

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EFICÁCIA ANTI-HIPERALGÉSICA DAS ASSOCIAÇÕES DE
CETAMINA E SEUS ISÔMEROS COM IFENPRODIL
ADMINISTRADAS DE FORMA PREVENTIVA E POR VIA
SUBARACNÓIDEA EM RATOS E CÃES**

Eric Schmidt Rondon
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Fevereiro de 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**EFICÁCIA ANTI-HIPERALGÉSICA DAS ASSOCIAÇÕES DE
CETAMINA E SEUS ISÔMEROS COM IFENPRODIL
ADMINISTRADAS DE FORMA PREVENTIVA E POR VIA
SUBARACNÓIDEA EM RATOS E CÃES**

Eric Schmidt Rondon

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2009

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

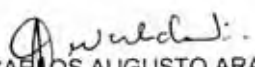
TÍTULO: EFICÁCIA ANTI-HIPERALGÉSICA DAS ASSOCIAÇÕES DE
CETAMINA E SEUS ISÔMEROS COM IFENPRODIL
ADMINISTRADAS DE FORMA PREVENTIVA E POR VIA
SUBARACNÓIDEA EM RATOS E CÃES

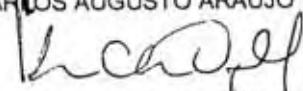
AUTOR: ERIC SCHMIDT RONDON

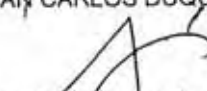
ORIENTADOR: Dr. CARLOS AUGUSTO ARAUJO VALADÃO

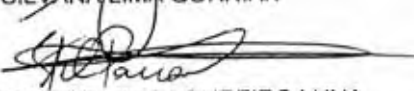
Co-Orientador(a): DR. CARLOS AMILCAR PARADA

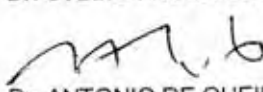
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em CIRURGIA
VETERINÁRIA pela Comissão Examinadora:


Dr. CARLOS AUGUSTO ARAUJO VALADÃO

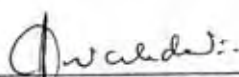

Dr. JUAN CARLOS DUQUE MORENO


Dra. SILVANA LIMA GÓRNIK


Dr. STELIO PACCA LOUREIRO LUNA


Dr. ANTONIO DE QUEIROZ NETO

Data da realização: 16 de fevereiro de 2009.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr. CARLOS AUGUSTO ARAUJO VALADÃO

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ERIC SCHMIDT RONDON – nasceu no Rio de Janeiro – RJ – Brasil, no dia 19 de março de 1973. No ano de 1995, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ e em 2000, obteve o título de Mestre em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Fluminense, Niterói – RJ. Iniciou suas atividades docentes em 2001 como professor de Técnica Cirúrgica e Anestesiologia Veterinária na Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro – RJ, função ocupada até 2002. No ano seguinte, atuou como professor nas disciplinas de Farmacologia e Anestesiologia Veterinárias na Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal, Campo Grande – MS e professor substituto de Clínica Médica e Terapêutica de Pequenos Animais na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), na mesma cidade. No período entre 2004 e 2006, como professor assistente, ministrou aulas nas disciplinas de Farmacologia e Farmacologia Básica na UFMS. Em 2005 ingressou no programa de pós-graduação, em nível de doutorado, em Cirurgia Veterinária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Desde 2006 é professor assistente de Semiologia Veterinária na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia “Professor Haroldo Sampaio Ribeiro” da UFMS.

“Se, a princípio, a idéia não é absurda, então não há esperança para ela.”
(Albert Einstein)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho àqueles que contribuíram para a sua realização de forma indireta, mas indispensável, e aos que proveram as bases para que eu pudesse construir uma educação formal.

À minha esposa Bebel e aos nossos filhos Pedro e Júlia...
...aos meus pais, Rose e Selmo...
...à minha avó Alice e à tia Mary.

Usufruindo da licença poética, aqui permitida, transcrevo para vocês que tanto sofreram com minhas inúmeras viagens:

“O tempo é muito lento para os que esperam
Muito rápido para os que têm medo
Muito longo para os que lamentam
Muito curto para os que festejam
Mas, para os que amam, o tempo é eterno”.
(William Shakespeare)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão pela orientação, aprendizado, companheirismo e amizade.

Ao Prof. Dr. Carlos Amilcar Parada pela co-orientação, aprendizado e amizade.

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha e ao Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira por permitirem a execução de parte deste trabalho no laboratório de dor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP/USP).

Aos técnicos do laboratório de dor (FMRP/USP), Ieda Regina dos Santos Schivo e Sérgio Roberto Rosa que, gentilmente, doaram parte de seu tempo ao meu aprendizado.

Ao colega Prof. Dr. Luís Fernando Ferrari pela amizade e supervisão em meu treinamento nos métodos desenvolvidos com ratos.

Aos colegas, pós-graduandos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/Unesp), Maristela de Cássia Seldo Lopes e André Escobar e ao residente em anestesiologia veterinária (FCAV/Unesp) Alessandro Rodrigues de Carvalho Martins pelos procedimentos anestésiológicos realizados nos cães.

Aos professores da UFMS e amigos Cícero Lacerda Farias, Carlos Stief Neto, Ademar Macedo dos Santos e Arley Coelho da Silveira.

À Izabel Valdes Batista, funcionária do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFMS.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
LISTA DE SÍMBOLOS.....	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO.....	xix
SUMMARY	xx
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	2
2.1. Conceituação de dor, nocicepção e analgesia.....	2
2.2. Indicadores da sensação de dor e da analgesia.....	3
2.3. Fisiologia da dor.....	4
2.4. Fisiopatologia da dor.....	12
2.5. Analgesia e fármacos analgésicos.....	14
CAPÍTULO 2 – EFICÁCIA ANTI-HIPERALGÉSICA DA ASSOCIAÇÃO DE CETAMINA E SEUS ISÔMEROS COM IFENPRODIL.....	23
RESUMO	23
SUMMARY	24
1. Introdução	25
2. Material e métodos.....	27
2.1. Preparo dos animais	28
2.2. Delineamento experimental	28
2.2.2. Aplicação dos fármacos e do estímulo hiperalgésico	31
3. Resultados	34
3.1. Determinação da potência relativa dos fármacos	34
3.2. Isobologramas	41
4. Discussão.....	57
5. Conclusões	62

CAPÍTULO 3 – EFICÁCIA ANTI-HIPERALGÉSICA DA ASSOCIAÇÃO DE IFENPRODIL COM CETAMINA RACÊMICA EM CÃES	63
RESUMO	63
SUMMARY	64
1. Introdução	65
2. Material e métodos.....	66
2.1. Preparo dos animais	67
2.2. Delineamento experimental	67
3. Resultados	75
3.1. Escores de sedação	75
3.2. Escores de claudicação	75
3.3. Freqüências cardíacas.....	75
3.4. Freqüências respiratórias.....	75
3.5. Testes com filamentos de von Frey	78
3.6. Testes com planímetro	78
4. Discussão.....	81
5. Conclusão	84
REFERÊNCIAS.....	85
APÊNDICES.....	103
Anexo 1. Tabela de conversão do número do filamento de von Frey para o valor da força expressa em gramas	103
Anexo 2. Valores das freqüências cardíacas aferidas em cães tratados com CET+SAL ou IFE+CET entre 1 h e 24 h após o estímulo cirúrgico.....	104
Anexo 3. Valores das freqüências respiratórias aferidas em cães tratados com CET+SAL ou IFE+CET entre 1 h e 24 h após o estímulo cirúrgico.....	105
Anexo 4. Variação (Δ) nas reações de retirada (g) detectadas pelo teste com filamentos de von Frey entre 1 h e 24 h após a incitação cirúrgica em cães pré-tratados com CET+SAL ou IFE+CET.	106

Anexo 5. Variação (Δ) nas áreas de apoio (cm ²) detectadas pelo teste com planímetro entre 1 h e 24 h após a incitação cirúrgica em cães pré-tratados com CET+SAL ou IFE+CET.....	107
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
Bpm	Batimentos cardíacos por minuto
CET	Cetamina racêmica
CPP	3-(-2-carboxipiperazina-4-propil)1-fosfato
CR	Cetamina R(-)
CS	Cetamina S(+)
Dp	Desvios padrão
EC ₅₀	Concentração de um fármaco que produz 50% da resposta entre um valor máximo e um mínimo
ECLD	Escore de claudicação
ES	Escore de sedação
FC	Frequência cardíaca
<i>f</i>	Frequência respiratória
GMP _c	Guanosina monofosfato cíclica
IASP	Associação internacional para o estudo da dor
IFE	Ifenprodil
IH	Intensidade hiperalgésica
IM	Intramuscular
IP	Intraperitoneal
IT	Intratecal
IV	Intravenosa
KA	Cainato
L3	3 ^a vértebra lombar
L5	5 ^a vértebra lombar
L6	6 ^a vértebra lombar
LRA	Limiar de resposta aversiva
LTP	Potencialização a longo prazo
NaCl	Cloreto de sódio
NMDA	N-metil-D-aspartato

NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
NRM	Núcleo magno da rafe
PAG	Área cinzenta pariaquedutal
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGs	Prostaglandinas
Pp	Parcela perdida
RNMDA	Receptor N-metil-D-aspartato
RNMDAs	Receptores N-metil-D-aspartato
SC	Subcutânea
SNC	Sistema nervoso central
SRD	Sem raça definida
VO	Via oral
vs.	Versus

LISTA DE SÍMBOLOS

S(+)	Isômero dextrorrotatório
R(-)	Isômero levorotatório
h	Horas
min	Minutos
Δ (δ)	Letra grega delta
β	Letra grega beta
5-HT	5-Hidroxitriptamina
ϵ	Letra grega epsílon
ng	Nanogramas
α	Letra grega alfa
μ	Letra grega mü
Mg ⁺²	Íon Magnésio
Ca ⁺²	Íon Cálcio
mg	Miligramas
kg	Quilogramas
nmol	Nanomolar
σ	Letra grega sigma
mL	Mililitros
μ g	Microgramas
μ L	Microlitros

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 2 – EFICÁCIA ANTI-HIPERALGÉSICA DA ASSOCIAÇÃO DE CETAMINA E SEUS ISÔMEROS COM IFENPRODIL

Tabela 1. Relação nominal dos fármacos, suas respectivas abreviaturas – convencionadas para este experimento – e doses utilizadas na determinação das potências relativas. Os medicamentos foram injetados por via intratecal em ratos Wistar, 30 min antes do estímulo com PGE ₂ . O peso corporal base considerado para o cálculo das doses foi 200 g.	32
Tabela 2. Relação nominal das combinações farmacológicas testadas com as respectivas doses (µg) e abreviaturas convencionadas. O pré-tratamento refere-se à administração do fármaco cuja dose foi mantida fixa. O tratamento consistiu na aplicação de doses variáveis do segundo fármaco da associação. Os medicamentos foram injetados por via intratecal em ratos Wistar, 30 min antes do estímulo com PGE ₂ . O peso corporal base considerado para o cálculo das doses foi 200 g.	34
Tabela 3. Variação (Δ) das reações de retirada (g) em resposta às administrações de cinco doses, por via IT (intratecal), de 20 µL de CET (cetamina racêmica), 30 min antes do estímulo hiperalgésico com PGE ₂ (100 ng em 100 µL, por via intraplantar). No grupo salina aplicou-se 20 µL (por via IT) de solução NaCl a 0,9%. Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos. As doses foram calculadas a partir do peso corporal base de 200 g.	37
Tabela 4. Variação (Δ) das reações de retirada (g) em respostas às administrações de cinco doses por via IT (intratecal) de 20 µL de CR [cetamina R(-)], 30 min antes do estímulo hiperalgésico	

com PGE ₂ (100 ng em 100 µL, por via intraplantar). No grupo salina aplicou-se 20 µL (por via IT) de solução NaCl a 0,9%. Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos. As doses foram calculadas a partir do peso corporal base de 200 g.....	38
Tabela 5. Variação (Δ) das reações de retirada (g) em resposta às administrações de cinco doses, por via IT (intratecal), de 20 µL de CS [cetamina S(+)], 30 min antes do estímulo hiperalgésico com PGE ₂ (100 ng, 100 µL, por via intraplantar). No grupo salina aplicou-se 20 µL (por via IT) de solução NaCl a 0,9%. Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos. As doses foram calculadas a partir do peso corporal base de 200 g.	39
Tabela 6. Variação (Δ) das reações de retirada (g) em resposta às administrações de quatro doses, por via IT (intratecal), de 20 µL de IFE (ifenprodil), 30 min antes do estímulo hiperalgésico com PGE ₂ (100 ng, 100 µL). No grupo salina aplicou-se 20 µL (por via IT) de solução NaCl a 0,9%. Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos. As doses foram calculadas a partir do peso corporal base de 200 g.....	40
Tabela 7. Variação (Δ) das reações de retirada (g) em resposta às administrações de cetamina recêmica (20 µg), ifenprodil (0,6 e 2 µg) e suas associações. No grupo salina aplicou-se solução NaCl a 0,9%. O volume final de injeção, por via intratecal, foi ajustado para 20 µL. A PGE ₂ (100 ng em 100 µL, por via intraplantar) foi aplicada 30 min após o último tratamento. Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos. Peso corporal base: 200 g.	43
Tabela 8. Respostas – em % de inibição hiperalgésica – às administrações, por via intratecal, de cetamina racêmica (20 µg), ifenprodil (0,6 e 2 µg) e suas associações. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.....	44

Tabela 9. Variação (Δ) das reações de retirada (g) em resposta às administrações de ifenprodil (0,6 μ g), cetamina racêmica (6 e 20 μ g) e suas associações. No grupo salina aplicou-se solução NaCl a 0,9%. O volume final de injeção, por via intratecal, foi ajustado para 20 μ L. A PGE ₂ (100 ng em 100 μ L, por via intraplantar) foi aplicada 30 min após o último tratamento. Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos. Peso corporal base: 200 g.....	45
Tabela 10. Respostas – em % de inibição hiperalgésica – às administrações, por via intratecal, de ifenprodil (0,6 μ g), cetamina racêmica (6 e 20 μ g) e suas associações. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.....	46
Tabela 11. Variação (Δ) das reações de retirada (g) em resposta às administrações de 20 μ g de cetamina R(-), ifenprodil (0,6 e 2 μ g) e suas associações. No grupo salina aplicou-se solução NaCl a 0,9%. O volume final de injeção, por via intratecal, foi ajustado para 20 μ L. O estímulo hiperalgésico aplicado foi uma injeção intraplantar de PGE ₂ (100 ng em 100 μ L, por via intraplantar). Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos. Peso corporal base: 200 g.....	48
Tabela 12. Variação (Δ) das reações de retirada (g) em resposta às administrações de ifenprodil (0,6 μ g), forma R(-) da cetamina (6 e 20 μ g) e suas associações. No grupo salina aplicou-se solução NaCl a 0,9%. O volume final de injeção, por via intratecal, foi ajustado para 20 μ L. O estímulo hiperalgésico aplicado foi uma injeção intraplantar de PGE ₂ (100 ng em 100 μ L, por via intraplantar). Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos. Peso corporal base: 200 g.....	49
Tabela 13. Respostas – em % de inibição hiperalgésica – às administrações, por via intratecal, de ifenprodil (0,6 μ g), forma	

R(-) da cetamina (20 e 60 µg) e suas associações. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.....	50
Tabela 14. Variação (Δ) das reações de retirada (g) em resposta às administrações de 20 µg de cetamina S (+), ifenprodil (0,6 e 2 µg) e suas associações. No grupo salina aplicou-se solução NaCl a 0,9%. O volume final de injeção, por via intratecal, foi ajustado para 20 µL. O estímulo hiperalgésico aplicado foi uma injeção intraplantar de PGE ₂ (100 ng em 100 µL, por via intraplantar). Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos. Peso corporal base: 200 g.....	52
Tabela 15. Respostas – em % de inibição hiperalgésica – às administrações, por via intratecal, da forma S(+) da cetamina (20 µg), ifenprodil (0,6 e 2 µg) e suas associações. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.....	53
Tabela 16. Variação (Δ) das reações de retirada (g) em resposta às administrações de ifenprodil (0,6 µg), de 6 e 20 µg de cetamina S(+) e suas associações. No grupo salina aplicou-se solução NaCl a 0,9%. O volume final de injeção, por via intratecal, foi ajustado para 20 µL. O estímulo hiperalgésico aplicado foi uma injeção intraplantar de PGE ₂ (100 ng em 100 µL, por via intraplantar). Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos. Peso corporal base: 200 g.....	54
Tabela 17. Respostas – em % de inibição hiperalgésica – às administrações, por via intratecal, de ifenprodil (0,6 µg), forma S(+) da cetamina (20 e 60 µg) e suas associações. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.....	55

CAPÍTULO 3 – EFICÁCIA ANTI-HIPERALGÉSICA DA ASSOCIAÇÃO DE IFENPRODIL COM CETAMINA RACÊMICA EM CÃES

Tabela 1. Escore de sedação: a primeira coluna descreve o comportamento a ser observado no animal e a outra, atribui
--

um valor. Estes parâmetros foram utilizados na avaliação do estado de alerta dos cães empregados no experimento.....	68
Tabela 2. Escore de claudicação onde a primeira coluna descreve o tipo de apoio apresentado pelo animal e a outra, atribui um valor correspondente. Estes parâmetros foram utilizados na avaliação do nível de apoio do membro dos cães antes e após a incisão do coxim metatársico.	69
Tabela 3. Médias aritméticas das frequências cardíacas de cães submetidos aos tratamentos com CET+SAL (cetamina racêmica + solução NaCl a 0,9%) ou IFE+CET (ifenprodil + cetamina racêmica) e avaliados no período entre 60 e 1440 min após o estímulo cirúrgico.....	76
Tabela 4. Médias aritméticas das frequências respiratórias de cães submetidos aos tratamentos com CET+SAL (cetamina racêmica + solução NaCl a 0,9%) ou IFE+CET (ifenprodil + cetamina racêmica) e avaliados no período entre 60 e 1440 min após o estímulo cirúrgico.....	77
Tabela 5. Médias das variações (Δ) nas reações de retirada (g) em resposta aos tratamentos com cetamina racêmica e solução de NaCl à 0,9% ou ifenprodil e cetamina racêmica detectadas pelo teste com filamentos de von Frey entre 1 e 24 h após o estímulo cirúrgico em cães.....	79
Tabela 6. Médias das variações (Δ) nas áreas de apoio (cm ²) em resposta aos tratamentos com cetamina racêmica e solução de NaCl a 0,9% ou ifenprodil e cetamina racêmica detectadas pelo teste com planímetro entre 1 e 24 h após o estímulo cirúrgico em cães.	80

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Figura 1. Nociceptor: A) os componentes operacionais do nociceptor incluem um terminal periférico que inerva tecidos alvo e faz a transdução do estímulo nóxi, um axônio que conduz potenciais de ação da periferia para o SNC, um corpo celular na raiz do gânglio dorsal e um terminal no SNC onde a informação é transferida para neurônios de segunda ordem; B) a transdução é mediada por canais iônicos com transdutores de alto limiar que despolarizam o terminal periférico ativando canais de sódio voltagem-dependentes. A transmissão ocorre em resposta ao influxo de cálcio no terminal central liberando glutamato assim como múltiplas moléculas moduladoras e sinalizadoras e está submetido tanto a influências excitativas quanto inibidoras. Adaptado a partir de WOOLF & MA (2007).	6
--	---

CAPÍTULO 2 – EFICÁCIA ANTI-HIPERALGÉSICA DA ASSOCIAÇÃO DE CETAMINA E SEUS ISÔMEROS COM IFENPRODIL

Figura 1. Caixas em acrílico com compartimentos individuais: A) os ratos foram colocados em boxes individuais para ambientarem-se durante 20 min. Abaixo do piso, em tela de arame, foi posicionado um espelho em posição inclinada; B) em destaque, a imagem especular demonstrando a visão do experimentador durante a realização dos testes. Ratos Wistar, machos, peso corporal entre 180 e 200 g.	29
Figura 2. Analgesímetro digital. A ilustração mostra o equipamento utilizado para avaliar a hiperalgesia. Uma ponteira de polipropileno com 0,7 mm ² (1) foi fixada a um transdutor de	

- força (2) ligado ao aparelho de leitura (3) que converteu a força aplicada para valores em gramas.30
- Figura 3. Posicionamento correto para o teste. Para que a avaliação com analgesímetro digital pudesse ser feita, o rato deveria estar em decúbito esterno-abdominal e em estado de alerta. A ponteira do aparelho foi aplicada entre as malhas da grade no centro da superfície plantar esquerda (círculo em vermelho). Ratos Wistar, machos, peso corporal entre 180 e 200 g.30
- Figura 4 . Gráficos dose vs. resposta para CET (cetamina racêmica). Os valores representam as médias aritméticas com seus respectivos erros padrão: A) na representação em colunas, as doses superiores a 30 µg foram anti-hiperalgésicas e a de 600 µg foi analgésica; houve diferença significativa entre os efeitos produzidos a partir de 60 µg confrontados com os obtidos por 30 µg.; B) a curva, calculada por regressão linear das doses, demonstra os valores médios encontrados confrontados com os intervalos de confiança (95%). Ratos machos da linhagem Wistar. Peso corporal base: 200 g.37
- Figura 5. Gráficos dose vs. resposta para CR. Os valores representam as médias aritméticas com seus respectivos erros padrão: A) na representação em colunas, as doses superiores a 60 µg foram efetivas tendo havido diferença significativa entre os efeitos produzidos por 200 µg vs. 60 µg, 400 µg vs. 200 µg e 600 µg vs. 400 µg; B) a curva, obtida a partir da regressão linear das doses, demonstra os valores médios encontrados confrontados com os intervalos de confiança (95%). Ratos machos da linhagem Wistar. Peso corporal base: 200 g.38
- Figura 6. Gráficos dose vs. resposta para CS. Os valores representam as médias aritméticas com seus respectivos erros padrão: A) na representação em colunas, as doses superiores a 20 µg foram efetivas tendo havido diferença significativa entre os

- efeitos produzidos por 30 μg vs. 20 μg e 60 μg vs. 30 μg ; B) a curva, obtida a partir da regressão linear das doses, demonstra os valores médios encontrados confrontados com os intervalos de confiança (95%). Ratos machos da linhagem Wistar. Peso corporal base: 200 g.39
- Figura 7. Gráficos dose vs. resposta para ifenprodil. Os valores representam as médias aritméticas com seus respectivos erros padrão: A) na representação em colunas, as doses superiores a 2 μg foram efetivas tendo havido diferença significativa entre os efeitos produzidos por 20 μg vs. 2 μg ; B) a curva, obtida a partir da regressão linear das doses, demonstra os valores médios encontrados confrontados com os intervalos de confiança (95%). Ratos machos da linhagem Wistar. Peso corporal base: 200 g.40
- Figura 8. Isoblograma CET+IFE. Uma dose não efetiva de CET (20 μg) foi empregada como pré-tratamento a duas doses de IFE (0,6 e 2 μg). A subdose de IFE tornou-se efetiva após o uso de CET e a dose subliminar, teve seu efeito melhorado. A associação farmacológica demonstrou ser sinérgica. Fármacos aplicados por via IT, 30 min antes do estímulo hiperalgésico (PGE_2 , 100 ng em 100 μL por via intraplantar). Ratos Wistar machos. Peso corporal base: 200 g.43
- Figura 9. Representação gráfica, em valores percentuais, do isoblograma CET+IFE. Cinco tratamentos são confrontados. Ao se somar a inibição percentual promovida pelos agentes usados de forma isolada constata-se que sua associação produz efeito superior. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.44
- Figura 10. Isoblograma IFE+CET. Uma dose não efetiva de IFE (0,6 μg) foi utilizada como pré-tratamento a duas doses de CET (6 e 20 μg). As subdoses de CET tornaram-se efetivas após o

- uso de IFE. A associação farmacológica demonstrou ser de sinergismo. Fármacos aplicados por via IT, 30 min antes do estímulo hiperalgésico (PGE_2 , 100 ng em 100 μL por via intraplantar). Ratos Wistar machos. Peso corporal base: 200 g.....45
- Figura 11. Representação gráfica, em valores percentuais, do isoblograma IFE+CET. Cinco tratamentos são confrontados. Ao se somar a inibição percentual promovida pelos agentes usados de forma isolada constata-se que sua associação produz efeito superior. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.....46
- Figura 12. Isoblograma CR+IFE. Uma dose não efetiva de CR (20 μg) foi utilizada como pré-tratamento a duas doses de IFE (0,6 e 2 μg). Não houve diferença entre os tratamentos com fármacos utilizados isoladamente ou em associação. Fármacos aplicados por via IT, 30 min antes do estímulo hiperalgésico (PGE_2 , 100 ng em 100 μL por via intraplantar). Ratos Wistar machos. Peso corporal base: 200 g.....48
- Figura 13. Isoblograma IFE+CR. Uma dose não efetiva de IFE (0,6 μg) foi utilizada como pré-tratamento a duas doses de CR (20 e 60 μg). A subdose de IFE tornou efetivas as doses de CR. A associação farmacológica demonstrou ser de sinergismo. Fármacos aplicados por via IT, 30 min antes do estímulo hiperalgésico (PGE_2 , 100 ng em 100 μL por via intraplantar). Ratos Wistar machos. Peso corporal base: 200 g.49
- Figura 14. Representação gráfica, em valores percentuais, do isoblograma IFE+CR. Cinco tratamentos são confrontados. Ao se somar a inibição percentual promovida pelos agentes usados de forma isolada constata-se que sua associação produz efeito superior. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.....50

- Figura 15. Isoblograma CS+IFE. A dose aplicada de CS (20 μ g) foi utilizada como pré-tratamento a duas doses de IFE (0,6 e 2 μ g) potencializando a ação destas. A associação farmacológica demonstrou ser de sinergismo. Fármacos aplicados por via IT, 30 min antes do estímulo hiperalgésico (PGE₂, 100 ng em 100 μ L por via intraplantar). Ratos Wistar machos. Peso corporal base: 200 g.....52
- Figura 16. Representação gráfica, em valores percentuais, do isoblograma CS+IFE. Cinco tratamentos são confrontados. Ao se somar a inibição percentual promovida por CS 20 e IFE 0,6 constata-se que sua associação produz efeito superior a soma dos efeitos isolados. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.....53
- Figura 17. Isoblograma IFE+CS. Uma dose não efetiva de IFE (0,6 μ g) foi utilizada como pré-tratamento a duas doses de CS (6 e 20 μ g). A subdose de CS tornou-se efetiva após o uso de IFE e a dose subliminar teve seu efeito melhorado. A associação farmacológica demonstrou ser de sinergismo. Fármacos aplicados por via IT, 30 min antes do estímulo hiperalgésico (PGE₂, 100 ng em 100 μ L por via intraplantar). Ratos Wistar machos. Peso corporal base: 200 g.....54
- Figura 18. Representação gráfica, em valores percentuais, do isoblograma IFE+CS. Cinco tratamentos são confrontados. Ao se somar a inibição percentual promovida pelos agentes usados de forma isolada constata-se que sua associação produz efeito superior. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.....55
- Figura 19. Comparação entre a administração prévia de CET ou de IFE:
A) o uso de IFE seguido por CET foi significativamente melhor que o inverso, B) apresentando diferença de 22,59% na

inibição hiperalgésica. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.....	56
Figura 20. Comparação entre a administração prévia de CR ou de IFE: A) o uso de IFE seguido por CR foi significativamente melhor que o inverso, B) apresentando diferença de 19,54% na inibição hiperalgésica. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.....	56
Figura 21. Comparação entre a administração prévia de CS ou de IFE: não houve diferença significativa entre o pré-tratamento com CS ou com IFE. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.	57
 CAPÍTULO 3 – EFICÁCIA ANTI-HIPERALGÉSICA DA ASSOCIAÇÃO DE IFENPRODIL COM CETAMINA RACÊMICA EM CÃES	
Figura 1. Avaliação da sensibilidade cutânea com filamentos de von Frey: A) com o animal em decúbito e o membro locomotor apoiado, mas não contido pelo examinador, aplicou-se o filamento; o posicionamento do experimentador impediu que o canino visualizasse a execução do teste; B) na imagem pormenorizada, os pontos brancos representam os locais avaliados distanciados entre si como pontos cardinais em torno da futura ferida cirúrgica (linha vermelha). As medidas foram validadas apenas se os valores encontrados coincidissem nos quatro pontos.	70
Figura 2. Pista para impressão das pegadas dos cães. A) As três primeiras pegadas (círculos em verde), foram desconsideradas e a 4ª (círculo em vermelho), foi utilizada; B) no detalhe, a impressão do coxim metatársico na 4ª pegada a ser decalcada, para mensuração em planímetro.	72

- Figura 3. A punção subaracnóidea, realizada L6 e L5, foi confirmada pela drenagem de líquido cefalorraquidiano. Os cães estavam anestesiados com propofol, aplicado por via intravenosa.....73
- Figura 4. Valores médios das frequências cardíacas de cães, após aplicação dos protocolos CET+SAL (cetamina racêmica + solução NaCl 0,9%) e IFE+CET (ifenprodil + cetamina racêmica) entre 1 h e 24 h do período pós-cirúrgico. Não foram encontradas diferenças dentro e entre os tratamentos.....76
- Figura 5. Valores médios das frequências respiratórias nos dois protocolos farmacológicos testados em cães. Não houve diferença significativa ao serem confrontados os tratamentos CET+SAL e IFE+CET em um determinado tempo bem como os valores basais não variaram significativamente entre 1 h e 24 h do período pós-cirúrgico.....77
- Figura 6. Variação (Δ) das reações de retirada (g) obtidas a partir da aplicação dos filamentos de von Frey em cães. O confronto entre os dois protocolos, considerando-se um determinado tempo de avaliação, demonstrou que o uso associado de fármacos resultou numa maior redução do Δ (g). Este achado repetiu-se em todos tempos testados. Estão representados as médias aritméticas e respectivos erros padrão.....79
- Figura 7. Variação (Δ) das áreas de apoio (cm²) dos membros pélvicos de cães submetidos a planimetria. O confronto entre os dois protocolos, considerando-se um determinado tempo de avaliação, demonstrou que o uso associado de fármacos resultou em menor Δ . Este achado repetiu-se em todos tempos testados. Estão representados as médias aritméticas e respectivos erros padrão.....80

EFICÁCIA ANTI-HIPERALGÉSICA DAS ASSOCIAÇÕES DE CETAMINA E SEUS ISÔMEROS COM IFENPRODIL ADMINISTRADAS DE FORMA PREVENTIVA E POR VIA SUBARACNÓIDEA EM RATOS E CÃES

RESUMO – Em dois ensaios testou-se a eficácia da cetamina e do ifenprodil administrados preventivamente e por via subaracnóidea, no controle da hiperalgesia induzida ($p \leq 0,05$). As provas farmacológicas utilizaram ratos Wistar em duas etapas: determinação da potência relativa e isobologramas. O estímulo hiperalgésico – injeção intraplantar de prostaglandina E_2 – foi avaliado com um analgesímetro digital. Todos fármacos apresentaram ação anti-hiperalgésica com diferentes valores de EC_{50} , crescentes nesta ordem: ifenprodil, cetamina S(+), cetamina racêmica e cetamina R(-). O ifenprodil potencializou a ação da cetamina e seus isômeros e foi potencializado pelo racemato e a forma S(+). Os resultados embasaram os ensaios clínicos. Nestes, oito cães foram utilizados para comparar o efeito anti-hiperalgésico do ifenprodil associado à cetamina racêmica com o uso isolado desta, durante 24 h após lesão cirúrgica incisional no coxim metatársico. Foram avaliados os escores de sedação e de claudicação; contagens da frequência cardíaca e da respiratória; testes com filamentos de von Frey e medição da superfície de apoio plantar com planímetro nos tempos basal e 60, 90, 120, 180, 240, 480, 720 e 1440 min pós-trauma. A comparação entre grupos e ao longo do tempo revelou que os escores se mantiveram inalterados e as frequências não variaram significativamente. Os testes de von Frey e com planímetro demonstraram diferenças significativas entre os protocolos. Concluiu-se que, ainda que o estímulo seja cirúrgico, o pré-tratamento com ifenprodil melhora a ação anti-hiperalgésica da cetamina racêmica nas primeiras 24 h após a lesão.

Palavras-Chave: cetamina, hiperalgesia, ifenprodil

ANTIHYPERALGESIC EFFICACY OF THE ASSOCIATIONS OF KETAMINE AND ITS ISOMERS WITH IFENPRODIL ADMINISTRED IN A PREVENTIVE FORM AND BY SPINAL ROUTE IN RATS AND DOGS

SUMMARY – In two different opportunities, it was tested the efficacy of cetamina and ifenprodil, administered preventively and by spinal route, in the control of induced hyperalgesia ($P \leq 0.05$). The pharmacological tests had used Wistar rats in two stages: determination of the relative power and isobolograms. The hyperalgesic stimulus – E_2 prostaglandin intraplantar injection – was evaluated by electronic pressure meter. All the drugs had presented antihyperalgesic action with different ED_{50} values increasing in this order: ifenprodil, S(+) ketamine, racemic ketamine and R(-) ketamine. Ifenprodil potentiated ketamine and its isomers action, and was potentiated by racemate and S(+) form. The results had based the clinical tests. In these, eight dogs had been used to compare the antihyperalgesic effect of ifenprodil associated with ketamine with the isolated use of ketamine during 24 hours after surgical incision in the metatarsal pad. Sedation and claudication scores, respiratory and cardiac rates, von Frey filaments tests and the determination of plantar support area had been used in baseline and 60, 90, 120, 180, 240, 480, 720 and 1440 min after-trauma. The comparison between groups and throughout the time showed that the scores had kept unchanged and the rates had not varied significantly. The tests with von Frey filaments and with planimeter had demonstrated significant differences between the protocols. One concluded that, despite the stimulus is surgical, pretreatment with ifenprodil improves the antihyperalgesic action of racemic ketamine in the first 24 hours after the injury.

Key-words: ketamine, hyperalgesia, ifenprodil

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

Conforme RAJA, MEYER & CAMPBELL (1988), a dor é a contrapartida perceptiva da resposta do corpo ao estímulo que ameaça a integridade de seus tecidos. Sua natureza aversiva motiva o organismo a evitar o estímulo nóxi e ajuda a promover a cicatrização ao prevenir o contato e/ou o movimento da área lesada. Entretanto, sua forma mórbida é considerada um erro de adaptação por provocar hiperalgesia e alodinia, ser incapacitante e gerar alterações homeostáticas potencialmente fatais.

