



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FARMACOLOGIA  
E TERAPÊUTICA

Cristina Balensiefer Vicenzi

**AVALIAÇÃO DA CONFIABILIDADE DE UM MODELO DE DOR OROFACIAL  
INFLAMATÓRIA CRÔNICA INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO INTRA-  
ARTICULAR DE ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND (CFA) EM RATOS  
WISTAR**

Porto Alegre  
Agosto de 2022

CRISTINA BALENSIEFER VICENZI

**AVALIAÇÃO DA CONFIABILIDADE DE UM MODELO DE DOR OROFACIAL  
INFLAMATÓRIA CRÔNICA INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO INTRA-  
ARTICULAR DE ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND (CFA) EM RATOS  
WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia e Terapêutica.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Iraci LS Torres

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Xavier

Porto Alegre  
Agosto de 2022

## CIP - Catalogação na Publicação

Balensiefer Vicenzi, Cristina

AVALIAÇÃO DA CONFIABILIDADE DE UM MODELO DE DOR OROFACIAL INFLAMATÓRIA CRÔNICA INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO INTRA-ARTICULAR DE ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND (CFA) EM RATOS WISTAR / Cristina Balensiefer Vicenzi. -- 2022.

62 f.

Orientador: Iraci Lucena da Silva Torres.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Inflamação Aguda. 2. Adjuvante Completo de Freund. 3. Dor orofacial. I. Lucena da Silva Torres, Iraci, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Cristina Balensiefer Vicenzi

**AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE DE UM MODELO DE DOR  
OROFACIAL INFLAMATÓRIA CRÔNICA INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO  
INTRA-ARTICULAR DE ADJUVANTE COMPLETO DE FREUND (CFA) EM  
RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em  
Farmacologia e Terapêutica.

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Francisco Montagner - PPGODO/UFRGS

Dr. Bettega Costa Lopes. Universidade de Pittsburgh (EUA)

Profª Drª. Mirna Leal Bainy - PPGFT/UFRGS

Membro Suplente

Profª Drª. Liciane Medeiros - PPGFT/UFRGS

*Tudo tem o seu tempo  
determinado, e há um tempo para  
todo propósito debaixo do céu.*

*Eclesiastes 3:1*

*Dedico este trabalho aos meus pais, Alceu e Teonísia, pelo exemplo diário de dedicação e amor a mim ao longo de suas vidas.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, principal responsável pelo milagre da minha vida e pela realização deste e de todos os demais trabalhos que chegaram ao final em minha vida e pelos que ainda estão por vir.

A toda a minha família, que me apoiou e incentivou para que chegasse ao final com êxito, em especial aos meus pais, Alceu e Teonísia, por me guiarem pela vida até aqui. Por abdicarem dos seus sonhos pelos meus e me mostrarem sempre o caminho do amor e da retidão.

Ao meu namorado Matheus, meu muito obrigada mais sincero. Obrigada por ser meu companheiro, pelo amor incondicional, pelo companheirismo e carinho em todos os momentos e por estar do meu lado sempre.

À minha amiga que a vida me deu, Simone e seu esposo Eliandro, que gentilmente me receberam e hospedaram em sua casa. Nunca terei como retribuir tamanho carinho e empatia.

À minha orientadora Profa. Iraci Lucena da Silva Torres, por toda a dedicação comigo e com o meu trabalho e pelos preciosos ensinamentos.

Aos meus colegas de grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: investigações pré-clínicas, agradeço pelo empenho na condução dos protocolos experimentais, pela amizade e companheirismo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica pela oportunidade de realizar mestrado em uma instituição de qualidade, em um Programa de Pós-Graduação conceituado e reconhecido.

À Unidade de Experimentação Animal e todos os seus funcionários – Daniela, Inácio, Marta, Rosa, Sonia e Tuane – pela dedicação com os projetos de pesquisa e com os pesquisadores.

À agência de fomento FIPE-HCPA, pelo apoio financeiro viabilizando pesquisas de qualidade na ciência brasileira.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>11</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>12</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....	<b>14</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>15</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>17</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2. CONTEXTUALIZAÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>2.1. Dor</b> .....	<b>21</b>
<b>2.2. Dor inflamatória e dor orofacial</b> .....	<b>24</b>
<b>2.3. Modelos animais de dor orofacial</b> .....	<b>25</b>
<b>2.4. Tolerância e hiperalgesia induzidas pela morfina</b> .....	<b>26</b>
<b>2.5. Uso de melatonina na tolerância e hiperalgesia induzidas pela morfina</b> .....	<b>27</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>30</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
<b>4.1. OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>30</b>
<b>4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>31</b>
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
<b>5.1. Animais</b> .....	<b>32</b>
<b>5.2. Local da Pesquisa</b> .....	<b>32</b>
<b>5.3. Delineamento Experimental</b> .....	<b>32</b>
<b>5.4. Randomização dos animais</b> .....	<b>34</b>
<b>5.5. Modelo de dor crônica inflamatória orofacial</b> .....	<b>34</b>
<b>5.6. Tratamentos farmacológicos</b> .....	<b>36</b>



<b>5.7. Testes Comportamentais.....</b>	<b>37</b>
5.7.1. Limiar nociceptivo mecânico (von Frey facial eletrônico) .....	37
5.7.2. Limiar nociceptivo térmico (acetona).....	37
5.7.3. Teste do campo aberto (Open Field) .....	37
5.7.4. Teste do labirinto em cruz elevado (Elevated Plus Maze) .....	38
<b>5.8. Morte dos animais .....</b>	<b>39</b>
<b>5.9. Análise estatística.....</b>	<b>39</b>
<b>6. RESULTADOS - ARTIGO .....</b>	<b>40</b>
<b>7. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE MELATONINA SOBRE A HIPERALGESIA E TOLERÂNCIA INDUZIDAS PELA MORFINA.....</b>	<b>70</b>
<b>7.1. Resultados Parciais.....</b>	<b>70</b>
7.1.1. Efetividade do modelo de dor.....	70
7.1.2. Efeito do tratamento agudo .....	70
7.1.3. Efeito do tratamento crônico .....	71
7.1.4. Efeito de longo prazo do tratamento .....	71
7.1.5. Teste da Acetona .....	74
7.1.6. Campo Aberto .....	74
7.1.7. Labirinto em Cruz Elevado .....	74
<b>8. DISCUSSÃO PRELIMINAR DOS DADOS PARCIAIS .....</b>	<b>77</b>
<b>9. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXOS/APÊNDICES .....</b>	<b>92</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros comportamentais dos testes da Acetona, Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado.....	75
--	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Linha do tempo do desenho experimental.....	34
Figura 2: Identificação do sítio de injeção na articulação temporomandibular.....	36
Figura 3: Dados do teste de von Frey.....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - análise de variância

ATM - articulação temporomandibular

BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro

cAMP - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

CFA - Adjuvante Completo de Freund

cGMP - monofosfato cíclico de guanosina

C $\gamma$ / PKC $\gamma$  - proteína quinase

DMeMo - Grupo Dor + Melatonina + Morfina

DMeS - Grupo Dor + Melatonina + Solução Salina

DN - dor neuropática

DTM - disfunções temporomandibulares

DVMo - Grupo Dor + Veículo + Morfina

DVS - Grupo Dor + Veículo + Solução Salina

EBA - entrada nos braços abertos

EBF - entrada nos braços fechados

EPM - erro padrão da média

GEE - equações generalizadas estimadas

GT - gânglio trigeminal

HSPs - proteína de choque térmico de estresse

HSP27 - proteína de choque térmico 27

IL-1 $\beta$  – interleucina 1 $\beta$

IL-10 – interleucina 10

NMDA - N-metil D-Aspartato

NO - óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintase

NT - neuralgia do trigêmeo

PHD - *protected head dipping*

SMeMo - Grupo Sham + Veículo + Morfina

SMeS - Grupo Sham + Melatonina + Solução Salina

SNC - sistema nervoso central

SVMo - Grupo Sham + Melatonina + Morfina

SVS - Grupo Sham + Veículo + Solução Salina

TBA - tempo gasto nos braços abertos

TBF - tempo gasto nos braços fechados

V1 - ramo oftálmico

V2 - ramo maxilar

V3 - ramo mandibular

## LISTA DE SÍMBOLOS

% – porcentagem

$\geq$  – maior ou igual a

$<$  – menor

$\beta$  – beta

$\gamma$  – gama

$\mu$  - micro

g - grama

kg - quilograma

L - litro

mg – miligramas

mL – mililitros

mm – milímetros

## RESUMO

**Introdução:** O modelo de artrite em ratos induzido pela administração de Adjuvante Completo de Freund (CFA) é bem caracterizado na literatura e é rotineiramente empregado para busca de novos fármacos para o tratamento da dor inflamatória, incluindo a osteoartrite. A administração de CFA na articulação temporomandibular (ATM) tem sido utilizada como um modelo de dor orofacial inflamatória crônica. A lesão do tecido periférico decorrente da indução do modelo geralmente produz aumento da sensibilidade térmica, bem como da sensibilidade mecânica.

**Objetivo:** Dessa forma, considerando a importância do uso de modelos confiáveis para investigação de novas opções de tratamento em estudos pré-clínicos, este estudo teve como objetivo avaliar o curso temporal do desenvolvimento da dor orofacial inflamatória crônica em ratos, induzida por injeção unilateral de CFA na ATM, procurando determinar parâmetros objetivos que justifiquem seu uso. Como objetivo secundário foram investigados os efeitos da administração de melatonina sobre a hiperalgesia induzida pela morfina em ratos. **Materiais e**

**Métodos:** *No experimento 1*, 22 ratos Wistar adultos foram divididos em dois grupos: sham (solução salina) e dor (injeção intra-articular de 50 µl de CFA na ATM direita). A sensibilidade mecânica da região da ATM foi verificada usando um analgesímetro eletrônico von Frey no baseline e nos dias 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 e 25 após a indução do modelo. Além disso, os testes de acetona e *Operant Orofacial Pain Assessment Device* (OPAD) foram realizados para avaliar a sensibilidade térmica. Os comportamentos locomotor e exploratório, e do tipo-ansioso foram avaliados pelos testes do Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado, respectivamente. Os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-10 e BDNF foram mensurados pela técnica de ELISA no gânglio trigeminal. A avaliação qualitativa do grau de inflamação na área retrodiscal foi feita por meio de histologia e microscopia óptica. A pontuação foi baseada em um sistema pelo qual a porcentagem de células mononucleares infiltrantes foi classificada como ausente, leve, moderada e grave. *No experimento 2*, 70 ratos Wistar machos adultos foram divididos em oito grupos: Sham+Veículo+Salina (SVS); Sham+Veículo+Morfina (SVMo); Sham+Melatonina+Salina (SMoS); Sham+Melatonina+Morfina (SMoMo); Dor+Veículo+Salina (DVS); Dor+Veículo+Morfina (DVMo); Dor+Melatonina+Salina (DMoS); Dor+Melatonina+Morfina (DMoMo). Os animais foram tratados por oito dias consecutivos com morfina (5 mg/Kg s.c.) e/ou melatonina (50 mg/Kg i.p.), ou seus respectivos veículos. A hiperalgesia mecânica da região da ATM foi verificada pelo von Frey eletrônico no baseline e nos dias 13, 14, 18, 21 e 22 após a indução do modelo. Além disso, foram realizados os testes de acetona, OPAD Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado. Os dados

foram avaliados utilizando teste “t” e “U” de Mann-Whitney para dados não paramétricos e expressos como média ± erro padrão da média (EPM) ou mediana e intervalo interquartil, considerando significativos  $P < 0,05$ . O SPSS 20.0 para macOS foi usado para análise estatística. Este projeto foi avaliado e aprovado pela CEUA-HCPA (#20200689). **Resultados:** *Experimento 1:* foi observado o estabelecimento do modelo de dor nos seguintes parâmetros: 1. diminuição da latência de retirada da face no teste de von Frey entre os dias sete e 23 após a injeção de CFA; 2. diminuição do número de lambidas no teste OPAD; 3. redução do índice de ansiedade no Labirinto em Cruz Elevado; 4. aumento do número de *rearings* no Open Field; 5. redução dos níveis de BDNF no gânglio trigeminal; 6. aumento do espessamento do disco articular e maior escore de inflamação na ATM. *Experimento 2:* houve replicação do modelo de dor do experimento 1, indexado pela redução do limiar nociceptivo no teste de von Frey. Observou-se efeito do modelo, da morfina e da melatonina no teste do Labirinto em Cruz Elevado, enquanto que nos parâmetros do teste do Campo Aberto e teste da acetona, não houve efeito. Apesar do reduzido número de animais, foi possível observar o efeito antinociceptivo da morfina que foi incrementado pela administração conjunta da melatonina. Nos períodos e doses avaliadas não foi possível determinar a hiperalgesia e tolerância induzidas pela morfina. Por outro lado, os resultados demonstram que a melatonina não apresentou efeito analgésico agudo na dose utilizada, necessitando de administração repetida para induzir analgesia neste modelo de dor. Além disso, a melatonina induziu uma potencialização em relação a analgesia da morfina, demonstrando um excelente efeito sinérgico. Estes efeitos da melatonina se mantêm por pelo menos 24h após o final do tratamento. Outra observação importante é que a ação dos fármacos é estado específico, uma vez que os resultados distintos em animais com e sem dor. **Conclusão:** Esta dissertação demonstra que a administração intra-articular de CFA na ATM em ratos pode ser utilizada para avaliar alterações agudas e crônicas que mimetizam a artrite inflamatória da ATM. No entanto, os estudos crônicos são limitados a 25 dias após a injeção de CFA, pois a partir desse período a dor não está mais presente. No segundo experimento, os resultados preliminares permitem concluir que a melatonina é capaz de potencializar a analgesia induzida pela morfina, que permanece por pelo menos 24 horas após o final do tratamento, assim como a analgesia induzida pela melatonina *per se*, que necessita de doses repetidas para induzir efeito analgésico. Mais estudos estão em andamento para melhor entender os efeitos observados.

Palavras-Chave: Dor inflamatória orofacial; Adjuvante Completo de Freund; Nocicepção; Morfina; Melatonina; Ratos Wistar.



