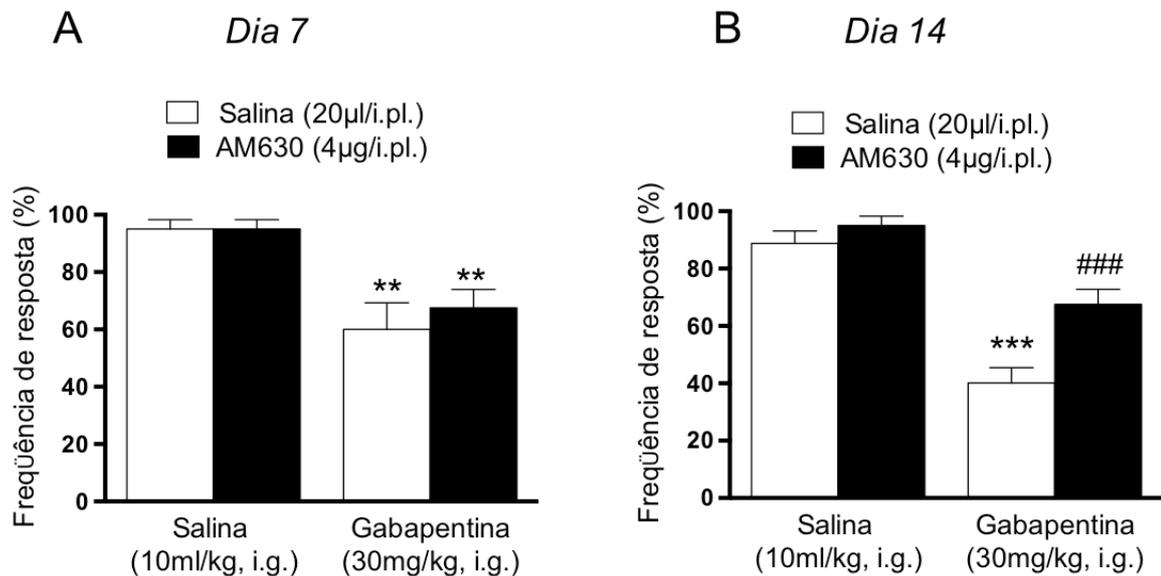
O tratamento por via i.t. com o antagonista destes receptores, o AM281 (2 µg/5 µL, 15 min antes), reverteu parcialmente o efeito anti-hiperalgésico da GABAP sobre a hiperalgisia mecânica promovida pela LPNI no 7º. dia após a LPNI (salina-GABAP: $35,0 \pm 8,2\%$ de resposta; AM281-GABAP: $70,0 \pm 5,3\%$ de resposta), sendo que esta

participação continuou a ser observada no 14^o. dia após este procedimento (salina-GABAP: $47,5 \pm 10,6\%$ de resposta; AM281-GABAP: $82,5 \pm 5,9\%$ de resposta).

Novamente, quando administrado nas mesmas condições por esta via, o antagonista não causou efeito isoladamente sobre a hiperalgesia decorrente da LPNI nem no 7^o. nem no 14^o. dia após a lesão nervosa.

Figura 7 – Influência do antagonista CB2, por via i.pl. sobre o efeito anti-hiperalgésico da GABAP no 7^o. (painel A) e no 14^o. (painel B) dia após a indução da lesão nervosa, no modelo de LPNI em camundongos.