Sob o ponto de vista econômico estima-se que a dor cause prejuízos de 80 bilhões de dólares por ano somente nos Estados Unidos da América (DA SILVA & RIBEIRO FILHO, 2006). A despeito do motivo – humanitário, médico ou econômico – há o consenso de que a dor deve ser aliviada sempre que é previsível ou há suspeição de sua presença. No que tange a neurofisiologia, animais e humanos apresentam vias nociceptivas semelhantes, sendo razoável considerar que um mesmo incitamento possa ser doloroso para ambos.

Como parte do arsenal farmacoterapêutico contra a dor, os antagonistas do RNMDA (receptor N-metil-D-aspartato), outrora preferencialmente usados como anestésicos dissociativos, vem sendo investigados como agentes anti-hiperalgésicos eficazes em situações nas quais os fármacos tradicionalmente utilizados falharam. Contudo, esta classe de medicamentos, desde a descoberta da primeira substância – fenciclidina, cujo uso clínico foi abolido – até a popularização da cetamina, tem seu emprego terapêutico correlacionado a alterações motoras e cognitivas.

A melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos relacionados aos RNMDAs (receptores do NMDA), em particular, o reconhecimento de seu papel nas vias nociceptivas e a identificação de seus subtipos, permitiram avanços. Todavia, a maior parte das referências encontradas na literatura científica descrevem o uso dos antagonistas dos RNMDAs para alívio da dor neuropática e/ou crônica, poucas estão relacionadas à inflamatória. Não obstante a caracterização dos RNMDAs como canais

multiméricos regulados por ligantes (RANG *et al.*, 2004a), a descoberta de agentes bloqueadores seletivos e a síntese de novos compostos, até o momento, não há estudos sobre a administração associada de antagonistas dos RNMDAs que atuem em diferentes sítios de ação, como a cetamina e o ifenprodil, para o controle da hiperalgesia.

Face ao apresentado, testou-se a eficácia da cetamina, seus isômeros e do ifenprodil, usados de forma preventiva, isolada ou associada, pela via subaracnóidea no controle da hiperalgesia induzida. Foram realizados dois ensaios. O primeiro, farmacológico, visou determinar a potência relativa e o tipo de interação – antagônica, aditiva ou potencializadora – entre os medicamentos. O segundo, clínico, aplicou os dados extrapolados do anterior para confrontar a eficácia de dois protocolos anti-hiperalgésicos até 24 h após o estímulo cirúrgico.

2. Revisão de literatura

2.1. Conceituação de dor, nocicepção e analgesia

A dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada à lesões reais ou potenciais (IASP, 1994), ou seja, é a percepção, interpretação subjetiva de um sinal nociceptivo (PADDLEFORD, 1998). Conforme MELZACK (2001), padrões característicos individuais de impulsos nervosos gerados por uma rede neuronal vastamente distribuída no cérebro a produzem, o que gerou o neologismo “neuroassinatura”.

A dor, enquanto processo fisiológico, apresenta uma função protetora (MUIR III *et al.*, 2001a) entretanto, sua forma mórbida, subdividida em inflamatória e neuropática (THURMON, TRANQUILLI & BENSON, 1999), produz hipersensibilidade no local de lesão e em tecidos saudáveis adjacentes (WOOLF & SALTER, 2000) estando relacionada à lesões teciduais provocadas por doença ou cirurgia (PADDLEFORD, 1998). A dor também foi classificada, conforme a origem, em somática, visceral e

neuropática. Em humanos, a cronicidade do processo, se caracteriza por grande intensidade diante de uma doença ou lesão pequena (MELZACK, 1999) e assim como as formas neuropática e aguda severa, foi considerada um erro de adaptação (MILAN, 1999).

A nocicepção é uma série complexa de eventos eletroquímicos que ocorrem entre o sítio de lesão tecidual e a percepção da dor (FINE & ASHBURN, 1998), isto é, uma resposta neuronal à aplicação de estímulo nóxio (KITCHELL, 1987) sem conotação emocional (STEFFEY, 2003), constituindo-se por quatro processos: transdução, transmissão, modulação e percepção (FINE & ASHBURN, 1998).

Analgesia, no sentido literal da palavra, significa ausência de dor, mas é freqüentemente empregada para designar uma redução em sua percepção (CARSTENS, 1987). Na analgesia profilática, um ou mais fármacos são administrados ao paciente antes que se inicie o estímulo nóxio para evitar os estados de hiperalgesia (FANTONI & MASTROCINQUE, 2002) e alodinia (THURMON, TRANQUILLI & BENSON, 1999) que acompanham a dor mórbida e contribuem para alterações homeostáticas (OLIVEIRA, R. M., 2005).

2.2. Indicadores da sensação de dor e da analgesia

Há três grandes categorias de indicadores da sensação de dor: auto-registros, observáveis e fisiológicos. O primeiro grupo é somente aplicável à espécie humana. Os observáveis ou comportamentais podem ser capturados por escalas de mensuração e usualmente se referem ao comportamento ou desempenho físico. Os fisiológicos relacionam-se às alterações biológicas e baseiam-se nas mudanças em FC (frequência cardíaca), *f* (frequência respiratória), tensão muscular e outras associadas ao estresse, à agonia e à aflição da resposta (DA SILVA & RIBEIRO FILHO, 2006).

CARSTENS (1987) afirmou que a avaliação da analgesia em animais pode ser feita pela constatação do aumento no limiar ou na latência de reflexos de retirada e pela observação de reações comportamentais ou nocifensivas mais complexas provocadas por estímulos de ameaça ou lesão tecidual.

2.3. Fisiologia da dor

2.3.1. Aspectos neuroanatômicos

Os nociceptores apresentam como componentes operacionais um terminal periférico, que inerva os tecidos e faz a transdução do estímulo nóxio, o axônio que conduz os potenciais de ação da periferia para o SNC (sistema nervoso central), o corpo celular na raiz dorsal do gânglio e um terminal central que transfere as informações para neurônios de segunda ordem (Figura 1) (WOOLF & MA, 2007).

Os nociceptores foram classificados como polimodais (captam pressão, calor e fatores químicos), mecânicos de alto limiar e mecanotérmicos de baixo-limiar (RANG et al., 2004b). Têm suas atividades influenciadas por substâncias algógenas livres nos vasos sangüíneos ou liberadas em decorrência de processos inflamatórios, traumáticos e/ou isquêmicos a partir de células lesadas, leucócitos ou plaquetas (FANTONI & MASTROCINQUE, 2002).

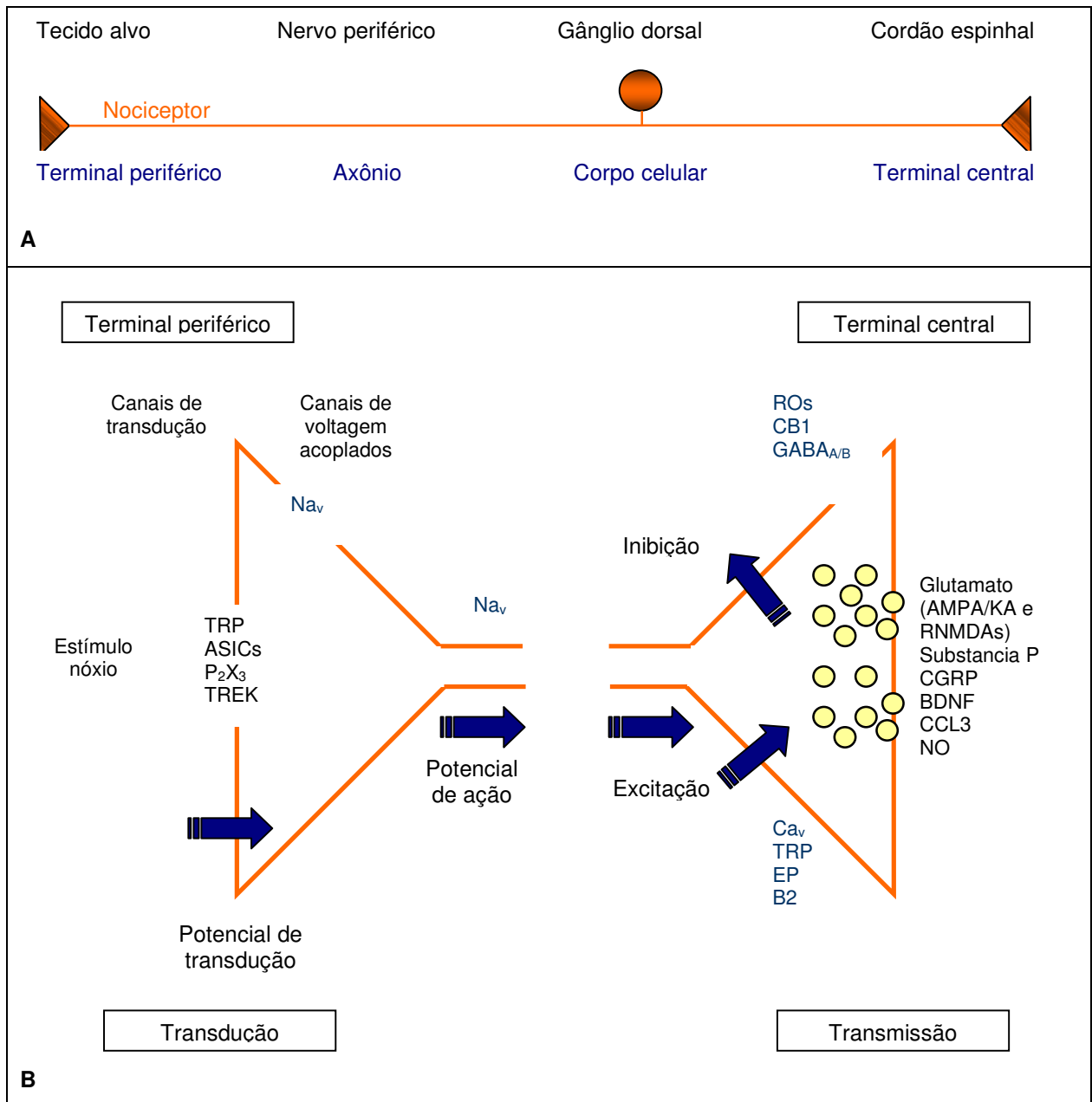
As fibras não mielinizadas do tipo C possuem receptores polimodais e, as mielinizadas A δ (finas) e A β (grossas), os mecânicos e mecanotérmicos (ANDRADE, 2002). As amielínicas transmitem dores crônicas, difusas, obtusas, em queimação e de espasmos e as mielínicas, dores agudas, acuradamente localizadas e penetrantes (MUIR III et al., 2001a). Os estímulos viscerais são conduzidos somente por fibras C diferentemente dos demais que apresentam transmissão bimodal, ou seja, mediada por fibras A e C (ANDRADE, 2002). Os receptores polimodais estão na proporção de, no máximo, dois para cada 5 cm² de superfície cutânea (KITCHELL, 1987). Um subtipo de fibras C, chamado de silencioso, é somente quimiosensitivo (LEVINE & TAIWO, 1994). Apresentado de três a vinte terminações por 1 a 8 cm² de pele, as fibras A δ são de dois tipos: I, com alto limiar para calor, é a principal responsável pela hiperalgesia, e II, com um limiar mais baixo, informa o aferente ao primeiro estímulo nóxio (KITCHELL, 1987).

Os nervos sensitivos penetram a raiz dorsal da medula espinhal, ascendem ou descendem um ou dois segmentos no trato de Lissauer e terminam na massa cinzenta do corno dorsal na lâmina II conhecida como substância gelatinosa (MUIR III et al., 2001a). A maioria dos aferentes nociceptivos A δ e C fazem sinapse com os corpos

celulares das lâminas I e II; outras fibras A penetram no corno dorsal na lâmina V (RANG *et al.*, 2004b), mas todos fazem sinapses com nervos secundários também chamados interneurônios, neurônios internunciais ou de segunda ordem (CARVALHO & LEMÔNICA, 1998). As fibras A δ e C liberam glutamato capaz de promover potenciais sinápticos rápidos e lentos (JESSELL & KELLY, 1991).

A lâmina I tem interneurônios específicos para nocicepção que recebem impulsos das fibras A δ e C e neurônios de larga faixa dinâmica que transmitem impulsos de nociceptores e mecanoreceptores de baixo limiar (JESSELL & KELLY, 1991).

O corno dorsal recebe, filtra, atenua ou amplifica os estímulos sensitivos antes de transmiti-los a outros segmentos espinhais ou ao córtex (FINE & ASHBURN, 1998). O impulso modulado atua sobre fibras pré-ganglionares simpáticas, somatomotoras – originado as respostas reflexas – e neurônios supraespinhais (STEFFEY, 2003). Segundo a “Teoria do Controle do Portão ou Teoria da Comporta” (MELZACK & WALL, 1965) a substância gelatinosa bloqueia a transferência das informações entre os aferentes e os neurônios espinotalâmicos. As fibras não mielinizadas suprimem neurônios internunciais inibitórios e as mielinizadas os ativam reduzindo a percepção da dor (JESSELL & KELLY, 1991).



ASICs= canais iônicos sensíveis a ácidos; BDNF= fator neurotrófico derivado do cérebro; B2= receptor 2 da bradicinina; Ca_v= canal de cálcio voltagem-dependente; CB1= receptor canabinóide 1; CCL3= quimiocina 3; CGRP= peptídeo relacionado ao gene calcitonina; EP= receptores para prostaglandinas; GABA_{A/B}= receptores gabaérgicos A e B; Na_v= canais de sódio voltagem-dependente; NO= óxido nítrico; ROs= receptores opióides; TREK= canais de potássio sensíveis ao calor; TRP= receptores químicos/térmicos.

Figura 1. Nociceptor: A) os componentes operacionais do nociceptor incluem um terminal periférico que inerva tecidos alvo e faz a transdução do estímulo nódio, um axônio que conduz potenciais de ação da periferia para o SNC, um corpo celular na raiz do gânglio dorsal e um terminal no SNC onde a informação é transferida para neurônios de segunda ordem; B) a transdução é mediada por canais iônicos com transdutores de alto limiar que despolarizam o terminal periférico ativando canais de sódio voltagem-dependentes. A transmissão ocorre em resposta ao influxo de cálcio no terminal central liberando glutamato assim como múltiplas moléculas moduladoras e sinalizadoras e está submetido tanto a influências excitativas quanto inibidoras. Adaptado a partir de WOOLF & MA (2007).

As vias ascendentes do corno dorsal para o cérebro consistem dos tratos lateral espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico e sistemas espinomedular pós-sináptico da coluna dorsal e ascendente multissináptico propioespinhal. O trato paleoespinotalâmico é formado pelos segmentos espinomesencefálico, espinoreticular e pela projeção medial espinotalâmica, conduz impulsos promotores de respostas afetivas e endócrinas além de reflexos autonômicos (FINE & ASHBURN, 1998) e relaciona-se aos estímulos viscerais (ANDRADE, 2002). O trato neoespinotalâmico constitui-se da projeção lateral talâmica do trato espinotalâmico e converge impulsos nociceptivos mais rápidos, discretos e acuradamente localizados ativando reflexos supra-segmentais e corticais (FINE & ASHBURN, 1998) correlacionando-se aos impulsos somáticos (ANDRADE, 2002).

O córtex cerebral é responsável pelos aspectos somáticos da dor (FANTONI & MASTROCINQUE, 2002), o sistema límbico pelo comportamento motivacional afetivo (WILLIS & CHUNG, 1987) e a formação reticular pelo despertar abrupto, alerta difuso e disparo de respostas homeostáticas protetoras (STEFFEY, 2003). No mesencéfalo, a PAG (área cinzenta pariaquedutal) ativa, por meio do núcleo paragigantocelular reticular adjacente, o NRM (núcleo magno da rafe) que recebe aferência dos neurônios espinotalâmicos e constitui-se como um dos mecanismos de portão da via descendente (RANG *et al.*, 2004b). A modulação cerebral da nocicepção ocorre principalmente na PAG e na medula ventromedial rostral (XU, M. *et al.*, 2007) tendo as vias serotoninérgica e noradrenérgica como as mais importantes (FINE & ASHBURN, 1998).

A partir do cérebro, vias descendentes fazem sinapses com interneurônios medulares (ANDRADE, 2002). Estas vias utilizam as monoaminas – serotonina, noradrenalina e dopamina – como neurotransmissores primários e influem na modulação podendo produzir tanto antinocicepção quanto pró-nocicepção dependentes não somente do tipo de impulso nociceptivo, mas também de componentes subjetivos como atenção, motivação, emoção e comportamento (BENARROCH, 2008).

2.3.2. Aspectos bioquímicos

As fibras C são incitadas pela bradicinina, 5-HT (5-hidroxitriptamina ou serotonina), concentrações elevadas de íons hidrogênio (LEVINE & TAIWO, 1994) e íons potássio (SINATRA, 1992).

A bradicinina, descoberta no final dos anos 1940 pelo médico e farmacologista carioca Prof. Maurício Oscar da Rocha e Silva, foi inicialmente utilizada como vasodilatador para o tratamento de pacientes humanos sofrendo de hipertensão (TUOTO, 2008). Posteriormente, mostrou-se um potente agente algogênico (DRAY & BEVAN, 1993) que injetada em humanos provoca nocicepção (RAJA, MEYER & CAMPBELL, 1988). Contribui no desenvolvimento da dor inflamatória com a incitação e a sensibilização dos nociceptores (FERREIRA, LORENZETTI & POOLE, 1993). O estímulo aos receptores de bradicinina ativa uma isoforma de proteína cinase C (PKC ϵ) que fosforila receptores vanilóides facilitando a abertura do canal iônico sob seu controle (RANG *et al.*, 2004a). Em adição, subtipos 1 do receptor vanilóide, aumentam em número em decorrência da inflamação e contribuem para a hiperalgesia primária (RANG *et al.*, 2004b).

Após estímulo nóxio, taquicininas como a substância P e neurocinina A são liberadas na medula espinhal. A primeira, provoca despolarização da membrana celular dos neurônios do corno dorsal e conseqüente facilitação da transmissão do impulso nociceptivo periférico (RANG *et al.*, 2004b). Além deste efeito, também colabora para a inflamação e ativação de células imunes (CARVALHO & LEMÔNICA, 1998), aumenta a produção e liberação de enzimas lisossomais e a descarga de PGE₂ (prostaglandina E₂) e interleucinas 1 e 6 (LEVINE & TAIWO, 1994).

As PGs são substâncias hiperalgésicas (RAJA, MEYER & CAMPBELL, 1988) cujas isoformas E₁ e E₂ apresentam ação duradoura (CARVALHO, 2002). A PGE₂ tem papel preponderante nos processos dolorosos (ITO, OKUDA-ASHITAKA & MINAMI, 2001) atuando como mediador final da inflamação e sensibilizando diretamente os nociceptores aferentes primários (TYERS & HAYWOOD, 1979). Está envolvida na hiperalgesia provocada pela bradicinina (LEVINE & TAIWO, 1994). Quando a PGE₂ é injetada por via intraganglionar ou intraplantar induz hipernocicepção com igual

magnitude e duração (FERRARI *et al.*, 2007). VIVANCOS, PARADA & FERREIRA (2003) testaram o efeito da injeção intraplantar de PGE₂ (100 ng/100 µL). Utilizando um analgesímetro digital, concluíram que houve hiperalgesia, com efeito máximo em 3 h e duração da fase platô entre 4 e 6 h. Uma correlação direta entre concentração de PGE₂ no sítio inflamatório e o aumento da sensação dolorosa foi demonstrada em pacientes humanos (MNT, 2005) e também em felinos (SCHAIBLE & SCHMIDT, 1988).

Os receptores adrenérgicos α_2 localizados em terminais aferentes periféricos e espinhais, em neurônios na lâmina superficial da medula espinhal e em núcleos do tronco encefálico, quando ativados, têm ação analgésica (CARVALHO & LEMÔNICA, 1998). Foi observada analgesia com a administração de noradrenalina por via espinhal pela inibição de neurônios do corno dorsal (CARSTENS, 1987). Em contraste, a ativação da fosfolipase C pela norepinefrina induz a síntese de prostaciclina (LEVINE & TAIWO, 1994).

A serotonina tem ação algogênica quando aplicada por via parenteral periférica (RAJA, MEYER & CAMPBELL, 1988) pela interação com receptores 5HT₃ (LEVINE & TAIWO, 1994). Por outro lado, atua como transmissor dos neurônios inibitórios descendentes do NRM ao corno dorsal (RANG *et al.*, 2004b) e injetada por via espinhal induz analgesia (CARSTENS, 1987).

A histamina aplicada por via intradérmica gera vasodilatação local, rubor e prurido (RANG *et al.*, 2004c) e parece potencializar a ação das poliaminas que atuam facilitando a ativação dos RNMDAs (CHIZH, HEADLEY & TZSCHENTKE, 2001).

A adenosina apresenta ação algica ou anti-álgica na dependência da interação com receptores A1 ou A2, respectivamente (RANG *et al.*, 2004c). De forma indireta, contribui para a hiperalgesia e mimetiza a ação da PGE₂ (LEVINE & TAIWO, 1994).

As fibras C das vias descendentes fazem sinapses com interneurônios medulares e liberam opióides endógenos (ANDRADE, 2002) capazes de suscitar antinocicepção ou pró-nocicepção, fenômeno dependente dos RNMDAs (XU, M. *et al.*, 2007). Os opióides agonistas do receptor μ ativam a proteína cinase C facilitando a remoção do bloqueio exercido pelo íon magnésio sobre os RNMDAs (LUFT & MENDES, 2005). O influxo de cálcio assim criado abre canais de larga condutância de

potássio cálcio-sensitivos provocando hiperpolarização nos neurônios do corno dorsal e inibição da liberação dos opióides (SONG & MARVIZÓN, 2005).

O glutamato, principal aminoácido excitatório do SNC é agonista em receptores dos tipos metabotrópico e ionotrópico (MUIR & LEES, 1995), é onipresente nos aferentes primários sendo liberado de seus terminais a partir de estímulo nódio (KING & LOPEZ-GARCIA, 1993).

Os receptores ionotrópicos são das subclasses: AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico), KA (cainato), ambos importantes na transmissão excitativa rápida das vias nociceptivas e NMDA, relacionado aos potenciais pós-sinápticos excitativos lentos (CRAIG, 2005). Até o momento, foram identificadas 18 subunidades de receptores ionotrópicos para glutamato das quais, sete são para NMDA e o restante são para AMPA (GluR1-4/GluRA-D) ou KA (GluR5-7) (BROCKIE & MARICQ, 2006). Os RNMDAs controlam canais de cátions permeáveis a íons monovalentes e ao cálcio (CHAPLAN, MALMBERG & YAKSH, 1997).

A estimulação dos aferentes primários ativa, inicialmente, os receptores pós-sinápticos para glutamato do tipo não-NMDA promovendo a abertura dos canais iônicos a eles acoplados, influxo de íons e a conseqüente despolarização da membrana celular. Após a incitação ultrapassar um determinado limiar elétrico, o bloqueio promovido pelo Mg^{+2} ao RNMDA – portão de voltagem – é removido (CHAPLAN, MALMBERG & YAKSH, 1997) e a interação simultânea do glutamato e da glicina, um co-agonista, cada qual em seus sítio de ação, promove a abertura do canal iônico (PETRENKO *et al.*, 2003). O influxo de cálcio estimula fosfolipases e a conseqüente produção de diacilglicerol, eicosanóides, 1,4,5-trifosfato de inositol, ativação de proteína cinase C e da NOS (enzima óxido nítrico sintetase). A NOS catalisa a conversão de L-arginina em NO (óxido nítrico). O NO difunde-se para fora da célula, penetra em neurônios vizinhos levando a formação de GMPc (guanosina monofosfato cíclica). Dependendo da expressão dos canais controlados pela GMPc, o NO pode agir de forma excitadora ou inibidora (RIEDEL & NEECK, 2001) e, assim como as PGs, atuar como mensageiro retrógrado secundário causando a amplificação pré-sináptica da liberação de neurotransmissores (CHAPLAN, MALMBERG & YAKSH, 1997). A partir do aumento do Ca^{+2} intracelular, genes – C-fos e C-jun – atuam como terceiros mensageiros

influenciando no controle da transcrição de neuropeptídeos como dinorfina, encefalina e taquicininas na medula espinhal agindo sobre a memória da resposta nociceptiva (CARVALHO & LEMÔNICA, 1998).

Os RNMDAs estão implicados na LTP (“long term potentiation” ou potencialização a longo prazo) que ocorre no hipocampo (PALL, 2002) mecanismo pelo qual, estabelecem o nível de excitabilidade nas vias neuronais (SANDKÜHLER & LIU, 1998). Com isso, controlam a dor crônica e o processo de aprendizado e memória à condições aversivas (GRAVIUS *et al.*, 2006). Estas ações, torna-os essenciais no desenvolvimento e indução da plasticidade sináptica (KÖHR, 2007) e embora possam ser de curta duração, possibilitam a cronicidade da dor (URBAN, THOMPSON & DRAY, 1994; ZHUO, 2004).

Os receptores NMDA apresentam cinéticas de ativação e desativação lentas (CANDY, BRICKEY & FARRANT, 2001). Foram identificados em axônios mielinizados e amielinizados nos tecidos periféricos somáticos (PETRENKO *et al.*, 2003), em posição pré-sináptica em neurônios aferentes primários, nos corpos celulares de neurônios do corno dorsal e pós-sináptica, em interneurônios excitatórios do trato corticoespinhal no corno ventral (CHAPLAN, MALMBERG & YAKSH, 1997) com distribuição heterogênea no cérebro (BOYCE *et al.*, 1999).

Os RNMDAs são compostos por diferentes combinações de múltiplas subunidades proteicas (NIKAM & MELTZER, 2002). Segundo ALEXANDER, MATHIE & PETERS (2008), recentemente o Comitê para Nomenclatura e Classificação de Receptores da União Internacional de Farmacologia (NC-IUPHAR) reestruturou a classificação dos receptores para glutamato. Assim, as subunidades dos RNMDAs foram denominadas: GluN1, GluN2 (A,B,C e D) e GluN3 (A ou B).

Um canal iônico funcional depende da combinação de GluN1 com pelo menos uma subunidade GluN2 (PETRENKO *et al.*, 2003). Canais formados pelas subunidades GluN2A e GluN2B abrem-se com níveis de condutância maiores que os das subunidades GluN2C e GluN2D, menos sensíveis ao bloqueio do Mg^{+2} (CANDY, BRICKEY & FARRANT, 2001).

Enquanto GluN2A foi encontrada nos cornos dorsal e ventral (BOYCE *et al.*, 1999), GluN2B apresentou concentração discreta nas fibras das lâminas I e II, rara no

corno ventral, e estava ausente no cerebelo. Presumiu-se que sua presença é pré-sináptica em fibras aferentes primárias do tipo C, podendo regular a liberação de substância P e glutamato e modular a transmissão nociceptiva no cordão espinhal (LIU, MANTYH & BASBAUM, 1997).

Os RNMDAs que contêm as subunidades GluN2A e GluN2B contribuem para a maior parte das correntes excitativas pós-sinápticas mediadas por este receptor. A aplicação de antagonistas GluN2A ou GluN2B reduzem a LTP sem aboli-la. A associação destes fármacos suprimem-na completamente (ZHUO, 2007).

A ativação das subunidades GluN1 e GluN2 faz com que o NO possa regular a atividade da NOS neuronal através de um mecanismo de mensageiro retrógrado no cordão espinhal (XU, L. *et al.*, 2007).

2.4. Fisiopatologia da dor

O limiar de excitação dos terminais nociceptivos pode ser baixado por mudanças a partir de uma ativação prévia (auto-sensibilização) ou por aumento na excitabilidade (heterossensibilização) iniciada por estímulos sensitivos que não os ativariam (WOOLF & SALTER, 2000). Estimulação repetitiva do aferente primário com frequências que induzem à LTP raramente ocorrem nas fibras C em condições fisiológicas, mas foram observadas durante picos de atividade ectópica nos aferentes primários de pacientes com lesão tecidual (CHIZH, 2007). Uma pequena proporção de neurônios sensitivos é chamada de silenciosa ou adormecida por não responder até mesmo a incitamentos intensos. Entretanto, quando sob influência de mediadores da inflamação ou substâncias químicas torna-se sensibilizada e responsiva a estímulos sensoriais (DRAY, 1995).

A sensibilização periférica é produzida por estímulo de baixa intensidade sobre as fibras A δ e C resultando em hiperalgesia primária e alodinia periférica (CHAPLAN, MALMBERG & YAKSH, 1997).

A sensibilização central – nível aumentado de transmissão sináptica no corno dorsal após incitamento nociceptivo periférico intenso (BLEAKMAN, ALT &

NISENBAUM, 2006) – gera resposta prolongada na excitabilidade de neurônios medulares (MUIR III *et al.*, 2001a). Está relacionada à liberação de glutamato e ao aumento dos campos de receptores dos neurônios de larga faixa dinâmica (EIDE, 2000) provocando alodinia e hiperalgesia mediadas por receptores para substância P e RNMDAs (CARVALHO & LEMÔNICA, 1998).

REN, LADAROLA & DUBNER (1996) afirmaram que embora os sistemas de receptores NMDA e para neurocininas possam ser co-ativados em resposta à inflamação, contribuem de forma independente para o desenvolvimento da hiperalgesia.

FERREIRA & LORENZETTI (1994) descobriram que a administração de PGE₂, por via intraplantar, provoca liberação contínua de glutamato espinhal que interage com os RNMDAs sensibilizando, de forma retrógrada, os neurônios sensoriais primários. De modo complementar, PARADA *et al.*, (2003) relacionaram a liberação de glutamato espinhal durante a inflamação com a hiperalgesia e a participação de nociceptores associados a canais de sódio resistentes a tetrodotoxina. Sabe-se que a PGE₂ baixou o limiar para evocar potenciais de ação e também induziu a despolarização em neurônios do gânglio dorsal (KASAI & MIZUMURA, 2001).

SOUTH *et al.* (2003) afirmaram que a destruição de subunidades GluN1 atenua a resposta à estímulos nocivos sem alterar a relacionada aos incitamentos agudos inofensivos, revelando a importância dos RNMDAs na hipersensibilidade. Em adição, GAO *et al.* (2005) demonstraram que houve aumento no número de subunidades GluN1, em ratos submetidos à dor neuropática experimental, correlacionado à alodinia. Por outro lado, INOUE, MISHINA & UEDA (2000) propuseram que GluN2A modula de forma inibitória os neurônios primários estimulados por substância P.

Camundongos com dor inflamatória apresentaram um aumento na expressão de GluN2B no prosencéfalo sugerindo a importância de antagonistas seletivos como analgésicos (WEI *et al.*, 2001). Ademais, a concentração extracelular de poliaminas facilitadoras da ativação dos RNMDAs, pode aumentar, no SNC, durante os estados de dor apontando para a participação de GluN2B na transmissão nociceptiva e notabilizando seus antagonistas na atenuação do estímulo nociceptivo com preservação da transmissão fisiológica (CHIZH, HEADLEY & TZSCHENTKE, 2001).

2.5. Analgesia e fármacos analgésicos

2.5.1. Aspectos gerais

O controle efetivo da dor muitas vezes requer uma abordagem multifária (SERPELL, 2005) acompanhada por diagnóstico neuroanatômico (SHORT, 1998). Tratamentos bem ou mal sucedidos devem também serem analisados à luz de características genéticas (TURK, 2000).

Os antagonistas dos RNMDAs potencializaram a analgesia de opióides administrados a ratos Srague-Dawley e Wistar-Kyoto, mas não em ratos Dark-Agouti. O achado demonstrou a importância das diferenças entre linhagens ao se testar a ação de antagonistas dos RNMDAs (PLESAN *et al.*, 1999).

Experimentos com eletrofisiologia demonstraram que estímulos repetitivos e de baixa frequência sobre fibras C – 0,5 a 2 Hz – reduzem o limiar de ativação dos neurônios do cordão espinhal e prolongam suas descargas posteriores a um estímulo breve. Este fenômeno foi denominado como “windup” (AIDA, 2005).

O bloqueio dos RNMDAs foi indicado na reversão do “windup” sem mudança nas respostas nociceptivas basais (DICKENSON, 1990). É possível distinguir três grandes classes de antagonistas dos RNMDAs baseando-se em seus mecanismos de ação: os competitivos, agem no sítio do glutamato ou da glicina; os bloqueadores do canal (Ex. cetamina) e os inibidores do sítio de poliaminas (Ex. ifenprodil). Os dois primeiros não diferenciam os subtipos GluN1 ou GluN2 (KÖHR, 2007). Dentre os antagonistas não competitivos, os com alta afinidade pelo RNMDA estão relacionados à cinéticas de ativação e desativação lentas e pequena dependência de voltagem, características correlacionadas à neurotoxicidade (CHIZH, 2007).

O MK-801 (dizocilpina), antagonista glutamatérgico, aplicado por via IP (intraperitoneal) na dose de 0,4 mg/kg, intensificou o efeito antinociceptivo da agmatina em camundongos (OLIVEIRA, G. L., 2005).

A administração de 100 µg, por via IT (intratecal), do antagonista competitivo do RNMDA CPP – 3-(2-carboxipiperazina-4-propil)1-fosfato – ou de cetamina reduziu a óxido nítrico sintetase do tipo neuronal e aumentou as isoformas endotelial e incitável

da NOS. Estas mudanças ocorreram rapidamente, mas de forma duradoura parecendo influenciar as vias relacionadas ao NO e a resposta aos antagonistas do RNMDA (INFANTE *et al.*, 2007).

A dizocilpina (3 mg/kg) injetada por via IV (intravenosa) bloqueou o “windup” em neurônios do corno dorsal com a mesma magnitude que o CI-1041 (10 mg/kg, por via IV), antagonista GluN2B. Este resultado indica um papel predominante da subunidade GluN2B no “windup” e nos processos de plasticidade que acompanham os estados de dor inflamatória e neuropática em ratos (KOVÁCS *et al.*, 2003).

O perzinfotel, antagonista competitivo do glutamato, foi administrado pelas vias IP e VO (oral) nas doses de 10 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente. Reduziu a hipersensibilidade induzida pela PGE₂ entre 60 e 80% com melhor relação entre eficácia e efeitos adversos quando comparado à cetamina e ao ifenprodil. Os achados sugeriram que a afinidade pelo GluN2B não é a única forma de reduzir as ações indesejáveis dos antagonistas do RNMDA (BRANDT *et al.*, 2005).