## ABSTRACT

**Introduction:** The arthritis model in rats induced by the administration of Complete Freund's Adjuvant (CFA) is well characterized in the literature, being routinely used to screen for new drugs for the treatment of inflammatory pain, including osteoarthritis. The administration of CFA into the temporomandibular joint (TMJ) has been used as a model of chronic inflammatory orofacial pain. Peripheral tissue injury resulting from the model usually produces increased thermal as well as mechanical sensitivity. **Aim:** Thus, considering the importance of using reliable models to investigate new treatment options in preclinical studies, this study aimed to evaluate the temporal course of the development of chronic inflammatory orofacial pain in rats, induced by unilateral injection of CFA into the TMJ, seeking to determine objective parameters that justify its use. As a secondary objective, the effects of melatonin administration on morphine-induced hyperalgesia in rats were investigated. **Materials and methods:** *In experiment 1*, 22 adult male Wistar rats were divided into two groups: sham (saline solution) and pain (intra-articular injection of 50 µl of CFA into the right TMJ). Mechanical sensitivity of the TMJ region was verified using an electronic von Frey analgesimeter at baseline and on days 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, and 25 after model induction. In addition, the Acetone and the Operant Orofacial Pain Assessment Device (OPAD) tests were performed to assess thermal sensitivity. The locomotor and exploratory, and anxiety-like behaviors were evaluated by the Open Field and Elevated Plus Maze tests, respectively. The levels of IL-1 $\beta$ , IL-10 and BDNF were measured by ELISA in the trigeminal ganglion. Qualitative assessment of the degree of inflammation in the retrodiscal area was performed using histology and light microscopy. Scoring was based on a system whereby the percentage of infiltrating mononuclear cells was classified as absent, mild, moderate, and severe. *In experiment 2*, 70 adult male Wistar rats were divided into eight groups: Sham+Vehicle+Saline (SVS); Sham+Vehicle+Morphine (SVMo); Sham+Melatonin+Saline (SMoS); Sham+Melatonin+Morphine (SMEMo); Pain+Vehicle+Saline (DVS); Pain+Vehicle+Morphine (DVMo); Pain+Melatonin+Saline (DMoS); Pain+Melatonin+Morphine (DMEMo). The animals were treated during eight consecutive days with morphine (5 mg/kg s.c.) and/or melatonin (50 mg/kg i.p.), or their respective vehicles. The mechanical sensitivity of the TMJ region was verified using an electronic von Frey analgesimeter at baseline and on days 13, 14, 18, 21 and 22 after model induction. In addition, the acetone and the OPAD tests were performed to assess thermal sensitivity. The locomotor and exploratory, and anxiety-like behaviors were evaluated by the Open Field and Elevated

Plus Maze tests, respectively. Ethical approval was obtained from CEUA-HCPA (#20200689).

**Results:** *Experiment 1:* the establishment of the pain model was observed in the following parameters: 1. decrease in face withdrawal latency in the von Frey test between days seven and 23 after CFA injection; 2. decrease in the number of licks in the OPAD test; 3. reduction of the anxiety index in the Elevated Plus Maze; 4. increase in the number of rearings in the Open Field; 5. reduction of BDNF levels in the trigeminal ganglion; 6. increased joint disc thickening and higher TMJ inflammation score. *Experiment 2:* the pain model from experiment 1 was replicated, indexed by the reduction of the nociceptive threshold in the von Frey test. There was an effect of the model, morphine and melatonin in the Elevated Plus Maze test, while no effects were observed in the parameters of the Open Field and the Acetone tests. Despite the small number of animals, it was possible to observe the antinociceptive effect of morphine that was increased by the combined administration of melatonin. The hyperalgesia and tolerance induced by morphine could not be observed at the current time and dose. On the other hand, the results demonstrate that melatonin did not present an acute analgesic effect at the dose employed, requiring repeated administration to induce analgesia in this model. In addition, melatonin induced a potentiation of the morphine analgesia, demonstrating an excellent synergistic effect. These effects of melatonin are maintained for at least 24 hours after the end of treatment. Another important observation is the state-specific effect, since drug-induced effects have temporally different effects between the sham and pain groups. In conclusion, this dissertation demonstrates that intra-articular administration of CFA into the TMJ in rats can be used to assess acute and chronic changes that mimic TMJ inflammatory arthritis. However, chronic studies are limited to 25 days after CFA injection, since after this period, pain is no longer present. In the second experiment, the preliminary results enable us to conclude that melatonin is capable of potentiating the morphine-induced analgesia, which persists for at least 24 hours after the end of treatment, as well as melatonin-induced analgesia per se, which requires repeated doses to induce an analgesic effect. More studies are underway aiming to better understand the observed effects.

Keywords: Orofacial inflammatory pain; Complete Freund's Adjuvant; Nociception; Morphine; Melatonin; Wistar Rats.

## 1. INTRODUÇÃO

A dor orofacial crônica é um problema de saúde pública com prevalência que varia de 7 a 11% na população geral, chegando a 50% em idosos (MACFARLANE *et al.*, 2002). Devido à sua complexidade e lacunas atuais na compreensão de sua etiologia e mecanismos fisiopatológicos, as condições de dor crônica são difíceis de diagnosticar e tratar (SLADE *et al.*, 2020). Os sinais e sintomas clínicos da dor orofacial crônica podem ser bastante heterogêneos, levando à necessidade de um diagnóstico detalhado e tratamento individualizado (MACFARLANE *et al.*, 2002). Além disso, alodinia e hiperalgesia, características típicas da dor crônica, podem induzir ao estresse e estão relacionadas a comorbidades como ansiedade e sintomas depressivos (FILLINGIM *et al.*, 2020; GREENSPAN *et al.*, 2020). A dor crônica e suas características, juntamente com as comorbidades, tem um impacto muito significativo na qualidade de vida, prejudicando e limitando as atividades diárias, influenciadas muitas vezes por efeitos adversos relacionados às terapias utilizadas no manejo da dor crônica (MARTIN E FOROUZANFAR, 2011; SILVA *et al.*, 2021).

Entre as principais causas de dor orofacial crônica estão as dores de dente, dores de cabeça persistentes, e condições mais complexas, como neuralgia do trigêmeo (NT) e disfunção temporomandibular (DTM) (WONG E FARHAT, 2013), que são extremamente incapacitantes. Além disso, a maioria das dores crônicas orofaciais tem origem inflamatória. Após uma lesão ou o início de uma doença, um processo inflamatório agudo é essencial para proteção contra patógenos e lesões, promovendo remodelação e reparo tecidual. No entanto, quando a inflamação persiste, com duração de seis semanas ou mais, torna-se crônica, resultando em dor persistente e perda de função (LIPNIL-STANGELJ, 2013; MEACHAN *et al.*, 2017).

A avaliação da dor orofacial em humanos é complexa e existem lacunas de conhecimento nesta área. Nesse contexto, o emprego de modelos animais de dor orofacial possibilita investigar essas lacunas, possibilitando a busca tanto de um melhor entendimento da fisiopatologia dos transtornos de origem craniofacial (SIQUEIRA-LIMA *et al.*, 2017), quanto de novas terapêuticas farmacológicas e não farmacológicas. Modelos animais de dor orofacial podem ser induzidos por intervenções neuropáticas ou inflamatórias. Diversos modelos foram desenvolvidos para o estudo da dor crônica inflamatória, tanto para condições inflamatórias localizadas, quanto para as generalizadas. As respostas inflamatórias localizadas são comumente desenvolvidas pela injeção de uma substância irritante, como a formalina, o

Adjuvante Completo de Freund (Complete Freund Adjuvant - CFA) ou carregenina na pata (BURMA *et al.*, 2009). Cada uma dessas substâncias produz um curso de tempo diferentes para as respostas nociceptivas, que varia de minutos quando utiliza-se a formalina até semanas quando o CFA é injetado, possibilitando estudos a curto e longo prazo envolvendo os efeitos da inflamação local (MOGIL, 2009, MYUNG *et al.*, 2006).

Modelos animais são uma ferramenta útil para entender os mecanismos fisiopatológicos subjacentes aos transtornos da ATM e para avaliar a eficácia das injeções intra-articulares. Uma variedade de modelos animais tem sido usada para avaliar vários aspectos da administração de fármacos na ATM, incluindo efeitos adversos de formulações intra-articulares existentes e a eficácia de tratamentos emergentes. Modelos em roedores de dor orofacial comumente tem foco na doença da articulação temporomandibular degenerativa e dor na ATM. Modelos de inflamação da ATM em ratos foram desenvolvidos usando uma variedade de métodos que vão desde abertura repetida, manual e forçada da boca (método mecânico), procedimentos cirúrgicos, até injeção intra-articular de agentes químicos. Vários métodos analíticos, como análise não invasiva do padrão de refeições, monitoramento do comportamento entre outros foram publicados para avaliar os resultados de sintomas dolorosos (SPERRY *et al.*, 2019). No entanto, uma das principais dificuldades consiste em obter um modelo que facilite a indução de sintomas nociceptivos de forma suficientemente prolongada para avaliar o efeito analgésico de um sistema de liberação de fármacos em longo prazo.

Para indução de inflamação crônica, destaca-se o CFA por sua capacidade de produzir inflamação e resposta nociceptiva de longa duração. Estudos prévios com CFA e DTM demonstraram níveis elevados de CGRP, fator de crescimento neural (NGF), interleucina-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no sítio inflamado até seis semanas após administração de CFA em ratos (SPEARS *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2018). Na inflamação induzida pelo CFA há uma resposta inflamatória bifásica: inicial (inflamação aguda) e tardia (inflamação crônica, considerado a partir do 14º dia após a injeção do CFA), permitindo o estudo da fisiopatologia na condição crônica dolorosa (PHILIPPE *et al.*, 1997).

O modelo de indução de inflamação pela injeção local de CFA tem sido utilizado pela literatura e demonstrou ser válido para a avaliação do efeito analgésico e anti-inflamatório da melatonina (LASTE *et al.*, 2012; LASTE *et al.*, 2013). Além disso, tem sido demonstrado que a administração sistêmica ou intratecal de melatonina pode ter efeito analgésico dependente da dose além de neutralizar a hiperalgesia induzida pela morfina (WANG *et al.*, 2012). A maior

parte dos estudos que envolvem melatonina e controle da resposta nociceptiva direciona-se para a atuação da melatonina no gânglio da raiz dorsal e na medula espinhal, que estão relacionados à modulação da dor em regiões de tronco e membros. poucos estudos focam no papel da melatonina relacionada às dores orofaciais e às vias trigeminais envolvidas (HUANG *et al.*, 2013), destacando a necessidade de mais estudos avaliando o efeito da melatonina em diferentes quadros de dor orofacial e seus efeitos na hiperalgesia e tolerância induzidas pela morfina.

Dessa forma, considerando a importância do uso de modelos confiáveis para investigação de novas opções de tratamento em estudos pré-clínicos, esta dissertação teve como objetivo avaliar o curso temporal do desenvolvimento da dor orofacial inflamatória crônica em ratos induzida por injeção unilateral de 50 µg/50 µL de CFA na ATM, que vem sendo utilizado em estudos anteriores (SANTOS *et al.*, 2018; GARATTINI *et al.*, 2019; JIN *et al.*, 2019), procurando determinar parâmetros objetivos que justifiquem seu uso. De forma secundária, objetivou-se investigar os efeitos da administração de melatonina sobre a hiperalgesia induzida pela morfina em ratos.

## **2. CONTEXTUALIZAÇÃO**

### **2.1. Dor**

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for Study of Pain – IASP*) conceitua a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual real ou potencial”, com importantes dimensões afetivas e cognitivas (IASP, 2020). A dor está presente em muitos quadros clínicos e é considerada o “quinto sinal vital”. No entanto, seu manejo continua sendo um desafio, principalmente na dor crônica, necessitando de novas opções terapêuticas (CAMPBELL e MEYER, 2006).

Dor é classificada com base na duração dos quadros dolorosos, em dor aguda (menos de 6 semanas), subaguda (6 a 12 semanas) e crônica (12 semanas ou mais) (MERSKEY e BOGDUK, 2011). Considerando o grande potencial incapacitante e a alta prevalência na população em geral, o estudo dos mecanismos fisiopatológicos e de novas terapias farmacológicas e não farmacológicas dos quadros de dor aguda e crônica são particularmente importantes. Nos Estados Unidos, condições dolorosas crônicas inflamatórias, como osteoartrite e artrite reumatoide tem prevalência de 16% e 6%, respectivamente, e as taxas de

sucesso de tratamento atingem cerca de 30% (OLIVIERO *et al.*, 2018). A dor resulta da ativação do sistema nociceptivo e de influências genéticas e sensoriais intrincadas em uma rede complexa de sinalização (BERTA *et al.*, 2017; TOTSCH e SORGE, 2017). O processo nociceptivo é desencadeado por um estímulo nocivo ou injúria periférica que ativa fibras nervosas livres aferentes, denominadas nociceptores, encontrados em todo o organismo, exceto no sistema nervoso central (SNC) (BASBAUM e JESSEL, 2013). Os nociceptores são ativados por estímulos nocivos térmicos, mecânicos e químicos e transmitem o estímulo excitatório SNC por meio de potenciais elétricos (BASBAUM e JESSEL, 2013). Os corpos celulares dos nociceptores localizados na face estão encontrados no gânglio trigeminal e os demais, no gânglio dorsal da medula espinhal (BASBAUM e JESSEL, 2013).

A fisiopatologia da dor é um processo complexo que depende de vários mecanismos em nível periférico e central. Lesões periféricas englobam mudanças na excitabilidade na periferia, no gânglio da raiz dorsal, em neurônios da medula espinhal, nos sistemas descendentes inibitórios e alterações neuroplásticas corticais (BARON *et al.*, 2010). Processos periféricos incluem descargas ectópicas e espontâneas, alterações em canais iônicos, em neurônios aferentes primários, em neurônios simpáticos no gânglio da raiz dorsal e sensibilização dos nociceptores. Processos centrais são relacionados à sensibilização central com alterações em neurotransmissores, neuromoduladores, receptores e canais iônicos (SU *et al.*, 2014). Nesse contexto, o sistema imunológico tem um papel crítico no desenvolvimento e na manutenção da dor crônica: várias citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias têm funções no estabelecimento dessa condição (TOTSCH e SORGE, 2017). Assim, condições crônicas de dor são resultado de processos mal adaptativos nas vias nociceptivas, que perpetuam e modulam processos centrais de sensibilização (WU *et al.*, 2016).