Antagonista de receptor CB₂

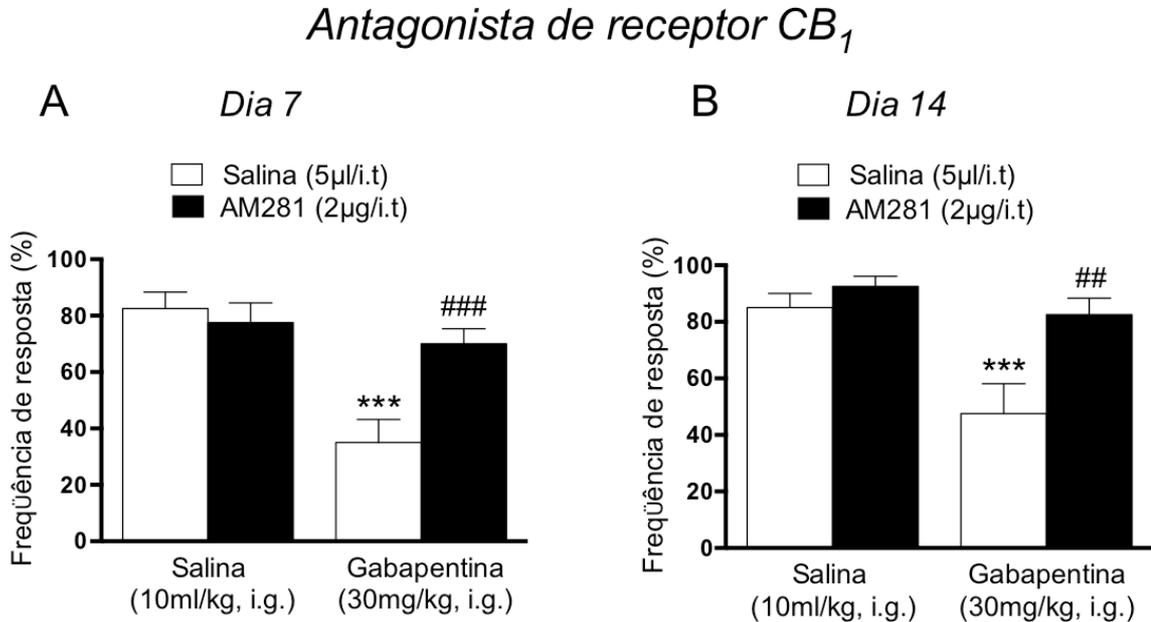


Os dados são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), N = 8 animais. (*) representa a comparação com o grupo salina-salina; (#) denota a comparação com o grupo salina-GABAP. Análise de variância de uma via (one-way-ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

4.4 CONTRIBUIÇÃO DE RECEPTORES CB2 ESPINAIS PARA O EFEITO ANTI-HIPERALGÉSICO DA GABAP

Diferentemente do que ocorreu com o tratamento por via periférica, os resultados apresentados na Figura 9 demonstram que os receptores CB2 espinais não contribuem para a atividade anti-hiperalgésica da GABAP em nenhum dos períodos de observação avaliados neste estudo.

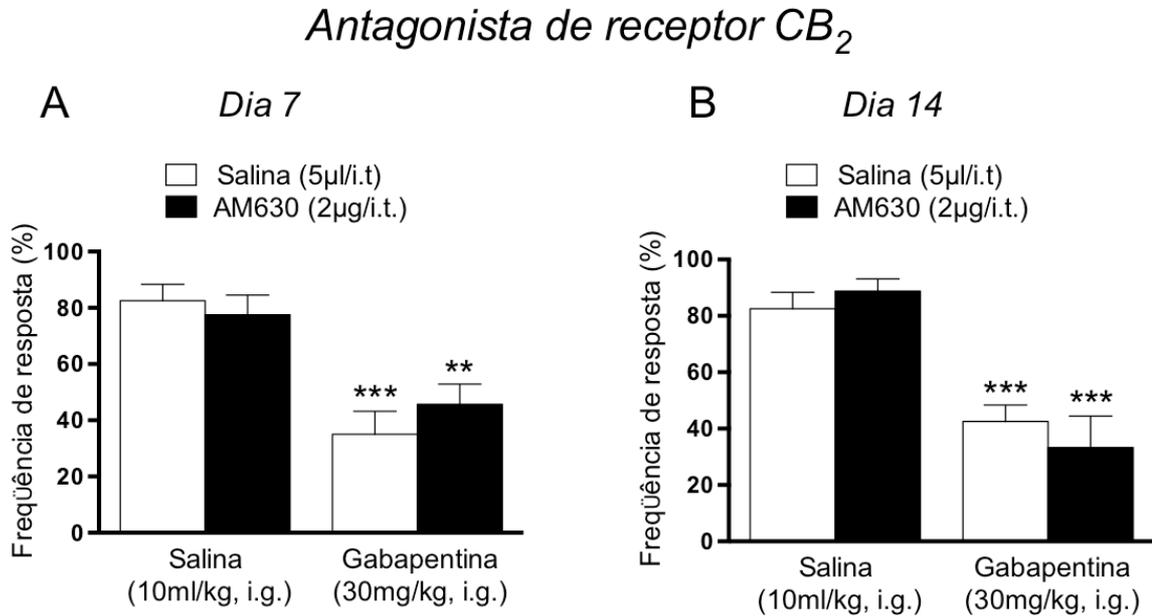
Figura 8 – Influência do antagonista CB1, por via i.t. sobre o efeito anti-hiperalgésico da GABAP no 7º. (painel A) e no 14º. (painel B) dia após a indução da lesão nervosa, no modelo de LPNI em camundongos.