As conantocinas produzidas por lesmas cônicas marinhas são antagonistas do RNMDA e modulam a excitabilidade do SNC aliviando a dor. Algumas parecem apresentar ação seletiva sobre o sítio de poliaminas (SHEN, LAYER & MCCABE, 2000).

FISHER, CODERRE & HAGEN (2000), ao analisarem os resultados de 132 trabalhos com humanos e 378 com animais, concluíram que os RNMDAs medeiam comportamentos nociceptivos e os seus antagonistas aliviam a dor crônica mas, com vários efeitos colaterais indesejáveis como alucinações, salivação excessiva, náuseas, aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca.

Os antagonistas do RNMDA promoveram efeitos psicotrópicos indesejáveis pela relação do receptor com percepção sensorial, cognição e nível de consciência (SUZUKI, MATTHEWS & DICKENSON, 2001). Os não seletivos produziram alucinações, disforia, alterações motoras e cognitivas (BOYCE *et al.*, 1999) os que são também não competitivos prejudicaram o aprendizado e a memória em animais e humanos (NIKAM & MELTZER, 2002). Subunidades GluN2B estão envolvidas na LTP e na formação da memória contextual, fenômenos prejudicados por seu bloqueio (ZHAO *et al.*, 2005).

NAKAZATO, KATO & WATANABE (2005) testaram o CP 101,606 – antagonista GluN2B – em ratos, pelas vias SC (subcutânea), intracerebroventricular e IT na dose de 10 mg/kg, e doses de 100 nmol e 300 nmol, respectivamente. Concluíram que bloqueadores do RNMDA não seletivos exercem sua ação ao nível espinal e os seletivos GluN2B, supraespinal.

2.5.2. Cetamina racêmica

A cetamina – cloridrato de DL-2-(O-clorofenil)-2-(metilamino) ciclo-hexano (ALVES, DÓREA & ANDRADE, 2002) – é uma arilciclohexilamina composta pelos enantiômeros R(-) e S(+). Sua apresentação comercial contém os conservantes cloreto de benzetônio ou clorbutanol (LUFT & MENDES, 2005) e pH da solução aquosa de 3,5 (BRANSON, 2003).

Age como antagonista do RNMDA a partir da interação com o sítio da fenciclidina no interior do canal iônico atuando de forma não competitiva ao glutamato (CHIZH, 2007). Entretanto, segundo ORSER, PENNEFATHER & MACDONALD (1997), além do bloqueio interno, relacionado à redução do tempo de abertura do canal, a cetamina também age externamente – porção hidrofóbica – diminuindo a frequência de abertura. Outros mecanismos farmacodinâmicos incluem o antagonismo aos receptores AMPA e KA através do sistema glutamato/NO/GMPc (LUFT & MENDES, 2005), a atividade gabaérgica indireta, o impedimento na recaptação das catecolaminas (VALADÃO, 2002), as ações antimuscarínicas central e periférica (ALVES, DÓREA & ANDRADE, 2002), o bloqueio na liberação de acetilcolina mediada pelo RNMDA e a atuação como agonista em receptores adrenérgicos α (CORTOPASSI & FANTONI, 2002) e opióides (VALADÃO, 2002). CHIZH (2007) destacou que a influência sobre receptores opióides e transportadores monoaminérgicos é irrelevante em doses subanestésicas com efeito analgésico e LUFT & MENDES (2005) afirmaram que o bloqueio dos receptores opióides não reduz a ação analgésica da cetamina.

A cetamina na forma de gel foi aplicada em pacientes humanos e demonstrou ação tópica efetiva, dose-dependente, no controle da dor neuropática (GAMMAITONI, GALLAGHER & WELZ-BOSNA, 2000).

Em experimento com 12 pacientes humanos, utilizou-se a cetamina (0,4 mg/kg; IV) para controle da dor neuropática periférica de longa duração, originada por trauma e não responsiva a vários tratamentos. Obteve-se analgesia e foram descritos 62 efeitos colaterais entre os quais, tontura e sonolência foram os mais prevalentes (KVARNSTRÖ *et al.*, 2003).

Foi reportado um caso, em humano, de dor por lesão do nervo ciático refratária à terapia com antiinflamatórios, antidepressivos, anticonvulsivantes, anestésico local (por via epidural), cetamina (0,3 mg/kg; por via IV) e psicoterapia. O tratamento com cetamina 25 µg/kg/h, por via epidural, por 10 dias foi efetivo, isento de efeitos adversos e recorrência por pelo menos oito meses após o seu término (TAKAHASHI *et al.*, 1998). Achado semelhante havia sido feito por KRISTENSEN, SVENSSON & GORDH (1992) ao controlarem a dor em paciente com lesão no nervo ciático pela administração de 200 e 500 nmol de CPP por via intratecal num intervalo de duas horas sugerindo a importância do bloqueio dos RNMDAs neste quadro clínico.

A cetamina aplicada em infusão contínua, por via SC, com doses progressivas (0,05;0,075;0,1 e 0,15 mg/kg/h) amenizou dores pós-herpéticas em humanos. Irritação local, náusea, fadiga e tontura foram os efeitos colaterais observados (EIDE *et al.*, 1995).

Pacientes com alodinia e dor neuropática pós-traumática foram tratados com infusão de cetamina (dose média de 58 mg, por via IV, durante 2 h). A interrupção da administração cessou os efeitos terapêuticos, entretanto, permaneceram os efeitos colaterais indesejáveis (MAX *et al.*, 1995).

A administração simultânea de cetamina na forma de *bolus* e infusão contínua – 60 µg/kg, por via IV, durante 5 min e 6 µg/kg/min, por via IV, por 20 min, respectivamente – amenizou a hiperalgesia provocada pelo frio sem alterar o limiar de percepção da dor em um estudo com 12 pacientes humanos (JERUM, WARNCKE & STUBHAUG, 2003).

Pacientes com dor neuropática do nervo trigêmeo foram tratados com cetamina e midazolam (0,4 mg/kg e 0,05 mg/kg, respectivamente) aplicados por via IM (intramuscular), repetindo-se a cetamina (4 mg/kg, VO) uma semana depois. Relataram ação analgésica que durou dias após o uso (RABBEN, SKJELBRED & ØYE, 1999).

O tratamento com cetamina (100 a 1000 nmol/50 µL, por via intraplantar), prévio ao estímulo nóxi com placa quente, controlou a hiperalgesia em ratos (OATWAY, REID & SAWYNOK, 2003). A cetamina (1 a 10 mg/kg, por via IV), comparada à dizocilpina e à memantina, inibiu mais intensamente a resposta neuronal a estímulos térmicos e mecânicos evocados por ligadura de nervo espinhal em ratos (SUZUKI, MATTHEWS & DICKENSON, 2001).

Estudos de resposta a estímulos viscerais em ratos, comprovaram ação antinociceptiva da cetamina nas doses de 4 mg/kg, por via epidural e 10 mg/kg, por via IV (ALAM, SAITO & KOSAKA, 1996).

Por via intratecal preventiva, a cetamina (1 mg/kg) postergou, mas não impediu a ocorrência de hiperalgesia mecânica em ratos submetidos ao modelo de mononeuropatia periférica (HARTRICK, WISE & PATTERSON, 1997).

A cetamina (10, 50, 100 ou 500 µg, por via intratecal e 10, 25 ou 50 mg/kg, por via intraperitoneal) aumentou o limiar do reflexo de retirada em ratos submetidos ao estímulo com carragenina administrada por via intraplantar. A ação antinociceptiva ocorreu pela ativação do sistema inibitório monoaminérgico descendente mas, o efeito anti-hiperalgésico não foi influenciado pelas monoaminas (KAWAMATA *et al.*, 2000).

A administração de cetamina (4,64 mg/kg, por via IV) em ratos bloqueou o RNMDA por 30 a 40 min e controlou a alodinia por 3 h. Concluiu-se que o uso por um período curto atenuou a hiperexcitabilidade central e promoveu analgesia duradoura sem efeitos adversos (CHRISTOPH *et al.*, 2006).

Ratos foram medicados com cetamina 0,5% (1 mg/kg) por via IT previamente à cirurgia para indução de dor neuropática experimental. Notou-se redução da alodinia ao frio e da mecânica na comparação entre animais tratados e não tratados. Este efeito perdurou por pelo menos 14 dias (BURTON *et al.*, 1999).

Doses baixas de cetamina (<2 mg/kg, em *bolus*, IM; <1 mg/kg, em *bolus*, IV ou epidural; ≤ 20 µg/kg/min, IV) inibiram os RNMDAs do corno dorsal (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

A cetamina foi indicada no controle da dor crônica, intensa e incapacitante não responsiva à outras farmacoterapias (HOCKING & COUSINS, 2003) útil, particularmente, como agente anti-hiperalgésico e para evitar a sensibilização central (THURMON, TRANQUILLI & BENSON, 1999).

Em oposição aos achados que comprovaram a eficácia antinociceptiva da cetamina, HAINES & GAINES (1999) a administraram em 21 pacientes humanos (por via oral, dose inicial de 20 mg até a máxima de 100 mg, 1 vez ao dia por uma semana) e encontraram efeito analgésico somente em 14% deles. De forma semelhante, DE VRY *et al.* (2004) afirmaram que a injeção IP (5, 10 e 20 mg/kg) de cetamina administrada em ratos, não controlou a hiperalgesia e a alodinia, ação somente obtida com doses superiores a 50 mg/kg, por via SC com efeitos adversos como ataxia e comportamento estereotipado.

Uma revisão de 33 trabalhos que utilizaram cetamina de forma preemptiva ou pós-operatória em pacientes humanos concluiu que sua eficácia na analgesia perioperatória permanece incerta. O mau emprego da metodologia científica foi apontada como responsável pela dualidade dos resultados (ELIA & TRAMÈR, 2005).

2.5.3. Estereoisômeros da cetamina

A descoberta do isômero S(+) despertou a expectativa de redução da dose em 50% com potência equianalgésica em relação ao racemato (JIMÉNEZ, 2004). Comparado a forma racêmica, o enantiômero dextrorotatório – S(+) – demonstrou de 2 a 4 vezes mais afinidade pelo RNMDA (MUIR & LEES, 1995) e o dobro da potência para prevenir a sensibilização central. Apresentou potência analgésica 3 a 4 vezes maior que a do isômero levorotatório – R(-) – e, em doses equianalgésicas, produziu menos alterações psíquicas e agitação que as formas racêmica e levógira (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

O índice terapêutico do isômero S(+) foi 2,5 vezes superior ao o da forma R(-) e 1,6 vezes maior que o da cetamina racêmica (MARIETTA *et al.*, 1977).

Em cães SRD (sem raça definida), a depuração de eliminação da cetamina S(+) foi 35% maior que o da R(-) (HENTHORN *et al.*, 1999). Em estudo com voluntários humanos concluiu-se que a depuração plasmática da cetamina S(+) é dificultada pela forma R(-). A taxa média de depuração plasmática do racemato foi de 14,8 mL/kg/min, o da cetamina S(+) foi 26,3 mL/kg/min e o do isômero R(-) 13,8 mL/kg/min (IHMSSEN, GEISLINGER & SCHÜTTLER, 2001).

Cetamina, cetamina S(+) e a forma R (-) foram aplicadas por via IT (10, 50 e 100 µg) em ratos que receberam estímulo algogênico com injeção de carragenina intraplantar. O racemato e a forma S(+) foram eficazes no controle da dor inflamatória (KLIMSCHA *et al.*, 1998).

JOÓ *et al.* (2000) testaram a ação antinociceptiva da cetamina e seus enantiômeros administrados por via IT. Após a determinação da potência relativa dos fármacos e isobologramas envolvendo a associação com morfina e dexmedetomidina concluíram que o uso isolado dos antagonistas dos RNMDAs, com exceção da dose efetiva de 300 µg de racemato, não produziu antinocicepção. A cetamina racêmica e a S(+) potencializaram o efeito antinociceptivo da morfina e da dexmedetomidina.

Cetamina S(+) e alfentanil foram administrados por via IV até que se fosse atingida uma concentração plasmática estável por 10 min (30 ng/mL/min e 10 ng/mL/min, respectivamente). Ambos atenuaram a hiperalgesia e a alodinia provocadas por estimulação elétrica em humanos com a mesma magnitude, mas com duração mais prolongada para o alfentanil (KOPPERT *et al.*, 2001).

A cetamina S(+) (1 mg/kg) produziu analgesia nos períodos trans e pós-operatórios equivalentes à bupivacaína à 0,25 % com adrenalina (1:200.000) em um estudo com crianças submetidas à herniorrafia inguinal. Os volumes administrados foram os mesmos e a via, a epidural sacral (MARHOFER *et al.*, 2000).

O efeito da administração por via epidural sacral da cetamina S(+) foi comparada ao da via IM. Crianças de 1 a 7 anos de idade, receberam a mesma dose (1 mg/kg). Os autores concluíram que a analgesia promovida pelo bloqueio regional teve duração superior sugerindo efeito analgésico local (KOINIG *et al.*, 2000).

Em estudo isobolográfico, HORVATH *et al.* (2001) concluíram que a coadministração, por via IT, de 100 µg de cetamina S(+) melhorou significativamente a ação antinociceptiva de 60 µg de endomorfina-1, um agonista endógeno do receptor opióide μ .

A aplicação preventiva, por via epidural, da cetamina racêmica (0,6 mg/kg) ou da cetamina S(+) – 0,6 mg/kg – em cães reduziu a hiperalgesia pós-incisional, sem alterar a frequência cardíaca e a respiratória, porém o efeito do racemato foi mais duradouro (DUQUE *et al.*, 2004).

2.5.4. Ifenprodil

O Ifenprodil – 2-(4-benzilpiperidino)-1-(4-hidroxifenil)-1-propanol – (CHENARD & MENNITI, 1999) está disponível comercialmente na forma de tartarato como uma mistura de diastereoisômeros, eritro e treo (BREW *et al.*, 2005). Não se correlaciona, estruturalmente, com os demais antagonistas dos RNMDAs conhecidos (CHENARD *et al.*, 1991).

Apresenta elevada taxa de efeito de primeira passagem com 5% de biodisponibilidade e meia-vida de 1 h e 30 min o que inviabiliza seu uso por via oral como analgésico (BREW *et al.*, 2005).

Quanto à farmacodinâmica, destaca-se pelo antagonismo aos RNMDAs por meio das subunidades GluN2B (CHENARD & MENNITI, 1999) no sítio de poliaminas, de forma voltagem-independente e não competitiva ao glutamato (CHRISTOPHER, RIVY & SCATTON, 1989). Uma outra maneira de descrever sua ação é a ampliação da fração de receptores inibidos por prótons (ALEXANDER, MATHIE & PETERS, 2008) potencializando o bloqueio iônico (MOTT *et al.*, 1998).

A seletividade pelo GluN2B é cerca de 160 (BOYCE *et al.*, 1999) a 400 vezes (WILLIAMS, 1993) maior que para GluN2A. Além da potente atividade antagonista adrenérgica α_1 sobretudo, na forma eritro (BREW *et al.*, 2005), o ifenprodil apresenta, no SNC, afinidade nanomolar pelos receptores serotoninérgicos (5HT_{1A} e 5HT₂),

adrenérgicos α_1 e opióides μ e σ (CHENARD *et al.*, 1995). Um efeito neuroprotetor preventivo foi descrito (BATH *et al.*, 1996).

PAOLETTI & NEYTON (2007) constataram dependência de atividade-uso do ifenprodil pela qual, o aumento da concentração de glutamato na fenda sináptica, melhora seu desempenho. Em situações de redução do pH (potencial hidrogeniônico) torna-se também mais eficaz e por isso, beneficia mais os tecidos inflamados e/ou isquêmicos que os saudáveis (CHIZH, HEADLEY & TZSCHENTKE, 2001).

A ação estado-dependente do ifenprodil está correlacionada a poucos efeitos adversos (KEW, TRUBE & KEMP, 1996), mas alguns pacientes podem apresentar hipotensão (BREW *et al.*, 2005). BOYCE *et al.* (1999) demonstraram que doses 5 vezes superiores (50 mg/kg, IP) as que induzem antinocicepção provocaram ptose, piloereção e hiperventilação.

Houve controle da dor inflamatória em ratos tratados com 0,05 μ g/g de ifenprodil, por via IT (XU & YANG, 2006). A dose de 20 nmol pela mesma via, teve ação antinociceptiva em camundongos que receberam capsaicina intraplantar, mas a coadministração de NMDA bloqueou o efeito (SAKURADA *et al.*, 1998).

A aplicação de ifenprodil (30 mg/kg, por via IP) em ratos diminuiu a hiperalgesia provocada por capsaicina intraplantar e prolongada por estímulo vibratório (KIM *et al.*, 2007).

CHIZ *et al.* (2001) concluíram que o efeito antinociceptivo do ifenprodil (4,64 a 100 mg/kg, por via IP) envolveu estruturas supraespinhais.

Ifenprodil (1 e 3 mg/kg, por via IP) aplicado em ratos não alterou a analgesia promovida por opióides agonistas μ (REDWINE & TRUJILLO, 2003). Entretanto, conforme FISCHER, CARRIGAN & DYKSTRA (2005) o pré-tratamento com ifenprodil (3,2 a 10 mg/kg, por via IP) potencializou a ação da morfina (0,1 a 10 mg/kg, por via IP) no teste de placa quente em ratos, embora seu uso isolado, tenha sido inócuo.

DE VRY *et al.* (2004), testando um modelo de dor neuropática em ratos, afirmaram que o ifenprodil (5, 10 e 20 mg/kg, por via IP) não controlou, ou o fez raramente, a hiperalgesia térmica e a alodinia mecânica.

CAPÍTULO 2 – EFICÁCIA ANTI-HIPERALGÉSICA DA ASSOCIAÇÃO DE CETAMINA E SEUS ISÔMEROS COM IFENPRODIL

RESUMO – Os RNMDAs controlam canais permeáveis a íons monovalentes e ao cálcio relacionados com hiperalgesia. A cetamina e o ifenprodil são antagonistas dos RNMDAs não competitivos ao glutamato e que atuam em diferentes locais. Enquanto a primeira, age no sítio da fenciclidina, o último bloqueia a ação das poliaminas na subunidade GluN2B. As interações farmacológicas entre cetamina e ifenprodil foram investigadas em ratos por meio de analgesímetro digital. CET (cetamina racêmica), CR – cetamina R(-) –, CS – cetamina S(+) – e IFE (ifenprodil) foram administrados, por via intratecal, 30 min antes do estímulo hiperalgésico com injeção intraplantar de PGE₂. Em uma primeira fase, determinou-se a potência relativa dos fármacos: CET (6; 20; 30; 60 e 600 µg), CR (20, 60, 200, 400 e 600 µg), CS (6, 20, 30, 60 e 200 µg) e IFE (0,6; 2; 20; 60 µg). Depois, estudos com isobologramas apontaram as interações farmacológicas entre os agentes. CR, CET, CS e IFE, em ordem crescente, produziram efeito anti-hiperalgésico. Uma dose de CET foi analgésica. O IFE potencializou a ação da cetamina e seus isômeros e foi potencializado pelo racemato e enantiômero S(+). O pré-tratamento com IFE foi melhor que o com CET e com CR. Os resultados sugerem que a ação modulatória do IFE sobre a subunidade GluN2B associada à oclusão do canal iônico induzida pela cetamina pode ser útil no tratamento da dor inflamatória mediada pelos RNMDAs ($p \leq 0,05$)

Palavras-chave: cetamina racêmica, cetamina R(-), cetamina S(+), hiperalgesia, ifenprodil, ratos

ANTIHYPERALGESIC EFFICACY OF THE ASSOCIATION OF KETAMINE, ITS ISOMERS AND IFENPRODIL

SUMMARY – The NMDA receptors (NMDARs) control monovalent and calcium permeable ion channels related to hyperalgesia. Ketamine and ifenprodil are glutamate non competitive antagonists acting at different sites. While the first acts at phencyclidine site, the last one blocks polyamines actions at the GluN2B subunit. The pharmacological interactions between ketamine and ifenprodil had been investigated in rats by means of an electronic pressure meter test. CET (racemic ketamine), CR – R(-) ketamine - , CS – S(+) ketamine – and ifenprodil (IFE) had been administered by intratecal route, 30 min before the hyperalgesic stimulus with intraplantar E₂ prostaglandin. In a first phase, it was determined relative powers of the drugs: CET (6; 20; 30; 60 e 600 µg), CR (20, 60, 200, 400 e 600 µg), CS (6, 20, 30, 60 e 200 µg) and IFE (0,6; 2; 20; 60 µg). Later, studies with isobolograms had pointed the pharmacological interactions. CR, CET, CS and IFE, in sequence increasing, had produced antihyperalgesic effect. A dose of CET was analgesic. The IFE potentiated the action of the ketamine and its isomers and was potentiated by racemate and S(+) enantiomer. The pretreatment with ifenprodil was better than the ones with CET or CR. The results suggest that the modulatory action of ifenprodil on the GluN2B subunit associated with the ion channel occlusion induced by ketamine can be useful in the treatment of the inflammatory pain mediated by the NMDARs ($P \leq 0.05$).

Key-words: racemic ketamine, R(-) ketamine, S(+) ketamine, hyperalgesia, ifenprodil, rats

1. Introdução

Dentre os receptores para glutamato, os RNMDAs são os mais importantes na transmissão excitativa lenta das vias nociceptivas (WOOLF & SALTER, 2000) desempenhando um papel-chave na hipersensibilidade (SOUTH *et al.*, 2003). Sua estrutura multimérica, regulada por ligantes (RANG *et al.*, 2004a), apresenta três subunidades com diferentes isoformas (GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D, GluN3A e GluN3B) (ALEXANDER, MATHIE & PETERS, 2008), mas GluN1 e GluN2 precisam coexistir para que o receptor seja funcional.

Os RNMDAs controlam canais iônicos permeáveis a íons monovalentes e ao cálcio (PETRENKO *et al.*, 2003) com cinéticas de ativação e desativação lentas (CANDY, BRICKEY & FARRANT, 2001).

A incitação dos aferentes primários deve ter magnitude suficiente para superar o portão de voltagem que mantém inativo o RNMDA. Uma vez obedecida esta condição, o agonista glutamato interage no GluN2 simultaneamente à glicina, um co-agonista que atua em GluN1. A ativação do RNMDA, promove, a abertura do canal iônico a ele acoplado com conseqüente influxo de íons Ca^{+2} (ERREGER *et al.*, 2004).

O aumento da concentração de Ca^{+2} intracelular desencadeia uma série de eventos. As fosfolipases catalisam a produção de diacilglicerol, eicosanóides e 1,4,5-trifosfato de inositol. A proteína cinase C e a NOS são ativadas. A NOS auxilia na conversão de L-arginina em NO (RIEDEL & NEECK, 2001) que, assim como as PGs, amplifica a liberação pré-sináptica de neurotransmissores por um mecanismo de mensageiro retrógrado secundário (CHAPLAN, MALMBERG & YAKSH, 1997). Ainda em decorrência da elevação do Ca^{+2} citoplasmático, genes – c-fos e c-jun – atuam como terceiros mensageiros influenciando no controle da transcrição de neuropeptídeos colaborando assim, para a cronicidade da dor (CARVALHO & LEMÔNICA, 1998).

Os RNMDAs estão associados à hiperalgesia por lesão nervosa ou inflamatória (RIEDEL & NEECK, 2001), à sensibilização neuronal relacionada à dor crônica (MILAN, 1999) e ao “windup” (RABBEN, SKJELBRED & ØYE, 1999).

A subunidade GluN2B parece regular a liberação de substância P, modulando a transmissão nociceptiva no cordão espinhal (LIU, MANTYH & BASBAUM, 1997) e

assim como a GluN2A, induz a maior parte das correntes pós-sinápticas excitativas relacionadas aos RNMDAs (ZHUO, 2007).

Tendo em vista o reconhecimento do papel dos RNMDAs na dor aguda e crônica envolvendo os fenômenos hiperalgésico e alodínico que as acompanham, o estudo de seus antagonistas vem ganhando destaque. Foi notado um ressurgimento no uso da cetamina, fármaco que chegou a ser considerado como de “segunda linha” dadas as alterações psíquicas, locomotoras e cognitivas relacionadas as suas doses dissociativas.

A cetamina racêmica – enantiômeros R(-) e S(+) – bloqueia os canais iônicos acoplados aos RNMDAs por sua porção interna em doses subanestésicas (VALADÃO, 2002) e externa, reduzindo, respectivamente, o tempo e a frequência de abertura do canal (ORSER, PENNEFATHER & MACDONALD, 1997). Alguns autores concluíram que é capaz de reduzir comportamentos nocifensivos em ratos (ALAM, SAITO e KOSAKA, 1996; BURTON, LEE, SAAB *et al.*, 1999; KAWAMATA, OMOTE, SONODA *et al.*, 2000; SUZUKI, MATTHEWS e DICKENSON, 2001; OATWAY, REID e SAWYNOK, 2003; CHRISTOPH, SCHIENE, ENGLBERGER *et al.*, 2006) e em humanos (EIDE *et al.*, 1995; TAKAHASHI *et al.*, 1998; JERUM, WARNCKE & STUBHAUG, 2003; KVARNSTRÖ *et al.*, 2003) além de controlar a alodinia por tempo superior ao bloqueio dos RNMDAs (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Os enantiômeros S(+) (MUIR & LEES, 1995; KOPPERT *et al.*, 2001) e R(-) (OLIVEIRA *et al.*, 2004) da cetamina também manifestaram ação antinociceptiva sendo que o primeiro tem de duas a quatro vezes mais afinidade pelos RNMDAs e o dobro da potência do racemato para prevenir a sensibilização central (MUIR & LEES, 1995).

Mais recentemente, a descoberta do antagonismo sobre GluN2B de um fármaco anti-hipertensivo, o ifenprodil, despertou novos interesses. O ifenprodil bloqueia, seletivamente, a subunidade GluN2B (CHENARD & MENNITI, 1999) de forma voltagem-independente e não competitiva ao glutamato. Interage com o sítio de poliaminas (CHRISTOPHER, RIVY & SCATTON, 1989) aumentando a sensibilidade da GluN2B à inibição promovida por prótons (ALEXANDER, MATHIE & PETERS, 2008). Demonstrou ação antinociceptiva em vários modelos de dor em animais (CHIZH *et al.*,

2001; BREW *et al.*, 2005) apesar de não apresentar correlação estrutural com os outros antagonistas dos RNMDAs convencionais (CHENARD *et al.*, 1991).

Considerando que a cetamina e o ifenprodil reduzem as respostas dos RNMDAs por mecanismos diferentes, foi conjecturado que um fármaco pode potencializar o efeito anti-hiperalgésico do outro. A fim de refutar ou confirmar a hipótese, foram realizados ensaios farmacológicos determinando, em uma primeira fase, a potência relativa dos agentes e em subsequência, o resultado de suas co-administrações para o controle da hiperalgesia induzida.

2. Material e métodos

Foram utilizados 199 ratos, machos, da linhagem Wistar, com peso corporal entre 180 e 200 g provenientes do biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP, Ribeirão Preto – SP – Brasil) e mantidos com ração comercial e água fornecidas em regime *ad libitum*.

Os ensaios farmacológicos foram realizados no Laboratório de Dor da FMRP/USP.

Cada rato foi utilizado uma única vez. Após os testes, todos foram devolvidos com vida ao biotério da FMRP/USP.

Os cuidados com os animais e os procedimentos realizados estiveram de acordo com o estabelecido pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) (IASP, 2005) e com as normas aprovadas pelo Conselho da Sociedade Norte-Americana de Fisiologia (MUIR III *et al.*, 2001b).

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da FCAV/Unesp-Jaboticabal, Processo nº 004990-08.

Todos os esforços foram realizados para minimizar o número de animais empregados e o nível de desconforto.

2.1. Preparo dos animais

Grupos com seis ratos, escolhidos de forma aleatória, foram separados em caixas para alojá-los. No dia anterior aos testes, os animais foram submetidos à tricotomia na região lombo-sacra e identificados individualmente.

Os experimentos foram conduzidos entre às 8 h e 16 h, sempre no mesmo local, uma sala silenciosa (sala de testes) com temperatura ambiente controlada (25 °C) nas dependências do Laboratório de Dor da FMRP/USP.

Antes da realização dos testes, os ratos passaram por dois períodos de ambientação. No primeiro, permaneceram por 1 h, dentro das caixas na sala de testes. Vinte minutos antes das medições basal e da 3ª hora, os animais foram colocados em caixas de acrílico com compartimentos individuais¹ e piso em tela de arame (Figura 1).

2.2. Delineamento experimental

2.2.1. Método de avaliação da hiperalgesia

O método empregado foi o descrito por VIVANCOS *et al.* (2004). O equipamento utilizado – von Frey eletrônico ou analgesímetro digital² – constituiu-se por um transdutor de força, em cuja extremidade foi fixada uma ponteira de polipropileno de 0,7 mm², ligado a um aparelho que fez a leitura da força aplicada convertendo-a em gramas (Figura 2). Com o animal em estado de alerta e posicionado em decúbito esterno-abdominal (Figura 3), aplicou-se a ponteira no coxim metatársico esquerdo de forma perpendicular e em movimento progressivo ascendente até que o reflexo de retirada do membro fosse obtido.

Em conformidade com WILLIS & CHUNG (1987), movimentos de flexão em ações rítmicas como locomoção ou os atos de coçar ou cavar foram desconsiderados. O tempo total de leitura para cada grupo não ultrapassou 20 min. Foram reputados

¹ Insight Pesquisa e Ensino, Box de contenção com suporte para teste de analgesímetro, Ribeirão Preto – SP, Brasil.

² Insight Pesquisa e Ensino, Modelo EFF 301, Ribeirão Preto – SP, Brasil.

como parcelas perdidas (Pp) animais que não mantiveram a posição adequada para a realização do teste em tempo hábil.

O resultado lido no analgesímetro foi validado apenas quando o animal apresentasse três marcações semelhantes, isto é, com diferença entre a maior e a menor, inferior a 6 g. A média aritmética das três leituras válidas gerou o IH (intensidade hiperalgésica). Para as análises estatísticas e representações gráficas foi considerada a variação (Δ) da reação de retirada obtida pela diferença entre a IH da medida basal – antes da administração de qualquer substância – e a IH tomada três horas após o desafio (3ª hora) com PGE_2 momento no qual este mediador químico atinge o seu efeito máximo (VIVANCOS, PARADA & FERREIRA, 2003).

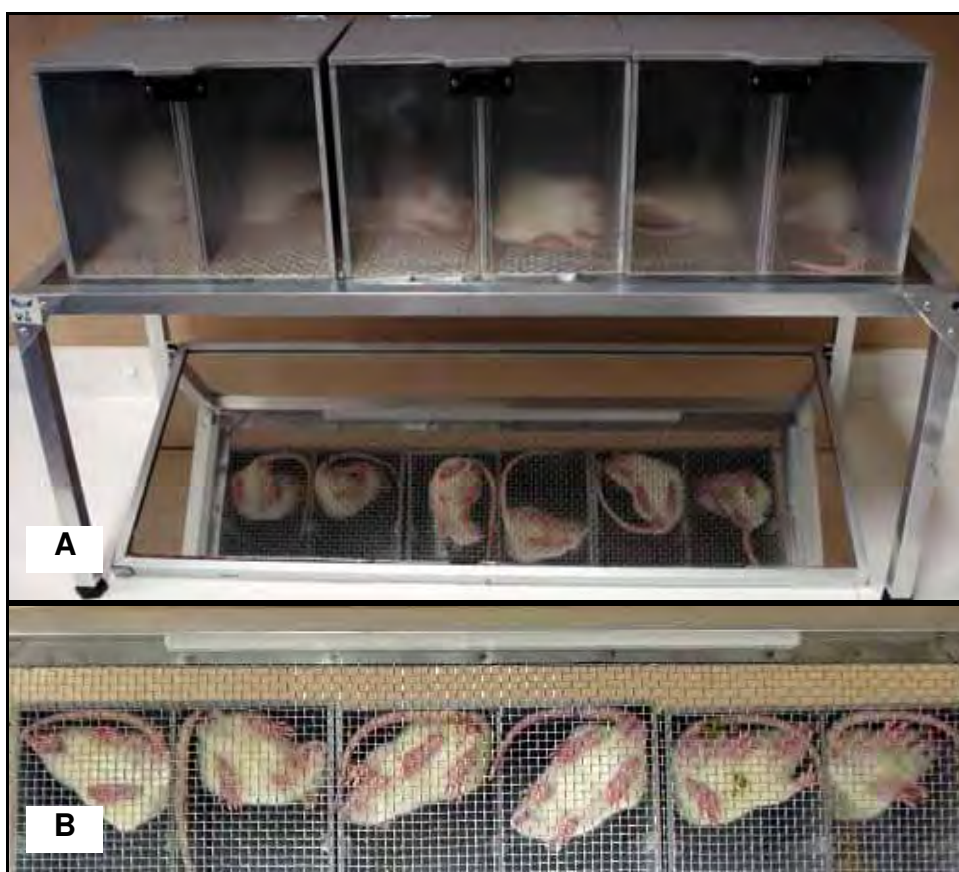


Figura 1. Caixas em acrílico com compartimentos individuais: A) os ratos foram colocados em boxes individuais para ambientarem-se durante 20 min. Abaixo do piso, em tela de arame, foi posicionado um espelho em posição inclinada; B) em destaque, a imagem especular demonstrando a visão do experimentador durante a realização dos testes. Ratos Wistar, machos, peso corporal entre 180 e 200 g.



Figura 2. Analgesímetro digital. A ilustração mostra o equipamento utilizado para avaliar a hiperalgesia. Uma ponteira de polipropileno com 0,7 mm² (1) foi fixada a um transdutor de força (2) ligado ao aparelho de leitura (3) que converteu a força aplicada para valores em gramas.



Figura 3. Posicionamento correto para o teste. Para que a avaliação com analgesímetro digital pudesse ser feita, o rato deveria estar em decúbito esterno-abdominal e em estado de alerta. A ponteira do aparelho foi aplicada entre as malhas da grade no centro da superfície plantar esquerda (círculo em vermelho). Ratos Wistar, machos, peso corporal entre 180 e 200 g.

2.2.2. Aplicação dos fármacos e do estímulo hiperalgésico

Após a obtenção da medida basal, os animais foram submetidos à punção intratecal percutânea com agulha incorporada à seringa³ de 0,3 mL entre a 5ª e 6ª vértebras lombares (L5 e L6) utilizando a técnica descrita por MESTRE, PÉLISSIE, FIALIP *et al.* (1994). O posicionamento correto da agulha foi confirmado pela ocorrência de um movimento brusco na cauda – chicotear – (MASSONE, 2003) permitindo a aplicação do protocolo farmacológico em teste.