Alterações periféricas e centrais que resultam em sensibilização central, nos quadros de dor crônica, levam a respostas exacerbadas a estímulos nocivos (hiperalgesia) e respostas a estímulos não nocivos (alodinia) (KUFFLER, 2020). O processo de sensibilização central é caracterizado por uma resposta nociceptiva exacerbada aos estímulos aferentes normais ou abaixo do limiar (KUNER, 2010), representada por alodinia e hiperalgesia. Pode ocorrer como resultado da sobrecarga de sensibilização periférica, mas em certas condições de dor crônica, a sensibilização central pode ser independente da aferência periférica (MEACHAN *et al.*, 2017). A sensibilização central é predominantemente mediada pela ativação dos receptores NMDA, que iniciam uma cascata de eventos intracelulares aumentando o influxo de íons cálcio (SONG; WU; ZUO, 2015).

O receptor NMDA foi descoberto há mais de três décadas. Tais receptores são expressos dentro e fora do sistema nervoso central (SNC) (BOZIC; VALDIVIELSO, 2015). Os receptores NMDA são amplamente distribuídos em todos os estágios de desenvolvimento e desempenham um papel crítico nas funções cerebrais de nível superior, incluindo desenvolvimento neuronal, aprendizado, memória e plasticidade sináptica (HANSEN *et al.*, 2017). Os receptores NMDA têm sido relacionados na fisiopatologia de uma variedade de distúrbios neurológicos e psiquiátricos, incluindo dor, isquemia cerebral/acidente vascular cerebral isquêmico, lesão cerebral traumática, doença de Alzheimer, doença de Huntington, doença de Parkinson, depressão, esquizofrenia, comprometimento cognitivo, e epilepsia (PAOLETTI; BELLONE; ZHOU, 2013, HANSEN *et al.*, 2017). Com relação à dor patológica, a ativação do receptor NMDA contribui para o desenvolvimento do fenômeno de *wind-up* e sensibilização central (WOOLF, 2011). A literatura também sugere que os receptores NMDA estão envolvidos na sensibilização periférica e na dor visceral (SHANTHANNA, 2012).

Os receptores NMDA são heterotetrâmeros (quatro subunidades ligadas de forma não covalente que podem não ser idênticas) que formam um poro de canal iônico central (VYKLYCKY *et al.*, 2014; HANSEN *et al.*, 2017). Os vários subtipos de receptores NMDA influenciam os atributos biofísicos, farmacológicos e de sinalização do receptor NMDA (PAOLETTI; BELLONE; ZHOU, 2013, HANSEN *et al.*, 2017).

Por outro lado, o processo nociceptivo decorrente de lesões do sistema nervoso periférico e central pode ser exacerbado e atingir o tecido saudável adjacente por meio da ativação das células gliais da medula espinhal (WU *et al.*, 2016). Além disso, sabe-se que lesões periféricas e da medula espinhal resultam na expressão aumentada de canais de sódio em neurônios do corno dorsal da medula e no tálamo, contribuindo para o processo de sensibilização central (KO *et al.*, 2016).

Doenças que cursam com quadros de dor crônica estão relacionadas a sintomas de depressão e de ansiedade, relatados por mais de 50% dos pacientes (NAKAMURA *et al.*, 2014; LERMAN *et al.*, 2015; HALL-FLAVIN, 2016; DUNNE *et al.*, 2018). O diagnóstico e tratamento dos pacientes com dor crônica pode ser um desafio, pois os fármacos disponíveis nem sempre são eficazes e relacionados a efeitos colaterais (LIPPE *et al.*, 2010; FISHMAN *et al.*, 2013). Entre os tipos de dor crônica, estão a dor inflamatória crônica, que é decorrente de exacerbção da resposta inflamatória à lesão, e a dor neuropática (DN), que envolve lesão de sistema nervoso periférico ou central (MERSKEY e BOGDUK, 2011).

## 2.2. Dor inflamatória e dor orofacial

O processo inflamatório agudo é essencial para proteção contra patógenos e lesões, promovendo remodelação e reparo tecidual. Quando a inflamação persiste, perdurando seis semanas ou mais, torna-se crônica e resulta em dor e perda de função. Mediadores pró-inflamatórios como prostaglandinas, citocinas, proteases, neuropeptídeos e fatores de crescimento estão relacionados com a inflamação e podem sensibilizar nociceptores (LIPNIK-STANGELJ, 2013; MEACHAN *et al.*, 2017).

Quadros de dor crônica devem ser tratados com uma abordagem multimodal, utilizando fármacos não opioides e técnicas não farmacológicas (DIBONAVENTURA *et al.*, 2017). Tanto o dano endotelial quanto o aumento da atividade neuronal resultam no recrutamento de monócitos / macrófagos (periféricos) e na ativação da microglia (central), que liberam mediadores que levam à sensibilização central, favorecendo a manutenção da dor e consequentemente o estabelecimento de quadro de dor crônica (MALCANGIO, 2019).

Os três sistemas mais suscetíveis a dor inflamatória são a pele, as articulações e o intestino (WIDDIFIELD *et al.*, 2014; LOFTUS e SANDBORN, 2002). Algumas das condições de dor mais comuns afetam a região craniofacial, incluindo dores agudas, como dor de dente e dores de cabeça, e condições de dor crônica mais complexa, como a neuralgia do trigêmeo (NT) e as disfunções temporomandibulares (DTM) (WONG e FARHAT, 2013). A região craniofacial é parcialmente inervada pelo nervo trigêmeo (NT). O NT, o maior nervo craniano, é um nervo misto: o aspecto sensorial inerva a pele da face, mucosa oral, cavidade nasal, seios paranasais, córnea, dentes, articulação temporomandibular (ATM), partes da língua, face, músculos mastigatórios, outros músculos menores, bem como a maior parte da dura-máter e as artérias cerebrais; e o aspecto motor (nervos motores braquiais) suprime os músculos mastigatórios (temporal, masseter, lateral, e pterigoideos mediais e ventre anterior do músculo digástrico). No entanto, o segmento sensorial é muito maior que a porção motora. O NT possui três ramos principais: o ramo oftálmico (V1), o ramo maxilar (V2) e o ramo mandibular (V3) (MATTHEWS, 1985).

As fibras sensoriais dos 3 ramos do NT convergem no gânglio trigeminal, onde os corpos celulares das fibras aferentes são localizados. O gânglio do trigêmeo é semelhante ao gânglio da raiz dorsal no sistema somatossensorial da coluna vertebral em termos de transmissão



do estímulo e de marcadores associados à nocicepção (KRYZANOWSKA e AVEDAÑO, 2012).

As síndromes da dor orofacial abrangem várias entidades clinicamente definidas e classificadas. A Classificação Internacional de Cefaleias 2018 classifica esses transtornos nociceptivos de dor facial como neuropatias cranianas dolorosas e outras dores faciais (ZÚÑIGA-ROMERO *et al.*, 2014). Além das neuropatias trigeminais pós-traumáticas ou pós-herpéticas dolorosas inequívocas, a síndrome da ardência bucal, a dor facial e dentária idiopática persistente e a neuralgia trigeminal também foram identificadas com testes sensoriais neurofisiológicos e quantitativos para envolver o sistema nervoso (ZAMANILLO *et al.*, 2013).

### **2.3. Modelos animais de dor orofacial**

A avaliação da dor orofacial em humanos é complexa e existem lacunas de conhecimento nesta área. Nesse contexto, o emprego de modelos animais de dor orofacial possibilita investigar essas lacunas, como explorar em profundidade a fisiopatologia dos distúrbios de origem craniofacial (SIQUEIRA-LIMA *et al.*, 2017). No entanto, é necessário que os modelos animais sejam reprodutíveis e confiáveis permitindo uma melhor compreensão da fisiopatologia da dor orofacial crônica. Além disso, um alto grau de especificidade em relação à avaliação das condições de dor orofacial possibilita que os resultados possam ser traduzidos na prática clínica (BENOLIEL e SHARAV, 2010). Portanto, gerar novos modelos, ou melhorar os já existentes, poderia fornecer novas formas de abordar a complexa neurobiologia desse tipo de dor, ajudar a desenvolver novas terapias farmacológicas e não farmacológicas e melhorar a eficácia dos tratamentos atuais (ROMERO-REYES *et al.*, 2013).

Modelos animais de dor orofacial podem ser induzidos por intervenções neuropáticas ou inflamatórias. Os modelos inflamatórios geralmente são induzidos por injeções de formalina, capsaicina, glutamato e óleo de mostarda (MELO JUNIOR *et al.*, 2017). Além disso, CFA, carragenina e solução salina ácida podem induzir inflamação periférica ou de longa duração induzindo hiperalgesia pela liberação de mediadores pró-inflamatórios (ou seja, citocinas), alterações no pH local e ativação direta de nociceptores periféricos. Assim, os agentes inflamatórios algogênicos são capazes de mimetizar condições semelhantes à dor orofacial crônica (BLOOD-SIEGFRIED, 2015). Para isso, é necessário que o modelo seja

capaz de promover algesia prolongada, permitindo a observação das intervenções experimentais analgésicas em longo prazo.

A injeção de substâncias algogênicas na ATM tem a vantagem de ser simples e reprodutível. O adjuvante de Freund, foco deste estudo, é uma solução emulsificada de óleo mineral de antígeno com características imunopotenciadoras. Na sua forma completa (CFA) é composto por micobactérias inativadas e secas (principalmente *Mycobacterium tuberculosis*). Em modelos de dor orofacial em roedores utilizando CFA, a substância pode ser injetada na região das vibrissas, diretamente no masseter, na ATM ou no nervo infraorbitário (KIM *et al.*, 2015; SCARABELOT *et al.*, 2016). O CFA é o composto mais utilizado em experimentos pré-clínicos neste campo (NICOT *et al.*, 2021). A aplicação unilateral de CFA é acompanhada de hiperalgesia mecânica e hipersensibilidade térmica quando administrada na ATM ou na pele perioral (IMBE e REN, 1999), gerando um modelo típico de DTM.

A escolha do protocolo de CFA ideal para o estudo da dor em roedores tem sido um desafio, devido à variabilidade observada entre os estudos. A dose empregada de CFA varia de 15 a 250 µg, com a maioria dos estudos utilizando 50 µg (KOOP *et al.*, 2017; ITO *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018; GARATTINI *et al.*, 2019; JIN *et al.*, 2019). O volume de injeção e a concentração também são bastante heterogêneos. O volume varia de 15 a 100 µL (SCARABELOT *et al.*, 2016; FERRARA *et al.*, 2019; SCARABELOT *et al.*, 2019; CAMINSKI *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2012). Alguns até usam uma subdose de 1µg/2µL na ATM (IVANUSIC *et al.*, 2011). Na maioria dos casos, os animais recebem um volume não superior a 50 µL na ATM. Apenas alguns estudos usam um volume de 60 µL (MAGNI *et al.*, 2015) ou 100 µL da solução (FERRARA *et al.*, 2019). A concentração de CFA injetado varia de 0,5 µg/µL (OKAMOTO *et al.*, 2006; SCARABELOT *et al.*, 2016; SCARABELOT *et al.*, 2019) a 1 µg/µL (KOOP *et al.*, 2017; MAGNI *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2018; FERRARA *et al.*, 2019; GARATTINI *et al.*, 2019).

#### **2.4. Tolerância e hiperalgesia induzidas pela morfina**

Os analgésicos opioides, como a morfina, são potentes fármacos, amplamente utilizados em âmbito ambulatorial e hospitalar para o tratamento da dor aguda e crônica. Entretanto, seu uso em longo prazo pode resultar em tolerância, em que a eficácia analgésica

diminui gradativamente em doses fixas de fármacos, juntamente com o desenvolvimento de hiperalgesia paradoxal (FIELDS, 2011).

Tolerância e hiperalgesia são os principais efeitos adversos do tratamento com morfina limitando o seu uso (VOLKOW e MCLELLAN, 2016). A tolerância à morfina é uma condição em que a administração repetida do fármaco leva a redução da sua eficácia analgésica, resultando numa necessidade de aumento da dose para alcançar o efeito analgésico adequado (WANG *et al.*, 2012). Em contrapartida, abstinência é uma condição que ocorre quando o consumo de morfina é abruptamente interrompido após seu uso crônico. Nesse caso, surgem sinais de abstinência, incluindo dores nas costas e nas pernas, transtornos de sono, fadiga crônica, inquietação e transtornos do humor (KOOB, SANNA e BLOOM, 1998). Os mecanismos precisos de tolerância à morfina e dependência física ainda são pouco compreendidos (ZHAO *et al.*, 2012). Além disso, não há tratamento específico para tolerância à morfina ou dependência física (JOSEPH, STANCLIFF e LANGROD, 2000).

Assim como a tolerância induzida pela morfina, a hiperalgesia precisa de tempo e doses crescentes para ocorrer. O principal mecanismo de tolerância a opioides é a dessensibilização dos receptores. A proteína quinase C $\gamma$  (PKC $\gamma$ ), a principal forma da família da PKC na medula espinhal, tem um papel crucial na indução da dessensibilização do receptor opioide. A administração repetida de morfina induz a ativação de PKC em astrócitos reativos no corno dorsal da medula espinhal (NARITA *et al.*, 2004). Estudos relatam que o aumento na expressão de PKC $\gamma$  induzido pela administração crônica de morfina é inibido pela co-administração de melatonina. Além disso, o efeito regulatório da melatonina no receptor NMDA já foi previamente descrito (HOSSEINZADEH *et al.*, 2019). Dessa forma, o uso da melatonina pode ser uma alternativa na prevenção da hiperalgesia e tolerância induzidas pela morfina.

## **2.5. Uso de melatonina na tolerância e hiperalgesia induzidas pela morfina**

A melatonina é uma molécula produzida pela glândula pineal, conhecida por seu papel na regulação do ritmo circadiano (HOSSEINZADEH *et al.*, 2018; MEHRZADI *et al.*, 2020). Além disso, tem sido demonstrado que a melatonina apresenta propriedades sedativas, hipnóticas, analgésicas, anti-inflamatórias e antioxidantes, indicando ser um potencial adjuvante antinociceptivo para controle da dor. A percepção de dor, particularmente induzida por frio e calor, varia ao longo do dia, o que pode ser resultado das mudanças no nível circulante

de melatonina (AVIRAM; SHOCHAT; PUD, 2015). Cabe salientar que a administração sistêmica ou intratecal de melatonina pode ter efeito analgésico dependente da dose além de neutralizar a hiperalgesia induzida pela morfina (WANG *et al.*, 2012). Considerando estes efeitos, o uso preemptivo de melatonina na profilaxia da dor e inflamação do pós-operatório tem sido indicado (YOUSAF *et al.*, 2010).