Os dados são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), N = 8 animais. (*) representa a comparação com o grupo salina-salina; (#) denota a comparação com o grupo salina-GABAP. Análise de variância de uma via (one-way-ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

O tratamento por via i.t. com o antagonista destes receptores, o AM630 (2 μ g/5 μ L, 15 min antes), não reverteu o efeito anti-hiperalgésico da GABAP sobre a hiperalgesia mecânica promovida pela LPNI no 7º. dia após a LPNI (salina-GABAP: $35,0 \pm 8,2\%$ de resposta; AM281-GABAP: $45,7 \pm 7,2\%$ de resposta), sendo que esta ausência de influência também foi observada no 14º. dia após este procedimento (salina-GABAP: $47,5 \pm 10,6\%$ de resposta; AM281-GABAP: $82,5 \pm 5,9\%$ de resposta). Mais uma vez, quando administrado nas mesmas condições por esta via, o antagonista não causou efeito isoladamente sobre a hiperalgesia decorrente da LPNI nem no 7º. dia nem no 14º. dia após a lesão nervosa.

Figura 9 – Influência do antagonista CB₂, por via i.t. sobre o efeito anti-hiperalgésico da GABAP no 7^o. (painel A) e no 14^o. (painel B) dia após a indução da lesão nervosa, no modelo de LPNI em camundongos.



Os dados são expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM), N = 8 animais. (*) representa a comparação com o grupo salina-salina; (#) denota a comparação com o grupo salina-GABAP. Análise de variância de uma via (one-way-ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Um grande número de estudos pré-clínicos tem demonstrado o papel benéfico da GABAP em diferentes modelos de dor neuropática. Estes trabalhos demonstram a ação da GABAP na redução de comportamentos de dor associados a estímulos térmicos, mecânicos e químicos, tanto após sua administração oral, i.p. ou i.t.¹³. Neste mesmo sentido, estudo anterior realizado em nosso laboratório demonstrou a atividade antineuropática da GABAP, na dose de 30 mg/kg por via oral, no modelo de LPNI; além disso, foi registrada a participação do sistema adenosinérgico para esta ação da GABAP⁵². O presente estudo amplia estes achados ao observar que o sistema EC também contribui para esta ação da GABAP no mesmo modelo, tanto em nível central (medula espinal) quanto periférico (i.pl).

No presente estudo, o antagonista de receptores CB1 (AM281) quando administrado por via i.pl ou i.t. reverteu parcialmente o efeito anti-hiperalgésico promovido pela GABAP nos dias 7 e 14 após a LPNI, sugerindo a participação deste receptor em nível medular e periférico para o efeito da GABAP, sendo que outros estudos fortalecem esta ideia para outras modalidades terapêuticas. Recentemente, avaliando o efeito antineuropático da estimulação elétrica espinal em ratos após neuropatia induzida por LPNI, Sun e colegas⁵⁴ demonstraram que o efeito anti-hiperalgésico (hiperalgesia mecânica) induzido por esta modalidade terapêutica é amplificado pela administração do inibidor da receptação de EC, o LY2183240, sendo que a administração sistêmica do antagonista CB1, AM251, reverte esta amplificação. Já em publicação de Hama⁵⁵, foi utilizado o modelo de neuropatia induzida por lesão da medula espinal de ratos para avaliação do possível efeito agudo ou crônico de diferentes classes de fármacos sobre a hiperalgesia mecânica. Os autores registraram que o tratamento sistêmico prévio dos animais com antagonista específico de receptores CB1, o rimonabante, bloqueou o efeito antinociceptivo do CP 55.940, um análogo do agonista não-seletivo de receptores para EC.

Efeito semelhante também foi observado quando da administração central do antagonista de receptores CB1. Yang e colaboradores⁵⁶, utilizando modelo de ligação nervosa em ratos e camundongos, observaram que a administração espinal do antagonista deste receptor, o AM251, reverteu a redução da hipersensibilidade à estimulação mecânica induzida pela neuropatia, bem como os potenciais elétricos

registrados eletrofisiologicamente em fibras nociceptivas induzidas por estimulação elétrica espinal.

Por sua vez, Munawar e colaboradores⁵⁷, observaram em modelo animal de neuropatia induzida por zalcitabina, que mimetiza a neuropatia em pacientes que utilizam inibidores da transcriptase reversa, que tanto a ANA quanto o 2-AG tiveram efeito anti-hiperalgésico (hiperalgesia térmica) em camundongos, sendo que a atividade da ANA foi antagonizada pela administração sistêmica de antagonistas tanto de receptores CB1, quanto de CB2. Este último dado reforça os observados no presente estudo, de que o antagonista de receptores CB2, que não apresentou ação quando administrado por via i.t., reverteu o efeito anti-hiperalgésico da GABAP quando administrados por via i.pl. no 14º dia após a LPNI.