As doses foram calculadas a partir do peso corporal base de 200 g. Os volumes finais de injeção foram ajustados para 20 µL utilizando-se solução de NaCl 0,9% como diluente.

Em cada grupo, houve um rato que recebeu solução de NaCl a 0,9% por via IT com mesmo volume final de injeção (20 µL) dos outros cinco medicados e foi utilizado para determinar se a PGE₂ aplicada evocava hiperalgesia. Os resultados obtidos com os animais tratados com NaCl a 0,9% de diferentes doses de um mesmo fármaco, balizaram os efeitos produzidos pelo medicamento em função da dose administrada. Nos gráficos e análises estatísticas os ratos que serviram como controle para o estímulo hiperalgésico aparecem representados como grupo salina.

Para determinar as potências relativas, 20 µL de cada fármaco foram administrados por via IT. Este volume final de injeção já havia sido descrito por outros autores que trabalharam com ratos na mesma faixa de peso dos que foram utilizados (CHAPLAN, MALMBERG & YAKSH, 1997; XU & YANG, 2006).

A fim de estabelecer as curvas isobol, após a administração do 1º antagonista RNMDA, foi feita nova punção intratecal seguida da aplicação do 2º tratamento. Neste caso, foram administrados 10 µL de cada agente para que o volume final se mantivesse inalterado entre os testes de potência relativa e isobolográficos.

Trinta minutos após o último tratamento os animais receberam a injeção intraplantar de 100 µL de PGE₂⁴ (VIVANCOS *et al.*, 2004) na concentração de 1 ng/µL pela via intraplantar no membro esquerdo. A PGE₂ utilizada havia sido previamente

³ Seringa BD com Agulha BD Ultra-Fine®, Becton, Dickinson and Co., São Paulo – SP, Brasil.

⁴ E₂ Prostaglandin, Sigma-Aldrich, Saint Louis – Missouri, USA.

diluída em etanol e armazenada conforme as orientações do fabricante e rediluída, no máximo 10 min antes do uso, em solução de NaCl 0,9%. A dose e volume de PGE₂ empregados haviam sido testados no trabalho de VIVANCOS, VERRI JR & CUNHA (2004) e considerados efetivos na indução da hiperalgesia.

2.2.3. Determinação da potência relativa dos fármacos

XU & YANG (2006) descreveram a dose de 0,5 µg/g de cetamina racêmica e a de 0,05 µg/g (por via IT) de ifenprodil como analgésicas. Estas doses foram tomadas como parâmetro para a elaboração das doses testadas.

Cetamina racêmica⁵, cetamina R(-)⁶, cetamina S(+)⁷ e ifenprodil⁸ foram diluídos, quando necessário, em solução de NaCl a 0,9%. Cada dose calculada foi administrada (por via IT) a cinco ratos, o sexto animal do grupo recebeu injeção (por via IT) de solução de NaCl a 0,9%, conforme discriminado no item 2.2.2. O tratamento precedeu o estímulo hiperalgésico em 30 min. As doses empregadas estão relacionadas na tabela 1.

Tabela 1. Relação nominal dos fármacos, suas respectivas abreviaturas – convencionadas para este experimento – e doses utilizadas na determinação das potências relativas. Os medicamentos foram injetados por via intratecal em ratos Wistar, 30 min antes do estímulo com PGE₂. O peso corporal base considerado para o cálculo das doses foi 200 g.

FÁRMACOS	ABREVIATURAS	DOSES (µg/200g)				
Cetamina racêmica	CET	6	20	30	60	600
Cetamina R(-)	CR	20	60	200	400	600
Cetamina S(+)	CS	6	20	30	60	200
Ifenprodil	IFE	0,6	2	20	60	—

⁵ Francotar, Laboratório Virbac, Eurofarma Laboratórios Ltda., São Paulo – SP, Brasil.

⁶ Cetamina R(-), Laboratório Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira – SP, Brasil.

⁷ Ketamin S(+), Laboratório Cirstália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira – SP, Brasil.

⁸ Ifenprodil Tartrate Salt, Sigma-Aldrich, Saint Louis – Missouri, USA.

2.2.4. Determinação das interações farmacológicas

Realizaram-se estudos isobolográficos embasados na determinação da potência relativa dos fármacos (Item 2.2.3). Desta forma, a dose não efetiva (subdose) de um agente ou sua dose efetiva, mas inferior a dose máxima (dose subliminar) foram fixadas e administradas como pré-tratamento à subdoses e/ou doses subliminares do outro fármaco.

Cada substância foi diluída em solução de NaCl a 0,9% para que a injeção fosse de 10 µL e, desta forma, a aplicação dos dois agentes mantivesse o mesmo volume final do usado nos testes de potência relativa.

Ao se testar uma interação farmacológica, administrou-se a combinação de medicamentos (por via IT) a cinco ratos, o sexto animal do grupo recebeu injeção por via IT de solução de NaCl a 0,9%. O tratamento com associação de fármacos precedeu o estímulo hiperalgésico em 30 min. Os grupos foram identificados com as abreviaturas dos medicamentos, seguindo a sua seqüência de administração, unidas pelo sinal + (símbolo de somação). A dose empregada para o segundo fármaco administrado encontra-se representada, sem a unidade de medida, após a abreviatura da associação farmacológica. A tabela 2 relaciona os medicamentos utilizados com suas respectivas abreviaturas e doses.

2.2.5. Análises estatísticas

Os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism®⁹.

Fez-se uso dos testes de análise de variância de uma via e o pós-teste de comparação múltipla de colunas de Student-Newman-Keuls. O teste t (Student) foi utilizado para confrontar resultados entre dois grupos.

As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

⁹ GraphPad Prism versão 4.00, GraphPad Software, Inc – California, EUA.

Tabela 2. Relação nominal das combinações farmacológicas testadas com as respectivas doses (μg) e abreviaturas convencionadas. O pré-tratamento refere-se à administração do fármaco cuja dose foi mantida fixa. O tratamento consistiu na aplicação de doses variáveis do segundo fármaco da associação. Os medicamentos foram injetados por via intratecal em ratos Wistar, 30 min antes do estímulo com PGE_2 . O peso corporal base considerado para o cálculo das doses foi 200 g.

ASSOCIAÇÕES (Pré-tratamento + tratamento)	SUBDOSES OU DOSES SUBLIMINARES (μg)		ABREVIATURAS
	Pré-tratamento	Tratamento	
Cetamina + ifenprodil	20	0,6	CET+IFE 0,6
		2	CET+IFE 2
Ifenprodil + cetamina	0,6	6	IFE+CET 6
		20	IFE+CET 20
Cetamina R(-) + ifenprodil	20	0,6	CR+IFE 0,6
		2	CR+IFE 2
Ifenprodil + cetamina R(-)	0,6	20	IFE+CR 20
		60	IFE+CR 60
Cetamina S(+) + ifenprodil	20	0,6	CS+IFE 0,6
		2	CS+IFE 2
Ifenprodil + cetamina S(+)	0,6	6	IFE+CS 6
		20	IFE+CS 20

CET= cetamina racêmica; CR= cetamina R(-); CS= cetamina S(+); IFE= ifenprodil.

3. Resultados

3.1. Determinação da potência relativa dos fármacos

As medições, determinadas experimentalmente com o analgesímetro digital, representam a intensidade da hiperalgesia e foram convertidas a Δ (variação) da reação de retirada (g). Essas variações acompanhadas por suas médias aritméticas, erros padrão e desvios padrão estão relacionados em tabelas.

As representações gráficas, em colunas e em curvas, tiveram as doses inseridas no eixo das abscissas e as respostas, no eixo das ordenadas. Nestas, encontram-se também os valores médios apurados e seus respectivos erros padrão.

As curvas foram elaboradas a partir da regressão linear das doses [$\log(\text{dose})$]. Calculou-se as EC_{50} que representam a dose do fármaco que produz 50% da resposta entre os valores máximo e mínimo. A EC_{50} está relacionada à potência do fármaco.

3.1.1. Cetamina racêmica

Um animal não permaneceu na posição adequada para a realização do teste em tempo hábil e por isso, foi considerado como parcela perdida. A partir da dose de 60 μg alguns ratos apresentaram variação na reação de retirada inferior a zero e esta tendência se confirmou com a dose de 600 $\mu\text{g}/200\text{ g}$ refletindo-se na média do grupo (Tabela 3).

O gráfico em colunas (Figura 4A) demonstra que as doses superiores a 30 μg foram efetivas, mas as respostas diferiram significativamente das de 60 μg .

Submetendo-se as doses à regressão linear (Figura 4B), alcançou-se $\log EC_{50}$ de 1,538 $\mu\text{g}/200\text{ g}$ correspondendo à $EC_{50} = 34,48\text{ }\mu\text{g}/200\text{ g}$ (0,17 mg/kg).

3.1.2. Enantiômero R(-) da cetamina

Em três ratos não foi possível estabelecer a intensidade hiperalgésica visto não terem atendido às exigências para o teste. Assim, foram considerados como parcelas perdidas (Tabela 4).

A representação gráfica em colunas (Figura 5A) evidencia que doses superiores a 60 $\mu\text{g}/200\text{ g}$ produziram efeito. A dose de 200 μg reduziu mais a intensidade hiperalgésica que a de 60 μg , o mesmo tendo sido observado no confronto entre 400 μg vs. 200 μg e 600 μg vs. 400 μg .

Após a regressão linear das doses (Figura 5B), foi precisado $\log EC_{50}$ de 2,087 $\mu\text{g}/200\text{ g}$ correspondendo à $EC_{50} = 122,3\text{ }\mu\text{g}/200\text{ g}$ (0,61 mg/kg).

3.1.3. Enantiômero S(+) da cetamina

Como anteriormente descrito, as variações nas reações de retirada (g) suas médias, erros padrão e desvios padrão estão apresentados na tabela 5.

Doses acima de 20 $\mu\text{g}/200\text{ g}$ foram anti-hiperalgésicas tendo havido diferença significativa entre os efeitos produzidos por 30 μg vs. 20 μg e 60 μg vs. 30 μg . Alguns animais tratados com 200 μg demonstraram variações nas reações de retirada inferiores a zero, mas o achado não se confirmou nos demais (Figura 6A).

As doses foram convertidas por regressão linear (Figura 6B). O $\log EC_{50}$ calculado foi 1,254 $\mu\text{g}/200\text{ g}$ correspondendo a $EC_{50} = 17,96\text{ }\mu\text{g}/200\text{ g}$ (0,09 mg/kg).

3.1.4. Ifenprodil

Os resultados (g) foram apresentados na tabela 6.

O gráfico em colunas (Figura 7A) demonstra que doses superiores à 2 $\mu\text{g}/200\text{ g}$ foram eficazes na redução da hiperalgesia. As doses de 20 μg e de 2 μg produziram efeitos de intensidade significativamente diferentes. Em alguns casos, o fármaco mostrou-se analgésico entretanto, este achado não se refletiu nas médias dos grupos (20 e 60 μg).

Após a regressão linear das doses (Figura 7B), foi encontrado $\log EC_{50}$ de 0,3087 $\mu\text{g}/200\text{ g}$ correspondendo à $EC_{50} = 2,035\text{ }\mu\text{g}/200\text{ g}$ (0,01 mg/kg).

Tabela 3. Variação (Δ) das reações de retirada (g) em resposta às administrações de cinco doses, por via IT (intratecal), de 20 μ L de CET (cetamina racêmica), 30 min antes do estímulo hiperálgico com PGE₂ (100 ng em 100 μ L, por via intraplantar). No grupo salina aplicou-se 20 μ L (por via IT) de solução NaCl a 0,9%. Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos. As doses foram calculadas a partir do peso corporal base de 200 g.

GRUPOS	Salina			CET		
DOSES	20 μ L	6 μ g	20 μ g	30 μ g	60 μ g	600 μ g
Δ da reação de retirada (g)	16,28	12,72	11,98	11,20	-3,78	-2,67
	14,81	16,41	17,73	6,12	4,01	-2,48
	14,22	12,10	11,41	5,78	1,97	2,56
	17,79	18,86	16,63	9,45	-0,78	-4,52
	14,63	12,10	12,28	Pp	3,29	-2,72
n	5	5	5	4	5	5
Médias	15,55	14,44	14,01	8,138	0,942	-1,966
Desvios Padrão	1,476	3,055	2,94	2,629	3,211	2,662
Erros Padrão	0,6601	1,366	1,315	1,314	1,436	1,19

CET= cetamina racêmica; n= tamanho da amostra; Pp = parcela perdida; Δ = variação.

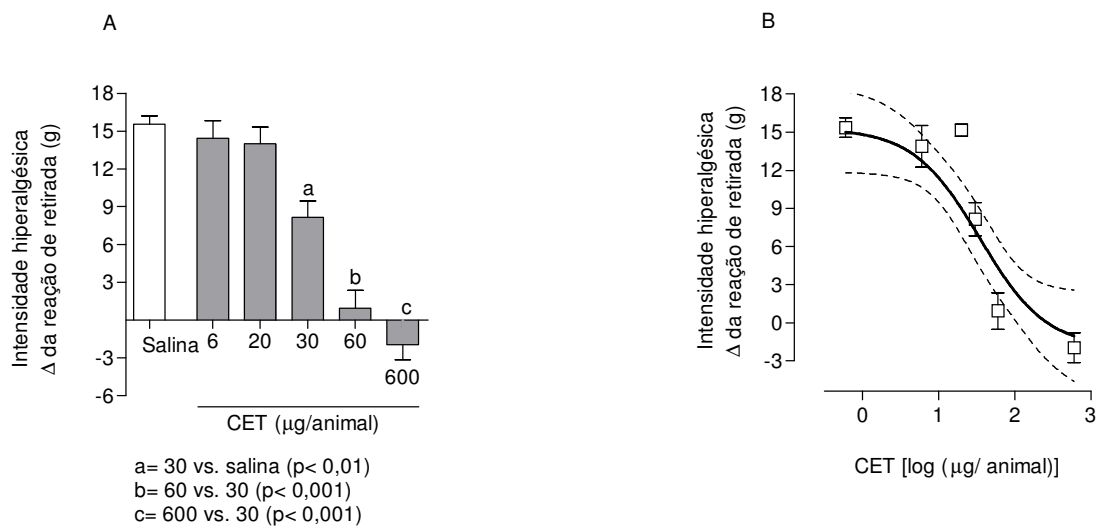


Figura 4 . Gráficos dose vs. resposta para CET (cetamina racêmica). Os valores representam as médias aritméticas com seus respectivos erros padrão: A) na representação em colunas, as doses superiores a 30 μ g foram anti-hiperalgésicas e a de 600 μ g foi analgésica; houve diferença significativa entre os efeitos produzidos a partir de 60 μ g confrontados com os obtidos por 30 μ g.; B) a curva, calculada por regressão linear das doses, demonstra os valores médios encontrados confrontados com os intervalos de confiança (95%). Ratos machos da linhagem Wistar. Peso corporal base: 200 g.

Tabela 4. Variação (Δ) das reações de retirada (g) em respostas às administrações de cinco doses por via IT (intratecal) de 20 μ L de CR [cetamina R(-)], 30 min antes do estímulo hiperálgico com PGE₂ (100 ng em 100 μ L, por via intraplantar). No grupo salina aplicou-se 20 μ L (por via IT) de solução NaCl a 0,9%. Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos. As doses foram calculadas a partir do peso corporal base de 200 g.

GRUPOS	Salina	CR				
DOSES	20 μ L	20 μ g	60 μ g	200 μ g	400 μ g	600 μ g
Δ da reação de retirada (g)	17,09	14,38	12,61	11,43	5,62	4,33
	16,21	15,73	12,76	7,36	7,37	4,02
	14,93	15,56	13,37	9,11	7,23	4,76
	16,87	16,41	11,01	7,56	7,35	4,63
	17,27	17,16	Pp	Pp	Pp	3,16
n	5	5	4	4	4	5
Médias	16,47	15,85	12,44	8,865	6,893	4,180
Desvios Padrão	0,9518	1,036	1,007	1,880	0,8506	0,6378
Erros Padrão	0,4256	0,4631	0,5034	0,9402	0,4253	0,2853

CR= cetamina R(-); n= tamanho da amostra; Pp= parcela perdida; Δ = variação.

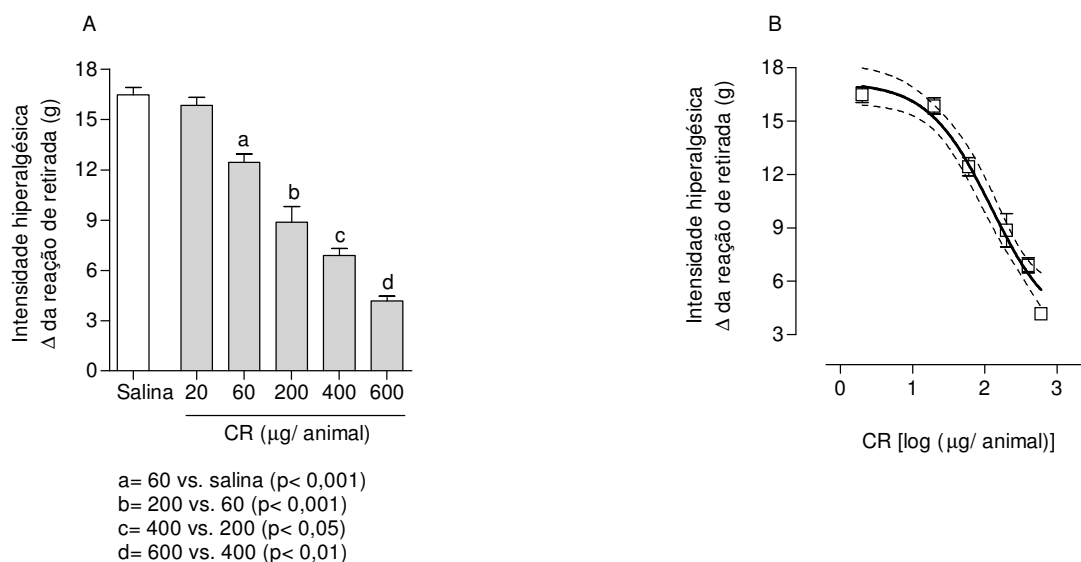


Figura 5. Gráficos dose vs. resposta para CR. Os valores representam as médias aritméticas com seus respectivos erros padrão: A) na representação em colunas, as doses superiores a 60 μ g foram efetivas tendo havido diferença significativa entre os efeitos produzidos por 200 μ g vs. 60 μ g, 400 μ g vs. 200 μ g e 600 μ g vs. 400 μ g; B) a curva, obtida a partir da regressão linear das doses, demonstra os valores médios encontrados confrontados com os intervalos de confiança (95%). Ratos machos da linhagem Wistar. Peso corporal base: 200 g.

Tabela 5. Variação (Δ) das reações de retirada (g) em resposta às administrações de cinco doses, por via IT (intratecal), de 20 μ L de CS [cetamina S(+)], 30 min antes do estímulo hiperalgésico com PGE₂ (100 ng, 100 μ L, por via intraplantar). No grupo salina aplicou-se 20 μ L (por via IT) de solução NaCl a 0,9%. Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos. As doses foram calculadas a partir do peso corporal base de 200 g.

GRUPOS	Salina	CS				
DOSES	20 μ L	6 μ g	20 μ g	30 μ g	60 μ g	200 μ g
Δ da reação de retirada (g)	17,55	9,15	12,05	8,47	3,57	-0,12
	16,35	18,78	12,84	5,86	0,66	-0,19
	13,91	16,69	9,09	8,85	3,82	0,12
	13,36	17,69	11,40	5,15	1,93	1,01
	20,53	14,89	8,44	7,01	3,09	0,54
n	5	5	5	5	5	5
Médias	16,34	15,44	10,76	7,068	2,614	0,2720
Desvios Padrão	2,907	3,796	1,909	1,603	1,312	0,5017
Erros Padrão	1,3	1,698	0,8536	0,717	0,5866	0,2244

CS= cetamina S(+); n= tamanho da amostra; Δ = variação.

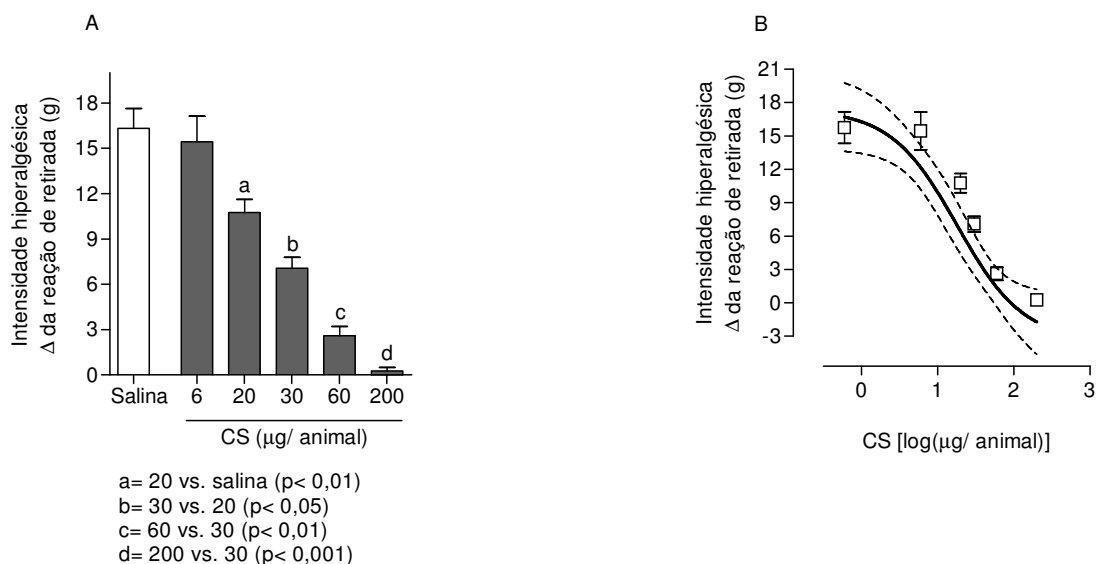


Figura 6. Gráficos dose vs. resposta para CS. Os valores representam as médias aritméticas com seus respectivos erros padrão: A) na representação em colunas, as doses superiores a 20 μ g foram efetivas tendo havido diferença significativa entre os efeitos produzidos por 30 μ g vs. 20 μ g e 60 μ g vs. 30 μ g; B) a curva, obtida a partir da regressão linear das doses, demonstra os valores médios encontrados confrontados com os intervalos de confiança (95%). Ratos machos da linhagem Wistar. Peso corporal base: 200 g.

Tabela 6. Variação (Δ) das reações de retirada (g) em resposta às administrações de quatro doses, por via IT (intratecal), de 20 μ L de IFE (ifenprodil), 30 min antes do estímulo hiperalgésico com PGE₂ (100 ng, 100 μ L). No grupo salina aplicou-se 20 μ L (por via IT) de solução NaCl a 0,9%. Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos. As doses foram calculadas a partir do peso corporal base de 200 g.

GRUPOS	Salina		IFE		
DOSES	20 μ L	0,6 μ g	2 μ g	20 μ g	60 μ g
Δ da reação de retirada (g)	16,18	9,58	5,67	1,17	1,64
	15,32	14,51	8,67	-2,25	2,31
	13,30	15,35	6,92	0,90	0,49
	12,35	14,62	9,55	3,68	1,34
	12,54	14,63	7,11	3,60	-0,10
n	5	5	5	5	5
Médias	13,94	13,74	7,584	1,420	1,136
Desvios Padrão	1,719	2,348	1,531	2,432	0,9512
Erros Padrão	0,7688	1,05	0,6846	1,088	0,4254

IFE= ifenprodil; n= tamanho da amostra; Δ = variação.

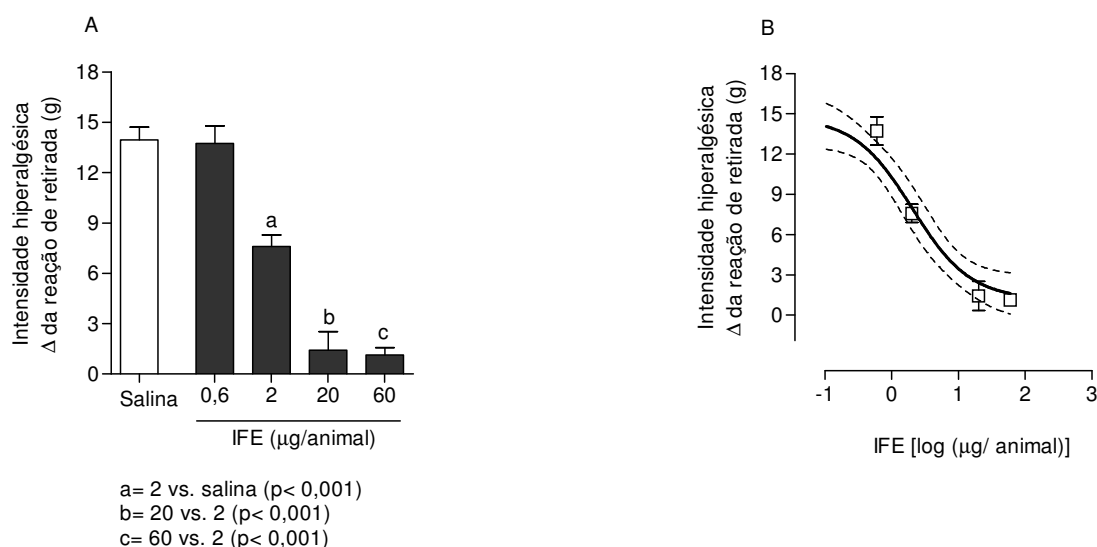


Figura 7. Gráficos dose vs. resposta para ifenprodil. Os valores representam as médias aritméticas com seus respectivos erros padrão: A) na representação em colunas, as doses superiores a 2 μ g foram efetivas tendo havido diferença significativa entre os efeitos produzidos por 20 μ g vs. 2 μ g; B) a curva, obtida a partir da regressão linear das doses, demonstra os valores médios encontrados confrontados com os intervalos de confiança (95%). Ratos machos da linhagem Wistar. Peso corporal base: 200 g.

3.2. Isobologramas

Os estudos de potência relativa embasaram os isobologramas. As subdoses e as doses subliminares foram selecionadas.

Os deltas das reações de retirada (g) estão apresentados em tabelas e foram utilizados na elaboração de gráficos dose (eixo das abscissas) vs. resposta (eixo das ordenadas). As colunas denotam valores absolutos ou percentuais, conforme a representação gráfica.

Objetivando-se quantificar a inibição da hiperalgesia promovida pelos fármacos os valores das reações de retirada foram convertidos em valores percentuais conforme a fórmula abaixo:

$$D = 100\% \text{ de hiperalgesia} - C\%$$

Para tanto, considerou-se que o grupo salina de cada isoblograma apresentou reações de retirada (A) que correspondem a 100% de hiperalgesia. Os grupos tratados com os fármacos em teste tiveram suas respostas (B) convertidas em percentual hiperalgésico, por meio de regra de três, seguindo o seguinte princípio: se o valor (A) representa 100% de hiperalgesia o valor (B) corresponde então a (C%) de hiperalgesia. Por fim, subtraindo-se 100% de hiperalgesia do valor percentual de cada grupo (C%) chegou-se ao percentual de inibição hiperalgésica para este grupo (D), valor que figura nos gráficos.

3.2.1. Interação farmacológica entre cetamina racêmica e ifenprodil

3.2.1.1. Pré-tratamento com cetamina racêmica

As respostas (g) aos tratamentos preventivos ao estímulo hiperalgésico encontram-se na tabela 7.

Uma dose não efetiva de CET (20 µg/200 g) modificou significativamente o efeito produzido pelas doses de 0,6 µg e 2 µg/200 g de IFE. Um gráfico (Figura 8) expressa a ação sinérgica da associação de CET com IFE para o efeito anti-hiperalgésico. A

comparação entre os tratamentos associados (CET+IFE 0,6 vs. CET+IFE 2) também apresentou respostas significativamente diferentes.

Os valores convertidos em percentuais de inibição hiperalgésica (Tabela 8) demonstram que a soma da inibição conseguida com os fármacos isolados é inferior à promovida pela combinação destes, configurando potencialização. Este achado está representado na figura 9.

3.2.1.2. Pré-tratamento com ifenprodil

Os resultados (g) dos tratamentos preventivos ao estímulo hiperalgésico encontram-se na tabela 9.

Ao administrarem-se subdoses de CET (6 µg e 20 µg) após uma dose fixa não efetiva de IFE (0,6 µg/200 g) os deltas das reações de retirada (g) apresentaram-se significativamente diferentes entre os grupos CET (6 µg) vs. IFE+CET 6 e grupos CET (20 µg) vs. IFE+CET 20 conforme ilustrado na figura 10. O tratamento IFE+CET 20 foi mais efetivo que o IFE+CET 6.

Os resultados em percentual de inibição hiperalgésica foram relacionados na tabela 10. O efeito obtido pelos tratamentos associados supera a soma dos efeitos conseguidos com os fármacos isolados (Figura 11).

Tabela 7. Variação (Δ) das reações de retirada (g) em resposta às administrações de cetamina racêmica (20 μ g), ifenprodil (0,6 e 2 μ g) e suas associações. No grupo salina aplicou-se solução NaCl a 0,9%. O volume final de injeção, por via intratecal, foi ajustado para 20 μ L. A PGE₂ (100 ng em 100 μ L, por via intraplantar) foi aplicada 30 min após o último tratamento. Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos. Peso corporal base: 200 g.

TRATAMENTOS	Controle	Fármacos isolados			Fármacos associados	
GRUPOS	Salina	CET	IFE		CET+IFE 0,6	CET+IFE 2
DOSES	20 μ L	20 μ g	0,6 μ g	2 μ g	20 μ g + 0,6 μ g	20 μ g + 2 μ g
Δ da reação de retirada (g)	12,02	11,98	9,58	5,67	4,87	2,94
	13,63	17,73	14,51	8,67	4,74	1,30
	15,89	11,41	15,35	6,92	2,20	0,75
	14,66	16,63	14,62	9,55	8,76	3,81
	—	12,28	14,63	7,11	4,50	1,04
n	4	5	5	5	5	5
Médias	14,05	14,01	13,74	7,584	5,014	1,968
Desvios Padrão	1,639	2,94	2,348	1,531	2,362	1,335
Erros Padrão	0,8193	1,315	1,056	0,6846	1,056	0,597

CET= cetamina racêmica; IFE= ifenprodil; n= tamanho da amostra; Δ = variação.

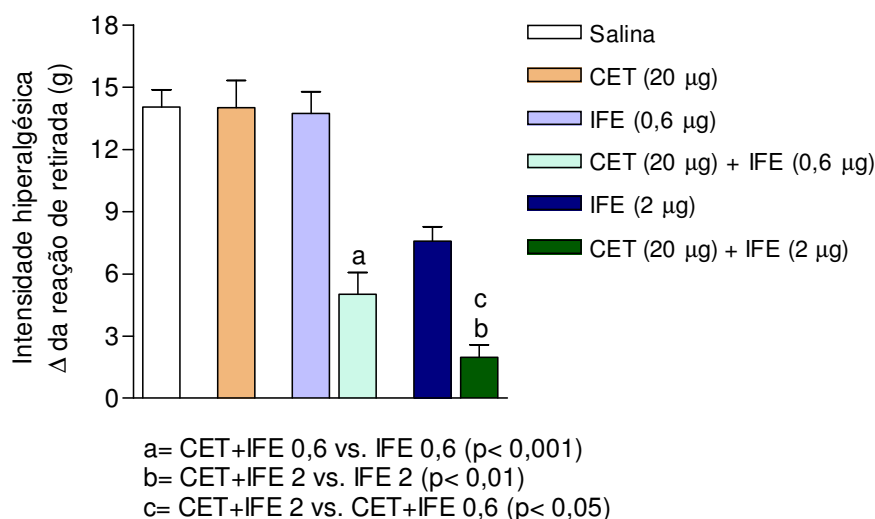


Figura 8. Isoblograma CET+IFE. Uma dose não efetiva de CET (20 μ g) foi empregada como pré-tratamento a duas doses de IFE (0,6 e 2 μ g). A subdose de IFE tornou-se efetiva após o uso de CET e a dose subliminar, teve seu efeito melhorado. A associação farmacológica demonstrou ser sinérgica. Fármacos aplicados por via IT, 30 min antes do estímulo hiperálgico (PGE₂, 100 ng em 100 μ L por via intraplantar). Ratos Wistar machos. Peso corporal base: 200 g.

Tabela 8. Respostas – em % de inibição hiperalgésica – às administrações, por via intratecal, de cetamina racêmica (20 µg), ifenprodil (0,6 e 2 µg) e suas associações. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.

TRATAMENTOS	Fármacos isolados			Fármacos associados	
GRUPOS	CET	IFE		CET+IFE 0,6	CET+IFE 2
DOSES	20 µg	0,6 µg	2 µg	20 µg + 0,6 µg	20 µg + 2 µg
Inibição hiperalgésica	0,31%	2,22%	46,02%	64,31%	85,99%

CET= cetamina racêmica; IFE= ifenprodil.

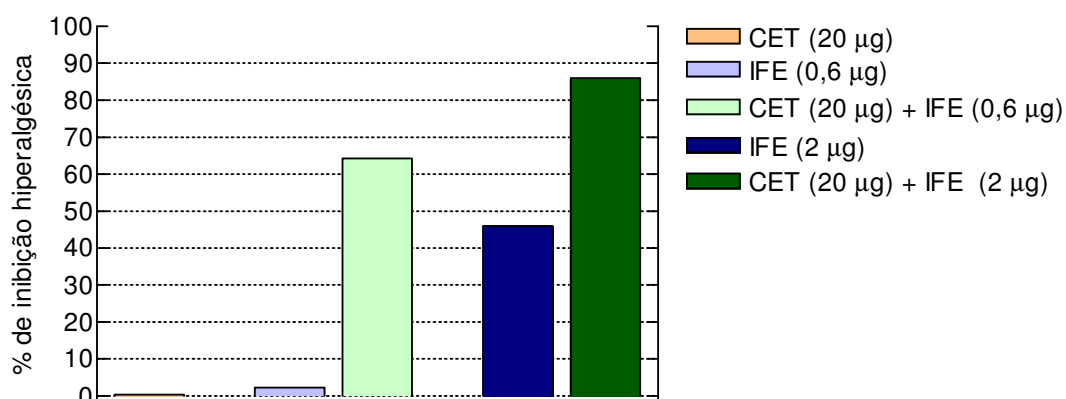


Figura 9. Representação gráfica, em valores percentuais, do isoblograma CET+IFE. Cinco tratamentos são confrontados. Ao se somar a inibição percentual promovida pelos agentes usados de forma isolada constata-se que sua associação produz efeito superior. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.