Devido a sua capacidade de reduzir a ativação do receptor NMDA, a melatonina desempenha um papel importante nos mecanismos moleculares de tolerância à morfina, aumentando a ação antinociceptiva de opioides e revertendo a tolerância à morfina (SONG; WU; ZUO, 2015). Além disso, a administração em longo prazo de morfina induz a ativação da microglia aumentando a expressão da proteína de choque térmico 27 (HSP27). A expressão da proteína de choque térmico de estresse (HSPs) é um importante fator na neuroinflamação (VAN NOORT, 2008). A retirada da morfina evoca um estresse severo. O estresse celular durante a administração contínua de morfina é evidente pela expressão de HSP27, em resposta à lesão glial, protegendo contra o estresse oxidativo, apoptose e remodelação do citoesqueleto (SANZ *et al.*, 2001; ALMELA *et al.*, 2011; MARTINEZ-LAORDEN *et al.*, 2012). A expressão de HSP27 é marcadamente aumentada após administração contínua de morfina (DRASTICHOVA *et al.*, 2012). O tratamento com melatonina reverte parcialmente a tolerância à morfina, inibindo a ativação microglial e reduzindo a expressão de HSP27 no corno dorsal da medula espinhal de ratos (LIN *et al.*, 2016). Além disso, a melatonina impede a ativação microglial na medula espinhal de ratos, reduzindo a atividade de PKC e a super-regulação de adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico (cAMP) (WANG *et al.*, 2012).

A melatonina reverte a tolerância e dependência à morfina também por ativação dos receptores periféricos benzodiazepínicos, demonstrando o seu envolvimento neste processo modulatório (RAGHAVENDRA e KULKARNI, 1999). Essas ações da melatonina podem também estar relacionadas à supressão do óxido nítrico sintase (NOS) e redução dos níveis de óxido nítrico (NO) (RAGHAVENDRA e KULKARNI, 2000). O consumo crônico de morfina leva à superprodução de NO, que atua como um fator importante nos sinais comportamentais de abstinência desencadeados pela ativação neuronal (LUE *et al.*, 1999). O aumento dos níveis de NO desempenha um papel fundamental na tolerância e dependência da morfina, aumentando o nível de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) e a fosforilação de algumas proteínas-chave (LUE *et al.*, 1999). Portanto, agentes que suprimem a síntese ou liberação de NO, como a melatonina, podem atenuar o desenvolvimento da tolerância e dependência da morfina

(DAMBISYA e LEE, 1996). A melatonina atua inibindo a óxido nítrico sintase reduzindo os níveis de NO (RAGHAVENDRA e KULKARNI, 2000).

O quadro de abstinência à morfina induzido pela naloxona em camundongos, é inibido pela melatonina, por meio do aumento do conteúdo de  $\beta$ -endorfina na substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo, e pela diminuição do nível de  $\beta$ -endorfina no núcleo arqueado hipotalâmico (WEI, XU e YU, 2007). A melatonina também reduz a dependência física e consequentemente, a síndrome de abstinência, diminuindo os níveis séricos de norepinefrina e dopamina e os níveis de NO plasmático e central (ZHOU, HUO e QIU, 2002). Ramelteon, um agonista não seletivo do receptor de melatonina, também atenua os sintomas de abstinência à morfina (MOTAGHINEJAD, MOTAGHINEJAD e HOSSEINI, 2015). Estudos recentes demonstraram que a inflamação e a superprodução de radicais livres têm papéis críticos na tolerância e na dependência física a opioides (HOSSEINZADEH *et al.*, 2018; SAFFAR *et al.*, 2020). Assim, os agentes anti-inflamatórios e antioxidantes podem atenuar a tolerância e a dependência física induzida pela morfina (HASSANIPOUR *et al.*, 2018). A melatonina regula a expressão de genes relacionados a tolerância à morfina (HOSSEINZADEH *et al.*, 2018), um efeito que pode ser resultado de suas potentes propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes.

A melatonina potencializa a analgesia induzida pela morfina e reduz a hiperalgesia relacionada à morfina (tanto mecânica quanto térmica) (ZAHN *et al.*, 2003). Ao inibir a via PKC, a melatonina limita a proliferação de células de glioma e mitiga a hiperalgesia relacionada à morfina por meio da inibição das atividades de PKC $\gamma$  e NMDA na medula espinhal (FAN *et al.*, 2017). A melatonina também atenua a hiperalgesia induzida pela exposição neonatal à morfina, promovendo marcada analgesia durante a fase I do teste da formalina (ativação direta dos processos sensoriais nociceptivos) e fase II (dependente da resposta inflamatória subsequente) (ROZISKY *et al.*, 2016). Além disso, a melatonina induz a fosforilação da calmodulina inibindo a interação da calmodulina com suas proteínas alvo do que tem papel fundamental na manutenção da hiperalgesia relacionada à morfina (SOTO-VEGA *et al.*, 2004).

### **3. JUSTIFICATIVA**

O manejo dos quadros de dor crônica orofacial permanece sendo um desafio devido à complexidade de diagnóstico e dificuldade de obtenção de alívio com os fármacos tradicionalmente utilizados. Desta forma, as dores crônicas têm sido manejadas com diferentes abordagens, tanto farmacológicas quanto não farmacológicas, na tentativa de melhorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos. Nesse contexto, o emprego de modelos animais de dor orofacial possibilita investigar as lacunas de conhecimentos nesta área, permitindo uma melhor compreensão da fisiopatologia dos transtornos de origem craniofacial, assim como de novas terapias farmacológicas, avaliando o seu impacto em parâmetros comportamentais, na resposta nociceptiva, seus efeitos neuroquímicos e moleculares. No entanto, é necessário que os modelos animais sejam reprodutíveis e confiáveis. Portanto, produzir novos modelos, ou melhorar os já existentes, pode fornecer novas formas de abordar a complexa neurobiologia da dor crônica, auxiliando no desenvolvimento de novas terapias farmacológicas e não farmacológicas, visto que modelos pré-clínicos possibilitam a avaliação de características farmacocinéticas, farmacodinâmicas e toxicológicas. Além disso, possibilitam a avaliação do efeito de intervenções já existentes na resposta nociceptiva, comportamento e em níveis de biomarcadores de inflamação e plasticidade neuronal.

Neste contexto, os fármacos opioides, potentes analgésicos amplamente utilizados, estão relacionados a importantes efeitos adversos, incluindo tolerância, dependência e indução de hiperalgesia (ROECKEL *et al.*, 2017). A busca de opções terapêuticas que limitem a indução dos efeitos adversos de opioides reveste-se de fundamental importância. Estudos têm demonstrado o efeito analgésico da administração da melatonina dependente da dose e sua capacidade de neutralizar a hiperalgesia induzida pela morfina. Desta forma, torna-se essencial a realização de estudos que envolvam a utilização dessa terapêutica, avaliando o seu impacto nas respostas nociceptiva e neuroquímica sobre a hiperalgesia induzida pela morfina em modelos animais de dor crônica inflamatória orofacial.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. OBJETIVO GERAL**

Considerando a importância do uso de modelos confiáveis para investigação de novas opções de tratamento em estudos pré-clínicos, esta dissertação teve como objetivo avaliar o curso temporal do desenvolvimento da dor orofacial inflamatória crônica em ratos induzida por injeção unilateral de 50 µg/50 µL de CFA na ATM, procurando determinar parâmetros objetivos que justifiquem seu uso.

De forma secundária, objetivou-se investigar os efeitos da administração de melatonina sobre a hiperalgesia induzida pela morfina em ratos utilizando o modelo de dor crônica inflamatória previamente avaliado.

## **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

### **Experimento 1**

- 1) Avaliar o desenvolvimento do modelo de dor crônica inflamatória orofacial na ATM em ratos induzida por CFA;
- 2) Determinar o comportamento do tipo-ansioso por meio do teste do Labirinto em Cruz Elevado;
- 3) Avaliar a atividade locomotora e exploratória pelo teste do Campo Aberto;
- 4) Analisar, por histologia, a resposta inflamatória local por meio de escore inflamatório e espessura do disco da ATM;
- 5) Analisar a resposta neuroinflamatória e neurotrófica por meio da avaliação dos níveis de BDNF e interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL-10) em gânglio trigeminal (GT).

### **Experimento 2 - resultados preliminares**

- 1) Avaliar o efeito da administração sistêmica de melatonina sobre a hiperalgesia e tolerância induzidas pela morfina, por meio dos testes:
  - a) de von Frey (hiperalgesia mecânica);
  - b) da acetona (hiperalgesia térmica ao frio).

2) Determinar o comportamento do tipo-ansioso por meio do teste do Labirinto em Cruz Elevado;

3) Avaliar a atividade locomotora e exploratória pelo teste do Campo Aberto.

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1. Animais**

Foram utilizados 70 ratos Wistar machos provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com 55 a 65 dias de idade ( $\geq$  250g) no início do experimento.

Os animais foram alojados em grupos de 3 por caixas-moradia, confeccionadas em polipropileno, medindo 49x34x16cm, com assoalho coberto de maravalha. Os animais foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), em ambiente controlado com ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade relativa do ar de 40 a 60%, com livre acesso à água e ração (Nuvilab CR1, Nuvital®). Todos os procedimentos para minimizar dor e desconforto foram realizados, obedecendo os Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Envolvendo Animais (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: 8<sup>th</sup> Edition*, 2011), assim como a Lei 11794/08 (BRASIL, 2008) de Procedimentos para o Uso Científico de Animais (Lei AROUCA).

### **5.2. Local da Pesquisa**

Este projeto foi desenvolvido no Centro de Pesquisa Experimental (CPE) do HCPA, na UEA, na Unidade de Proteína Laboratoriais (UPL) e no Laboratório de Patologia Experimental.

### **5.3. Delineamento Experimental**

Este estudo teve caráter experimental, no qual ratos foram expostos a um modelo de dor crônica inflamatória orofacial.



**Experimento 1:** no primeiro experimento, previamente à indução do modelo de dor inflamatória (dia 0), foi realizada a randomização dos animais com base nas medidas do limiar nociceptivo basal. Os testes nociceptivos foram repetidos após estabelecimento da dor inflamatória, nos dias 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 e 25.

Inicialmente, os animais foram divididos em dois grupos: (1) submetidos ao modelo sham de dor por injeção de solução salina (grupo Sham); (2) submetidos ao modelo de dor crônica inflamatória orofacial (por injeção de CFA).

- 1) Grupo Sham
- 2) Grupo Dor

**Experimento 2:** No segundo experimento, uma leva de ratos foi submetida ao modelo de dor orofacial e posteriormente tratada por 8 dias consecutivos, concomitantemente com morfina e/ou melatonina, nas doses de 5 mg/kg e 50 mg/kg, respectivamente. Os testes comportamentais foram realizados em diferentes etapas ao longo do estudo, com o objetivo de avaliar temporalmente os efeitos da dor inflamatória e da administração dos fármacos (Figura 1).

A primeira fase descrita no experimento 1 foi repetida. Após o estabelecimento da dor, os animais foram divididos em quatro novos subgrupos, de acordo com a administração de salina ou morfina, via subcutânea (s.c.). Finalmente, oito novos grupos foram formados, de acordo com a administração de veículo ou melatonina, administrados via intraperitoneal (i.p.), descritos da seguinte forma:

- 3) Grupo Sham + Veículo + Solução Salina (SVS)
- 4) Grupo Sham + Veículo + Morfina (SVMo)
- 5) Grupo Sham + Melatonina + Solução Salina (SMeS)
- 6) Grupo Sham + Melatonina + Morfina (SMeMo)
- 7) Grupo Dor + Veículo + Solução Salina (DVS)
- 8) Grupo Dor + Veículo + Morfina (DVMo)
- 9) Grupo Dor + Melatonina + Solução Salina (DMeS)

## 10) Grupo Dor + Melatonina + Morfina (DMeMo)

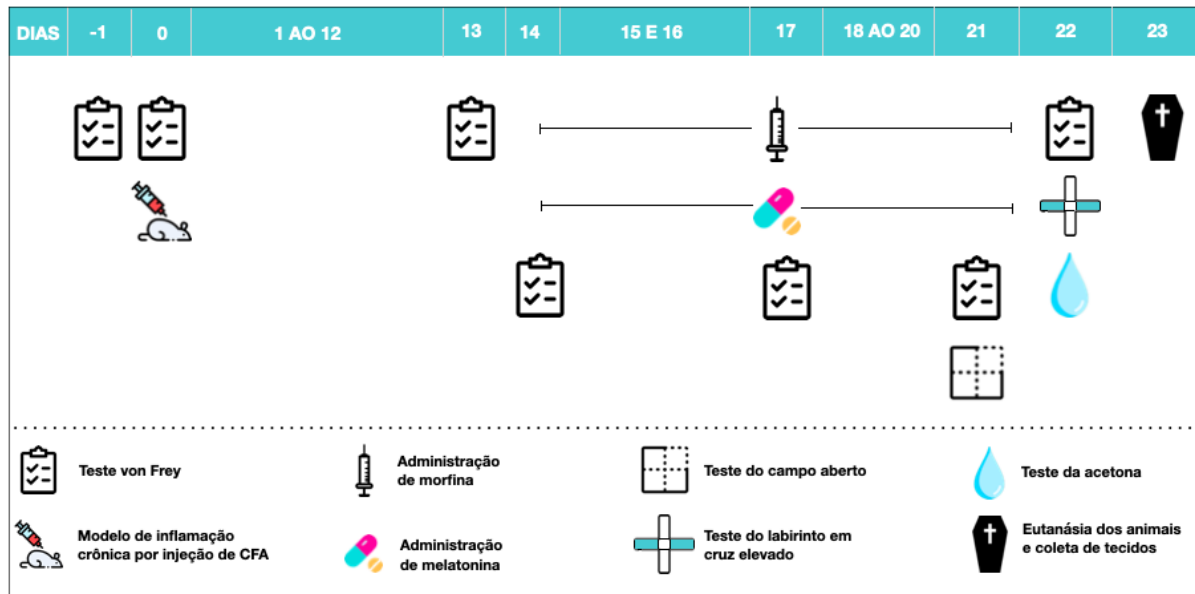


Figura 1. Linha do tempo do desenho experimental.