Desroches e colaboradores⁵⁸ avaliaram por diferentes abordagens a contribuição dos receptores canabinoides na ação periférica antinociceptiva da ANA e 2-AG ou dos inibidores das enzimas de degradação de EC em camundongos submetidos ao modelo de neuropatia induzida por LPNI. Os autores observaram que no 11º dia após a lesão nervosa, o tratamento local e ipsilateral com ANA, 2-AG, URB597 (inibidor da enzima de degradação da ANA) e URB602 (inibidor da enzima de degradação do 2-AG), isoladamente ou em diferentes combinações, produziram efeito anti-hiperalgésico (hiperalgesia mecânica), sendo que diferentes evidências sugeriram a contribuição de receptores CB1 e CB2 periféricos nesta ação. Em primeiro lugar, administrações contralaterais dos agentes testados anteriormente não promoveram atividade antinociceptiva, como ocorreu na primeira situação. Em segundo lugar, em animais *knock-out* para o receptor CB1, a injeção local de 2-AG e URB602 produziram efeito anti-hiperalgésico, enquanto a administração de ANA não promoveu esta ação. Finalmente, em animais *knock out* para receptores CB2 a administração periférica de ANA, 2-AG, URB597 e URB602 produziram efeito anti-hiperalgésico. Além disso, a administração de ANA + URB597 produziu efeito anti-hiperalgésico significativo em relação à ANA sozinha e a combinação de 2-AG com os dois inibidores enzimáticos não produziu aumento do efeito anti-hiperalgésico. Juntos, estes resultados confirmam que o efeito antinociceptivo do URB602 foi principalmente mediado por ativação indireta de receptores CB2, embora os receptores CB1 certamente estão envolvidos uma vez que o URB602 ainda causou antinocicepção nos animais *knock out* para receptores CB2.

Ainda reforçando os dados do presente estudo para o antagonista de receptores CB2, Martins e colaboradores⁵⁹ demonstra que o efeito anti-hiperalgésico (hiperalgesia mecânica) promovido pela imersão da pata de camundongos em água aquecida no modelo de dor induzida por injeção i.pl. de CFA (do inglês, *Complete Adjuvant of Freund*) foi antagonizado pela administração i.pl. de AM630, um antagonista do receptor CB2. Por outro lado, apesar desta ação periférica, os receptores CB2 espinais não contribuíram para a ação anti-hiperalgésica da GABAP no presente estudo.

Diferentemente dos presentes resultados, contudo, Fu e Taylor⁶⁰, reportaram que a administração i.t. de JWH-133, um agonista específico de receptores CB2, reduziu de maneira dependente de dose a hiperalgesia mecânica e térmica observada num modelo experimental de encefalomielite autoimune, sendo este efeito revertido pelo mesmo antagonista de receptores CB2 empregado no presente estudo, em doses semelhantes e também por via i.t., o AM630. Por sua vez, Lu e colaboradores⁶¹ utilizaram um modelo de dor relacionada a câncer ósseo induzido por inserção de células de carcinoma mamário no córtex ósseo da tíbia de ratos ósseo; neste modelo, os autores observaram que a administração i.t. de um agonista seletivo de receptores CB2, o JWH-015, promoveu efeito anti-hiperalgésico (hiperalgesia mecânica) observado no 7º. dia após a cirurgia, sendo este efeito revertido pelo tratamento prévio com o antagonista destes receptores, o AM630.

Nossos resultados quanto ao efeito anti-hiperalgésico do antagonista CB1 em nível central são condizentes com achados que mostram a expressão destes receptores fisiologicamente em nível central (corno dorsal e gânglio da raiz dorsal) e periférico¹⁵, sendo que estes podem ainda ter sua expressão aumentada após lesão nervosa¹⁴. Por outro lado, o fato de um efeito para o antagonista CB2 ter sido observado por via periférica pode ser explicada pelo fato de que na periferia, além de estar presente em terminações nervosas este receptor ocorre também em células imunes e em queratinócitos, a partir das quais pode reduzir a liberação de agentes nociceptivos¹⁴. Além disso, uma vez que a expressão de receptores é um processo dependente do tempo, isto poderia explicar porque em nosso estudo o antagonista AM630 teve efeito apenas no 14º dia após a LPNI. Apesar disto, outros autores sugeriram participação deste receptor, em nível de medula espinal e gânglio da raiz dorsal, na ação anti-hiperalgésica após lesão de nervo ciático⁶²; tais diferenças podem ser justificadas por conta de fatores tais como a modalidade sensorial avaliada, o nível

de EC produzido pela injúria, além da espécie e gênero de animais empregados nos estudos, entre outros.