Tabela 9. Variação (Δ) das reações de retirada (g) em resposta às administrações de ifenprodil (0,6 μ g), cetamina racêmica (6 e 20 μ g) e suas associações. No grupo salina aplicou-se solução NaCl a 0,9%. O volume final de injeção, por via intratecal, foi ajustado para 20 μ L. A PGE₂ (100 ng em 100 μ L, por via intraplantar) foi aplicada 30 min após o último tratamento. Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos. Peso corporal base: 200 g.

TRATAMENTOS	Controle	Fármacos isolados			Fármacos associados	
GRUPOS	Salina	IFE	CET		IFE+CET 6	IFE+CET 20
DOSES	20 μ L	0,6 μ g	6 μ g	20 μ g	0,6 μ g + 6 μ g	0,6 μ g + 20 μ g
Δ da reação de retirada (g)	12,02	9,58	12,72	11,98	6,94	2,42
	13,63	14,51	16,41	17,73	8,28	1,24
	15,89	15,35	12,10	11,41	6,81	2,97
	14,66	14,62	18,86	16,63	4,11	2,45
	—	14,63	12,10	12,28	7,04	0,06
n	4	5	5	5	5	5
Médias	14,05	13,74	14,44	14,01	6,636	1,828
Desvios Padrão	1,639	2,348	3,055	2,94	1,53	1,174
Erros Padrão	0,8193	1,05	1,366	1,315	0,6844	0,525

CET= cetamina racêmica; IFE= ifenprodil; n= tamanho da amostra; Δ = variação.

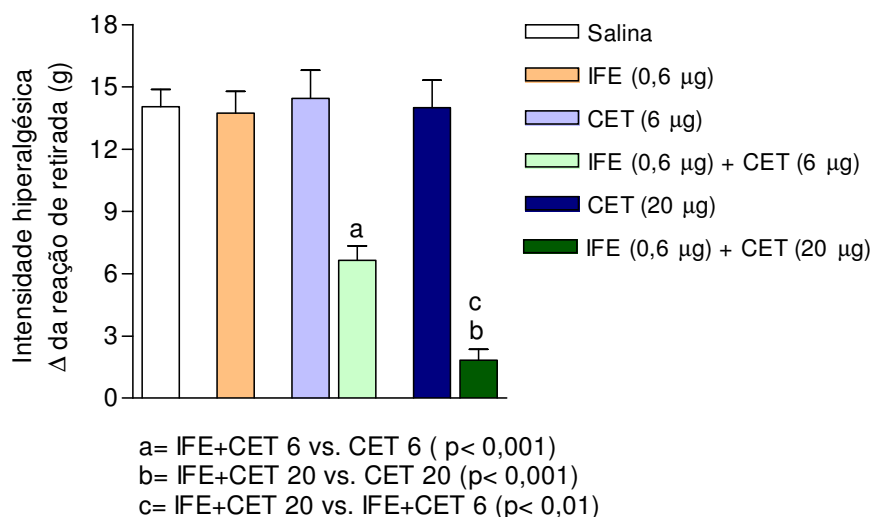


Figura 10. Isoblograma IFE+CET. Uma dose não efetiva de IFE (0,6 μ g) foi utilizada como pré-tratamento a duas doses de CET (6 e 20 μ g). As subdoses de CET tornaram-se efetivas após o uso de IFE. A associação farmacológica demonstrou ser de sinergismo. Fármacos aplicados por via IT, 30 min antes do estímulo hiperálgico (PGE₂, 100 ng em 100 μ L por via intraplantar). Ratos Wistar machos. Peso corporal base: 200 g.

Tabela 10. Respostas – em % de inibição hiperalgésica – às administrações, por via intratecal, de ifenprodil (0,6 µg), cetamina racêmica (6 e 20 µg) e suas associações. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.

TRATAMENTOS	Fármacos isolados			Fármacos associados	
GRUPOS	IFE	CET		IFE+CET 6	IFE+CET 20
DOSES	0,6 µg	6 µg	20 µg	0,6 µg + 6 µg	0,6 µg + 20 µg
Inibição hiperalgésica	2,22 %	0,0 %	0,31 %	52,77 %	86,9 %

CET= cetamina racêmica; IFE= ifenprodil.

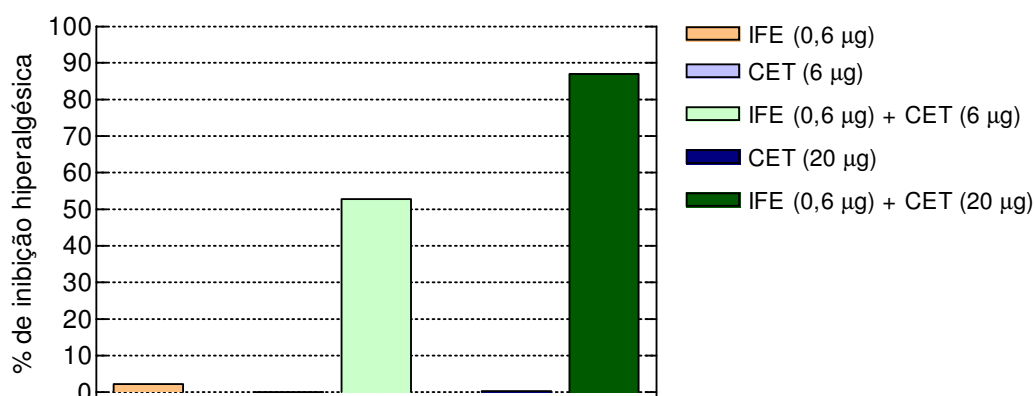


Figura 11. Representação gráfica, em valores percentuais, do isoblograma IFE+CET. Cinco tratamentos são confrontados. Ao se somar a inibição percentual promovida pelos agentes usados de forma isolada constata-se que sua associação produz efeito superior. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.

3.2.2. Interação farmacológica entre cetamina R(-) e ifenprodil

3.2.2.1. Pré-tratamento com cetamina R(-)

Um animal não atendeu aos requisitos para o teste e foi considerado como parcela perdida.

A aplicação prévia de cetamina R(-) (20 µg) não modificou significativamente o efeito das doses de 0,6 µg e 2 µg de ifenprodil. Os valores dos deltas das reações de retirada (g) estão na tabela 11 e o gráfico em colunas (Figura 12) aponta a proximidade entre os efeitos dos fármacos usados isoladamente ou de forma combinada.

3.2.2.2. Pré-tratamento com ifenprodil

Em oposição ao anteriormente observado, o tratamento com ifenprodil (0,6 µg) modificou o efeito das subdoses (6 e 20 µg) da cetamina R(-). Os resultados estão listados na tabela 12 e ilustrados na figura 13. O aumento da dose de cetamina R(-) intensificou o efeito inibitório do tratamento associado.

A inibição percentual promovida pelos agentes isolados ou em associação consta na tabela 13. Observando-se a inibição produzida pelos fármacos usados em combinação nota-se um valor superior à soma dos efeitos isolados (Figura 14).

Tabela 11. Variação (Δ) das reações de retirada (g) em resposta às administrações de 20 μ g de cetamina R(-), ifenprodil (0,6 e 2 μ g) e suas associações. No grupo salina aplicou-se solução NaCl a 0,9%. O volume final de injeção, por via intratecal, foi ajustado para 20 μ L. O estímulo hiperalgésico aplicado foi uma injeção intraplantar de PGE₂ (100 ng em 100 μ L, por via intraplantar). Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos. Peso corporal base: 200 g.

TRATAMENTOS	Controle	Fármacos isolados			Fármacos associados	
GRUPOS	Salina	CR	IFE		CR+IFE 0,6	CR+IFE 2
DOSES	20 μ L	20 μ g	0,6 μ g	2 μ g	20 μ g + 0,6 μ g	20 μ g + 2 μ g
Δ da reação de retirada (g)	12,94	14,38	9,58	5,67	11,18	3,36
	14,70	15,73	14,51	8,67	14,72	8,50
	16,93	15,56	15,35	6,92	14,04	7,24
	18,09	16,41	14,62	9,55	11,53	5,77
	—	17,16	14,63	7,11	Pp	6,39
n	4	5	5	5	4	5
Médias	15,67	15,85	13,74	7,584	12,87	6,252
Desvios Padrão	2,298	1,036	2,348	1,531	1,774	1,913
Erros Padrão	1,149	0,4631	1,05	0,6846	0,8871	0,5909

CR= cetamina R(-); IFE= ifenprodil; Pp= parcela perdida; n= tamanho da amostra; Δ = variação.

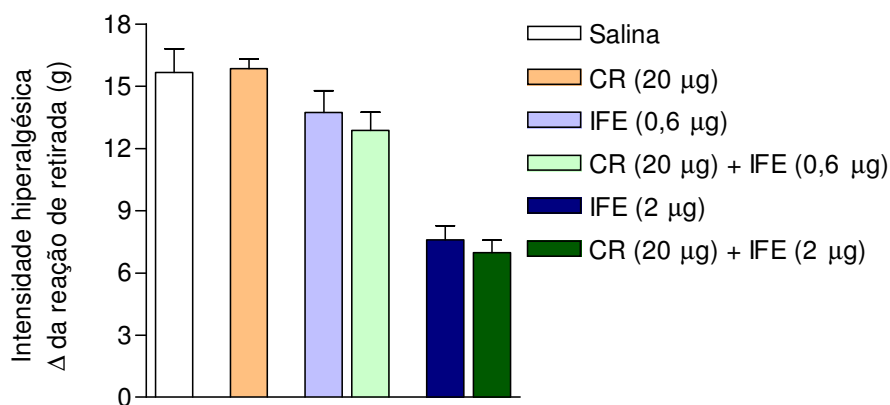


Figura 12. Isoblograma CR+IFE. Uma dose não efetiva de CR (20 μ g) foi utilizada como pré-tratamento a duas doses de IFE (0,6 e 2 μ g). Não houve diferença entre os tratamentos com fármacos utilizados isoladamente ou em associação. Fármacos aplicados por via IT, 30 min antes do estímulo hiperalgésico (PGE₂, 100 ng em 100 μ L por via intraplantar). Ratos Wistar machos. Peso corporal base: 200 g.

Tabela 12. Variação (Δ) das reações de retirada (g) em resposta às administrações de ifenprodil (0,6 μ g), forma R(-) da cetamina (6 e 20 μ g) e suas associações. No grupo salina aplicou-se solução NaCl a 0,9%. O volume final de injeção, por via intratecal, foi ajustado para 20 μ L. O estímulo hiperalgésico aplicado foi uma injeção intraplantar de PGE₂ (100 ng em 100 μ L, por via intraplantar). Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos. Peso corporal base: 200 g.

TRATAMENTOS	Controle	Fármacos isolados			Fármacos associados	
GRUPOS	Salina	IFE	CR		IFE+CR 20	IFE+CR 60
DOSES	20 µL	0,6 µg	20 µg	60 µg	0,6 µg + 20 µg	0,6 µg + 60 µg
Δ da reação de retirada (g)	12,94	9,58	14,38	12,61	9,71	3,72
	14,70	14,51	15,73	12,76	8,86	6,32
	16,93	15,35	15,56	13,37	9,62	3,81
	18,09	14,62	16,41	11,01	11,66	2,00
	—	14,63	17,16	Pp	9,19	3,22
n	4	5	5	4	5	5
Médias	15,67	13,74	15,85	12,44	9,808	3,814
Desvios Padrão	2,298	2,348	1,036	1,007	1,09	1,576
Erros Padrão	0,4631	1,05	0,4631	0,5034	0,4876	0,7047

CR= cetamina R(-); IFE= ifenprodil; n= tamanho da amostra; Pp = parcela perdida; Δ = variação.

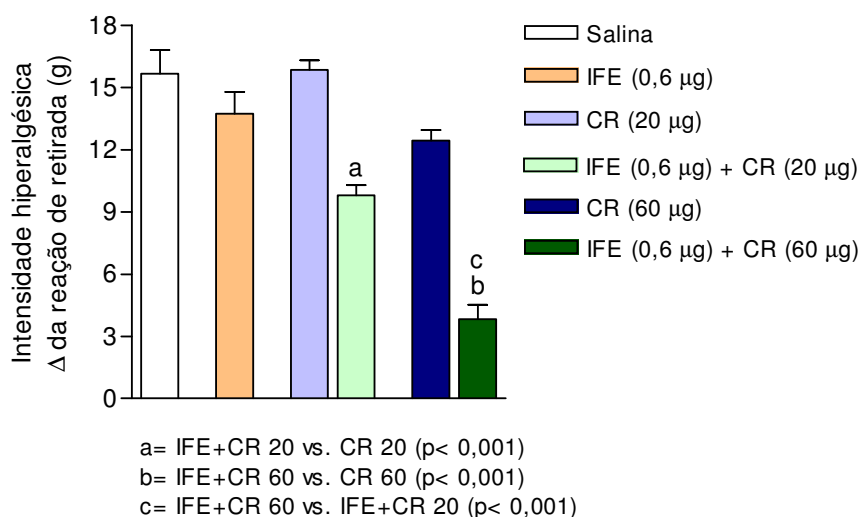


Figura 13. Isoblograma IFE+CR. Uma dose não efetiva de IFE (0,6 μ g) foi utilizada como pré-tratamento a duas doses de CR (20 e 60 μ g). A subdose de IFE tornou efetivas as doses de CR. A associação farmacológica demonstrou ser de sinergismo. Fármacos aplicados por via IT, 30 min antes do estímulo hiperalgésico (PGE₂, 100 ng em 100 μ L por via intraplantar). Ratos Wistar machos. Peso corporal base: 200 g.

Tabela 13. Respostas – em % de inibição hiperalgésica – às administrações, por via intratecal, de ifenprodil (0,6 µg), forma R(-) da cetamina (20 e 60 µg) e suas associações. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.

TRATAMENTOS	Fármacos isolados			Fármacos associados	
GRUPOS	IFE	CR		IFE+CR 20	CET+IFE 60
DOSES	0,6 µg	20 µg	60 µg	0,6 µg + 20 µg	0,6 µg + 60 µg
Inibição hiperalgésica	12,3 %	0 %	20,6 %	37,41 %	75,66 %

CR= cetamina R(-); IFE= ifenprodil.

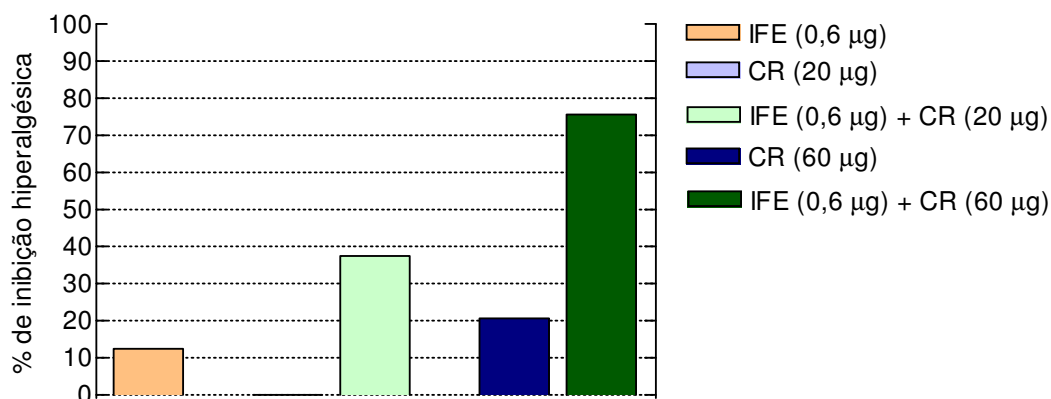


Figura 14. Representação gráfica, em valores percentuais, do isoblograma IFE+CR. Cinco tratamentos são confrontados. Ao se somar a inibição percentual promovida pelos agentes usados de forma isolada constata-se que sua associação produz efeito superior. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.

3.2.3. Interação farmacológica entre cetamina S(+) e ifenprodil

3.2.3.1. Pré-tratamento com cetamina S(+)

A dose subliminar de cetamina S(+) (20 µg) tornou efetiva a dose de 0,6 µg de ifenprodil e melhorou a ação da dose de 2 µg. Os deltas das reações de retirada (Tabela 14) foram ilustrados num gráfico em colunas (Figura 15) que demonstra a

redução da intensidade hiperalgésica após a associação de 20 µg de cetamina S(+) com as duas doses de ifenprodil (0,6 e 2 µg).

Os resultados da comparação entre a inibição percentual promovida pelos agentes usados de forma isolada ou associada (Tabela 15) estão ilustrados em gráfico (Figura 16). A associação CS+IFE 0,6 demonstrou potencialização entre os fármacos

3.2.3.2. Pré-tratamento com ifenprodil

As respostas aos tratamentos com fármacos isolados ou combinados foram tabulados (Tabela 16) e representados em gráficos.

Ao administrarem-se 20 µg e 60 µg de cetamina S(+) após uma dose fixa não efetiva de ifenprodil (0,6 µg/200 g) os deltas das reações de retirada (g) (Figura 17) apresentaram-se significativamente diferentes entre as comparações dos grupos CS 20 vs. CS+IFE 20 e grupos CS 60 vs. CS+IFE.

Os resultados do percentual de inibição hiperalgésica (Tabela 17) estão ilustrados no gráfico (Figura 18) que demonstra o quanto, percentualmente, os tratamentos com ifenprodil seguido por cetamina S(+) foram capazes de inibir a resposta hiperalgésica em comparação com o uso independente dos dois fármacos. A soma dos efeitos isolados é menor que o efeito combinado, denotando potencialização.

Tabela 14. Variação (Δ) das reações de retirada (g) em resposta às administrações de 20 μ g de cetamina S(+), ifenprodil (0,6 e 2 μ g) e suas associações. No grupo salina aplicou-se solução NaCl a 0,9%. O volume final de injeção, por via intratecal, foi ajustado para 20 μ L. O estímulo hiperalgésico aplicado foi uma injeção intraplantar de PGE₂ (100 ng em 100 μ L, por via intraplantar). Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos. Peso corporal base: 200 g.

TRATAMENTOS	Controle	Fármacos isolados			Fármacos associados	
GRUPOS	Salina	CS	IFE		CS+IFE 0,6	CS+IFE 2
DOSES	20 µL	20 µg	0,6 µg	2 µg	20 µg + 0,6 µg	20 µg + 2 µg
Δ da reação de retirada (g)	20,92	12,05	9,58	5,67	1,59	0,95
	19,33	12,84	14,51	8,67	6,78	0,55
	19,03	9,09	15,35	6,92	6,51	3,35
	15,70	11,40	14,62	9,55	5,47	3,62
	—	8,44	14,63	7,11	Pp	0,52
n	4	5	5	5	4	5
Médias	18,75	10,76	13,74	7,584	5,088	1,798
Desvios Padrão	2,193	1,909	2,348	1,531	2,399	1,552
Erros Padrão	1,096	0,8536	1,05	0,6846	1,2	0,6942

CS= cetamina S(+); IFE= ifenprodil; n= tamanho da amostra; Pp= parcela perdida; Δ = variação.

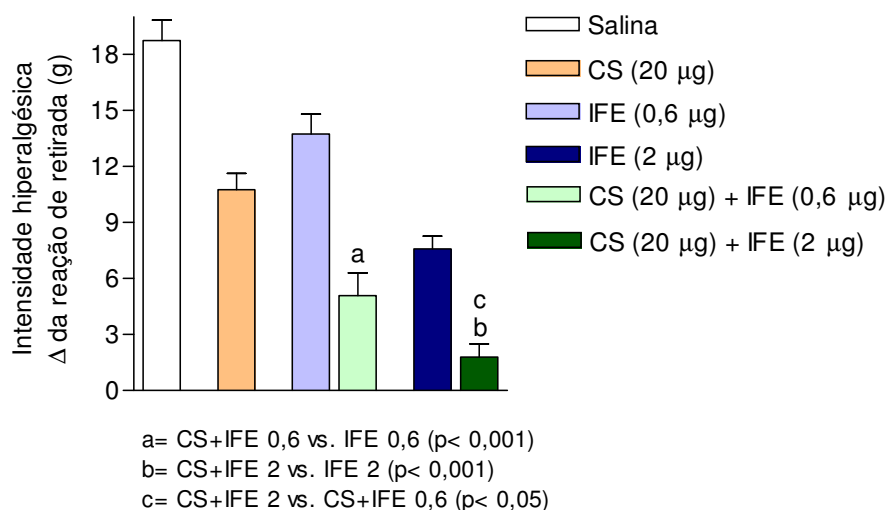


Figura 15. Isoblograma CS+IFE. A dose aplicada de CS (20 μ g) foi utilizada como pré-tratamento a duas doses de IFE (0,6 e 2 μ g) potencializando a ação destas. A associação farmacológica demonstrou ser de sinergismo. Fármacos aplicados por via IT, 30 min antes do estímulo hiperalgésico (PGE₂, 100 ng em 100 μ L por via intraplantar). Ratos Wistar machos. Peso corporal base: 200 g.

Tabela 15. Respostas – em % de inibição hiperalgésica – às administrações, por via intratecal, da forma S(+) da cetamina (20 µg), ifenprodil (0,6 e 2 µg) e suas associações. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.

TRATAMENTOS	Fármacos isolados			Fármacos associados	
GRUPOS	CS	IFE		CS+IFE 0,6	CS+IFE 2
DOSES	20 µg	0,6 µg	2 µg	20 µg + 0,6 µg	20 µg + 2 µg
Inibição hiperalgésica	42,61 %	26,72 %	59,55 %	72,86 %	90,41 %

CS= cetamina S(+); IFE= ifenprodil

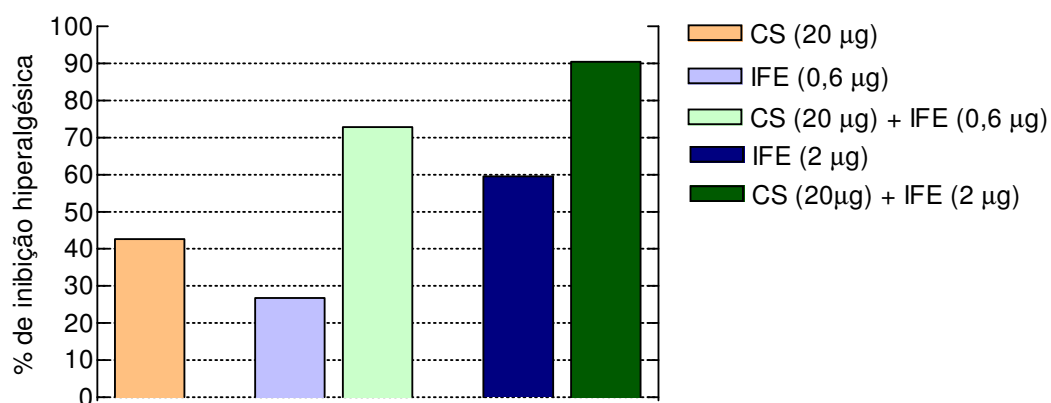


Figura 16. Representação gráfica, em valores percentuais, do isoblograma CS+IFE. Cinco tratamentos são confrontados. Ao se somar a inibição percentual promovida por CS 20 e IFE 0,6 constata-se que sua associação produz efeito superior a soma dos efeitos isolados. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g

Tabela 16. Variação (Δ) das reações de retirada (g) em resposta às administrações de ifenprodil (0,6 μ g), de 6 e 20 μ g de cetamina S(+) e suas associações. No grupo salina aplicou-se solução NaCl a 0,9%. O volume final de injeção, por via intratecal, foi ajustado para 20 μ L. O estímulo hiperalgésico aplicado foi uma injeção intraplantar de PGE₂ (100 ng em 100 μ L, por via intraplantar). Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos. Peso corporal base: 200 g.

TRATAMENTOS	Controle	Fármacos isolados			Fármacos associados	
GRUPOS	Salina	IFE	CS		IFE+CS 6	IFE+CS 20
DOSES	20 µL	0,6 µg	6 µg	20 µg	0,6 µg + 6 µg	0,6 µg + 20 µg
Δ da reação de retirada (g)	20,92	9,58	9,15	12,05	11,80	6,78
	19,33	14,51	18,78	12,84	6,85	0,39
	19,03	15,35	16,69	9,09	8,11	0,69
	15,70	14,62	17,69	11,40	7,66	9,54
	—	14,63	14,89	8,44	14,04	7,40
n	4	5	5	5	5	5
Médias	18,75	13,74	15,44	10,76	9,692	4,96
Desvios Padrão	2,193	2,348	3,796	1,909	3,085	4,164
Erros Padrão	1,096	1,05	1,698	0,8536	1,379	4,862

CS= cetamina S(+); IFE= ifenprodil; n= tamanho da amostra; Δ = variação.

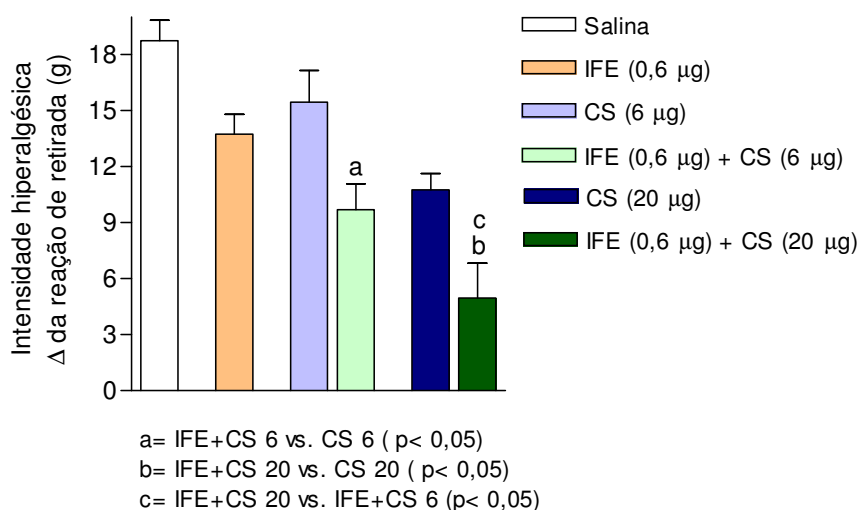


Figura 17. Isoblograma IFE+CS. Uma dose não efetiva de IFE (0,6 μ g) foi utilizada como pré-tratamento a duas doses de CS (6 e 20 μ g). A subdose de CS tornou-se efetiva após o uso de IFE e a dose subliminar teve seu efeito melhorado. A associação farmacológica demonstrou ser de sinergismo. Fármacos aplicados por via IT, 30 min antes do estímulo hiperalgésico (PGE₂, 100 ng em 100 μ L por via intraplantar). Ratos Wistar machos. Peso corporal base: 200 g.

Tabela 17. Respostas – em % de inibição hiperalgésica – às administrações, por via intratecal, de ifenprodil (0,6 µg), forma S(+) da cetamina (20 e 60 µg) e suas associações. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.

TRATAMENTOS	Fármacos isolados			Fármacos associados	
GRUPOS	IFE	CS		IFE+CS 6	IFE+CS 20
DOSES	0,6 µg	6 µg	20 µg	0,6 µg + 6 µg	0,6 µg + 20 µg
Inibição hiperalgésica	26,72 %	17,65 %	42,61 %	48,31 %	73,55 %

CS= cetamina S(+); IFE= ifenprodil

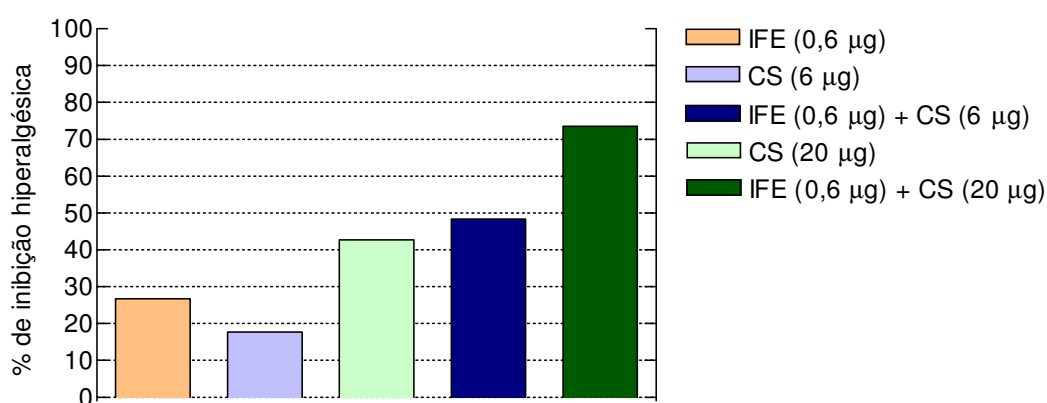


Figura 18. Representação gráfica, em valores percentuais, do isoblograma IFE+CS. Cinco tratamentos são confrontados. Ao se somar a inibição percentual promovida pelos agentes usados de forma isolada constata-se que sua associação produz efeito superior. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.

3.2.4. Comparação entre isobologramas

Foram comparadas as mesmas doses administradas variando a ordem de administração dos medicamentos.

Os grupos CET+IFE 0,6 e IFE+CET 20 (Figura 19A) apresentaram percentuais de inibição da hiperalgesia iguais a 86,9% e 64,31%, respectivamente (Figura 19B) tendo havido diferença significativa entre estes. O mesmo foi observado na comparação entre CR+IFE 0,6 vs. IFE+CR 20 cujos percentuais foram, em seqüência, 17,87% e 34,41% (Figura 20).

Confrontando-se os isobologramas CS+IFE 0,6 vs. IFE+CS 20 houve diferença de 0,69 pontos percentuais sem significado estatístico (Figura 21).

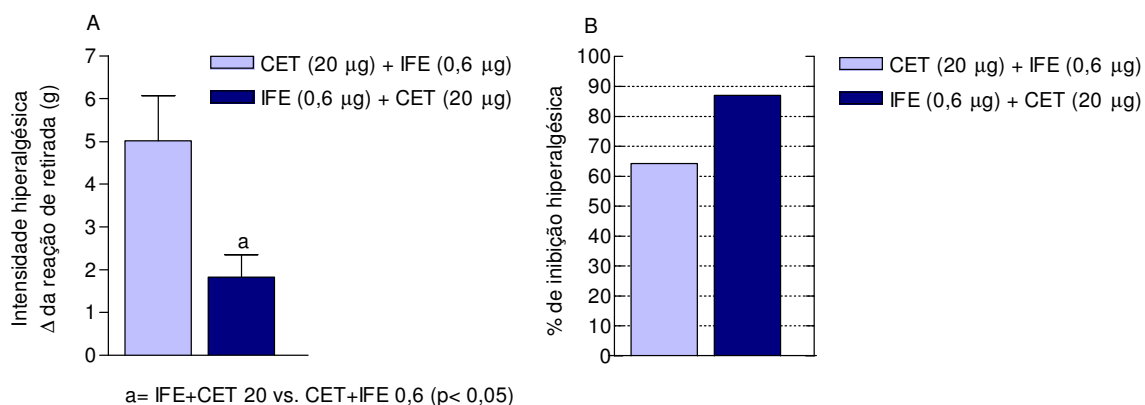


Figura 19. Comparação entre a administração prévia de CET ou de IFE: A) o uso de IFE seguido por CET foi significativamente melhor que o inverso, B) apresentando diferença de 22,59% na inibição hiperálgica. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.

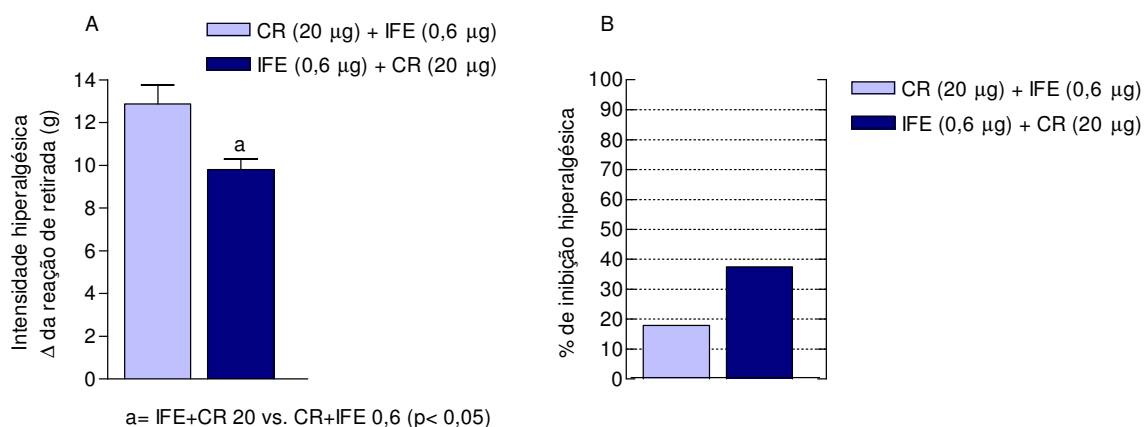


Figura 20. Comparação entre a administração prévia de CR ou de IFE: A) o uso de IFE seguido por CR foi significativamente melhor que o inverso, B) apresentando diferença de 19,54% na inibição hiperálgica. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.

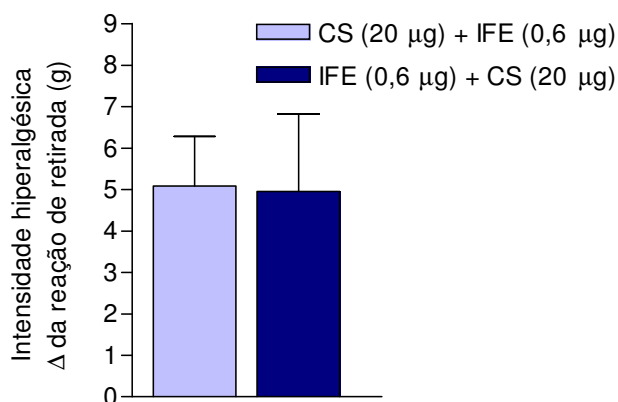


Figura 21. Comparação entre a administração prévia de CS ou de IFE: não houve diferença significativa entre o pré-tratamento com CS ou com IFE. Ratos da linhagem Wistar, machos, peso corporal base: 200 g.