### 5.4. Randomização dos animais

Após o período de adaptação (14 dias) à UEA do HCPA, os animais foram alocados aos seus respectivos grupos experimentais de acordo com o peso corporal. Durante as medidas basais do limiar de nocicepção, foram novamente randomizados pelo teste basal de von Frey e alocados em 2 grupos no experimento 1 Sham e Dor; e no experimento 2 em oito grupos experimentais: SVS, SVMo, SMeS, SMeMo, DVS, DVMo, DMeS, DMeMo. O teste de von Frey foi utilizado para avaliação do estabelecimento do modelo de dor crônica inflamatória, bem como a resposta a tratamentos farmacológicos e não farmacológicos (LASTE *et al.*, 2012). É imprescindível que, antes das intervenções farmacológicas, os animais que foram submetidos aos diferentes tratamentos apresentem limiar de dor semelhante, de acordo com a intervenção a qual forem submetidos.

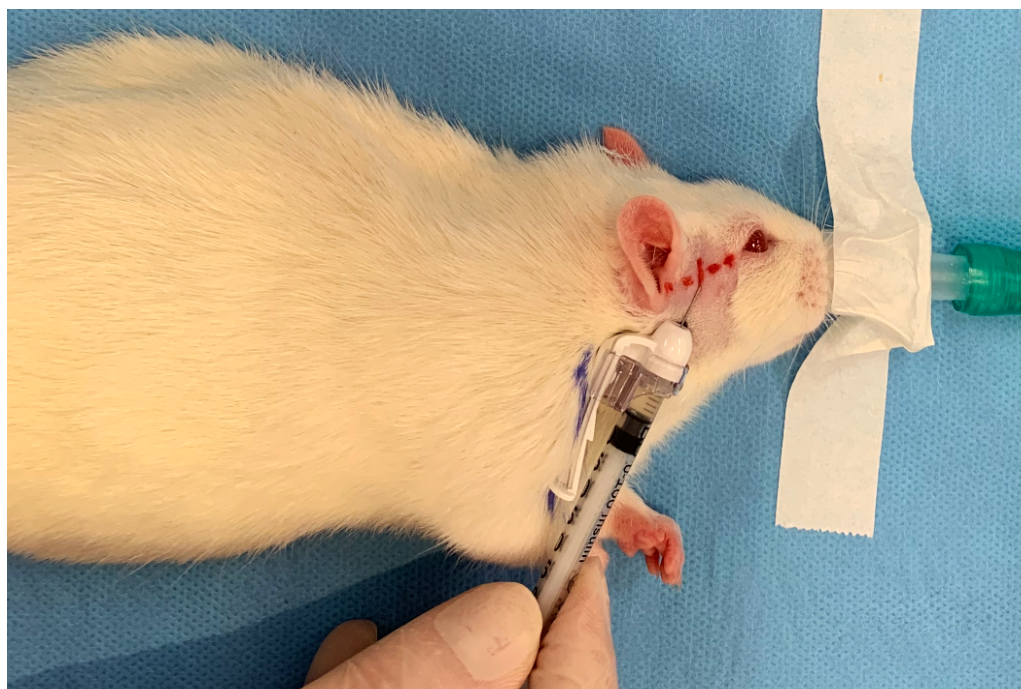
### 5.5. Modelo de dor crônica inflamatória orofacial

Neste estudo experimental, a dor crônica orofacial (DTM) foi induzida em ratos por meio da administração de CFA, (1 µg / µl, Sigma Aldrich, Missouri, USA) na dose de 50 µg / 50 µl (sem diluição), injetados no interior da ATM direita do animal previamente anestesiado

com isoflurano (indução 5% - SMITH, 1993; manutenção 2,5% - VAILLANCOURT, BERGER, BOKSA 1999; WOOD, 2001). A identificação do sítio de injeção na ATM foi feita pelo método descrito por Fuentes *et al.* (2017). Inicialmente, uma linha (A) foi traçada do ouvido externo ao globo ocular, paralela e sobre o arco zigomático do rato. Posteriormente, o côndilo foi localizado superficialmente, cerca de 5 mm à frente da orelha externa, coberto pelo arco zigomático. No ponto do côndilo foi traçada uma linha (B), perpendicular à linha (A). Uma agulha 30G de 8 mm foi inserida obliquamente, em um ângulo de 45 graus, num ponto (C), localizado 3mm abaixo da intersecção das linhas, de baixo para superior e lateral para medial. A agulha foi inserida com 7 mm de profundidade até atingir o côndilo da ATM, que serve de referência acima da qual, com cerca de 3 mm, sendo possível acessar o compartimento da ATM localizado acima do disco articular. Os pontos anatômicos essenciais para a realização desse procedimento estão localizados 5 mm atrás do arco zigomático e 5 mm anteriores à orelha externa, onde o processo condilar da articulação está localizado em profundidade, acima do qual é possível acessar o compartimento localizado acima da orelha sobre o disco articular (Figura 2).

Tanto o grupo que foi submetido ao modelo de dor, quanto o grupo controle receberam a injeção no interior da ATM, sendo um modelo de dor orofacial padronizado e descrito na literatura (WANG *et al.*, 2017; ROBIN, 2017). Uma revisão recente da literatura (NICOT *et al.*, 2021) aponta diversos trabalhos que utilizam este modelo em estudos experimentais com roedores, nos quais a dose de 50 µg / 50 µl de solução de CFA (sem diluição) é indicada como uma das mais frequentemente utilizadas. O grupo controle recebeu injeção de 50 µl de solução salina estéril 0.9%. A injeção de CFA ou salina é um procedimento rápido, de duração total de aproximadamente 5 minutos, não necessitando o animal ficar sob anestesia durante muito tempo, reduzindo os riscos. Foi monitorada a respiração durante a anestesia, e assim que o procedimento foi finalizado, o animal foi retirado da inalação de isoflurano e colocado em observação até a completa recuperação. Para o alívio da dor, nos 3 dias subsequentes à administração do CFA os animais foram tratados com tramadol por via i.p. (20 mg / kg a cada 12 horas) (GUZMAN-SILVA *et al.*, 2007).

A inflamação induzida pelo CFA promove uma resposta inflamatória bifásica: inicial (inflamação aguda) e tardia (inflamação crônica, considerado a partir do décimo quarto dia após a injeção do CFA), permitindo o estudo da fisiopatologia na condição crônica dolorosa (PHILIPPE *et al.*, 1997).



**Figura 2:** Identificação do sítio de injeção da articulação temporomandibular.

## 5.6. Tratamentos farmacológicos

A dor crônica inflamatória é estabelecida 14 dias após a injeção de CFA. Sendo assim, os tratamentos farmacológicos iniciaram a partir do décimo quarto dia de indução do modelo de dor. Os animais receberam injeção i.p. diária de salina, morfina e/ou melatonina. A melatonina foi administrada na dose de 50 mg/kg (LASTE *et al.*, 2012; ROZISKY *et al.*, 2016; SCARABELOT *et al.*, 2016). Primeiramente, a melatonina foi diluída em propilenoglicol (40%) por kg de peso corporal dos animais usando como transporte salina (NaCl, 0,9%), formando uma solução final de 50 mg/ml. Essa solução foi aquecida em banho-maria a 54°C para homogeneização. Após aspirar a dose em cada seringa para cada animal, esperou-se 2 minutos para resfriamento da solução e posterior administração. A dose utilizada de morfina foi 5 mg/kg diluída em solução salina e administrada por via s.c. (TORRES *et al.*, 2003; ROZISKY *et al.*, 2008; HESTEHAVE *et al.*, 2019; MAI *et al.*, 2020). Ambos os fármacos foram administrados uma vez ao dia por 8 dias consecutivos. Os veículos utilizados foram, solução salina para o controle da morfina e propilenoglicol 40% + solução salina 60% para o controle da melatonina.

## 5.7. Testes Comportamentais

### 5.7.1. Limiar nociceptivo mecânico (*von Frey facial eletrônico*)

O teste de von Frey foi realizado nos seguintes tempos: D-1, D0, D13, D14 (3x), D18, D21 e D22. As medidas basais foram tomadas 2 dias consecutivos antes da indução do modelo de dor para randomização dos animais (D-1 e D0). O ponto de medida no D-1 permitiu a adaptação dos animais ao teste e uma medida mais fidedigna em D0, evitando estresse agudo. No D14 os testes foram realizados 15, 30 e 60 min, após a primeira administração de morfina. Os ratos foram aclimatados à contenção na compressa 24 horas antes do teste, por um período de 10 minutos. No dia do teste os animais foram contidos na compressa posicionando o sensor do analgesímetro sobre a área a ser testada, no caso, região de ATM. Esta foi feita até que o rato fizesse um movimento aversivo de retirada, tentativa de morder a ponteira ou uma vocalização. O teste comportamental foi realizado em diferentes tempos ao longo do estudo, possibilitando uma avaliação temporal dos efeitos da dor inflamatória e do tratamento com os fármacos. O teste baseia-se na pressão máxima em gramas (g), necessária para que o animal demonstre sensibilidade ao contato com a pele (FRUHSTORFER, GROSS e SELBMANN, 2001; VIVANCOS *et al.*, 2004).

### 5.7.2. Limiar nociceptivo térmico (*acetona*)

O teste da acetona foi realizado no dia 22 do experimento. A alodinia ao frio foi avaliada usando o teste da acetona conforme descrito por Ma e colaboradores (2012), adaptado para ratos. O teste consistiu na aplicação (com seringa de insulina de 30 UI com agulha sem ponta), de 50 µL de acetona na superfície extra-oral na região das vibrissas, ipsilateral à injeção de CFA do animal, tendo o cuidado para evitar o contato da ponteira com a pele do animal. Após a aplicação, os animais foram colocados em uma caixa e foi analisada a frequência de *grooming* facial durante 1 min após a aplicação da acetona (MA *et al.*, 2012).

### 5.7.3. Teste do campo aberto (*Open Field*)

O teste de campo aberto foi realizado para avaliar a atividade locomotora e exploratória dos animais. O aparato consiste em uma caixa de madeira envernizada, medindo 50 x 60 x 40 cm, com a face anterior de vidro e o assoalho recoberto com linóleo, dividido em 12 retângulos

de 15,0 x 13,3 cm, com linhas escuras. O animal foi gentilmente colocado no canto posterior esquerdo da caixa e deixado livre para explorar o ambiente por 5 min (GOULD *et al.*, 2009). A medida da latência para saída do primeiro quadrado, tempo que o animal levou para colocar as quatro patas no quadrante seguinte, foi tomado como uma medida de ansiedade. O número de cruzamentos foi usado como medida de atividade locomotora (BRITTON e BRITTON, 1981). O número de *rearings*, definido como comportamento de levantar ambas as patas dianteiras, foi utilizado como medida de atividade exploratória. O tempo de *grooming*, definido como o comportamento de lambar a cabeça e o corpo, foi utilizado como medida da função biológica de autolimpeza e indicativo de comportamento do tipo ansioso (NIN *et al.*, 2012). Ao final de cada teste, o aparato foi limpo com quaternário de amônia para remover qualquer cheiro do animal previamente testado. A atividade locomotora e exploratória foi avaliada no dia 21 do experimento.

#### 5.7.4. Teste do labirinto em cruz elevado (*Elevated Plus Maze*)

Labirinto em cruz elevado é um teste utilizado para avaliar o comportamento do tipo ansioso do animal. O aparato é composto por dois braços abertos e dois braços fechados (50 cm x 40 cm x 10 cm) que se estendem a partir de uma plataforma central comum (10 cm x 10 cm), e é elevado a 50 cm do solo. No início do teste, o animal foi colocado na área central do aparato, de frente para um dos braços abertos, e seu comportamento foi registrado por 5 minutos, com auxílio de uma câmera. Os seguintes comportamentos foram avaliados: (1) número de entradas nos braços abertos (EBA); (2) número de entradas nos braços fechados (EBF); (3) tempo gasto nos braços abertos (TBA); (4) tempo gasto nos braços fechados (TBF) que foram considerados para refletir o medo de entrar nas áreas abertas, associada com ansiedade de ratos (BENETTI *et al.*, 2007); (5) número de *protected head dipping* (PHD); (6) número de *unprotected head dipping* (UHD), indicativo de atividade exploratória e tomada de risco; (7) tempo de *grooming* (em segundos); (8) número de *rearings*. Ao final de cada teste, o aparato foi limpo quaternário de amônia para remover qualquer cheiro do animal previamente testado. O comportamento do tipo ansioso foi analisado no dia 22 do experimento.

## 5.8. Morte dos animais

Os animais foram eutanasiados por decapitação sem uso de anestésico, 24 horas após a última avaliação dos testes comportamentais. É importante salientar que o modelo previa a verificação dos efeitos neuroquímicos e dosagens bioquímicas que podem ser alteradas pela utilização de anestesia durante a morte dos animais (BICKLER e FAHLMAN, 2006). Qualquer que seja o fármaco utilizado para a morte, afetará a fisiologia do animal de alguma maneira. Os barbitúricos, anestésicos gerais mais utilizados, são potentes hipnóticos, que produzem depressão dose-dependente do sistema nervoso central (SNC). Devido ao objetivo do trabalho, que prevê a preservação da fisiologia do encéfalo para posterior análise, a eutanásia por guilhotinamento se faz necessária (BICKLER e FAHLMAN, 2006). Além disso, estudos já demonstraram que a decapitação causa inconsciência rápida e indolor (HOLSON, 1992; VAN RIJN *et al.*, 2011). Para eutanásia foi utilizado equipamento específico para esse fim, obedecendo as Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), conforme a RN 37/2018.