Com relação aos mecanismos para o efeito anti-hiperalgésico observado no presente estudo para o antagonista CB1 em nível espinal, uma primeira possibilidade é de que estes receptores presentes no corno dorsal, estejam envolvidos num efeito potencializador da inibição da via ascendente nociceptiva. Alger⁶³, discorreu em seu artigo sobre “o que ainda não conhecemos” sobre as sinapses dos EC, visto que este sistema foi descoberto recentemente (década de 1990). O autor chama atenção para últimas descobertas sobre os circuitos pré e pós-sinápticos envolvendo o receptor CB1 entre neurônios na região do *nuclues accumbens*. Ainda segundo este autor, a ANA gerada pós-sinápticamente induziria uma forma de depressão da atividade pós-sináptica (depressão de longo prazo, do inglês *long-term depression*), além de atuar como um mensageiro retrógrado no neurônio pré-sináptico para modular inibitoriamente a liberação de GLU a partir do mesmo, com consequente depressão da atividade pré-sináptica. Se circuitos similares a este ocorrerem também no corno dorsal da medula espinal, esta ação dos EC no receptor CB1 resultaria em inibição da atividade da via ascendente nociceptiva.

A partir daí, pode-se levantar a hipótese de que a contribuição dos EC, atuando em receptores CB1 no corno dorsal da medula espinal, para a ação anti-hiperalgésica da GABAP no modelo de LPNI poderia resultar de uma potencialização da ação desta última em inibir a ascensão do estímulo nociceptivo pela via ascendente nociceptiva, ao ativar a via descendente inibitória da dor. Isto porque é conhecido o fato de que a GABAP em nível supraespinal, atua nas subunidades $\alpha 2\delta$ dos canais de Ca^{2+} de neurônios do LC, inibindo a liberação pré-sináptica de GABA que consequentemente promove a ativação desta via descendente inibitória¹³.

Outra possibilidade seria a de que esta potencialização do efeito entre GABA e EC se daria ao nível dos receptores TRPs presentes no corno dorsal da medula espinal e no gânglio da raiz dorsal, de forma a inibirem a passagem dos estímulos nociceptivos entre neurônios aferentes primários e secundários. Sabe-se que o aumento da atividade ectópica dos aferentes primários conduzidas para o corno dorsal da medula espinal pode contribuir para o efeito hiperalgésico observado em situações de dor neuropática¹².

Os receptores TRP, sub-tipo A1, (TRPA1) têm sido implicados como estruturas importantes na detecção de estímulos dolorosos pelos neurônios aferentes primários

em grande número de estudo⁶⁴. Em 2009, Bang e colegas⁶⁵ demonstraram que a GABAP é capaz de suprimir, em células em cultura, o aumento da atividade dos TRPA1 induzida por cinamaldeído. Por sua vez, os receptores TRP, subtipo V1 (TRPV1), são co-expressos nos neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos, juntamente com receptores CB1⁶⁶ e um novo conceito de que o *cross-talk* entre estes dois receptores poderiam promover diferentes impactos sobre a percepção dolorosa está imergindo⁴⁸. Isto provavelmente sugere que os receptores TRPs presentes no corno dorsal da medula ou nos gânglios da raiz dorsal poderiam ser alvos importantes para uma ação sinérgica entre a GABAP e os EC para promover inibição da atividade dos neurônios aferentes primários.

Além disso, com relação ao efeito encontrado no presente estudo para a administração i.pl. do antagonista CB2, poderia-se pensar um efeito somatório entre a ação central da GABAP com a ação do EC sobre células neuronais (CB1, como discutido anteriormente) e imunes na periferia. Isto porque é conhecido que os receptores CB2 localizados nas células imunológicas e nos queratinócitos reduzem a liberação de agentes pronociceptivos ou, ainda, aumentam a liberação de agentes antinociceptivos (opioides), conforme revisão recente de Maldonado e colaboradores¹⁴.

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos achados mostram uma importante contribuição dos receptores CB1, em nível espinal e periférico, bem como de receptores CB2 em nível periférico para o efeito antineuropático da GABAP no modelo de LPNI. Estes dados sugerem que os EC podem ser alvos de novas ferramentas farmacológicas para o tratamento da dor neuropática. Os resultados reforçam ainda a conclusão de recente revisão sistemática publicada por De Moulin e colaboradores⁷, indicando os gabapentinóides como agentes recomendados na primeira linha de tratamento desta condição, juntamente com os antidepressivos tricíclicos, e inibidores seletivos da recaptação da serotonina e noradrenalina.