4. Discussão

Os RNMDAs possuem subunidades heteromultiméricas (SILVA, 2002), com locais de interação para o agonista e o co-agonista e, a exemplo dos receptores gabaérgicos, sítios modulatórios (RANG *et al.*, 2004a). Os benzodiazepínicos potencializam a ação dos barbitúricos (MASSONE, 2002) ao atuarem, como agonistas, em sítios diferentes do receptor GABA_A (SPINOSA & GÓRNIK, 2002). ZHUO (2007) trabalhou com antagonistas GluN2A e GluN2B verificando que o uso combinado de fármacos foi melhor que o isolado na inibição da LTP. Até o momento, não foi encontrada na literatura científica nenhuma referência à administração associada de cetamina, seus isômeros e ifenprodil, mas considerando-se a similaridade estrutural dos dois receptores – RNMDAs e GABA_A – e os achados de ZHUO (2007) seria razoável projetar como possível uma ação sinérgica.

A comprovação da hipótese formulada dependeu de ensaios farmacológicos. Definiram-se inicialmente, as relações dose-e-resposta. Fundamentando-se nestes resultados, foi elaborada a segunda etapa objetivando distinguir sinergismo ou antagonismo na relação entre os agentes e, em se tratando do primeiro, se haveria adição ou potencialização de efeitos. Os estudos isoblográficos são as ferramentas

utilizadas para estabelecer o tipo de interação farmacológica entre agentes químicos (GENNINGS *et al.*, 1990). JOÓ *et al.* (2000) construíram isobologramas para definir as interações entre as associações de cetamina, seus enantiômeros, morfina e dexmedetomidina assim como HORVATH *et al.* (2001) com relação a cetamina S(+) e a endomorfina-1. A importância na distinção entre as relações sinérgicas – adição ou potencialização – é essencial visto que efeitos somatórios indicam, via de regra, o aumento da dose do fármaco com melhor relação risco-benefício em oposição ao uso combinado.

Os ratos Wistar foram selecionados para o modelo experimental por serem de fácil obtenção, manutenção e manipulação. Ademais, PLESAN *et al.* (1999) já haviam descrito resposta a ação antagonista ao RNMDA nesta linhagem.

A inflamação induzida pela administração de substâncias químicas visando aumentar a sensibilidade a testes de reação de retirada foi proposta por Randall e Selitto em 1957 (LE BARS, GOZARIU & CADDEN, 2001). A PGE₂ evoca redução do limiar hipernociceptivo (RAJA, MEYER & CAMPBELL, 1988) de longa duração (JESSELL & KELLY, 1991; CARVALHO, 2002) por sensibilização dos nociceptores aferentes primários (FERREIRA, MONCADA & VANE, 1973; HYLDEN & WILCOX, 1980; TAIWO *et al.*, 1989). O estímulo inflamatório gerado pela administração intraplantar de PGE₂ induz hiperalgesia e libera continuamente glutamato espinhal o qual, via RNMDAs, promove sensibilização retrógrada dos neurônios sensoriais primários (FERREIRA & LORENZETTI, 1994). A ligação entre aumento na acuidade da percepção de reações nocifensivas, processo inflamatório, hiperalgesia e RNMDAs motivaram o emprego de PGE₂. A aplicação de solução de NaCl a 0,9% (por via IT) e 100 ng de PGE₂ (100 µL, por via intraplantar) induziu, após 3 h, menor tolerância à carga aplicada pelo analgesímetro digital em conformidade com a técnica descrita por outros autores (VIVANCOS *et al.*, 2004; FERRARI *et al.*, 2007).

O assentamento das intensidades hiperalgésicas desconsiderou medições com diferença, entre a maior e a menor, superior a 6 g. VIVANCOS *et al.* (2004) haviam trabalhado com o limite máximo de 10 g. Entendeu-se que um maior rigor nos parâmetros conduziria a resultados mais fidedignos.

As doses testadas de cetamina racêmica foram: 6 µg (0,03 µg/g), 20 µg (0,1 µg/g), 30 µg (0,15 µg/g), 60 µg (0,3 µg/g) e 600 µg (3 µg/g). Doses superiores a 0,15 µg/g foram anti-hiperalgésicas e a de 3 µg/g, analgésica.

Há várias referências descrevendo o uso de cetamina racêmica em ratos para o controle da nocicepção induzida. ALAM SAITO & KOSAKA (1996) citaram que 4 µg/g, por via epidural, apresentou efeito antinociceptivo. KAWAMATA *et al* (2000) aplicaram 500 µg por via IT em ratos que receberam estímulo algésico com carragenina intraplantar tendo observado aumento no limiar do reflexo de retirada. A dose de 1 µg/g (por via IT) foi administrada preventivamente ao procedimento cirúrgico por HARTRICK, WISE & PATTERSON (1997) e por BURTON *et al.* (1999) em experimentos distintos. No primeiro o desenvolvimento da hiperalgesia mecânica foi postergada e no outro, a inibição da alodinia ao frio e mecânica durou 14 dias. Considerando-se que a injeção por via subaracnóidea utiliza 50% da dose da via epidural (SKARDA, 1999), pode-se inferir que as doses anti-hiperalgésicas encontradas neste trabalho (0,15 a 3 µg/g) coincidem com as descritas na literatura (1 µg/g, por via IT e 4 µg/g, por via epidural). Além disso 600 µg promoveram média negativa da variação de retirada do grupo demonstrando que a IH da 3ª hora, não obstante o efeito da PGE₂, teve valor superior a IH basal, ou seja, a cetamina racêmica também foi analgésica.

Os dois isômeros ópticos da cetamina promoveram anti-hiperalgesia. Doses entre 60 e 600 µg/200 g – R(-) – e 20 e 200 µg/g para a cetamina S(+) foram as efetivas. JOÓ *et al.* (2000) testaram em ratos os estereoisômeros da cetamina (por via IT) e não observaram antinocicepção. Entretanto, há descrições da ação antinociceptiva da cetamina S(+) em humanos (KOINIG, MARHOFER, KRENN *et al.*, 2000; MARHOFER, KRENN, PLOCHL *et al.*, 2000; KOPPERT, DERN, SITTL *et al.*, 2001) e em cães (DUQUE *et al.*, 2004). Há que se considerar o estímulo algogênico aplicado, o momento de administração do tratamento e o uso de uma única dose ou de curvas dose vs. resposta para se julgar a efetividade dos fármacos. Neste sentido, o trabalho de KLIMSCHA *et al.* (1998) revelando controle da dor inflamatória em ratos por 10, 50 e 100 µg (por via IT) de cetamina S(+) foi o que mais se aproximou do presente estudo.

Observou-se que a EC₅₀ da cetamina racêmica foi 3,5 vezes menor que a do isômero R(-) e 1,8 vezes maior que a da forma S(+). Este resultado, confirma a

expectativa de JIMÉNEZ (2004) que previa uma redução de aproximadamente 50% da dose efetiva da cetamina S(+) em relação ao racemato para a obtenção de um mesmo efeito analgésico. O confronto entre as EC_{50} dos enantiômeros revelou que a EC_{50} da forma R(-) foi 6,8 vezes superior ao da cetamina S(+). Há, na literatura, poucos estudos comparando a potência relativa da cetamina e suas isoformas. Neste sentido, OLIVEIRA *et al.* (2004) em trabalho de revisão literária descreveram que CS tem potência aproximadamente quatro vezes superior à CR, mas não se referiram ao estímulo induzido e à resposta avaliada.

O ifenprodil foi o fármaco que controlou a hiperalgesia com o menor valor para $EC_{50} = 0,0102 \mu\text{g/g}$. Doses entre 0,01 e 0,3 $\mu\text{g/g}$ foram efetivas. Testes em ratos haviam comprovado sua eficácia antinociceptiva por via IP nas doses de 10 $\mu\text{g/g}$ (BOYCE *et al.*, 1999) e 30 $\mu\text{g/g}$ (KIM *et al.*, 2007) e por via IT (20 nmol) (SAKURADA *et al.*, 1998). Possivelmente, o melhor desempenho do ifenprodil possa ser explicado por sua grande afinidade pelo subtipo GluN2B do RNMDA, entre 160 (BOYCE *et al.*, 1999) e 400 vezes (WILLIAMS, 1993) maior que pelo GluN2A em contraposição à menor seletividade da cetamina racêmica. A subunidade GluN2B parece ter um papel preponderante no “windup” e nos processos de plasticidade que acompanham os estados de dor inflamatória e neuropática (CHIZH *et al.*, 2001; BREW *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2007). ZHUO (2007) constatou que as subunidades GluN2A e GluN2B são responsáveis pela maior parte das correntes excitativas pós-sinápticas mediadas pelos RNMDAs sendo que o bloqueio promovido pelo ifenprodil as reduz quase completamente. XU & YANG (2006) comprovaram que tanto a cetamina racêmica (0,5 $\mu\text{g/g}$, por via IT) quanto o ifenprodil (0,05 $\mu\text{g/g}$, por via IT) elevaram o limiar para dor inflamatória com mecanismos e latência do efeito diferentes.

Uma única aplicação dos antagonistas do RNMDA, precedendo o estímulo algésico em 30 min, inibiu a hiperalgesia três horas após a injeção de PGE_2 . CHRISTOPH *et al.* (2006) asseveraram que o bloqueio ao RNMDA com duração entre 30 e 40 min controlou a alodinia por três horas justificando o achado pela atenuação da hiperexcitabilidade central. Consolidando esta informação, RAABBEN, SKJELBRED & ØYE (1999) e TAKAHASHI *et al.* (1998) referiram analgesia à dor neuropática em

humanos e BURTON *et al.* (1999), em ratos, que superaram o tempo de ação da cetamina racêmica. Os achados, portanto, confirmam o encontrado nestes trabalhos.

A CET e a CS potencializaram a ação do ifenprodil que por sua vez, fez o mesmo com o racemato e seus estereoisômeros. A interação entre 20 µg cetamina S(+) e 2 µg de ifenprodil (CS+IFE 2) foi sinérgica, mas ao contrário da CS+IFE 0,6 – 20 µg de Cetamina S(+) + 0,6 µg de ifenprodil –, não foi comprovada a potencialização. O fato pode estar relacionado ao emprego de doses subliminares que, em comparação com as subdoses, dificultam a diferenciação dos sinergismos por adição ou potencialização.

As aplicações de ifenprodil seguido por CET ou CR apresentaram melhores resultados que o inverso considerando-se as mesmas doses. A cetamina e o ifenprodil possuem sítios de interação diferentes. A primeira bloqueia o canal iônico acoplado ao RNMDA pela porção interna (ALVES, DÓREA & ANDRADE, 2002; VALADÃO, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2004) reduzindo o tempo, ou externa, diminuindo a frequência de abertura do mesmo (ORSER, PENNEFATHER & MACDONALD, 1997). Outra ação descrita é o antagonismo aos receptores AMPA/cainato pela inibição ao sistema glutamato/NO/GMPc (LUFT & MENDES, 2005). O ifenprodil é um antagonista no sítio de poliaminas (CHRISTOPHER, RIVY & SCATTON, 1989) cuja interação sensibiliza GluN2B à inibição promovida por prótons (RANG *et al.*, 2004a). NAKAZATO, KATO & WATANABE (2005) atestaram que antagonistas não seletivos do RNMDA agem ao nível espinhal e os seletivos, supraespinhal. Conforme FERRARI *et al.* (2007), fármacos injetados (por via IT) nas porções mais caudais da região lombar da coluna vertebral (cauda eqüina) são depositadas no espaço subaracnóideo atuando no cordão espinhal e também no gânglio da raiz dorsal. Os experimentos aqui apresentados não permitem afirmações a respeito do mecanismo ou local de ação – espinhal ou supraespinhal – dos fármacos.

Observou-se que a modulação do RNMDA, previamente ao bloqueio do canal iônico, permitiu que o ifenprodil potencializasse a cetamina R(-), efeito, provavelmente, refletido no melhor desempenho das associações IFE+CET e IFE+CR. Tal achado abre a perspectiva de novos estudos visando otimizar a inibição das correntes excitativas mediadas pelos RNMDAs e em consequência, a melhora no tratamento de estados de

hiperalgesia. Até o momento não foram encontradas citações na literatura científica que corroborem ou se contraponham a estes achados.

5. Conclusões

Considerando-se a administração por via intratecal em ratos Wistar, 30 minutos antes do estímulo hiperálgico com PGE₂, pode-se afirmar que:

- a ação anti-hiperálgica do ifenprodil, cetamina S(+), racêmica e R(-), em diferentes doses, é progressiva, nesta ordem;
- a dose de 3 µg/g de cetamina racêmica produz analgesia;
- a cetamina e seu isômero S(+) potencializam o efeito anti-hiperálgico do ifenprodil;
- o ifenprodil potencializa o efeito anti-hiperálgico da cetamina racêmica, R(-) e S(+).

CAPÍTULO 3 – EFICÁCIA ANTI-HIPERALGÉSICA DA ASSOCIAÇÃO DE IFENPRODIL COM CETAMINA RACÊMICA EM CÃES

RESUMO – A comprovação da ação anti-hiperalgésica da associação entre ifenprodil e cetamina racêmica (Capítulo 2) consubstanciou a extrapolação de doses, reconhecidamente efetivas em ratos, para a espécie canina. Oito cães clinicamente hígidos dentre os quais, três fêmeas fora dos períodos de pró-estro, estro ou gestacional foram utilizados. Cada animal, foi tratado, preventivamente por via subaracnóidea, com cetamina racêmica (0,3 mg/kg) ou ifenprodil (0,03 mg/kg) seguido por solução de NaCl a 0,9% (0,5 mL) e cetamina racêmica (0,3 mg/kg). Após anestesia geral, uma incisão cirúrgica atingindo pele e tecido celular subcutâneo foi realizada no coxim metatársico e, em ato contínuo, suturada. Os escores de sedação (ES) e de claudicação (ECLD), as frequências cardíaca (FC) e respiratória (f), testes de sensibilidade cutânea com filamentos de von Frey e mensuração da superfície de apoio – planimetria – foram utilizados na comparação entre as farmacoterapias em função do tempo pós-cirúrgico (60 a 1440 min). Após a cicatrização da ferida o mesmo procedimento foi repetido. Ao final dos experimentos, cada animal foi testado com os dois protocolos e os dois membros pélvicos foram avaliados. O ES indicou ausência de efeito hipnótico a partir de 60 min. O ECLD apontou valores idênticos ao basal. As FC e f não variaram significativamente em função do tempo e entre o uso isolado ou associado de fármacos. No entanto, os testes com filamentos de von Frey e com planímetro indicaram que o efeito anti-hiperalgésico foi maior na associação dos medicamentos ($p \leq 0,05$).

Palavras-chave: cães, cetamina racêmica, dor inflamatória, hiperalgesia, ifenprodil

ANTIHYPERALGESIC EFFICACY OF THE ASSOCIATION OF IFENPRODIL AND RACEMIC KETAMINE IN DOGS

SUMMARY – The evidence of the antihyperalgesic effect of the association of ifenprodil and racemic ketamine (Chapter 2) led to the extrapolation of doses, admittedly effective in rats, for the canine species. Eight clinically healthy dogs, including three females out of gestational, proestrus or estrus period, had been used. Each animal was treated preventively by spinal route with racemic ketamine (0.3 mg/kg) or with ifenprodil (0.03 mg/kg) followed by NaCl 0.9% solution (0.5 ml) and racemic ketamine (0.3 mg/kg). After general anaesthesia, a surgical incision reaching skin and subcutaneous cellular tissue was carried through metatarsal pad and, in continuous act, sutured. A sedation score (SE), a claudication score (ECLD), heart (HR) and respiratory (f) rates, von Frey filaments for skin sensibility test and the support area measurement – planimetry – had been used in the comparison between the treatments on the post surgical period (60 to 1440 min). After the wound healing, the same procedure was repeated. To the end of the experiments, each animal was tested with the two protocols and the two pelvic members had been evaluated. The SE indicated absence of hypnotic effect from 60 min. The ECLD pointed the same baseline values. FC and f had not varied significantly in function of the time and between the use isolated or associated of drugs. However, the tests with filaments of von Frey and planimetry showed less hyperalgesia when the drugs were associated ($P \leq 0.05$).

Key-words: dogs, racemic ketamine, inflammatory pain, hyperalgesia, ifenprodil

1. Introdução

A falta de priorização no tratamento da dor e muitas vezes até a indiferença, povoou por muitos anos a literatura médica. Já se propôs que o seu controle no pós-operatório, em animais, propiciaria sensação de bem estar resultando em danos à ferida cirúrgica, já que na ausência de dor, o animal não limitaria seus movimentos e tampouco pouparia a ferida dos atos de coçar ou morder (PASCOE, 1993). Passado este período de trevas, o consenso é que negligenciar a dor do paciente produz consequências reais e indesejáveis. Minimizá-la ou aboli-la corretamente influencia na recuperação e portanto, na qualidade dos resultados cirúrgicos (CARROLL, 2002).

Um boa gestão de controle da dor pós-operatória começa no pré-operatório com a administração de analgésicos (CARROLL, 2002). A analgesia preventiva visa interromper ou reduzir a sensibilização central e a dor mórbida provocadas pela incisão cirúrgica e pelo processo inflamatório pós-operatório (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Promove controle sobre a hiperalgesia, a alodinia (THURMON, TRANQUILLI & BENSON, 1999) e alterações homeostáticas potencialmente fatais (OLIVEIRA, R. M., 2005).

O bloqueio dos RNMDAs foi indicado para controlar a hiperalgesia, a alodinia (SANG, 2000), a sensibilização central (ANDRADE, 2002) e o “windup” (CHAPLAN, MALMBERG & YAKSH, 1997). Entretanto, o envolvimento destes receptores com a percepção sensorial, a cognição e o nível de consciência por muito tempo limitou o uso de seus antagonistas (SUZUKI, MATTHEWS & DICKENSON, 2001).

A evolução no estudo dos RNMDAs e sua importância na nocicepção conduziu a achados importantes. Estados dolorosos podem provocar o aumento de poliaminas no SNC potencializando a atividade de subunidades GluN2B e seu papel na transmissão nociceptiva (CHIZH, HEADLEY & TZSCHENTKE, 2001). A descoberta da prevalência das subunidades GluN2A e GluN2B nas correntes excitativas pós-sinápticas mediadas pelos RNMDAs, reforçou a idéia do uso de agentes mais seletivos (ZHUO, 2007).

A cetamina, fármaco derivado da fenciclidina e originalmente utilizado como anestésico dissociativo apresenta propriedades antinociceptivas comprovadas. Atua como antagonista não competitivo do glutamato e do aspartato ao bloquear os canais

iônicos acoplados aos RNMDAs (CHIZH, 2007) em doses subanestésicas (VALADÃO, 2002).

O ifenprodil, agente estruturalmente não correlacionado aos demais bloqueadores RNMDAs em uso (CHENARD *et al.*, 1991) foi inicialmente concebido como anti-hipertensivo. A descoberta de seu antagonismo seletivo às subunidades GluN2B culminou com os esforços para utilizá-lo como medicamento antinociceptivo.

Ao se examinarem os resultados positivos do efeito anti-hiperalgésico obtido pela administração associada de ifenprodil e cetamina por via subaracnóidea e de forma preventiva em ratos, foi ponderado se tais achados poderiam se confirmar em um modelo experimental que representasse um desafio na rotina anestesiológica da medicina veterinária. Para tanto, testou-se o uso da combinação farmacológica citada, em cães, submetidos à incisão cirúrgica e que tiveram a reação à hiperalgesia monitorada de forma multimodal durante as 24 h que sucederam o período operatório.

2. Material e métodos

Foram utilizados oito cães, SRD, com idade entre três e cinco anos e peso corporal na faixa de $16,9 \text{ kg} \pm 3,7 \text{ kg}$, dentre os quais, três fêmeas não gestantes e fora do período de estro e cinco machos. Todos foram considerados hígidos após exames clínicos e laboratoriais (hemograma e dosagens séricas de aspartato amino-transferase, alanina amino-transferase e uréia) e permaneceram alojados, com água à vontade e ração comercial servida duas vezes ao dia, em boxes individuais em canil do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) Júlio de Mesquita Filho, Campus de Jaboticabal.

Cada cão foi utilizado duas vezes com um intervalo mínimo de 20 dias. Após os testes, todos foram devolvidos ao canil e tiveram acompanhamento médico-veterinário para o tratamento das feridas cirúrgicas até completa cicatrização. Ao final do estudo, foram adotados por pessoas interessadas em criá-los como animais de estimação.

Os cuidados com os animais e os procedimentos realizados estiveram de acordo com o estabelecido pela IASP (IASP, 2005) e com as normas aprovadas pelo Conselho da Sociedade Norte-Americana de Fisiologia (MUIR III *et al.*, 2001b).

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da FCAV/Unesp-Jaboticabal, Processo nº 004990-08.

Todos os esforços foram realizados para minimizar o número de animais empregados e seu nível de desconforto.

2.1. Preparo dos animais

Durante uma semana os cães foram acompanhados, diariamente, pelo experimentador para que o reconhecessem e permitissem as manipulações necessárias à fase experimental. Findo este prazo, os animais foram identificados individualmente por números (1 a 8), pesados e submetidos à tricotomia entre a 3ª vértebra lombar (L3) e a 1ª vértebra sacral, ao redor dos coxins metatársicos e nos locais de venopunção.

Quarenta e oito horas antes dos testes, cada animal foi levado a um canil silencioso com temperatura ambiente controlada (25 °C) onde ficou alojado em gaiola individual, sob o mesmo regime alimentar a que estava habituado.

Os experimentos foram iniciados sempre às 7 h. Os animais foram submetidos a jejum alimentar de 12 h e hídrico de 4 h previamente à anestesia geral.

2.2. Delineamento experimental

Os experimentos, realizados em duas etapas, seguiram sempre a mesma seqüência: medidas basais, anestesia geral em plano superficial, tratamento, aprofundamento do plano anestésico, estímulo cirúrgico e avaliações. Na segunda, após cicatrização da ferida cirúrgica, os mesmos procedimentos foram repetidos, mas no membro pélvico contralateral e com o protocolo farmacológico não testado na

primeira fase. Desta forma, todos os animais receberam os dois tratamentos e os dois coxins metatársicos foram utilizados nas avaliações configurando um delineamento experimental em “crossover”.

2.2.1. Métodos de avaliação

O escore de sedação (ES) foi empregado para determinar a influência da anestesia geral na resposta dos cães às demais análises (Tabela 1).

A avaliação do comportamento nocifensivo constou dos indicadores fisiológicos – contagem da frequência cardíaca (FC) e da frequência respiratória (f) – e dos comportamentais: escore de claudicação (ECLD) e testes com filamentos de von Frey¹⁰ e com planímetro¹¹ (DUQUE, 2001).

Todas as mensurações foram feitas antes da aplicação dos fármacos (basal) e 60, 90, 120, 180, 240, 480, 720 e 1440 minutos após a administração dos tratamentos.

Tabela 1. Escore de sedação: a primeira coluna descreve o comportamento a ser observado no animal e a outra, atribui um valor. Estes parâmetros foram utilizados na avaliação do estado de alerta dos cães empregados no experimento.

COMPORTAMENTOS	ESCORES
Alerta e deambula com facilidade	0
Sonolento, em pé, cabeça abaixada e olhos semi-fechados	1
Sonolento, em decúbito e responde ao chamado	2
Sonolento, em decúbito e não responde ao chamado	3

¹⁰ Touch-Test Sensory Evaluator, North Coast Medical Inc, San Jose – CA.

¹¹ Portable Area Meter MOD.LI-300A, Li-Cor Biosciences, Lincoln, Nebraska – USA.

2.2.1.1. Frequências cardíaca e respiratória

A FC foi obtida por meio de auscultação com estetoscópio e a f por meio da observação dos movimentos do gradil costal e abdômen com o animal em decúbito lateral.

2.2.1.2. Escores de claudicação

Inspecionaram-se os cães parados e em movimento. A partir de um escore de claudicação confrontou-se o grau de apoio do membro locomotor em teste com o padronizado (Tabela 2).

Tabela 2. Escore de claudicação onde a primeira coluna descreve o tipo de apoio apresentado pelo animal e a outra, atribui um valor correspondente. Estes parâmetros foram utilizados na avaliação do nível de apoio do membro dos cães antes e após a incisão do coxim metatársico.

NÍVEIS DE APOIO	ESCORES
Apoio total	0
Apoio parcial em pé e andando (defesa do membro)	1
Apoio parcial somente em pé, ao caminhar não apóia	2
Não apóia o membro	3

2.2.1.3. Testes com filamentos de von Frey

Os filamentos de von Frey foram aplicados com o cão em decúbito lateral estando o membro pélvico em teste apoiado pela mão do examinador, sem o uso de qualquer tipo de contenção sobre o animal, permitindo que ações de esquiva fossem detectadas visualmente ou percebidas pelo tato. O posicionamento do experimentador impediu que o cão acompanhasse o movimento de aplicação do filamento (Figura 1A).

Foram padronizados quatro locais ao redor da lesão e a aproximadamente 0,3 cm de sua borda, distribuídos em forma de pontos cardeais (Figura 1B). O filamento foi pressionado de forma perpendicular à pele aumentando-se gradualmente a força até que o mesmo envergasse. Caso o cão apresentasse o reflexo de retirada do membro testava-se o filamento seguinte de menor calibre, decrescendo-se o diâmetro dos filamentos o quanto fosse necessário até que não houvesse resposta. Analogamente, mas em sentido inverso, a ausência de reflexo de retirada implicava na aplicação de um filamento de maior diâmetro até a obtenção da resposta.

Objetivando a validação da LRA (limiar de resposta aversiva) aferida num dado tempo, a mesma leitura de força aplicada deveria coincidir nos quatro pontos citados. O não atendimento a este quesito, indicaria a repetição do teste.

Cada número de filamento tem um valor correspondente em gramas segundo a tabela fornecida pelo fabricante (Anexo 1). O filamento que não gerou resposta e o que gerou tiveram seus números convertidos em gramas e a média aritmética destes valores foi considerada como a LRA.

As análises dos resultados valeram-se da variação (Δ) da reação de retirada (g). Para tanto, subtraiu-se a LRA basal da obtida no tempo considerado.

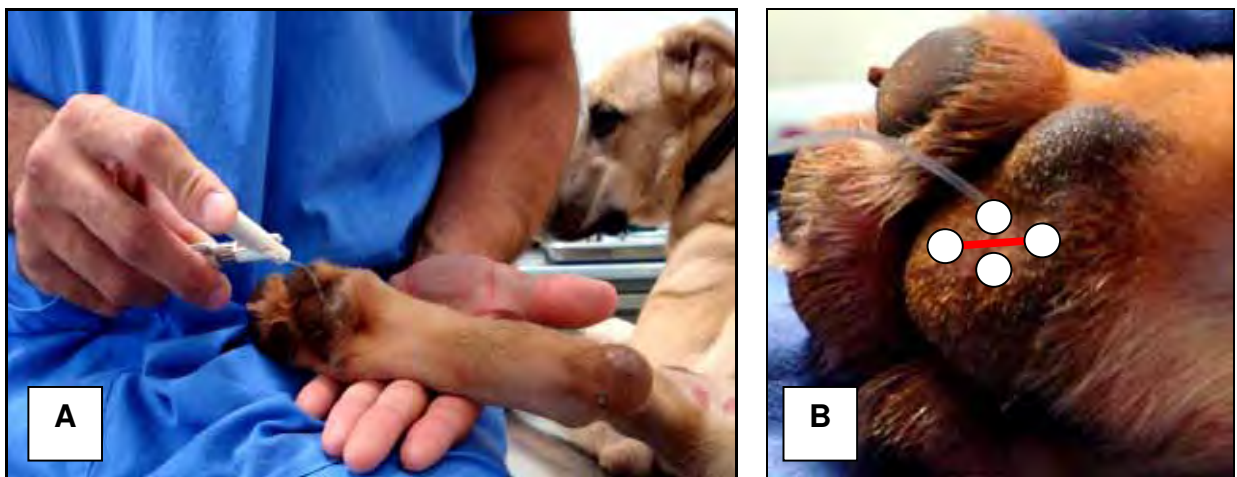


Figura 1. Avaliação da sensibilidade cutânea com filamentos de von Frey: A) com o animal em decúbito e o membro locomotor apoiado, mas não contido pelo examinador, aplicou-se o filamento; o posicionamento do experimentador impediu que o canino visualizasse a execução do teste; B) na imagem pormenorizada, os pontos brancos representam os locais avaliados distanciados entre si como pontos cardinais em torno da futura ferida cirúrgica (linha vermelha). As medidas foram validadas apenas se os valores encontrados coincidissem nos quatro pontos.

2.2.1.4. Testes com planímetro

O método empregado foi o mesmo utilizado por DUQUE (2001) tendo havido diferença apenas no tamanho da pista de caminhada.

O coxim metatársico em teste foi pintado com tinta hidrossolúvel¹². Os animais foram conduzidos por guia através de uma pista, com 3,5 m de comprimento, revestida com papel pardo sobre o qual colocou-se papel absorvente¹³ cobrindo uma área de 1,0 m de extensão por 0,6 m de largura. Apenas a 4ª pegada foi considerada (Figura 2 A e B). As marcas das pisadas válidas foram copiadas em filme para transparência e, posteriormente, a área total foi mensurada (cm²) com planímetro.

Os resultados analisados corresponderam à diferença entre a medida basal e a obtida num determinado tempo tendo sido, portanto, expressos como variação (Δ) da área planimétrica (cm²).

2.2.2. Mensurações basais

Na primeira etapa, a escolha do membro pélvico a ser testado ocorreu por sorteio.

Os cães foram carregados até a sala de testes onde avaliou-se o nível de consciência a partir do ES (Item 2.2.1). Após serem posicionados em decúbito lateral, foram estabelecidas as frequências cardíaca e respiratória (Item 2.2.1.1).

O examinador aplicou os filamentos de von Frey. Em seguida, os animais foram colocados de pé e em movimento para a determinação do escore de claudicação (Item 2.2.1.2) e conduzidos até a pista de planimetria onde o coxim metatársico em teste foi pintado para obtenção da área de apoio.

¹² Tempera Guache, Acrilex Tintas Especiais S.A, São Paulo – SP.

¹³ Toalhas de papel Kitchen, Melhoramentos Papéis Ltda., Caieiros – SP.

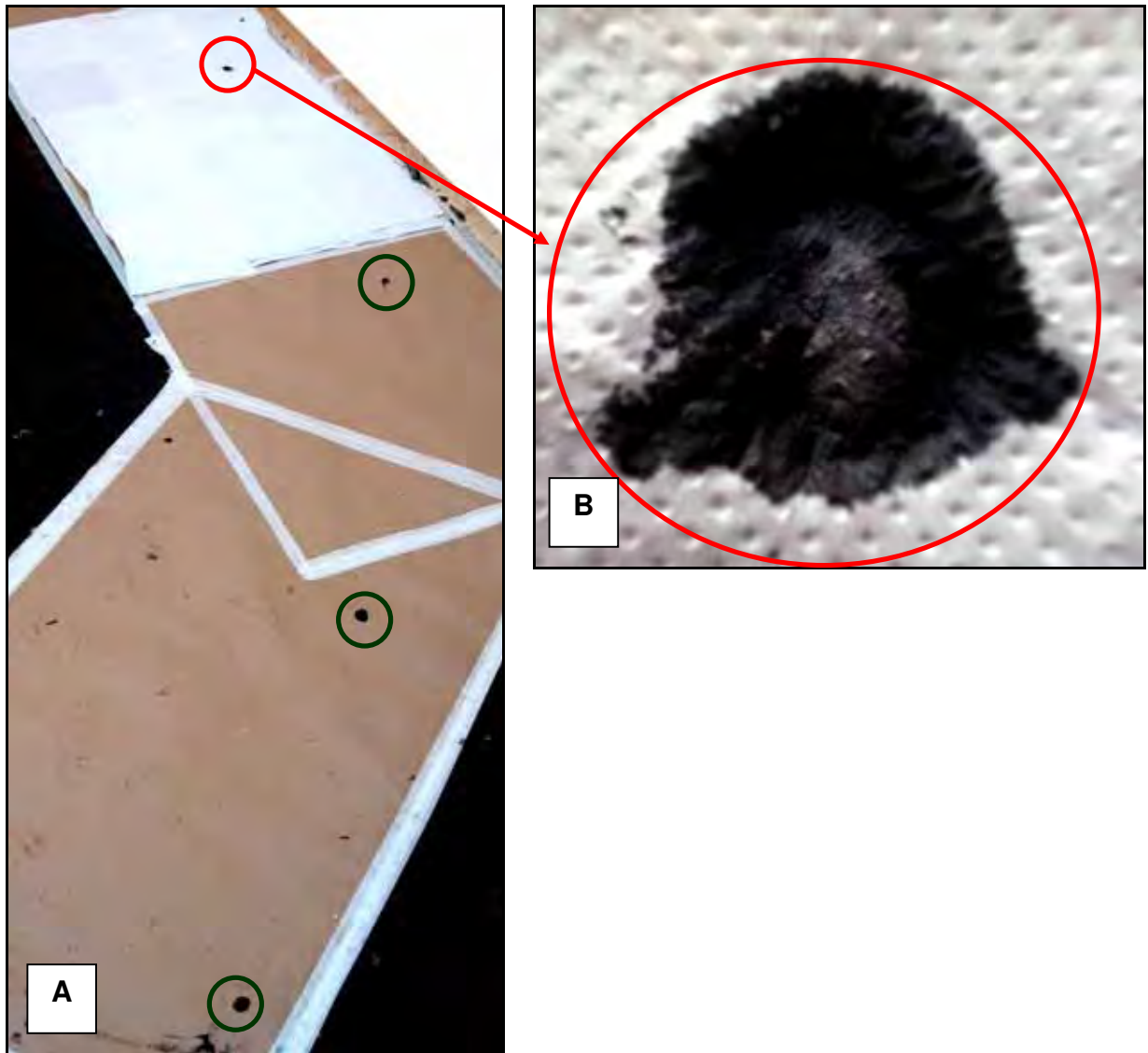


Figura 2. Pista para impressão das pegadas dos cães. A) As três primeiras pegadas (círculos em verde), foram desconsideradas e a 4ª (círculo em vermelho), foi utilizada; B) no detalhe, a impressão do coxim metatársico na 4ª pegada a ser decalcada, para mensuração em planímetro.