Os animais foram observados com relação à composição corporal (perda de peso/caquexia), mobilidade (letargia, ataxia), postura (incapacidade de permanecer em pé, arqueamento do dorso), alteração na frequência e no padrão respiratório, coloração de mucosas (cianose, palidez), grau de hidratação (aumento do tempo de preguiamento da pele, enoftalmia, oligúria), alimentação (anorexia). Foi realizada a antecipação de morte caso o animal apresente perda de peso superior a 10% (na primeira semana) ou 15% (até o final do protocolo experimental) ou outras alterações clínicas não revertidas/minimizadas com manejo, analgésicos e/ou fluidoterapia (ringer lactato intraperitoneal).

## 5.9. Análise estatística

Os dados do teste de von Frey foram analisados pelo teste ANOVA de medidas repetidas e ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni. Os dados do teste de acetona, campo aberto e labirinto em cruz elevado foram analisados por meio de uma ANOVA de medidas repetidas de três vias, seguida pelo teste de Bonferroni. Foi utilizado o programa estatístico SPSS (Statistical Package for the Social Science), versão 20.0. Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e foi considerada diferença estatística significativa quando  $P < 0.05$ .

## 7. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE MELATONINA SOBRE A HIPERALGESIA E TOLERÂNCIA INDUZIDAS PELA MORFINA

### 7.1. Resultados Parciais

#### 7.1.1. Efetividade do modelo de dor

De acordo com o teste ANOVA de medidas repetidas, no tempo basal, D0, não havia diferença entre os grupos sham e dor ( $P > 0.05$ ). Para observar a efetividade do modelo, foram comparados os grupos sham e dor no D13. No D13, houve diferença significativa entre grupos sham e dor ( $P < 0.001$ ) (Figura 3A).

#### 7.1.2. Efeito do tratamento agudo

Após a primeira administração dos fármacos foram comparados os grupos nos tempos em D14 - 15', D14 - 30' e D14 - 60'. De acordo com teste ANOVA de medidas repetidas (Bonferroni), em 15' não foi observado efeito de melatonina, morfina ou da associação de ambas nos grupos sham ( $P > 0.05$ ). Nos grupos dor, houve diferença entre os grupos DVS vs DVMo ( $P < 0.001$ ), DVS vs DMeMo ( $P < 0.001$ ) e DMeS vs DMeMo ( $P < 0.001$ ). Animais dor tiveram um efeito analgésico da morfina, mas sem efeito da melatonina *per se* (Figura 3B).

Em 30' não há efeito de melatonina, morfina ou da associação de ambas nos grupos sham ( $P > 0.05$ ). Nos grupos dor, houve diferença entre os grupos DVS vs DVMo ( $P \leq 0.001$ ), DVS vs DMeMo ( $P < 0.001$ ), DMeS vs DMeMo ( $P < 0.001$ ). Animais dor tiveram um efeito analgésico da morfina, mas sem efeito da melatonina (Figura 3B).

Em 60' houve diferença entre os grupos SVS vs SVMo ( $P \leq 0.001$ ), SMeS vs SMeMo ( $P < 0.001$ ), SVS vs SMeMo ( $P < 0.001$ ). Nos grupos dor, houve diferença entre os grupos DVS vs DVMo ( $P \leq 0.001$ ), DVS vs DMeMo ( $P < 0.001$ ), DVMo vs DMeMo ( $P < 0.001$ ), DMeS vs DMeMo ( $P < 0.001$ ). Nesse tempo, o efeito da morfina começa aparecer no grupo sham e não há efeito da melatonina, e é possível observar o efeito potencializador da melatonina na analgesia induzida pela morfina no grupo dor. De forma isolada, a melatonina não apresentou efeito analgésico no tratamento agudo em nenhum dos grupos. Ao longo do tempo (15', 30' e 60'), há uma redução do efeito analgésico da morfina no grupo dor (Figura 3B).



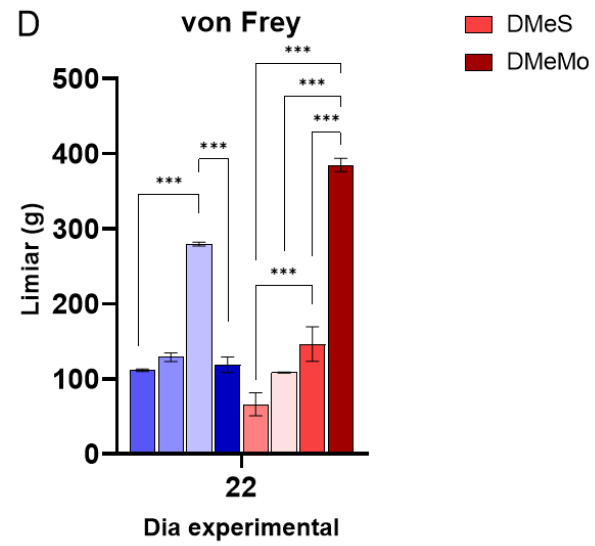
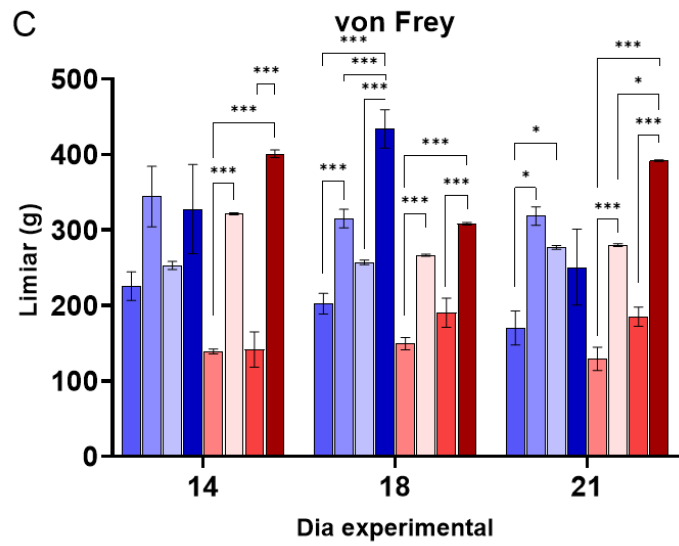
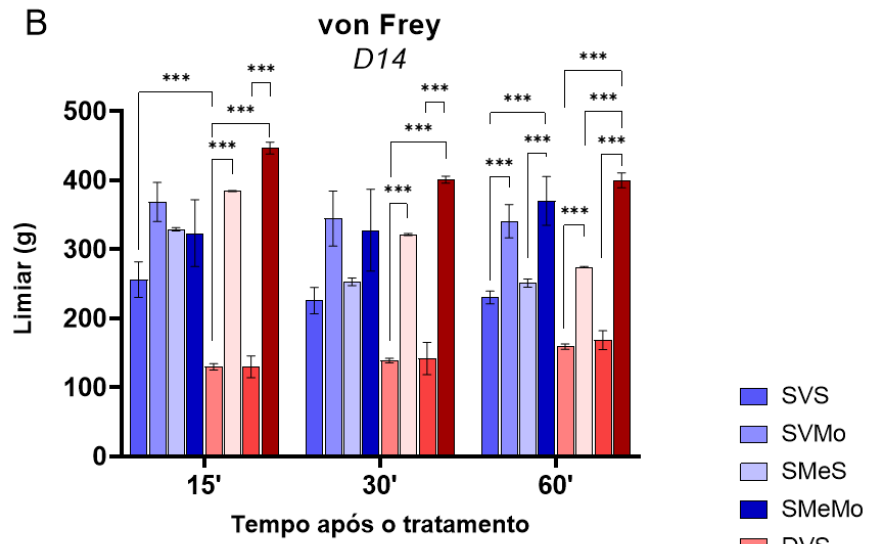
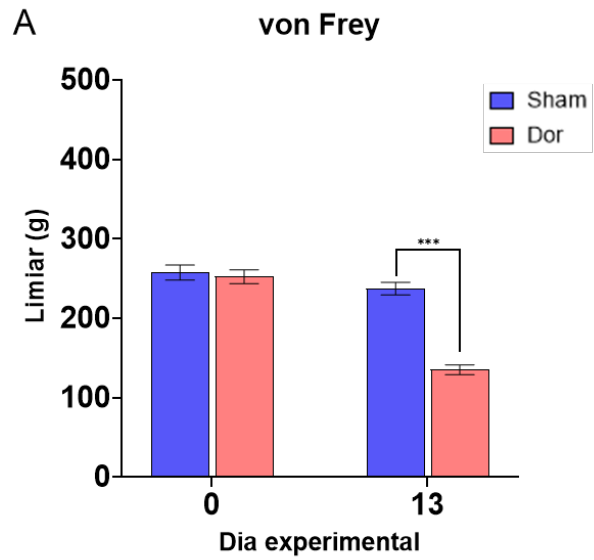
### *7.1.3. Efeito do tratamento crônico*

De acordo com a ANOVA de medidas repetidas, houve efeito do grupo e do tempo ( $P < 0.05$ ). No D18, houve diferença entre os grupos SVS vs SVMo, SVS vs SMeMo, SVMo vs SMeMo, SMeS vs SMeMo (Bonferroni,  $P < 0.001$  para todos). Nos grupos dor, houve diferença entre os grupos DVS vs DVMo, DVS vs DMeMo, DMeS vs DMeMo (Bonferroni,  $P < 0.001$  para todos) (Figura 3C).

No D21, houve diferença entre os grupos SVS vs SVMo ( $P < 0.05$ ). Nos grupos dor, houve diferença entre os grupos DVS vs DVMo ( $P < 0.001$ ), DVS vs DMeMo ( $P < 0.001$ ), DVMo vs DMeMo ( $P < 0.05$ ), DMeS vs DMeMo ( $P < 0.001$ ). A melatonina apresentou efeito analgésico de forma isolada no tratamento crônico nos animais sham em D21 ( $P < 0.05$ ) (Figura 3C).

### *7.1.4. Efeito de longo prazo do tratamento*

De acordo com o teste ANOVA de uma via, no D22, 24h após a última administração de morfina e/ou melatonina, houve diferença entre os grupos SVS vs SMeS ( $P < 0.001$ ), SMeS vs SMeMo (Bonferroni,  $P < 0.001$ ) (Figura 3D). Nos grupos dor, houve diferença entre os grupos DVS vs DMeS, DVS vs DMeMo, DVMo vs DMeMo, DMeS vs DMeMo, (Bonferroni,  $P < 0.001$  para todos). Nos animais sham, o efeito da melatonina permanece, não há efeito da morfina, tampouco potencialização do efeito analgésico na associação de morfina e melatonina. Nos animais dor, o efeito da morfina desaparece, e o efeito da melatonina permanece, assim como um forte efeito sinérgico da associação de ambos os fármacos (Figura 3D).



**Figura 3:** Teste de von Frey.

**Painel A:** Estabelecimento do modelo de dor - avaliações nos tempos Basal (D0) e D13 do experimento.

**Painel B:** Tratamento agudo - D14 (avaliações em 15, 30 e 60 minutos após a administração dos fármacos).

**Painel C:** Tratamento crônico - avaliações nos tempos D14 (30 minutos), D18 e D21.

**Painel D:** Efeito de longa duração - D22.

SVS = Sham + Veículo + Salina; SVMo = Sham + Veículo + Morfina; SMeS = Sham + Melatonina + Salina; SMeMo = Sham + Melatonina + Morfina; DVS = Dor + Veículo + Salina; DVMo = Dor + Veículo + Morfina; DMeS = Dor + Melatonina + Salina; DMeMo = Dor + Melatonina + Morfina.

Dados expressos como média  $\pm$  EPM. ANOVA de medidas repetidas / Bonferroni (Painéis A, B e C) e ANOVA de 1 via / Bonferroni (Painel D).

\* P < 0.05; \*\* P < 0.01; \*\*\* P < 0.001 (n = 6/grupo).

#### 7.1.5. Teste da Acetona

Os dados do teste de acetona foram avaliados pela ANOVA de três vias. Houve interação entre tratamento e modelo no tempo de duração de *groomings* ( $P < 0.05$ , Tabela 1).

#### 7.1.6. Campo Aberto

Os dados do teste de campo aberto foram avaliados pela ANOVA de três vias. Não houve efeito do modelo, tratamento, morfina ou ambos no número e tempo de *groomings*, *rearings*, latência do primeiro quadrante e número de cruzamentos ( $P > 0.05$ , Tabela 1).

#### 7.1.7. Labirinto em Cruz Elevado

Os dados do teste labirinto em cruz elevado foram avaliados por ANOVA de três vias. Houve efeito do tratamento (melatonina) em TBF ( $F_{(1,7)} = 10.223$ ,  $P < 0.05$ , Tabela 1). Houve interação entre modelo, tratamento (melatonina) e morfina no tempo de *groomings* ( $F_{(1,7)} = 6.312$ ,  $P < 0.05$ ). No número de UHD houve interação do tratamento (melatonina) e modelo ( $F_{(1,7)} = 13.23$ ,  $P < 0.05$ ), assim como no tratamento (melatonina) e morfina ( $F_{(1,7)} = 64.05$ ,  $P < 0.001$ ). Em relação ao número de entradas e o tempo gasto em braços abertos (EBA e TBA), houve interação entre tratamento (melatonina) e morfina ( $F_{(1,7)} = 13.23$ ,  $P < 0.05$ ;  $F_{(1,7)} = 14.18$ ,  $P < 0.01$ , respectivamente). Não houve efeito do modelo, tratamento, morfina ou ambos nos dados de EBF, PHD, número de *groomings* e *rearings* (Tabela 1).

**Tabela 1** – Parâmetros comportamentais dos testes da Acetona, Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado.