6.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas a partir dos resultados encontrados, pode-se mencionar que em nível pré-clínico seria interessante investigar a expressão dos receptores CB1 e CB2 tanto central (medula espinal) quanto periféricamente (pata ipsilateral).

Além disso, a avaliação de um possível efeito sinérgico entre uma dose submáxima da GABAP e inibidores da degradação de ANA ou 2-AG, poderia trazer informações sobre qual o EC endógeno responsável pela ativação destes receptores no modelo avaliado neste trabalho.

Finalmente, futuros estudos clínicos avaliando fármacos agonistas destes receptores com maior número de pacientes, randomizado e duplo-cego poderiam fornecer subsídios para a formulação de um modelo de utilização adequada e segura dos canabinóides na dor neuropática.

REFERÊNCIAS

1. Gozzani JL. Fisiopatologia da Dor. In: Cavalcanti IL, Madalena ML, editors. Dor. Rio de Janeiro: Editora SAERJ; 2003. p. 13-35.
2. IASP. International Association for the Study of Pain. [Internet]. Washington: Classification of Chronic Pain. Acesso em 19/4/2017. Disponível em: <https://www.iasp-pain.org/>.
3. Bannister K, Kucharczyk M, Dickenson AH. Hopes for the Future of Pain Control. Pain Ther. 2017.
4. Chichorro JG, Porreca F, Sessle B. Mechanisms of craniofacial pain. Cephalalgia. 2017;37(7):613-626.
5. Torrance N, Lawson KD, Afolabi E, Bennett MI, Serpell MG, Dunn KM, et al. Estimating the burden of disease in chronic pain with and without neuropathic characteristics: does the choice between the EQ-5D and SF-6D matter? Pain. 2014;155(10):1996-2004.
6. Smith BH, Torrance N. Epidemiology of neuropathic pain and its impact on quality of life. Curr Pain Headache Rep. 2012;16(3):191-198.
7. Moulin D, Boulanger A, Clark AJ, Clarke H, Dao T, Finley GA, et al. Pharmacological management of chronic neuropathic pain: revised consensus statement from the Canadian Pain Society. Pain Res Manag. 2014;19(6):328-335.
8. Johansen A, Romundstad L, Nielsen CS, Schirmer H, Stubhaug A. Persistent postsurgical pain in a general population: prevalence and predictors in the Tromso study. Pain. 2012;153(7):1390-1396.
9. van Hecke O, Austin SK, Khan RA, Smith BH, Torrance N. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. Pain. 2014;155(4):654-662.
10. Inês M, Conde V, Cortez J, Costa AL, Gordo AC. Análise económica do tratamento de doentes com Dor Neuropática periférica em Portugal. Dor. 2014;22.
11. Sicras-Mainar A, Rejas-Gutierrez J, Perez-Paramo M, Navarro-Artieda R. Cost of treatment of peripheral neuropathic pain with pregabalin or gabapentin in routine clinical practice: impact of their loss of exclusivity. J Eval Clin Pract. 2017;23(2):402-412.
12. Colloca L, Ludman T, Bouhassira D, Baron R, Dickenson AH, Yarnitsky D, et al. Neuropathic pain. Nat Rev Dis Primers. 2017;3:17002.