2.2.3. Aplicação dos fármacos e estímulo algésico

Após assepsia e antissepsia, fez-se venopunção, fixação de um cateter venoso e procedeu-se a administração de propofol¹⁴ na dose de 5 mg/kg. Sob anestesia geral, mas em plano anestésico que não aboliu o reflexo interdigital (MASSONE, 2003), o cão

¹⁴ Propofol, Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda., Itapira – SP.

foi colocado em decúbito lateral direito. Os membros pélvicos foram projetados cranialmente entre os torácicos de forma que a região lombo-sacra da coluna vertebral adquirisse posição convexa. Procedeu-se assepsia e antissepsia na pele entre a 2ª e 7ª vértebras lombares. Uma agulha descartável para anestesia espinhal com ponta tipo “quincke” 22G x 2½”¹⁵ foi introduzida com o bisel em direção caudal, para punção do espaço subaracnóideo entre L6 e L5 utilizando a técnica descrita por BILLER & HAIDER (1998) e SEIM III (2002).

A drenagem de líquido cefalorraquidiano foi o parâmetro utilizado para confirmar a punção subaracnóidea (Figura 3). Em seguida, injetaram-se os fármacos segundo as associações:

- CR+SAL: cetamina racêmica (0,3 mg/kg; 0,1 mL) associado à solução NaCl a 0,9% ou,
- IFE+CR: ifenprodil (0,03 mg/kg) seguido por NaCl a 0,9% (0,5 mL) e cetamina racêmica (0,3 mg/kg; 0,1 mL).

As diluições foram ajustadas de maneira que os dois protocolos tivessem o mesmo volume final de injeção de 0,15 mL/kg conforme o utilizado por KOZODY, ONG, PALAHNIUK *et al.* (1985).



Figura 3. A punção subaracnóidea, realizada L6 e L5, foi confirmada pela drenagem de líquido cefalorraquidiano. Os cães estavam anestesiados com propofol, aplicado por via intravenosa.

¹⁵ Spinal; Becton, Dickinson Ind. Cirúrgicas LTDA, Juiz de Fora – MG.

Após a injeção espinhal dos fármacos, o plano anestésico foi aprofundado até a 3ª fase do III estágio de Guedel (MASSONE, 2003) para que se pudesse realizar a incisão de 2 cm de extensão na pele e tecido celular subcutâneo, no coxim metatársico utilizando-se lâmina descartável de bisturi nº 24. Em ato contínuo a ferida foi suturada com fio de náilon monofilamentar agulhado 2-0¹⁶ utilizando-se quatro pontos em padrão simples descontínuo.

Depois da recuperação anestésica, o animal foi colocado na gaiola individual, sendo mantido com colar Elisabetano. Uma proteção feita com malha cirúrgica minimizou o atrito da ferida com o piso. O colar e a proteção foram retirados para a realização dos testes e recolocados após estes.

2.2.4. Tratamento da ferida cirúrgica

Terminado cada ensaio, os cães foram medicados com flunixinina meglumina¹⁷ (1,1 mg/kg, SC) durante três dias consecutivos, realizando-se curativo local com clorexidine até a cicatrização. Os pontos foram retirados entre 7 e 10 dias.

2.2.5. Análises estatísticas

Os resultados experimentais foram avaliados pelo programa GraphPad Prism®.

Os valores basais das frequências cardíaca e respiratória foram confrontados com os obtidos em dado tempo enquanto os resultados dos testes de sensibilidade cutânea com von Frey e de planimetria foram tratados como variações, ou seja, diferenças entre os valores basais e os aferidos em dado instante.

Aplicaram-se a análise de variância com repetição múltipla e pós-teste de comparação múltipla de colunas de Student-Newman-Keuls. As comparações entre dois grupos valeram-se do teste de Wilcoxon para amostras pareadas.

¹⁶ Nylon Monofilamentar 2-0, Cirumédica S.A., São Paulo – SP.

¹⁷ Banamine Injetável, Schering-Plough Ltda., Rio de Janeiro – RJ.

As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

3. Resultados

3.1. Escores de sedação

Todos cães estavam em alerta e deambulando com facilidade por ocasião da mensuração dos dados. Os escores foram, portanto, iguais a zero.

3.2. Escores de claudicação

Decorridos de 60 até 1440 min da realização da incisão plantar, os animais não apresentaram sinais de claudicação para os dois protocolos testados.

3.3. Frequências cardíacas

As frequências cardíacas observadas não variaram significativamente em relação aos valores basais dentro de um mesmo grupo e tampouco entre os grupos após os tratamentos com cetamina racêmica seguido por solução de NaCl 0,9% ou ifenprodil associado a solução de NaCl 0,9% e cetamina racêmica (Tabela 3 e Figura 4).

3.4. Frequências respiratórias

Não houve variação significativa entre os valores basais e os obtidos até 24 h dentro de um mesmo grupo ou entre os grupos (Tabela 4 e Figura 5).

Tabela 3. Médias aritméticas das frequências cardíacas de cães submetidos aos tratamentos com CET+SAL (cetamina racêmica + solução NaCl a 0,9%) ou IFE+CET (ifenprodil + cetamina racêmica) e avaliados no período entre 60 e 1440 min após o estímulo cirúrgico.

Tratamentos	Tempos (min)	FREQUÊNCIAS CARDÍACAS (Bpm)								
		Basal	60	90	120	180	240	480	720	1440
CET+SAL	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Médias	101	99	95	94	100	97	93	102	98
	Desvios padrão	14	13	16	15	19	15	14	14	18
	Erros padrão	4,9	4,5	5,6	5,3	6,5	5,2	4,8	4,9	6,3
IFE+CET	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Médias	97	105	96	87	107	96	100	89	108
	Desvios padrão	23	13	16	12	12	16	15	8	12
	Erros padrão	8,0	4,6	5,6	4,2	4,2	5,8	5,3	2,9	4,2

Bpm= batimentos cardíacos por minuto; CET= cetamina racêmica; IFE= ifenprodil; n= tamanho da amostra; SAL= solução NaCl a 0,9%.

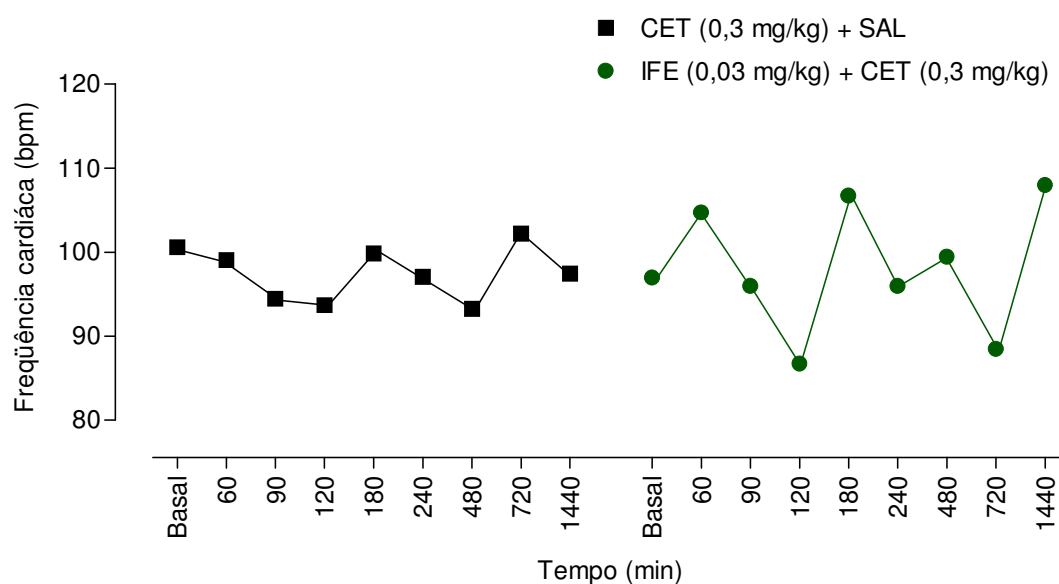


Figura 4. Valores médios das frequências cardíacas de cães, após aplicação dos protocolos CET+SAL (cetamina racêmica + solução NaCl 0,9%) e IFE+CET (ifenprodil + cetamina racêmica) entre 1 h e 24 h do período pós-cirúrgico. Não foram encontradas diferenças dentro e entre os tratamentos.

Tabela 4. Médias aritméticas das frequências respiratórias de cães submetidos aos tratamentos com CET+SAL (cetamina racêmica + solução NaCl a 0,9%) ou IFE+CET (ifenprodil + cetamina racêmica) e avaliados no período entre 60 e 1440 min após o estímulo cirúrgico.

Tratamentos	Tempos (min)	FREQUÊNCIAS RESPIRATÓRIAS (movimentos/min)								
		Basal	60	90	120	180	240	480	720	1440
CET+SAL	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Médias	21,5	21,9	23,1	24,4	23	19,1	20,4	20,8	21,1
	Desvios padrão	4,2	7,2	4,5	4,7	6,2	4,3	6,8	4,4	4
	Erros padrão	1,5	2,5	1,6	1,6	2,2	1,5	2,4	1,6	1,4
IFE+CET	n	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	Médias	26,6	19,1	23,9	20,1	25,8	23,8	21,6	21,3	23,8
	Desvios padrão	7,9	4,6	3,8	5,4	8,1	4,8	5,2	4	6,3
	Erros padrão	2,8	1,6	1,3	1,9	2,9	1,7	1,9	1,4	2,2

CET= cetamina racêmica; IFE= ifenprodil; n= tamanho da amostra; SAL= solução NaCl a 0,9%.

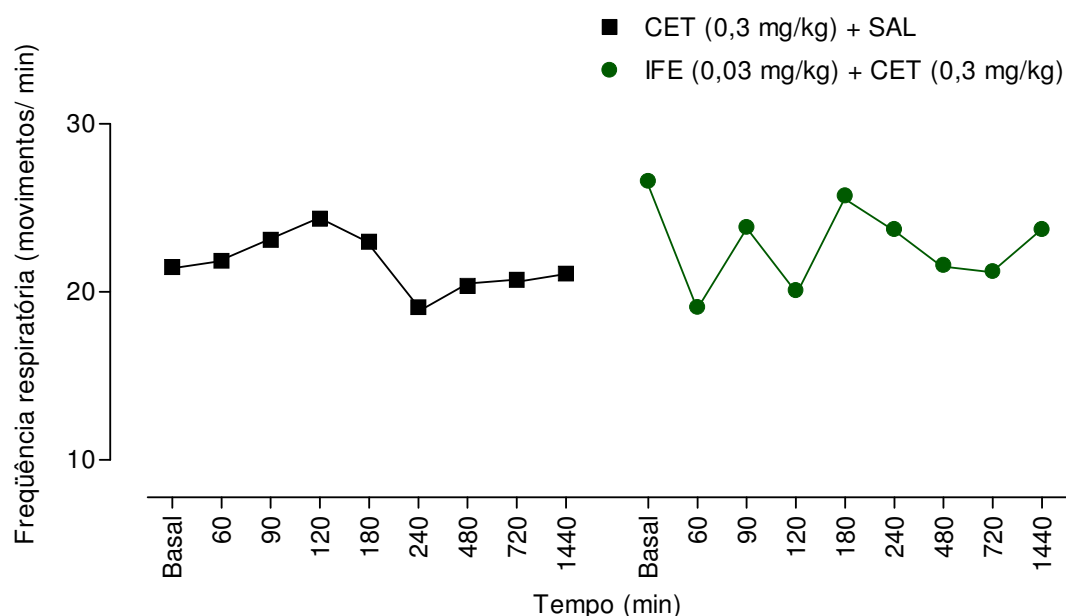


Figura 5. Valores médios das frequências respiratórias nos dois protocolos farmacológicos testados em cães. Não houve diferença significativa ao serem confrontados os tratamentos CET+SAL e IFE+CET em um determinado tempo bem como os valores basais não variaram significativamente entre 1 h e 24 h do período pós-cirúrgico.

3.5. Testes com filamentos de von Frey

As médias aritméticas, erros e desvios padrão dos valores encontrados referem-se às farmacoterapias com cetamina e ifenprodil associado a cetamina (Tabela 5).

Os cães tratados com a combinação apresentaram, em média, menor variação na reação de retirada em todos os tempos testados quando comparados aos que receberam somente cetamina. Entre os diferentes tempos de um mesmo tratamento não houve diferença significativa (Figura 6).

3.6. Testes com planímetro

As médias aritméticas, erros e desvios padrão dos Δ das áreas planimétricas (Tabela 6) estão relacionados a seguir. O animal 3 recusou-se a caminhar sobre a pista na primeira fase do experimento. Outras parcelas foram perdidas por danos ao papel absorvente ou não cooperação dos animais.

Comparando-se os dois protocolos farmacológicos em função de um dado tempo, notaram-se diferenças significativas entre todos os períodos testados. Considerando-se um mesmo tratamento, não houve diferenças significativas entre os tempos após o desafio cirúrgico (Figura 7).

Tabela 5. Médias das variações (Δ) nas reações de retirada (g) em resposta aos tratamentos com cetamina racêmica e solução de NaCl à 0,9% ou ifenprodil e cetamina racêmica detectadas pelo teste com filamentos de von Frey entre 1 e 24 h após o estímulo cirúrgico em cães.

Tratamentos	Δ DAS REAÇÕES DE RETIRADA (g)								
	Tempos (min)	60	90	120	180	240	480	720	1440
CET+SAL	n	8	8	8	8	8	8	8	8
	Médias	273	335	337	343	340	339	342	350
	Desvios padrão	96	78	75	75	81	81	85	86
	Erros padrão	33,9	27,6	26,7	26,5	28,8	28,5	30	30,4
IFE+CET	n	8	8	8	8	8	8	8	8
	Médias	29	74	84	84	84	98	120	151
	Desvios padrão	43	92	106	106	106	99	110	109
	Erros padrão	15,2	32,6	37,6	37,6	37,6	35,1	39	38,6

CET= cetamina racêmica; IFE= ifenprodil; n= tamanho da amostra; SAL= solução NaCl a 0,9%; Δ = variação.

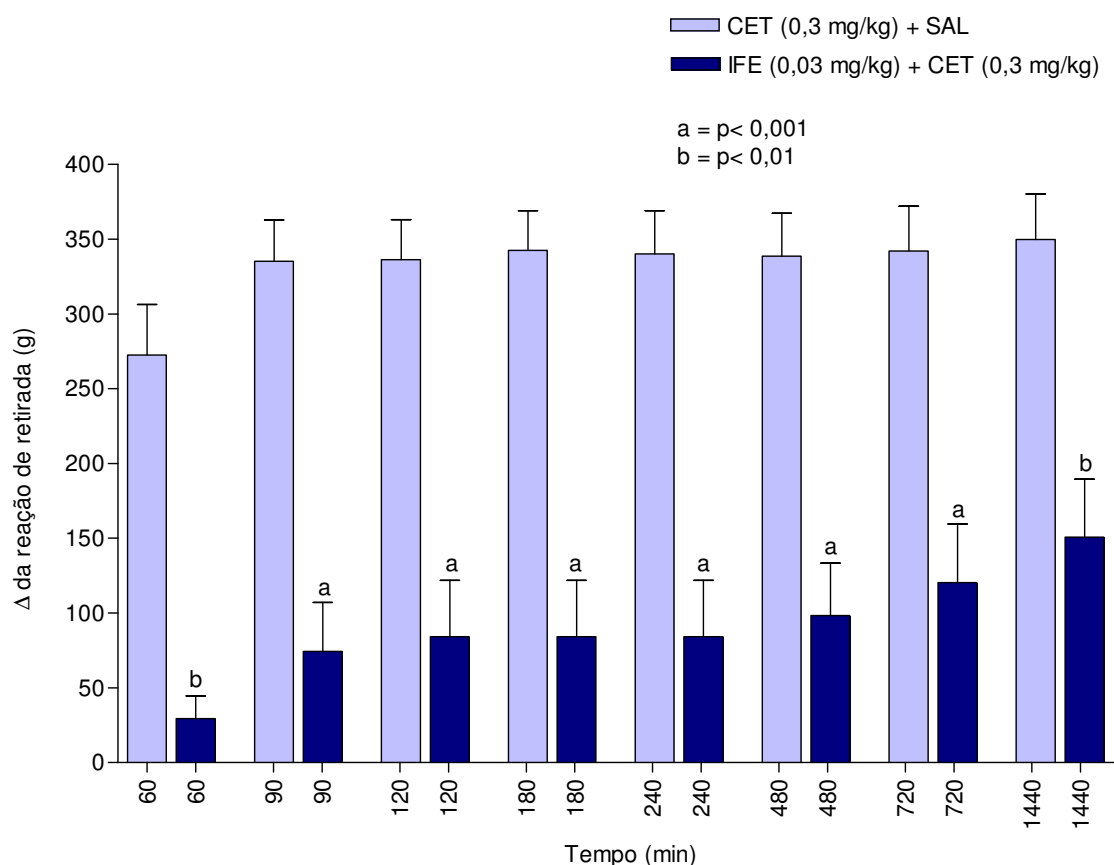


Figura 6. Variação (Δ) das reações de retirada (g) obtidas a partir da aplicação dos filamentos de von Frey em cães. O confronto entre os dois protocolos, considerando-se um determinado tempo de avaliação, demonstrou que o uso associado de fármacos resultou numa maior redução do Δ (g). Este achado repetiu-se em todos tempos testados. Estão representados as médias aritméticas e respectivos erros padrão.

Tabela 6. Médias das variações (Δ) nas áreas de apoio (cm^2) em resposta aos tratamentos com cetamina racêmica e solução de NaCl a 0,9% ou ifenprodil e cetamina racêmica detectadas pelo teste com planímetro entre 1 e 24 h após o estímulo cirúrgico em cães.

Tratamentos	Tempos (min)	Δ DAS ÁREAS DE APOIO (cm^2)							
		60	90	120	180	240	480	720	1440
CET+SAL	n	7	7	5	7	6	8	8	8
	Médias	1,76	1,46	2,22	1,86	1,92	2,28	1,89	2,27
	Desvios padrão	0,91	1,17	1,29	0,90	1,20	1,23	1,37	1,77
	Erros padrão	0,35	0,4	0,58	0,34	0,49	0,46	0,52	0,67
IFE+CET	n	8	8	8	8	8	7	7	7
	Médias	0,45	0,43	0,45	0,56	0,61	0,63	0,55	0,43
	Desvios padrão	0,63	0,38	0,65	0,54	0,67	0,72	0,83	0,6
	Erros padrão	0,22	0,13	0,23	0,19	0,24	0,27	0,31	0,23

CET= cetamina racêmica; IFE= ifenprodil; n= tamanho da amostra; SAL= solução NaCl a 0,9%; Δ = variação.

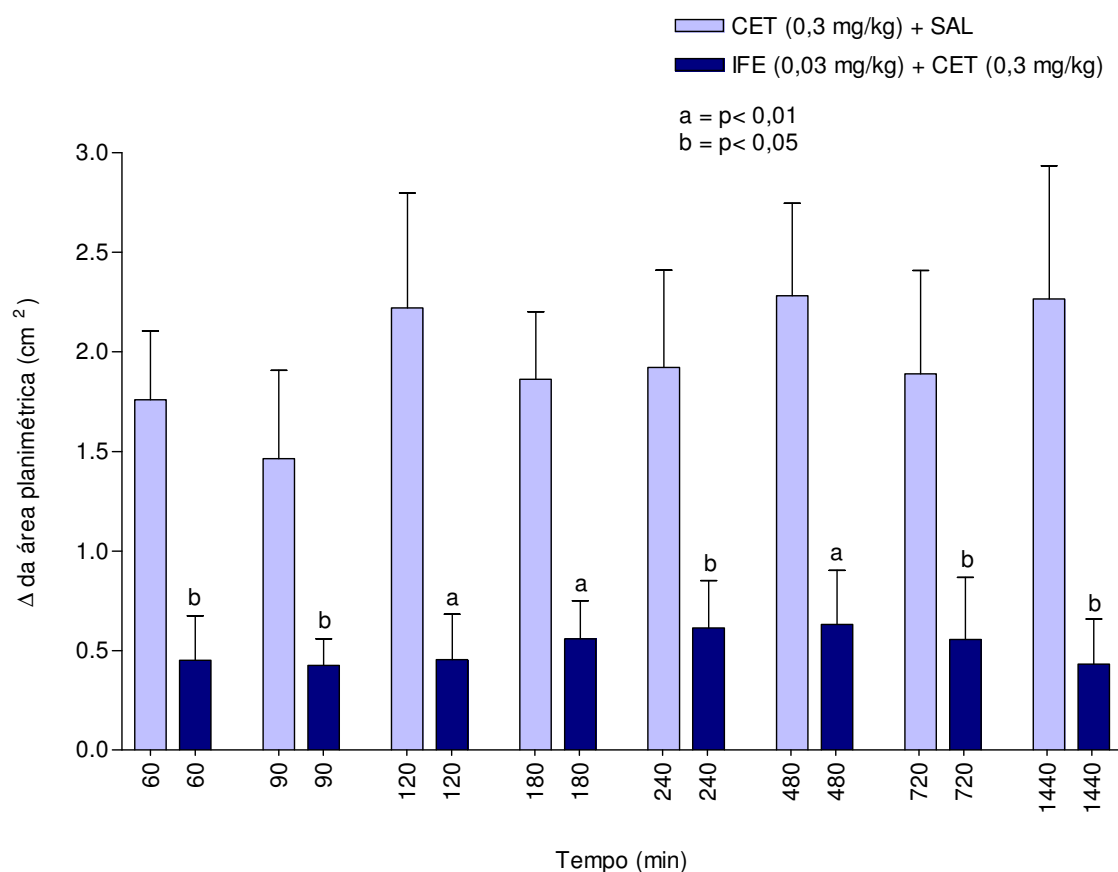


Figura 7. Variação (Δ) das áreas de apoio (cm^2) dos membros pélvicos de cães submetidos a planimetria. O confronto entre os dois protocolos, considerando-se um determinado tempo de avaliação, demonstrou que o uso associado de fármacos resultou em menor Δ . Este achado repetiu-se em todos tempos testados. Estão representados as médias aritméticas e respectivos erros padrão.

4. Discussão

Os resultados encontrados nos ensaios farmacológicos (Capítulo 2) permitiram concluir que a associação de ifenprodil com cetamina apresentou melhor ação anti-hiperalgésica que o uso isolado destes fármacos. O sinergismo foi de potencialização justificando o emprego combinado em oposição ao aumento da dose de um dos medicamentos. Contudo, o estímulo aplicado havia sido a administração de PGE₂ (100 ng em 100 µL por via intraplantar) em ratos com avaliação na 3ª hora. PLESAN *et al.* (1999) ressaltaram a importância de se considerarem as diferenças entre linhagens de ratos no estudo de antagonistas dos RNMDAs e assim, presumiu-se que a eficácia anti-hiperalgésica em ratos não é garantia de sucesso no uso em cães.

De maneira diversa, nos ensaios clínicos aqui apresentados realizados em cães, a indução hiperalgésica foi feita mediante incisão cirúrgica e a avaliação entre 60 e 1440 min após o trauma incisional. Sabe-se que a lesão tecidual gera liberação de bradicinina e 5-HT, dois importantes estímulos algogênicos sobre fibras C. As PGs são substâncias hiperalgésicas, com ação duradoura no caso da PGE₂ (RAJA, MEYER & CAMPBELL, 1988) que agem a partir da sensibilização dos nociceptores (TYERS & HAYWOOD, 1979). Há, portanto, diferenças entre os dois estímulos no que tange os mediadores envolvidos e sua conseqüente ação hiperalgésica.

Não existiu diferença significativa entre os escores de sedação entre os períodos basal e pós-tratamento denotando não ter havido influência deste parâmetro sobre as respostas hiperálgicas. O propofol utilizado para hipnose é incapaz de eliminar a reação reflexa à dor (SMITH & HOWIE, 2005) e gera um tempo para recuperação anestésica após a dose de indução que oscila, em cães, entre 2 e 4 min (BRANSON, 2003). Alguns autores citaram ser desprovido de ação analgésica (FANTONI, CORTOPASSI & BERNARDI, 2002; SMITH & HOWIE, 2005) ou que esta é mínima (BRANSON, 2003). Em adição, deve-se atentar para sua rápida biotransformação sem deixar resíduos (BRANSON, 2003) donde pode-se inferir que a primeira avaliação pós-cirúrgica, aos 60 min, não sofreu influência deste anestésico.

Os escores de claudicação permaneceram inalterados ao longo do tempo nos dois protocolos farmacológicos testados indicando que os animais sentiram-se

confortáveis em apoiar o membro locomotor em teste e ao mesmo tempo não apresentaram alterações motoras. Embora haja descrições de alterações motoras provocadas pelo uso de bloqueadores dos RNMDAs (BOYCE *et al.*, 1999) este efeito colateral não foi observado.

As frequências cardíaca e respiratória não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. DA SILVA & RIBEIRO FILHO (2006) afirmaram que estes indicadores de sensação são importantes dentro do processo de avaliação e mensuração das condições dolorosas e OLIVEIRA, R.M. (2005) descreveu alterações cardiovasculares no pós-operatório de pacientes humanos referindo dor. Alterações na frequência cardíaca e nos padrões respiratórios podem indicar dor, incômodo ou desconforto (CARROLL, 2002) entretanto, também refletem mudanças não relacionadas à nocicepção. Portanto, apesar da inexistência de uma correlação direta entre variações nas frequências cardíaca e respiratória e nocicepção, decidiu-se mensurá-los, pois variações significativas poderiam indicar incômodo, desconforto ou alterações homeostáticas necessitando de cuidados médico-veterinários.

A administração preventiva por via subaracnóidea em cães da associação de ifenprodil (0,03 mg/kg) com cetamina racêmica (0,3 mg/kg) demonstrou ação anti-hiperalgésica superior ao uso isolado da cetamina (0,3 mg/kg) no teste com filamentos de von Frey e com planímetro de 60 a 1440 min pós-trauma. A literatura científica carece de trabalhos utilizando estes fármacos pela via subaracnóidea e de forma preventiva em cães. DUQUE (2001) demonstrou a ação anti-hiperalgésica da cetamina racêmica em cães quando aplicada, por via epidural, antes do estímulo incisional.

Dentre os estudos que citam a cetamina racêmica como substância antinociceptiva, destacam-se os de ALAM SAITO & KOSAKA (1996), KAWAMATA *et al.* (2000) , HARTRICK, WISE & PATTERSON (1997) e BURTON *et al.* (1999). SAKURADA *et al.* (1998) comprovou efeito antinociceptivo do ifenprodil. XU & YANG (2006) demonstraram que tanto a cetamina racêmica quanto o ifenprodil elevaram o limiar para a dor inflamatória. Em comum, estes trabalhos utilizaram ratos e aplicaram os fármacos por via intratecal. Mais uma vez, não se podem desprezar as diferenças genéticas entre as espécies, visto que mesmo diferenças entre linhagens podem ser significativas (PLESAN *et al.*, 1999); as vias de aplicação; o estímulo nociceptivo e a

aplicação da medicação pré ou pós-trauma. Contudo, o resultado final do presente trabalho, ou seja, a ação anti-hiperalgésica da cetamina racêmica e do ifenprodil coincidem com os referendados.

Com relação aos testes com filamentos de von Frey, nenhum dos agentes testados apresentou efeito analgésico, no sentido literal da palavra, entretanto, o uso de fármacos associados teve ação anti-hiperalgésica superior ao uso isolado da cetamina racêmica. Este fato ficou comprovado pela menor variação da reação de retirada nos animais tratados com IFE+CET. Os achados confirmam o encontrado no capítulo 2 aqui apresentado e ressaltam a importância da modulação da subunidade GluN2B em associação ao bloqueio do canal iônico para minimizar a hiperalgesia.

O uso de planímetro para mensurar a área de apoio de membros locomotores em cães foi descrito por outros autores (MAZZEI, VALADÃO & OLESKOVICZ, 2000). FALCÃO *et al.* (2001) também aplicaram esta técnica para dimensionar lesões na pele. Todos os animais apresentaram uma redução na área de apoio dos membros locomotores em teste evidenciando que os fármacos aplicados não aboliram os estímulos nociceptivos. Entretanto, a associação de IFE+CET permitiu menor variação na área de apoio denotando melhor ação anti-hiperalgésica em comparação ao uso de CET+SAL em todos os tempos testados.

Apesar de DUQUE *et al.* (2004) terem comprovado antinocicepção promovida pela cetamina (0,6 mg/kg, por via epidural) com duração de 24 h após o estímulo incisional em cães, não há, até o momento, na literatura científica estudos com este desafio cirúrgico em cães tratados com ifenprodil ou cetamina racêmica por via subaracnóidea.

Em consonância com os princípios de bem-estar animal, preferiu-se administrar o ifenprodil em dose referida como efetiva em ratos seguida por outra, reconhecidamente anti-hiperalgésica de cetamina racêmica, preservando-se desta forma, a integridade dos cães. A associação farmacológica mostrou-se mais eficaz entretanto, permitiu consubstanciar a hipótese que o ifenprodil, isoladamente, deva apresentar também ação anti-hiperalgésica em cães quando utilizado preventivamente por via subaracnóidea.

5. Conclusão

Considerando-se a administração preventiva, por via subaracnóidea, em cães submetidos à incisão cirúrgica do coxim plantar e avaliados quanto a instalação de hiperalgesia pós-operatória, pode-se afirmar o ifenprodil (0,03 mg/kg) associado à cetamina racêmica (0,3 mg/kg) reduz a hiperalgesia com maior eficácia do que o uso isolado da última.

REFERÊNCIAS¹⁸

AIDA, S. The challenge of preemptive analgesia. **Pain:clinical updates**, v.XIII, n.2, p.1-4. June 2005.

ALAM, S.; SAITO, Y.; KOSAKA, Y. Antinociceptive effects of epidural and intravenous ketamine to somatic and visceral stimuli in rats. **Canadian Journal of Anesthesiology**, n.43, p.408-413. 1996.

ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to receptors and channels. **British Journal of Pharmacology**, v.153, n.2, p.1-209. 2008.

ALVES, T. C. A.; DÓREA, E. M. L.; ANDRADE, R. F. Anestésicos gerais intravenosos. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 6^aed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.391-403.

ANDRADE, S. F. Analgésicos. In: _____. **Manual de terapêutica veterinária**. 2^aed. São Paulo: Roca, 2002. p.77-88.

BATH, C. P.; FARRELL, L. N.; GILMORE, J.; WARD, M. A.; HICKS, C. A.; O'NEILL, M. J.; BLEAKMAN, D. The effects of ifenprodil and eliprodil on voltage-dependent Ca²⁺ channels and in gerbil cerebral ischemia. **European Journal of Pharmacology**, v.299, p.103-112. 1996.

BENARROCH, E. E. Descending monoaminergic pain modulation: bidirectional control and clinical relevance. **Neurology**, n.71, p.217-221. July 15 2008.

BILLER, D. S.; HAIDER, P. R. Técnicas radiográficas e ultra-sonográficas. In: BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders: clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 1998. p.41-69.

BLEAKMAN, D.; ALT, A.; NISENBAUM, E. S. Glutamate receptors and pain. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, p.1-13. 2006.

¹⁸ ABNT 6023, 2002.

BOYCE, S.; WYATT, A.; WEBB, J. K.; O'DONNELL, R.; MASON, G.; RIGBY, M.; SIRINATHSINGHI, D.; HILL, R. G.; RUPNIAK, N. M. J. Selective NMDA NR2B antagonists induce antinociception without motor dysfunction: correlation with restricted localization of NR2B subunit in dorsal horn. **Neuropharmacology**, v.38, p.611-623. 1999.

BRANDT, M. R.; CUMMONS, T. A.; POTESIO, L.; SUKOFF, S. J.; ROSENZWEIG-LIPSON, S. Effects of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist perzinfotel [EAA-090; [2-(8,9-dioxo-2,6-diazabicyclo[5.2.0]non-1(7)-en-2-yl)-ethyl]phosphonic acid] on chemically induced thermal hypersensitivity. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.313, n.3, p.1379-1386. 2005.

BRANSON, K. R. Anestésicos injetáveis. In: ADAMS, H. R. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 8ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p.179-223.

BREW, J.; BANNISTER, R. M.; BAXTER, A. D.; ROTHUL, A.; LYNE, M. H. **Treatment of pain with ifenprodil**. United States US 2005/0222205 A1. October 6 2005.

BROCKIE, P. J.; MARICQ, A. V. Ionotropic glutamate receptors: genetics, behavior and electrophysiology. **Neurobiology and behavior**. In: JORGENSEN, E. M.; KAPLAN, J. M. (Ed.). [S.I.]: The C. elegans Research Community, WormBook 2006. Disponível em:<<http://www.wormbook.org>>. Acesso em: 30/11/2007.

BURTON, A. W.; LEE, D. H.; SAAB, C.; CHUNG, J. M. Preemptive intrathecal ketamine injection produces a long-lasting decrease in neuropathic pain behaviors in a rat model. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v.24, n.3, p.208-213. 1999.

CANDY, S. C.; BRICKEY, S.; FARRANT, M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. **Current Opinion in Neurobiology**, n.11, p.327-335. 2001.

CARROLL, G. Tratamento da dor perioperatória. In: FOSSUM, T. W.; HEDLUND, C. S.; HULSE, D. A.; JOHNSON, A. L.; SEIM III, H. B.; WILLARD, M. D.; CARROLL, G. L. **Cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2002. p.94-99.

CARSTENS, E. E. Endogenous pain suppression mechanisms. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.191, n.10, p.1203-1206. November 15 1987.

CARVALHO, W. A. Analgésicos, antipiréticos e antiinflamatórios. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 6^aed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.431-455.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos centrais de transmissão e de modulação da dor: atualização terapêutica. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.48, n.3, p.221-240. Maio-Junho 1998.

CHAPLAN, S. R.; MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Efficacy of spinal NMDA receptor antagonism in formalin hyperalgesia and nerve injury evoked allodynia in the rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, n.280, p.829-838. 1997.

CHENARD, B. L.; BORDNER, J.; BUTLER, T. W.; CHAMBERS, L. K.; COLLINS, M. A.; DE COSTA, D. L.; DUCAT, M. F.; DUMONT, M. L.; FOX, C. B.; MENA, E. E.; MENNITI, F. S.; NIELSEN, J.; PAGNOZZI, M. J.; RICHTER, K. E. G.; RONA, R. T.; SHALABY, I. A.; STEMPLE, J. Z.; WHITE, W. F. (1S,2S)-1-(4-hydroxyphenyl)-2-(4-hydroxy-4-phenylpiperidino)-1-propanol: a potent new neuroprotectant which blocks N-methyl-D-aspartate responses. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.38, p.3138-3145. 1995.