Variável	Grupos								P
	SVS	SVMo	SMeS	SMeMo	DVS	DVMo	DMeS	DMeMo	
<i>Acetona</i>									
Grooming (n)	1.00 (0)	0	2(0.57)	3	1	1.5(0.5)	0	1.67(1.20)	>0.05
Tempo de Grooming (s)	1.49(0.74)	0	2.74(0.87)	4.25	4	2.38(0.11)	0	2.33(1.24)	>0.05
<i>Campo Aberto</i>									
Latência 1º quadrante	4.59(0.93)	11.21(2.84)	7.92(1.30)	5.67	6.34(4.72)	7.74(2.65)	3.24	7.38(3.34)	>0.05
Cruzamentos	73.33(11.20)	60.50(5.50)	75.33(11.83)	68	69(20)	89.67(8.35)	70	122.33(35.31)	>0.05
Rearings (n)	24(2.51)	24.50(2.50)	23(3.60)	26	24(8)	33.33(5.81)	26	43.67(9.28)	>0.05
Grooming (n)	1.67(0.66)	5(13)	2.67(0.88)	4	2(0)	2(0.57)	1	1(0.57)	>0.05
Tempo de Grooming (s)	3.78(1.64)	24.72(16.62)	13.77(5.06)	21.86	11.21(5.54)	4.50(1.44)	5.67	3.42(1.74)	>0.05
<i>Labirinto em Cruz Elevado</i>									
Entradas nos braços fechados (n)	2.5(1.5)	1	1(0)	1	2	1(0)	1	1(0)	>0.05
Tempo nos braços fechados (s)	212.91(17.14)	265.62	290.77(16.11)	290.55	252.57	291.33(2.75)	294.88	292.09(2.65)	c

Entrada nos braços abertos (n)	2.5(0.5)	1	0(0)	0	2	0(0)	0	0(0)	b, c
Tempo nos braços abertos (s)	74.80(18.36)	17.28	0(0)	0	37.53	0(0)	0	0(0)	b, c
<i>Rearings</i> (n)	23(5)	12	14.67(3.93)	13	14	8.5(0.5)	29	19.33(5.23)	>0.05
<i>Grooming</i> (n)	1(1)	1	0.33(0.33)	3	0	2.5(0.5)	2	1.66(0.66)	>0.05
Tempo de <i>Grooming</i> (s)	1.35(1.35)	1.90	3.78(3.78)	26.20	0	12.97(4.32)	19.44	7.65(6.29)	d
<i>Protected head dippings</i> (n)	3(0)	0	2.67(1.76)	3	7	1(1)	9	5.33(2.72)	>0.05
<i>Unprotected head dippings</i> (n)	8(1)	3	0(0)	0	6	0(0)	0	0(0)	a, b, c

Dados expressos como média  $\pm$  EPM. SVS = Sham + Veículo + Salina; SVMo = Sham + Veículo + Morfina; SMeS = Sham + Melatonina + Salina; SMeMo = Sham + Melatonina + Morfina; DVS = Dor + Veículo + Salina; DVMo = Dor + Veículo + Morfina; DMeS = Dor + Melatonina + Salina; DMeMo = Dor + Melatonina + Morfina. ANOVA de três vias.  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  ou  $P < 0.001$ . N = 1-4/ grupo. a=efeito do modelo; b=efeito da morfina; c=efeito da melatonina; d=interação entre modelo, morfina e melatonina.

## 8. DISCUSSÃO PRELIMINAR DOS DADOS PARCIAIS

Apesar de não haver resultados conclusivos devido ao reduzido número de animais, a partir destes dados preliminares foi possível observar o efeito antinociceptivo da morfina que foi incrementado pela administração conjunta com a melatonina. Nos períodos e doses avaliadas não foi possível determinar a hiperalgesia induzida pela morfina. Por outro lado, os resultados demonstram que a melatonina não apresentou efeito analgésico agudo, na dose e modelo utilizados, necessitando de administração repetida para induzir analgesia neste modelo. No entanto, a melatonina induz a potencialização da analgesia induzida pela morfina, demonstrando um excelente efeito sinérgico entre os fármacos. Estes efeitos da melatonina se mantêm por pelo menos 24 horas após o final do tratamento. Outra observação importante é o efeito dependente do estado basal dos animais, uma vez que os efeitos induzidos pelos fármacos têm efeitos temporalmente diferentes entre os grupos sham e dor, demonstrando um efeito estado-específico. Estes resultados sugerem que a melatonina desempenha um papel no aumento do limiar de dor associado à inflamação induzida por CFA potencializando o efeito analgésico da morfina. Ao contrário do observado nesta dissertação, um estudo anterior mostra que, em doses mais altas (60 mg/kg e 120 mg/kg), a melatonina induz analgesia no teste de *tail-flick*, iniciando 15 minutos após a administração de melatonina e atingindo o pico após 30 minutos, com duração de efeito superior a 100 minutos (YU *et al.*, 2000). Esta diferença no início de indução de analgesia pode ser decorrente da dose utilizada no corrente estudo. Além disso, um estudo prévio utilizando administração intratecal de melatonina mostrou efeito anti-alodínico em ratos com dor neuropática observado a partir de 30 minutos e até 240 minutos após a administração (WU; YANG; TSAI, 2000). Em ratos diabéticos, o melhor efeito antinociceptivo foi observado com 60 minutos de pré-tratamento (300 mg/kg por via oral) no teste de formalina (ARREOLA-ESPINO *et al.*, 2007). Em nosso estudo, a melatonina não apresentou efeito analgésico agudo no grupo dor em nenhum dos tempos avaliados (15, 30 e 60 min), no entanto, ela foi capaz de potencializar o efeito da morfina tanto no grupo sham quanto no grupo dor. Por outro lado, a administração repetida de melatonina induziu analgesia no grupo dor por, pelo menos, 24 horas após o final do tratamento (8 dias de tratamento). Ainda, a morfina apresentou uma redução do efeito analgésico ao longo do tempo e não manteve efeito antinociceptivo 24 horas após a última administração.

O efeito antinociceptivo da melatonina observado neste estudo corrobora dados anteriores do nosso grupo, usando um modelo inflamatório crônico induzido por CFA injetado na pata traseira de ratos, no qual foi demonstrada uma redução na resposta nociceptiva 60 minutos após a administração de 60 mg/kg de melatonina (LASTE *et al.*, 2012; LASTE *et al.*, 2015).

Evidências experimentais sugerem que o efeito analgésico da melatonina é mediado por vários sistemas, como o sistema opioide, N-metil-D-aspartato (NMDA), via do óxido nítrico, entre outros (AMBRIZ-TUTUTI *et al.*, 2009). Seu efeito é bloqueado por antagonistas de receptores mu, NMDA e MT2. É possível sugerir que o efeito analgésico da melatonina envolva uma ação anti-inflamatória induzida pela inibição da ciclooxigenase-2 e óxido nítrico sintase (TAO *et al.*, 2014).

O modelo de dor inflamatória empregado neste estudo tem sido amplamente utilizado para testar vários medicamentos analgésicos (LICHTENBERGER *et al.*, 2008), incluindo medicamentos com atividade anti-inflamatória (ZARINGHALAM *et al.*, 2010). O dano tecidual ou inflamação leva à liberação de uma variedade de mediadores inflamatórios – como histamina, serotonina, metabólitos ácidos (via ciclooxigenase) e cinina – de leucócitos migrando para a região afetada (MALEKI *et al.*, 2001). Essa cascata pode ser induzida pela injeção de CFA. Alguns desses agentes ativam nociceptores, enquanto outros liberam agentes algogênicos locais. As substâncias algogênicas sensibilizam os terminais nociceptivos, aumentando assim a excitabilidade neuronal nas vias de transmissão da dor e causando hiperalgesia secundária (POEGELLER *et al.*, 1996; TAN *et al.*, 1993). A transmissão da dor por fibras aferentes primárias, cujos processos centrais estão localizados no corno dorsal da medula espinhal, acredita-se que seja influenciada por vários sistemas de neurotransmissores, incluindo receptores opióides, adrenérgicos, substância P, glutamato e neurocinina (POEGELLER *et al.*, 1996; TAN *et al.*, 1993).

Vários estudos em modelos de inflamação em ratos demonstraram que outro possível mecanismo de efeito da melatonina nas doenças inflamatórias é a inibição da produção de óxido nítrico, modulação da ativação do fator de transcrição NF-kB, redução da expressão de ciclooxigenase e prostaglandinas e recrutamento de células polimorfonucleares no local da inflamação (LICHTENBERGER *et al.*, 2008; ESPOSITO *et al.*, 2010).

Essa hiperalgesia tardia foi relatada anteriormente após uma exposição inicial a altas doses de outros agonistas de receptores opioides  $\mu$ , incluindo heroína e fentanil, em ratos (CELERIER *et al.*, 2000). Um fenômeno semelhante também parece ocorrer em humanos após



a infusão do agonista do receptor mu, remifentanil (ANGST *et al.*, 2003). Isso indica que os sistemas facilitador e inibitório da dor são ativados simultaneamente pela morfina.

Os resultados dessa dissertação demonstram a potencialização dos efeitos analgésicos da morfina pela melatonina. Estes efeitos são observados tanto em animais sham (D18) quanto em animais dor (D21 e D22). A capacidade de potencialização que a melatonina exerce quando co-administrada com analgésicos opioides já havia sido observada em estudos anteriores. Em um artigo de revisão, Hemati e colaboradores (2020) indicaram que o principal mecanismo responsável por esta potencialização da analgesia induzida pela morfina, provavelmente é decorrente dos potentes efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da melatonina, especialmente em dores associadas à inflamação. A melatonina também aumenta as ações antinociceptivas de opioides por meio da regulação de várias vias de sinalização celular, como a redução da atividade do receptor NMDA e do nível de PKC e cAMP, podendo reduzir o consumo de morfina em diferentes doenças. Além disso, a diminuição do consumo de morfina promove redução dos efeitos adversos, incluindo dependência física, tolerância e hiperalgesia relacionada à morfina (SONG; WU; ZUO, 2015; RAGHAVENDRA; KULKARNI, 2000). Portanto, é razoável sugerir que a associação com melatonina possa reduzir a tolerância e hiperalgesia induzidas pela morfina, resultante de suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes.

Não foram observadas diferenças significativas no limiar nociceptivo no teste de acetona, talvez por termos utilizado um modelo de dor inflamatória crônica e este teste tem sido mais utilizado para modelos de dor neuropática. No entanto, diferenças significativas no limiar térmico ao frio são geralmente encontradas no período de dor aguda após injeção de CFA (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020), e dor neuropática (YOON *et al.*, 1994). Nas condições utilizadas neste estudo, não houve interação na alodinia ao frio (teste da acetona) em relação ao modelo, melatonina e morfina. Como já sugerido em outros estudos, a alodinia/hiperalgesia ao frio estaria relacionada principalmente à neurotoxicidade aguda, enquanto a alodinia/hiperalgesia mecânica refletiria a neurotoxicidade crônica (LING *et al.*, 2007; SAKURAI *et al.*, 2009). Além disso, a eficácia reduzida de opioides comumente associada a condições de dor neuropática, a morfina não conseguiu atingir 50% de eficácia na hipersensibilidade ao frio em camundongos SPARC-null em um estudo anterior (ORTIZ *et al.*, 2012).

Em nosso estudo, não encontramos efeito do modelo, morfina e/ou melatonina na locomoção dos ratos. Acredita-se que a atividade locomotora em campo aberto seja o resultado

do impulso de exploração e da inibição semelhante à ansiedade do animal em um novo ambiente. À medida que a dor inflamatória se desenvolve e a dor aumenta, seria de esperar uma diminuição concomitante do comportamento exploratório. A inflamação reduz a locomoção ou movimentos voluntários em camundongos e ratos (COBOS *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2012). Ao contrário desses relatos, no presente estudo, a hiperalgesia mecânica não está relacionada à hiperlocomoção. Assim, os movimentos voluntários e exploratórios podem ser específicos ao tipo de dor. Além disso, evidências sugerem que a via dopaminérgica mesoacumbente não parece ser crucial para a hiperlocomoção induzida por opioides. Nossos resultados corroboram com um estudo anterior, cujo tratamento com melatonina não alterou a atividade locomotora (GOLUS; KING, 1981).

No presente estudo, houve interação de alguns fatores do teste do labirinto em cruz elevado em relação ao modelo, morfina e/ou melatonina. Uma revisão de literatura com foco na administração de melatonina durante período perioperatório mostrou efeitos ansiolíticos e analgésicos significativos (ANDERSEN *et al.*, 2014). No geral, a melatonina é uma intervenção relevante e segura em tratamentos de sintomas depressivos, de ansiedade e transtornos do sono (MARSEGLIA *et al.*, 2015). É importante notar que o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico é bem conhecido por mediar os efeitos da morfina (NARANJO; TREMBLAY; BUSTO, 2001). Além disso, extensas evidências indicam que o sistema dopaminérgico mesolímbico, mesocortical e nigroestriatal está envolvido na mediação do estresse, medo ou ansiedade (BIGGIO *et al.*, 1990). Em um estudo anterior mostrou que a microinjeção de morfina não teve efeito sobre comportamentos semelhantes à ansiedade (ZARRIDAST *et al.*, 2008). Em contrapartida, de acordo com os resultados de estudos anteriores, a morfina, via receptores opioides  $\mu$ , exerce efeitos ansiolíticos, provavelmente por interagir com o sistema GABAérgico (SASAKI *et al.*, 2002).

Estes resultados preliminares, relacionados a hiperalgesia mecânica induzida pelo modelo de dor orofacial inflamatória, permitem concluir que a melatonina é capaz de potencializar a analgesia induzida pela morfina e este efeito permanece por pelo menos 24h após o final do tratamento, assim como a analgesia induzida pela melatonina *per se*, que necessita de doses repetidas para induzir efeito analgésico. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos na avaliação da hiperalgesia térmica e no campo aberto. Os dados do labirinto em cruz elevado sugerem uma interação entre modelo, morfina e melatonina, podendo indicar efeitos ansiolíticos e analgésicos da morfina e melatonina. Mais estudos estão em andamento para aumentar o número de animais e melhor entender os efeitos observados.