13. Kukkar A, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Implications and mechanism of action of gabapentin in neuropathic pain. *Arch Pharm Res.* 2013;36(3):237-251.
14. Maldonado R, Banos JE, Cabanero D. The endocannabinoid system and neuropathic pain. *Pain.* 2016;157 Suppl 1:S23-32.
15. Dogrul A, Seyrek M, Yalcin B, Ulugol A. Involvement of descending serotonergic and noradrenergic pathways in CB1 receptor-mediated antinociception. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2012;38(1):97-105.
16. Burston JJ, Woodhams SG. Endocannabinoid system and pain: an introduction. *Proc Nutr Soc.* 2014;73(1):106-117.
17. Wijma AJ, van Wilgen CP, Meeus M, Nijs J. Clinical biopsychosocial physiotherapy assessment of patients with chronic pain: The first step in pain neuroscience education. *Physiother Theory Pract.* 2016;32(5):368-384.
18. Garland EL. Pain processing in the human nervous system: a selective review of nociceptive and biobehavioral pathways. *Prim Care.* 2012;39(3):561-571.
19. Woolf CJ. What is this thing called pain? *J Clin Invest.* 2010;120(11):3742-3744.
20. Meacham K, Shepherd A, Mohapatra DP, Haroutounian S. Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. *Curr Pain Headache Rep.* 2017;21(6):28.
21. von Hehn CA, Baron R, Woolf CJ. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron.* 2012;73(4):638-652.
22. Teixeira MJ, Teixeira WGJ, Santos FPS, Andrade DCA, Bezerra SL, Figueiró JB, et al. Epidemiologia clínica da dor músculo-esquelética. *Rev Med.* 2001;80(11):1-21.
23. Morton DL, Sandhu JS, Jones AK. Brain imaging of pain: state of the art. *J Pain Res.* 2016;9:613-624.
24. Peirs C, Seal RP. Neural circuits for pain: Recent advances and current views. *Science.* 2016;354(6312):578-584.
25. Gebhart GF, Bielefeldt K. Physiology of Visceral Pain. *Compr Physiol.* 2016;6(4):1609-1633.
26. Becerra L, Bishop J, Barmettler G, Kainz V, Burstein R, Borsook D. Brain network alterations in the inflammatory soup animal model of migraine. *Brain Res.* 2017;1660:36-46.
27. Farquhar-Smith WP. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Anaesth Intensive Care Med.* 2007;9(1):3-7.

28. Braz J, Solorzano C, Wang X, Basbaum AI. Transmitting pain and itch messages: a contemporary view of the spinal cord circuits that generate gate control. *Neuron*. 2014;82(3):522-536.
29. Duan B, Cheng L, Ma Q. Spinal Circuits Transmitting Mechanical Pain and Itch. *Neurosci Bull*. 2017.
30. Woolf CJ, Ma Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron*. 2007;55(3):353-364.
31. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009;139(2):267-284.
32. Mason P. Medullary circuits for nociceptive modulation. *Curr Opin Neurobiol*. 2012;22(4):640-645.
33. Roberson DP, Binshtok AM, Blas F, Bean BP, Woolf CJ. Targeting of sodium channel blockers into nociceptors to produce long-duration analgesia: a systematic study and review. *Br J Pharmacol*. 2011;164(1):48-58.
34. Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science*. 1965;150(3699):971-979.
35. Kirkpatrick DR, McEntire DM, Hamsch ZJ, Kerfeld MJ, Smith TA, Reisbig MD, et al. Therapeutic Basis of Clinical Pain Modulation. *Clin Transl Sci*. 2015;8(6):848-856.
36. Ji RR, Chamesian A, Zhang YQ. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. *Science*. 2016;354(6312):572-577.
37. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. *Rang & Dale Farmacologia*. 7th ed. São Paulo: Elsevier; 2012.
38. Gallagher HC, Gallagher RM, Butler M, Buggy DJ, Henman MC. Venlafaxine for neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015(8):Cd011091.
39. Alrashood ST. Carbamazepine. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*. 2016;41:133-321.
40. Mula M. Using anxiolytics in epilepsy: neurobiological, neuropharmacological and clinical aspects. *Epileptic Disord*. 2016;18(3):217-227.
41. Ortiz MI, Fernandez-Martinez E, Ponce-Monter H, Perez-Hernandez N, Macias A, Rangel-Flores E, et al. The peripheral antinociceptive effect of nalbuphine is associated with activation of ATP-sensitive K⁺ channels. *Proc West Pharmacol Soc*. 2007;50:72-74.
42. Ossipov MH, Morimura K, Porreca F. Descending pain modulation and chronification of pain. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2014;8(2):143-151.