CHENARD, B. L.; MENNITI, F. S. Antagonists selective for NMDA receptors containing the NR2B subunit. **Current Pharmaceutical Design**, v.5, n.5, p.381-404. May 1999.

CHENARD, B. L.; SHALABY, I. A.; KOE, B. K.; RONA, R. T.; BUTLER, T. W.; PROCHNIAK, M. A.; SCHMIDT, A. W.; FOX, C. B. Separation of α_1 adrenergic and N-methyl-D-aspartate antagonist activity in a series of ifenprodil compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.34, n.10, p.3085-3090. 1991.

CHIZH, B. A. Low dose ketamine: a therapeutic and research tool to explore N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated plasticity in pain pathways. **Journal of Psychopharmacology**, v.21, n.3, p.259-271. 2007.

CHIZH, B. A.; HEADLEY, P. M.; TZSCHENTKE, T. M. NMDA receptor antagonists as analgesics: focus on the NR2B subtype. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.22, n.12, p.636-642. December 2001.

CHIZH, B. A.; REIBMÜLLER, H. S.; SCHEEDE, M.; HAASE, G.; ENGLBERGER, W. Supraspinal vs. spinal sites of the antinociceptive action of the subtype-selective NMDA antagonist ifenprodil. **Neuropharmacology**, v.40, p.212-220. 2001.

CHRISTOPH, T.; SCHIENE, K.; ENGLBERGER, W.; PARSONS, C. G.; CHIZH, B. A. The antiallodynic effect of NMDA antagonists in neuropathic pain outlasts the duration of the in vivo NMDA antagonism. **Neuropharmacology**, v.51, p.12-17. 2006.

CHRISTOPHER, C.; RIVY, J. P.; SCATTON, B. Ifenprodil and SL 82.0715 are antagonists at the polyamine site of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. **European Journal of Pharmacology**, v.164, p.611-612. 1989.

CORTOPASSI, S. R. G.; FANTONI, D. T. Anestésicos intravenosos. In: ANDRADE, S. F. **Manual de terapêutica veterinária**. 2ªed. São Paulo: Roca, 2002. p.365-372.

CRAIG, C. R. Introdução à farmacologia do sistema nervoso central. In: CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E. **Farmacologia moderna com aplicações clínicas**. 6ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.263-271.

DA SILVA, J. A.; RIBEIRO FILHO, N. P. **Avaliação e mensuração de dor: pesquisa, teoria e prática**. 1ªed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2006. 467 p.

DE VRY, J.; KUHL, E.; HUNKEL, P. F.; ECKEL, G. Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v.491, p.137-148. 2004.

DICKENSON, A. H. A cure for wind up: NMDA receptor antagonists as potential analgesics. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.11, n.8, p.307-309. August 1990.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anesthesia**, v.75, p.125-131. 1995.

DRAY, A.; BEVAN, S. Inflammation and hyperalgesia: highlighting the team effort. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.14, n.8, p.287-290. 1993.

DUQUE, J. C. M. **Efeitos da injeção epidural de cetamina ou cetamina S(+) na dor pós-incisional, em cães**. 2001. 59 f. (Dissertação em Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2001.

DUQUE, J. C. M.; VALADÃO, C. A. A.; FARIAS, A.; DE ALMEIDA, R. M.; OLESKOVICZ, N. Pre-emptive epidural ketamine or S(+)-ketamine in post-incisional pain in dogs: a comparative study. **Veterinary Surgery**, v.33, p.1-7. 2004.

EIDE, P. K. Wind-up and the NMDA receptor complex from a clinical perspective. **European Journal of Pain**, v.4, p.5-17. 2000.

EIDE, P. K.; STUBHAUG, H.; ØYE, I.; BREIVIK, H. Continuous subcutaneous administration of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist ketamine in the treatment of post herpetic neuralgia. **Pain**, v.61, p.221-228. 1995.

ELIA, N.; TRAMÈR, M. R. Ketamine and postoperative pain - a quantitative systematic review of randomized trials. **Pain**, v.113, p.61-70. 2005.

ERREGER, K.; CHEN, P. E.; WYLLIE, D. J. A.; TRAYNELIS, S. F. Glutamate receptor gating. **Critical Reviews in Neurobiology**, v.16, n.3, p.187-224. 2004.

FALCÃO, S. C.; COELHO, A. R. D. B.; ALMEIDA, E. L. D.; GALDINO, C. A. P. D. M. Processo modificado de reprodução e amplificação de imagem para mensuração de área por planimetria. Aplicação em feridas planas produzidas em cães, tratadas por curativos oclusivos de pele de rã. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.4, p.165-169. 2001.

FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G.; BERNARDI, M. M. Anestésicos intravenosos e outros parenterais. In: SPINOSA, H. D. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3ªed. São Paulo: Roca, 2002. p.117-128.

FANTONI, D. T.; MASTROCINQUE, S. Fisiopatologia e controle da dor. In: FANTONI, D. T.; CARTOPASSI, S. R. G. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2002. p.323-336.

FERRARI, L. F.; CUNHA, F. Q.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H. A novel technique to perform direct intraganglionic injections in rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v.159, p.236-243. 2007.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B. Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception. **Neuropharmacology**, v.33, n.11, p.1479-1485. 1994.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, n.10, p.1227-1231. 1993.

FERREIRA, S. H.; MONCADA, S.; VANE, J. R. Prostaglandins and the mechanism of analgesia produced by aspirin-like drugs. **British Journal of Pharmacology**, v.49, p.86-97. 1973.

FINE, P. G.; ASHBURN, M. A. Functional neuroanatomy and nociception. In: ASHBURN, M. A.; RICE, L. J. **Management of pain**. New York: Churchill Livingstone, 1998. p.1-16.

FISCHER, B. D.; CARRIGAN, K. A.; DYKSTRA, L. A. Effects of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists on acute morphine-induced and l-methadone-induced antinociception in mice. **Journal of Pain**, v.6, n.7, p.425-433. July 2005.

FISHER, K.; CODERRE, T. J.; HAGEN, N. A. Targeting the N-methyl-D-aspartate receptor for chronic pain management: preclinical animal studies, recent clinical experience and future research directions. **Journal of Pain and Symptom Management**, v.20, n.5, p.358-373. November 2000.

GAMMAITONI, A.; GALLAGHER, R. M.; WELZ-BOSNA, M. Topical ketamine gel: possible role in treating neuropathic pain. **Pain Medicine**, v.1, n.1, p.97-100. 2000.

GAO, X.; KIM, H. K.; CHUNG, J. M.; CHUNG, K. Enhancement of NMDA receptor phosphorylation of the spinal dorsal horn and nucleus gracilis neurons in neuropathic rats. **Pain**, v.116, p.62-72. 2005.

GENNINGS, C.; CARTER JR, W. H.; CAMPBELL, E. O.; STANISWALIS, J. G.; MARTIN, T. J.; MARTIN, B. R.; WHITE JR, K. L. Isobolographic characterization of drug interactions incorporating biological variability. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.252, n.1, p.208-217. 1990.

GRAVIUS, A.; PIETRASZEK, M.; SCHMIDT, W. J.; DANYSZ, W. Functional interaction of NMDA and group I metabotropic glutamate receptors in negatively reinforced learning in rats. **Psychopharmacology**, v.185, p.58-65. 2006.

HAINES, D. R.; GAINES, S. P. N of 1 randomized controlled trials of oral ketamine in patients with chronic pain. **Pain**, v.83, p.283-287. 1999.

HARTRICK, C. T.; WISE, J. J.; PATTERSON, J. S. Preemptive Intrathecal Ketamine Delays Mechanical Hyperalgesia in the Neuropathic Rat. **Anesthesia and Analgesia**, v.86, p.540-557. 1997.

HENTHORN, T. K.; KREJCIE, T. C.; NIEMANN, C. U.; ENDERS-KLEIN, C.; SHANKS, C. A.; AVRAM, M. J. Ketamine distribution described by a recirculatory pharmacokinetic model is not stereoselective. **Anesthesiology**, v.91, n.6, p.1733-1743. December 1999.

HOCKING, G.; COUSINS, M. J. Ketamine in chronic pain management: an evidence-based review. **Anesthesia & Analgesia**, v.97, n.6, p.1730-1739. December 2003.

HORVATH, G.; JOO, G.; DOBOS, I.; KLIMSCHA, W.; TOTH, G.; BENEDEK, G. The synergistic antinociceptive interactions of endomorphin-1 with dexmedetomidine and/or S(+)-ketamine in rats. **Anesthesia and Analgesia**, v.93, p.1018-1024. 2001.

HYLDEN, J. L. K.; WILCOX, G. L. Intrathecal morphine in mice: a new technique. **European Journal of Pharmacology**, v.67, n.2-3, p.313-316. October 17 1980.

IASP. Classification of chronic pain. In: MERSKEY, H.; BODKUK, N. **Pain terms: a current list with definitions and notes on usage**. 2^aed. Seattle: IASP Press, 1994. p.209-214.

_____. Animal models of pain and ethics of animal experimentation. **Core curriculum for professional education in pain**. In: CHARLTON, E. J. (Ed.). [S.I.]: IASP Press, 2005. Disponível em: <http://www.iasp-pain.org/AM/Template.cfm?Section=Core_Curriculum_Book&Template=/CM/HTMLDisplay.cfm&ContentID=1831#TOC>. Acesso em: 29/03/2007.

IHMSEN, H.; GEISLINGER, G.; SCHÜTTLER, J. Stereoselective pharmacokinetics of ketamine: R(-)-ketamine inhibits the elimination of S(+)-ketamine. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v.70, p.431-438. 2001.

INFANTE, C.; DÍAZ, M.; HERNÁNDEZ, A.; CONSTANDIL, L.; PELISSIER, T. Expression of nitric oxide synthase isoforms in the dorsal horn of monoarthritic rats: effects of competitive and uncompetitive N-methyl-D-aspartate antagonists. **Arthritis Research & Therapy**, v.9, n.3 May 23 2007.

INOUE, M.; MISHINA, M.; UEDA, H. Enhanced nociception by exogenous and endogenous substance P given into the spinal cord in mice lacking NR2A/ ϵ_1 , an NMDA receptor subunit. **British Journal of Pharmacology**, v.129, p.239-241. 2000.

ITO, S.; OKUDA-ASHITAKA, E.; MINAMI, T. Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin. **Neuroscience Research**, v.41, p.299-332. 2001.

JERUM, E.; WARNCKE, T.; STUBHAUG, A. Cold allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: the effect of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist ketamine – a double-blind, cross-over comparison with alfentanil and placebo. **Pain**, v.101, p.229-235. 2003.

JESSELL, T. M.; KELLY, D. D. Pain and analgesia. In: KANDELL, E. R.; SCHWARTZ, J. M.; JESSEL, T. M. **Principles of neural science**. New York: Elsevier Publishing Co., 1991. p.385-399.

JIMÉNEZ, C. Ketamina. ¿Nuevas posibilidades? **Revista Española de Anestesiología y Reanimación**, v.51, n.1, p.1-2. 2004.

JOÓ, G.; HORVATH, G.; KLIMSCHA, W.; KEKESI, G.; DOBOS, I.; SZIKSZAY, M.; BENEDEK, G. The effects of ketamine and its enantiomers on the morphine - or dexmedetomidine-induced antinociception after intrathecal administration in rats. **Anesthesiology**, v.93, p.231-241. 2000.

KASAI, M.; MIZUMURA, K. Effects of PGE₂ on neurons from rat dorsal root ganglia in intact and adjuvant-inflamed rats: role of NGF on PGE₂-induced depolarization. **Neuroscience Research**, v.41, p.345-353. 2001.

KAWAMATA, T.; OMOTE, K.; SONODA, H.; KAWAMATA, M.; NAMIKI, A. Analgesic mechanisms of ketamine in the presence and absence of peripheral inflammation. **Anesthesiology**, v.93, p.520-528. 2000.

KEW, J. N.; TRUBE, G.; KEMP, J. A. A novel mechanism of activity-dependent NMDA receptor antagonism describes the effect of ifenprodil in rat cultured cortical neurons. **Journal of Physiology**, v.497, p.761-772. 1996.

KIM, H. K.; SCHATTSCHEIDER, J.; LEE, I.; CHUNG, K.; BARON, R.; CHUNG, J. M. Prolonged maintenance of capsaicin-induced hyperalgesia by brief daily vibration stimuli. **Pain**, v.129, p.93-101. 2007.

KING, A. E.; LOPEZ-GARCIA, J. A. Excitatory amino acid receptor-mediated neurotransmission from cutaneous afferents in rat dorsal horn in vitro. **Journal of Physiology**, v.472, p.443-457. December 1993.

KITCHELL, R. L. Problems in defining pain and peripheral mechanisms of pain. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.191, n.10, p.1195-1199. November 15 1987.

KLIMSCHA, W.; HORVÁH, G.; SZIKSZAY, M.; DOBOS, I.; BENEDEK, G. Antinociceptive effect of the S(+)-enantiomer of ketamine on carrageenan hyperalgesia after intrathecal administration in rats. **Anesthesia & Analgesia**, v.86, p.561-565. 1998.

KÖHR, G. NMDA receptor antagonists: tools in neuroscience with promise for treating CNS pathologies. **Journal of Physiology**, v.581, p.1-2. May 15 2007.

KOINIG, H.; MARHOFER, P.; KRENN, C. G.; KLIMSCHA, W.; WILDLING, E.; ERLACHER, W.; NIKOLIC, A.; TURNHEIM, K.; SEMSROTH, M. Analgesics effects of caudal and intramuscular S(+)-ketamine in children. **Anesthesiology**, v.93, p.976-980. 2000.

KOPPERT, W.; DERN, S.; SITTL, R.; ALBRECHT, S.; SCHÜTTLER, J.; SCHMELZ, M. A new model of electrically evoked pain and hyperalgesia in human skin: the effects of intravenous alfentanil, S(+)-ketamine and lidocaine. **Anesthesiology**, v.95, p.395-402. 2001.

KOVÁCS, G.; KOCSIS, P.; TARNAWA, I.; HORVÁTH, C.; SZOMBATHELYI, Z.; FARKAS, S. NR2B containing NMDA receptor dependent windup of single spinal neurons. **Neuropharmacology**, v.46, n.1, p.23-30. 2003.

KOZODY, R.; ONG, B.; PALAHNIUK, R. J.; WADE, J. G.; CUMMING, M. O.; PUCCI, W. R. Subarachnoid bupivacaine decrease spinal cord blood flow in dogs. **Canadian Anesthetists' Society Journal**, v.33, n.3, p.216-222. 1985.

KRISTENSEN, J. D.; SVENSSON, B.; GORDH, T. The NMDA-receptor antagonist CPP abolishes neurogenic 'wind-up pain' after intrathecal administration in humans. **Pain**, v.51, p.249-253. 1992.

KVARNSTRÖ, A.; KARLSTEN, M. R.; QUIDING, H.; UIDING, B.; EMANUELSSON, M.; GORDH, T. The effectiveness of intravenous ketamine and lidocaine on peripheral neuropathic pain. **Acta Anesthesiologica Scandinavica**, v.47, p.868-877. 2003.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, n.53, p.597-652. 2001.

LEVINE, J.; TAIWO, Y. Inflammatory pain. In: WALL, P. D.; MELZACK, R.; BONICA, J. J. **Textbook of pain**. 3^aed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994. p.45-56.

LIU, H.; MANTYH, P. W.; BASBAUM, A. I. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. **Nature**, v.386, p.721-724. 1997.

LUFT, A.; MENDES, F. F. S(+) cetamina em baixas doses: atualização. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.55, n.4, p.460-469. Julho-Agosto 2005.

MARHOFER, P.; KRENN, C. G.; PLOCHL, W.; GLASER, C.; KOINIG, H.; FLEISCHMANN, E.; HÖCHTL, A.; SEMSROTH, M. S(+)-ketamine for caudal block in paediatric anaesthesia. **British Journal of Anaesthesia**, v.84, p.341-345. 2000.

MARIETTA, M. P.; WAY, W. L.; CASTAGNOLI, N.; TREVOR, A. On the pharmacology of the ketamine enantiomorphs in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.202, p.157-165. 1977.

MASSONE, F. Anestésicos injetáveis. In: FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2002. p.159-164.

_____. **Anestesiologia veterinária: farmacologia e técnicas**. 4^a.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 326 p.

MAX, M. B.; BYAS-SMITH, M. G.; GRACELY, R. H.; BENNETT, G. J. Intravenous infusion of the NMDA antagonist, ketamine, in chronic posttraumatic pain with allodynia: a double-blind comparison to alfentanil and placebo. **Clinical Neuropharmacology**, v.18, p.360-368. 1995.

MAZZEI, S.; VALADÃO, C. A.; OLESKOVICZ, N. **Comparação da injeção de cetamina ou morfina epidural na hiperalgesia pós-incisional em cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758)**. 2000. 48 f. (Trabalho de Iniciação Científica em Cirurgia Veterinária) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2000.

MELZACK, R. Pain - an overview. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v.43, n.9, p.880-884. October 1999.

_____. Pain and the neuromatrix in the brain. **Journal of Dental Education**, v.65, n.12, p.1378-1382. 2001.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v.150, n.699, p.971-979. November 19 1965.

MESTRE, C.; PÉLISSIE, T.; FIALIP, J.; WILCOX, G.; ESCHALIER, A. A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v.32, p.197-200. 1994.

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

MNT MEDICAL NEWS TODAY. *Correlation between prostaglandin E2 and pain Intensity*. Disponível em: <<http://www.medicalnewstoday.com/articles/29570.php>>. Acesso em: 05/05/2008.

MOTT, D. D.; DOHERTY, J. J.; ZHANG, S.; WASHBURN, M. S.; FENDLEY, M. J.; LYUBOSLAVSKY, P.; TRAYNELIS, S. F.; DINGLELINE, R. Like phenylethanolamines, protons produce a noncompetitive, voltage-independent inhibition of NR1-1a/NR2B receptors. **Nature Neuroscience**, v.1, p.659-667. 1998.

MUIR III, W. W.; HUBBELL, J. A. E.; SKARDA, R. T.; BEDNARSKI, R. M. Dor. In: _____. **Manual de anestesia veterinária**. 3ªed. Porto Alegre: Artmed, 2001a. p.243-250.

_____. Normas éticas para pesquisas que envolvem seres humanos e animais. In: _____. **Manual de anestesia veterinária**. 3ªed. Porto Alegre: Artmed, 2001b. p.411-412.

MUIR, K. W.; LEES, K. R. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v.26, p.503-513. 1995.

NAKAZATO, E.; KATO, A.; WATANABE, S. Brain but not spinal NR2B receptor is responsible for the anti-allodynic effect of an NR2B subunit-selective antagonist CP-101,606 in a rat chronic constriction injury model. **Pharmacology**, n.73, p.8-14. 2005.

NIKAM, S. S.; MELTZER, L. T. NR2B selective NMDA receptor antagonists. **Current Pharmaceutical Design**, v.8, n.10, p.845-855. 2002.

OATWAY, M.; REID, A.; SAWYNOK, J. Peripheral antihyperalgesic and analgesic actions of ketamine and amitriptyline in a model of mild thermal injury in the rat. **Anesthesia & Analgesia**, v.97, p.168-173. 2003.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GARCIA, J. B. S. Cetamina e analgesia preemptiva. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.54, n.5, p.739-752. 2004.

OLIVEIRA, G. L. **Mecanismos envolvidos na antinocicepção causada pela agmatina em camundongos**. 2005. 98 f. (Dissertação em Centro de Educação de Ciências da Saúde) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

OLIVEIRA, R. M. **Influência do controle da dor por bloqueio espinal na incidência de complicações cardiovasculares no pós-operatório de pacientes submetidos a cirurgias de grande porte em abdome superior e tórax, sob anestesia geral**. 2005. 106 f. (Dissertação em Setor de Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

ORSER, B. A.; PENNEFATHER, P. S.; MACDONALD, J. F. Multiple mechanisms of ketamine blockade of N-methyl-D-aspartate receptors. **Anesthesiology**, v.86, p.903-917. 1997.

PADDLEFORD, R. R. Analgesia and pain management. In: _____. **Manual of small animal anesthesia**. 2^aed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1998. p.227-246.

PALL, M. L. NMDA sensitization and stimulation by peroxynitrite, nitric oxide, and organic solvents as the mechanism of chemical sensitivity in multiple chemical sensitivity. **Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.16, p.1408-1417. September 2002.

PAOLETTI, P.; NEYTON, J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v.7, p.39–47. 2007.

PARADA, C. A.; VIVANCOS, G. G.; TAMBELI, C. H.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. **Pharmacology**, v.100, n.5, p.2923-2928. March 4 2003.

PASCOE, P. J. Patient aftercare. In: SLATTER, D. **Textbook of small animal surgery**. 2^aed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1993. v.1. p.230-240.

PETRENKO, A. B.; YAMAKURA, T.; BABA, H.; SHIMOJI, K. The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review. **Anesthesia & Analgesia**, v.97, p.1108-1116. 2003.

PLESAN, A.; HOFFMANN, O.; XU, X.; WIESENFELD-HALLIN, Z. Genetic differences in the antinociceptive effect of morphine and its potentiation by dextromethorphan in rats. **Neuroscience Letters**, v.263, p.53-56. 1999.

RABBEN, T.; SKJELBRED, P.; ØYE, I. Prolonged analgesic effect of ketamine, an N-methyl-D aspartate receptor inhibitor, in patients with chronic pain. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.289, n.2, p.1060-1066. 1999.

RAJA, S. N.; MEYER, R. A.; CAMPBELL, J. N. Peripheral mechanisms of somatic pain. **Anesthesiology**, v.68, p.571-590. 1988.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. Aminoácidos transmissores. In: _____. **Farmacologia**. 5^aed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004a. p.520-540.

_____. Fármacos analgésicos. In: _____. **Farmacologia**. 5^aed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004b. p.640-655.

_____. Hormônios locais, inflamação e alergia. In: _____. **Farmacologia**. 5^aed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004c. p.246-276.

REDWINE, K. E.; TRUJILLO, K. A. Effects of NMDA receptor antagonists on acute μ -opioid analgesia in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.76, p.361-372. 2003.

REN, K.; IADAROLA, M. J.; DUBNER, R. An isobolographic analysis of the effects of N-methyl-D-aspartate and NK1 tachykinin receptor antagonists on inflammatory hyperalgesia in the rat. **British Journal of Pharmacology**, n.117, p.196-202. 1996.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain and antinociception: current concepts. **Zeitschrift für Rheumatologie**, v.60, n.6, p.404-415. December 2001.

SAKURADA, T.; WAKO, K.; SUGIYAMA, A.; SAKURADA, C.; NO, K. T.; KISARA, K. Involvement of spinal NMDA receptors in capsaicin-induced nociception. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.59, n.2, p.339-345. 1998.

SANDKÜHLER, J.; LIU, X. Induction of long-term potentiation at spinal synapses by noxious stimulation or nerve injury. **European Journal of Neuroscience**, v.10, n.7, p.2476-2480. July 1998.

SANG, C. N. NMDA-receptor antagonists in neuropathic pain: experimental methods to clinical trials. **Journal of Pain and Symptom Management**, v.19, n.1(Suppl.). January 2000.

SCHAIBLE, H.; SCHMIDT, R. F. Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandin E₂. **Journal of Physiology**, v.403, p.91-104. 1988.

SEIM III, H. B. Fundamentos da neurocirurgia. In: FOSSUM, T. W.; HEDLUND, C. S.; HULSE, D. A.; JOHNSON, A. L.; SEIM III, H. B.; WILLARD, M. D.; CARROLL, G. L. **Cirurgia de pequenos animais**. 1^aed. São Paulo: Roca, 2002. p.1139-1158.

SERPELL, M. Pharmacological treatment of chronic pain. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v.6, n.2, p.32-42. 2005.

SHEN, G. S.; LAYER, R. T.; MCCABE, R. T. Conopeptides: from deadly venoms to novel therapeutics. **Drug Discovery Today**, v.5, p.98-106. 2000.

SHORT, C. E. Fundamentals of pain perception in animals. **Applied Animal Behaviour Science**, v.59, p.125-133. 1998.

SILVA, P. Receptores farmacológicos e seus sistemas efetores. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 6ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.103-122.

SINATRA, R. S. Pathophysiology of acute pain. In: SINATRA, R.; HORD, A.; GINSBERG, B. **Acute pain: mechanism & management**. London: Mosby International, 1992. p.44-55.

SKARDA, R. T. Local and regional anesthetic and analgesic techniques. In: THURMON, J. C.; TRANQUILLI, W. J.; BENSON, G. J. **Essentials of small animal anesthesia & analgesia**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p.203-224.

SMITH, D. J.; HOWIE, M. B. Anestesia geral: drogas intravenosas e inalantes. In: CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E. **Farmacologia moderna com aplicações clínicas**. 6ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.272-279.

SONG, B.; MARVIZÓN, J. C. G. N-methyl-D-aspartato receptors and large conductance calcium-sensitive potassium channels inhibit the release of opioid peptides that induce μ -opioid receptor internalization in the rat spinal cord. **Neuroscience**, v.2, n.136, p.549-562. 2005.

SOUTH, S. M.; KOHNO, T.; KASPAR, B. K.; HEGARTY, D.; VISSEL, B.; DRAKE, C. T.; OHATA, M.; JENAB, S.; SAILER, A. W.; MALKMUS, S.; MASUYAMA, T.; HORNER, P.; BOGULAVSKY, J.; GAGE, F. H.; YAKSH, T. L.; WOOLF, C. J.; HEINEMANN, S. F.; INTURRISI, C. E. A conditional deletion of the NR1 subunit of the NMDA receptor in adult spinal cord dorsal horn reduces NMDA currents and injury-induced pain. **Journal of Neuroscience**, v.23, n.12, p.5031-5040. June 15 2003.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L. Tranqüilizantes, relaxantes musculares de ação central e antidepressivos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.146-157.

STEFFEY, E. P. Introdução às drogas que agem no sistema nervoso central e princípios de anestesiologia. In: ADAMS, H. R. **Farmacologia e terapêutica em veterinária**. 8ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p.127-143.

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

TAIWO, Y. O.; BJERKNES, L. K.; GOETZL, E. J.; LEVINE, J. D. Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. **Neuroscience**, v.32, n.3, p.577-580. 1989.

TAKAHASHI, H.; MIYAZAKI, M.; NANBU, T.; YANAGIDA, H.; MORITA, S. The NMDA-receptor antagonist ketamine abolishes neuropathic pain after epidural administration in a clinical case. **Pain**, v.75, p.391-394. 1998.

THURMON, J. C.; TRANQUILLI, W. J.; BENSON, G. J. Perioperative pain and its management. In: _____. **Essentials of small animal anesthesia & analgesia**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999. p.28-60.

TUOTO, E. A. *Maurício Rocha e Silva*. Disponível em: <http://medbiography.blogspot.com/2008/02/mauricio-rocha-e-silva-incl-foto-photo.html>. Acesso em: 19/02/2009.

TURK, D. C. Everyone has won and all must have prizes. **Clinical Journal of Pain**, v.16, p.93-94. 2000.

TYERS, M. B.; HAYWOOD, H. Effects of prostaglandins on peripheral nociceptors in acute inflammation. **Agents and Actions-Supplements**, v.6, p.65-78. 1979.

URBAN, L.; THOMPSON, S. W.; DRAY, A. Modulation of spinal excitability:co-operation between neurokinin and excitatory amino acid neurotransmitters. **Trends in Neurosciences**, v.17, n.10, p.432-438. 1994.

VALADÃO, C. A. A. Anestésicos dissociativos. In: FANTONI, D. T.; CARTOPASSI, S. R. G. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2002. p.165-173.

VIVANCOS, G. G.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H. Opposite nociceptive effects of the arginine/NO/cGMP pathway stimulation in dermal and subcutaneous tissues. **British Journal of Pharmacology**, v.138, p.1351-1357. 2003.

VIVANCOS, G. G.; VERRI JR, W. A.; CUNHA, T. M.; SCHIVO, I. R. S.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p. 1-9. 2004.

WEI, F.; WANG, G.; KERCHNER, G. A.; KIM, S. J.; XU, H.; CHEN, Z. Genetic enhancement of inflammatory pain by forebrain NR2B over expression. **Nature Neuroscience**, v.4, p.164-169. 2001.

WILLIAMS, K. Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. **Molecular Pharmacology**, v.44, p.851-859. 1993.

WILLIS, W. D.; CHUNG, J. M. Central mechanisms of pain. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.191, n.10, p.1200-1202. November 15 1987.

WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors: noxious stimulus detectors. **Neuron**, n.55, p.353-364. August 2, 2007.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v.288, p.1765-1769. 2000.

XU, F.; YANG, J. Antiinflammatory pain effect of ifenprodil administrated subarachnoidly. **Jiangsu Medical Journal**, v.32, n.6, p.564-566. 2006.

XU, L.; MABUCHI, T.; KATANO, T.; MATSUMARA, S.; OKUDA-ASHITAKA, E.; SAKIMURA, K.; MISCHINA, M.; ITO, S. Nitric oxide (NO) serves as a retrograde messenger to activate neuronal NO synthase in the spinal cord via NMDA receptors. **Nitric Oxide**, v.17, p.18-24. 2007.

XU, M.; KIM, C. J.; NEUBERT, M. J.; HEINRICHER, M. M. NMDA receptor-mediated activation of medullary pro-nociceptive neurons is required for secondary thermal hyperalgesia. **Pain**, v.127, p.253-262. 2007.

ZHAO, M. G.; TOYODA, H.; LEE, Y. S.; WU, L. J.; KO, S. W.; ZHANG, X. H.; JIA, Y.; SHUM, F.; XU, H.; LI, B. M.; KAANG, B. K.; ZHUO, M. Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. **Neuron**, v.47, p.859-872. September 15, 2005.

ZHUO, M. Central plasticity in pathological pain. **Novartis Foundation Symposium**, n.261, p.132-145. 2004.

_____. Neuronal mechanism for neuropathic pain. **Molecular Pain**, v.3, n.14, p.1-9. 6 June 2007.

APÊNDICES

Anexo 1. Tabela de conversão do número do filamento de von Frey para o valor da força expressa em gramas

Número do filamento	Força (g)
1,65	0,005
2,36	0,023
2,44	0,028
2,83	0,068
3,22	0,166
3,61	0,407
3,84	0,692
4,08	1,202
4,17	1,479
4,31	2,041
4,56	3,630
4,74	5,495
4,93	8,511
5,07	11,749
5,18	15,136
5,46	28,84
5,88	75,858
6,10	125,892
6,45	281,838
6,65	446,683

Anexo 2. Valores das frequências cardíacas aferidas em cães tratados com CET+SAL ou IFE+CET entre 1 h e 24 h após o estímulo cirúrgico.

FREQUÊNCIAS CARDÍACAS (Bpm)										
Cães	Basal	60 min	90 min	120 min	180 min	240 min	480 min	720 min	1440 min	
CET+SAL	1	84	92	88	80	96	80	80	104	72
	2	80	80	80	68	80	76	80	88	79
	3	101	112	96	104	76	102	92	88	92
	4	120	112	88	92	84	92	88	114	111
	5	104	92	80	96	108	93	90	100	110
	6	104	116	104	104	116	108	88	112	84
	7	116	96	92	90	114	106	116	88	116
	8	96	93	128	116	125	120	112	124	116
IFE+CET	1	72	100	96	76	102	99	100	84	92
	2	68	88	72	76	87	84	84	92	104
	3	110	102	88	80	120	105	120	100	104
	4	96	116	90	108	123	120	120	100	128
	5	80	100	98	78	100	104	92	80	108
	6	100	126	104	100	104	64	80	80	96
	7	118	92	92	88	114	96	104	84	112
	8	132	114	128	88	104	96	96	88	120

Bpm= batimentos cardíacos por minuto

Anexo 3. Valores das frequências respiratórias aferidas em cães tratados com CET+SAL ou IFE+CET entre 1 h e 24 h após o estímulo cirúrgico.

		FREQUÊNCIAS RESPIRATÓRIAS (movimentos/min)								
Cães		Basal	60 min	90 min	120 min	180 min	240 min	480 min	720 min	1440 min
CET+SAL	1	16	20	20	22	22	23	25	19	28
	2	18	17	24	20	20	24	22	30	25
	3	16	18	19	28	14	11	12	16	20
	4	24	12	32	26	32	18	14	21	15
	5	24	24	22	20	24	16	16	18	21
	6	23	20	24	30	20	18	16	18	21
	7	27	30	26	30	32	22	30	20	21
	8	24	34	18	19	20	21	28	24	18
IFE+CET	1	24	16	27	18	34	24	26	26	16
	2	30	16	20	16	15	20	22	14	32
	3	18	12	18	18	21	24	24	22	21
	4	28	26	24	24	40	28	18	21	30
	5	16	22	26	17	20	14	11	20	25
	6	38	24	21	30	28	28	22	18	14
	7	36	19	27	24	26	28	22	25	26
	8	23	18	28	14	22	24	28	24	26

Anexo 5. Variação (Δ) nas áreas de apoio (cm^2) detectadas pelo teste com planímetro entre 1 h e 24 h após a incitação cirúrgica em cães pré-tratados com CET+SAL ou IFE+CET.

		Δ DAS ÁREAS DE APOIO (cm²)							
Cães		60 min	90 min	120 min	180 min	240 min	480 min	720 min	1440 min
CET+SAL	1	1,2	0,6	1,45	1,9	1,5	1,8	1,0	1,4
	2	0,8	0,0	Pp	0,9	Pp	0,6	0,0	0,0
	3	Pp	Pp	Pp	Pp	Pp	Pp	Pp	Pp
	4	2,1	1,1	2,2	2,2	2,4	2,1	2,3	2,2
	5	2,3	2,0	Pp	1,0	3,2	3,9	3,2	3,1
	6	0,6	1,7	1,0	2,2	1,1	2,2	1,0	4,2
	7	2,3	1,2	2,1	1,4	0,2	1,5	1,8	0,4
	8	3,1	3,7	4,4	3,5	3,2	3,9	4,0	4,5
IFE+CET	1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
	2	0,0	0,5	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	0,0
	3	1,4	0,9	0,0	1,3	1,1	1,5	Pp	Pp
	4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	6	0,00	0,7	0,0	0,4	0,2	0,3	0,4	0,8
	7	1,2	0,9	1,1	1,1	0,6	1,1	0,0	1,6
	8	1,0	0,5	1,6	0,3	1,6	Pp	1,7	0,6

Pp= parcela perdida