43. Kremer M, Salvat E, Muller A, Yalcin I, Barrot M. Antidepressants and gabapentinoids in neuropathic pain: Mechanistic insights. *Neuroscience*. 2016;338:183-206.
44. Kilic FS, Sirmagul B, Yildirim E, Oner S, Erol K. Antinociceptive effects of gabapentin & its mechanism of action in experimental animal studies. *Indian J Med Res*. 2012;135(5):630-635.
45. Schmacher MA, Basnaun AI, Way WL. Analgésicos opioides e antagonistas. In: Katzung BG, Masters SB, editors. *Farmacologia básica e clínica*. Porto Alegre: McGraw-Hill Medical; 2014. p. 243-264.
46. Russo EB. Beyond Cannabis: Plants and the Endocannabinoid System. *Trends Pharmacol Sci*. 2016;37(7):594-605.
47. Mackie K. Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *J Neuroendocrinol*. 2008;20 Suppl 1:10-14.
48. Di Marzo V, De Petrocellis L. Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2012;367(1607):3216-3228.
49. Munro G, Jansen-Olesen I, Olesen J. Animal models of pain and migraine in drug discovery. *Drug Discov Today*. 2017.
50. Jaggi AS, Jain V, Singh N. Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol*. 2011;25(1):1-28.
51. Burma NE, Leduc-Pessah H, Fan CY, Trang T. Animal models of chronic pain: Advances and challenges for clinical translation. *J Neurosci Res*. 2017;95(6):1242-1256.
52. Martins DF, Prado MR, Daruge-Neto E, Batisti AP, Emer AA, Mazzardo-Martins L, et al. Caffeine prevents antihyperalgesic effect of gabapentin in an animal model of CRPS-I: evidence for the involvement of spinal adenosine A1 receptor. *J Peripher Nerv Syst*. 2015;20(4):403-409.
53. Martins DF, Mazzardo-Martins L, Cidral-Filho FJ, Gadotti VM, Santos AR. Peripheral and spinal activation of cannabinoid receptors by joint mobilization alleviates postoperative pain in mice. *Neuroscience*. 2013;255:110-121.
54. Sun L, Tai L, Qiu Q, Mitchell R, Fleetwood-Walker S, Joosten EA, et al. Endocannabinoid activation of CB1 receptors contributes to long-lasting reversal of neuropathic pain by repetitive spinal cord stimulation. *Eur J Pain*. 2017;21(5):804-814.
55. Hama AT, Pearson JP, Sagen J. Effects of repeated dosing with mechanistically distinct antinociceptive ligands in a rat model of neuropathic spinal cord injury pain. *Pharmacol Res Perspect*. 2014;2(2):e00034.

56. Yang F, Xu Q, Shu B, Tiwari V, He SQ, Vera-Portocarrero LP, et al. Activation of cannabinoid CB1 receptor contributes to suppression of spinal nociceptive transmission and inhibition of mechanical hypersensitivity by Abeta-fiber stimulation. *Pain*. 2016;157(11):2582-2593.
57. Munawar N, Oriowo MA, Masocha W. Antihyperalgesic Activities of Endocannabinoids in a Mouse Model of Antiretroviral-Induced Neuropathic Pain. *Front Pharmacol*. 2017;8:136.
58. Desroches J, Charron S, Bouchard JF, Beaulieu P. Endocannabinoids decrease neuropathic pain-related behavior in mice through the activation of one or both peripheral CB(1) and CB(2) receptors. *Neuropharmacology*. 2014;77:441-452.
59. Martins DF, Brito RN, Stramosk J, Batisti AP, Madeira F, Turnes BL, et al. Peripheral neurobiologic mechanisms of antiallodynic effect of warm water immersion therapy on persistent inflammatory pain. *J Neurosci Res*. 2015;93(1):157-166.
60. Fu W, Taylor BK. Activation of cannabinoid CB2 receptors reduces hyperalgesia in an experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model of multiple sclerosis. *Neurosci Lett*. 2015;595:1-6.
61. Lu C, Shi L, Sun B, Zhang Y, Hou B, Sun Y, et al. A Single Intrathecal or Intraperitoneal Injection of CB2 Receptor Agonist Attenuates Bone Cancer Pain and Induces a Time-Dependent Modification of GRK2. *Cell Mol Neurobiol*. 2017;37(1):101-109.
62. Hsieh GC, Pai M, Chandran P, Hooker BA, Zhu CZ, Salyers AK, et al. Central and peripheral sites of action for CB(2) receptor mediated analgesic activity in chronic inflammatory and neuropathic pain models in rats. *Br J Pharmacol*. 2011;162(2):428-440.
63. Alger BE. Endocannabinoids at the synapse a decade after the dies mirabilis (29 March 2001): what we still do not know. *J Physiol*. 2012;590(10):2203-2212.
64. Jaggi AS, Singh N. Therapeutic targets for the management of peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2011;10(5):589-609.
65. Bang S, Yoo S, Hwang SW. Gabapentin Attenuates the Activation of Transient Receptor Potential A1 by Cinnamaldehyde. *Exp Neurol*. 2009;18:1-7.
66. Binzen U, Greffrath W, Hennessy S, Bausen M, Saaler-Reinhardt S, Treede RD. Co-expression of the voltage-gated potassium channel Kv1.4 with transient receptor potential channels (TRPV1 and TRPV2) and the cannabinoid receptor CB1 in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*. 2006;142(2):527-539.