## 9. CONCLUSÕES GERAIS

- Nesta dissertação foram estabelecidos importantes parâmetros nociceptivos, comportamentais e neuroquímicos do modelo de dor orofacial induzido por CFA, replicando alterações observadas em seres humanos com doenças inflamatórias da ATM.
- O modelo de dor orofacial é capaz de induzir diminuição no limiar nociceptivo mecânico a partir do D7 até D23 após a injeção de CFA.
- No teste OPAD, os animais apresentaram redução no número de lambidas, caracterizando hiperalgesia térmica;
- Não foi observada diferença entre os grupos no número e tempo de grooming no teste de acetona, que é usado para avaliar alodinia ao frio.
- 25 dias após a injeção a dor não estava mais presente e não foram observadas diferenças significativas nos níveis de IL-1 $\beta$  e IL-10 em gânglio trigeminal;
- A inflamação induzida por CFA produziu uma diminuição nos níveis de BDNF em gânglio trigeminal;
- O modelo de injeção intra-articular de CFA induz alterações distintas nos tecidos moles, incluindo infiltrado de células inflamatórias, formação precoce de pannus e espessamento do disco articular;
- Mais estudos utilizando o referido modelo devem ser estimulados para melhor caracterizar os mecanismos subjacentes à artrite da ATM e aumentar o conhecimento atual das doenças da ATM;
- A análise dos presentes dados é consistente com a hipótese de que a administração de CFA na ATM em ratos usando injeções intra-articulares locais pode ser utilizada para avaliar alterações agudas e crônicas que mimetizam a artrite inflamatória da ATM, possibilitando modificações no modelo conforme necessário para estudos posteriores.
- Os resultados preliminares relacionados aos efeitos dos fármacos na hiperalgesia mecânica permitem concluir que a melatonina é capaz de potencializar a analgesia induzida pela morfina, e este efeito permanece por pelo menos 24h após o final do tratamento;
- A melatonina não apresentou efeito agudo nos animais com dor e necessita de doses repetidas para induzir analgesia *per se*, no entanto, seu efeito permanece pelo menos até 24h após o final do tratamento;

- A morfina e a melatonina apresentam efeitos temporalmente estado específico em relação a hiperalgesia mecânica;
- Vinte e quatro horas após o final do tratamento a analgesia induzida pela morfina não está mais presente, no entanto a analgesia induzida pela associação de melatonina com morfina continua presente;
- No tempo experimental utilizado não foi possível observar hiperalgesia induzida pela morfina.
- No teste de alodinia ao frio (teste da acetona) e na locomoção (teste do campo aberto) não foram observados efeitos do modelo de dor ou dos fármacos.
- No teste de comportamento do tipo ansioso (labirinto em cruz elevado), foi observado interação entre modelo, morfina e melatonina, podendo indicar efeitos ansiolíticos e analgésicos da morfina e melatonina.

## REFERÊNCIAS

ALMELA, P. *et al.* Naloxone-precipitated morphine withdrawal evokes phosphorylation of heat shock protein 27 in rat heart through extracellular signal-regulated kinase. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. v. 51, p. 129-39, julho 2011.

AVIRAM, J.; SHOCHAT, T.; PUD, D. Pain perception in healthy young men is modified by time-of-day and is modality dependent. **Pain Medicine**. v. 16, n. 6, p. 1137-1144, junho 2015.

BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **Lancet neurology**. v. 9, n. 8, p. 807–19, agosto 2010.

BASBAUM, A. I.; JESSELL, T. M. Pain. In: KANDEL, E R. **Principles of neural science**. 5. ed. Nova Iorque: McGraw-Hill, 2013. Cap. 24. p. 530-555.

BENETTI, F. *et al.* Effects of neonatal novelty exposure on sexual behavior, fear, and stress-response in adult rats. **Developmental psychobiology**. v. 49, n.3, p. 258-264, abril 2007.

BENOLIEL, R.; SHARAV, Y. Chronic orofacial pain. **Curr Pain Headache Rep**. 14:33-40, fevereiro 2010.

BERTA, T. *et al.* Gene expression profiling of cutaneous injured and non-injured nociceptors in SNI animal model of neuropathic pain. **Science Report**. v. 7, agosto 2017.

BICKLER, P. E.; FAHLMAN, C. S. The inhaled anesthetic, isoflurane, enhances Ca<sup>2+</sup>-dependent survival signaling in cortical neurons and modulates MAP kinases, apoptosis proteins and transcription factors during hypoxia. **Anesthesia and Analgesia**. v. 103, n. 419, p. 419–429, agosto 2006.

BLOOD-SIEGFRIED, J. Animal Models for Assessment of Infection and Inflammation: Contributions to Elucidating the Pathophysiology of Sudden Infant Death Syndrome. **Frontiers in Immunology**. v. 30, n. 6, p. 137, março 2015.

BOZIC, M.; VALDIVIELSO, J. M. The potential of targeting NMDA receptors outside the CNS. **Expert Opin Ther Targets**. v. 19, n. 3, p. 399–413, 2015.

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. Brasília, DF, 2018.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 2008.

BRITTON, D. R.; BRITTON, K. T. A sensitive open field measure of anxiolytic drug activity. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 15, n. 4, p. 577-582, outubro 1981.

CAMINSKI, E. S. *et al.* Analgesic effects of the CTK 01512-2 toxin in different models of orofacial pain in rats. **Pharmacol Rep PR**. 72:600, junho 2020.

CAMPBELL, J. N.; MEYER, R. A. Mechanisms of neuropathic pain. **Neuron**. v. 52, p. 77–92, outubro 2006.

CHOI, Y. *et al.* Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. **Pain**. v. 59, p. 369–376, 1994.

COUNCIL, N. R. **Guide for the care and use of laboratory animals**. 8. ed. Washington: National Academies Press, 2010.

DAMBISYA, Y. M.; LEE, T. L. Role of nitric oxide in the induction and expression of morphine tolerance and dependence in mice. **British journal of pharmacology**. v. 117, n. 5, p. 914-918, março 1996.

DIBONAVENTURA, M. D. *et al.* The prevalence of probable neuropathic pain in the US: results from a multimodal general-population health survey. **Journal of Pain Research**. v. 10, p. 2525–2538, novembro 2017.

DRASTICHOVA, Z. *et al.* Global changes in the rat heart proteome induced by prolonged morphine treatment and withdrawal. **PLoS One**. v. 7, outubro 2012.

DUNNE, F. J. *et al.* Pain and pain syndromes. **British Journal of Hospital Medicine (London)**. v. 79. n. 8, p. 449–453, agosto 2018.

FAN, Y. *et al.* Role of endogenous melatoninergetic system in development of hyperalgesia and tolerance induced by chronic morphine administration in rats. **Brain research bulletin**. v. 135, p. 105-112, outubro 2017.

FERRARA, J. I. Jr *et al.* Photobiomodulation-induced analgesia in experimental temporomandibular disorder involves central inhibition of fractalkine. **Lasers Med Sci**. v. 34 p. 1841, dezembro 2019.

FIELDS, H. L. The doctor's dilemma: opiate analgesics and chronic pain. **Neuron**. v. 69, n. 4, p. 591–594, fevereiro 2011.

FISHMAN, S. M. *et al.* Core competencies for pain management: Results of an interprofessional consensus summit. **Pain Medicine**. v. 14, p. 971-981, julho 2013.

FRUHSTORFER, H.; GROSS, W.; SELBMANN, O. Von Frey hairs: New materials for a new design. **European Journal of Pain**. v. 5, n. 3, p. 341–342, 2001.

FUENTES, R. *et al.* Injection in temporomandibular joint of rats. Description of technical protocol. **Polish Journal of Veterinary Sciences**. v. 20, n. 2, p. 207–211, março 2017.

GARATTINI, E. G. *et al.* Propargylglycine decreases neuro-immune interaction inducing pain response in temporomandibular joint inflammation model. **Nitric Oxide Biol Chem**. 93:90, dezembro 2019.

GOULD, T. D.; DAO, D. T.; KOVACSICS, C. E. The open field test. Mood and anxiety related phenotypes in mice: Characterization using behavioral tests. **Neuromethods**. p. 1-20, julho 2009.

GUZMAN-SILVA, M. A. *et al.* Tramadol minimizes potential pain during post-oophorectomy in Wistar rats. **AATEX**. (14), 91–92, agosto 2007.

HALL-FLAVIN, D. K. **Is there a link between pain and depression? Can depression cause physical pain?** 2016. Disponível em: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/depression/expert-answers/pain-and-depression/faq-20057823>. Acesso em: 21 mar. 2022.

HANSEN, K.B. *et al.* NMDA receptors in the central nervous system. **Methods Mol Biol**. v. 1677, p. 1–80, 2017.

HASSANIPOUR, M. *et al.* Sumatriptan effects on morphine-induced antinociceptive tolerance and physical dependence: The role of nitric oxide. **European Journal of Pharmacology**. v. 15, p. 835, p. 52-60, setembro 2018.

HESTEHAVE, S. *et al.* The analgesic efficacy of morphine varies with rat strain and experimental pain model: implications for target validation efforts in pain drug discovery. **European Journal of Pain**. v. 23, p. 539-554, março 2019.

HOLSON, R. R. Euthanasia by decapitation: Evidence that this technique produces prompt, painless unconsciousness in laboratory rodents. **Neurotoxicology and Teratology**. 14, p. 253–257, julho-agosto 1992.

HOSSEINZADEH A. *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) signaling pathways and protective roles of melatonin. **Life sciences**. v. 201, p. 17- 29, maio 2018.

HOSSEINZADEH, A. *et al.* Molecular aspects of melatonin treatment in tinnitus: A review. **Current drug targets**. v. 20, n. 11, p. 1112-1128, 2019.

IMBE, H.; REN, K. Orofacial deep and cutaneous tissue inflammation differentially upregulates preprodynorphin mRNA in the trigeminal and paratrigeminal nuclei of the rat. **Brain Res Mol Brain Res**. 67:87-97, abril 1999.

ITO, R. *et al.* Tumor Necrosis factor Alpha signaling in trigeminal ganglion contributes to mechanical hypersensitivity in Masseter Muscle during temporomandibular joint inflammation. **J Oral Facial Pain Headache**. 32:75, 2018.

IVANUSIC, J. J. *et al.* Peripheral N-methyl-d-aspartate receptors contribute to mechanical hypersensitivity in a rat model of inflammatory temporomandibular joint pain. **Eur J Pain Lond Engl**. 15:179, fevereiro 2011.

JIN, Y-Z. *et al.* Connexin 43 contributes to temporomandibular joint inflammation induced-hypernociception via sodium channel 1.7 in trigeminal ganglion. **Neurosci Lett**. 707:134301, agosto 2019.

JOSEPH, H.; STANCLIFF, S.; LANGROD, J. Methadone maintenance treatment (MMT): a review of historical and clinical issues. **The Mount Sinai journal of medicine**. v. 67, n. 5-6, p. 347-364, outubro-novembro 2000.

- KIM, S. H. *et al.* Infliximab partially alleviates the bite force reduction in a mouse model of temporomandibular joint pain. **Journal of Korean Medical Science**. 30(5): 552–558, maio 2015.
- KO, J. S. *et al.* Spinal activity of interleukin 6 mediates myelin basic protein-induced allodynia. **Brain Behaviour Immun**. v. 56, p. 378–389, agosto 2016.
- KOOB, G. F.; SANNA, P. P.; BLOOM, F. E. Neuroscience of addiction. **Neuron**. v. 21, n. 3, p. 467-476, setembro 1998.
- KOOP, L. K. *et al.* Central role of Protein Kinase A in Promoting trigeminal nociception in an in Vivo model of temporomandibular disorders. **J Oral Facial Pain Headache**. 31:264, verão 2017.
- KRYZANOWSKA, A.; AVEDAÑO, C. Behavioral testing in rodent models of orofacial neuropathic and inflammatory pain. **Brain and Behavior**. v. 2, n. 5, p. 678-697, setembro 2012.
- KUFFLER, D. P. Injury-Induced Effectors of Neuropathic Pain. **Mol Neurobiol**. P. 1-16, janeiro 2020.
- KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nat Med**. v. 16, n. 11, p. 1258 – 66, novembro 2010.
- LASTE, G. *et al.* After-effects of consecutive sessions of transcranial direct current stimulation (tDCS) in a rat model of chronic inflammation. **Experimental Brain Research**. v. 221, n. 1. p. 75–83, agosto 2012.
- LERMAN, S. F. *et al.* Longitudinal associations between depression, anxiety, pain, and pain-related disability in chronic pain patients. **Psychosomatic Medicine**, v. 77, n. 3, 333–341, abril 2015.
- LIN, S. *et al.* Melatonin reverses morphine tolerance by inhibiting microglia activation and HSP27 expression. **Life sciences**. v. 152, p. 38-43, maio 2016.
- LIPNIK-STANGELJ, M. Mediators of inflammation as targets for chronic pain treatment. **Mediators Inflamm**. 2013:783235, novembro 2013.
- LIPPE, P. M. *et al.* The First National Pain Medicine Summit – final summary report. **Pain Medicine**. v. 11, p. 1447-1468, outubro 2010.
- LOFTUS, E. V.; SANDBORN, W. J. Epidemiology of inflammatory bowel disease. **Gastroenterol Clin North Am**. v. 31, p. 1–20, março 2002.
- LUE, W. M. *et al.* The role of nitric oxide in the development of morphine tolerance in rat hippocampal slices. **European journal of pharmacology**. v. 383, n. 2, p. 129-35, outubro 1999.



MA, F. *et al.* Orofacial neuropathic pain mouse model induced by Trigeminal Inflammatory Compression (TIC) of the infraorbital nerve. **Molecular Brain**. v. 5, n. 44, dezembro 2012.

MAGNI, G. *et al.* P2Y2 receptor antagonists as anti-allodynic agents in acute and sub-chronic trigeminal sensitization: Role of satellite glial cells. **Glia** 63:1256, julho 2015.

MAI, J. *et al.* Oral application of bulleyaconitine A attenuates morphine tolerance in neuropathic rats by inhibiting long-term potentiation at C-fiber synapses and protein kinase C gamma in spinal dorsal horn. **Molecular Pain**. v. 16, p. 1-11, janeiro-dezembro 2020.

MALCANGIO, M. Role of the immune system in neuropathic pain. **Scandinavian Journal of Pain**. v. 20,1 p. 33-37, dezembro 2019.

MARTINEZ-LAORDEN, E. *et al.* Morphine withdrawal activates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and heat shock protein 27 in the left ventricle: the role of extracellular signal-regulated kinase. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 342, p. 665-675, setembro 2012.

MATTHEWS, B. Peripheral and Central Aspects of Trigeminal Nociceptive Systems. **Philos. Trans. R. Soc. B Boil. Sci**. v. 308, p. 313–324, fevereiro 1985.

MEACHAM, K. *et al.* Neuropathic pain: central vs. peripheral mechanisms. **Curr Pain Headache Rep**. v. 21, p. 28, junho 2017.

MEHRZADI, S. *et al.* Mitochondrial dysfunction in age-related macular degeneration: melatonin as a potential treatment. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**. v. 24, n. 4, p. 359-378, abril 2020.

MELO JUNIOR, J. M. *et al.* Acute and neuropathic orofacial antinociceptive effect of eucalyptol. **Inflammopharmacology**. v. 25 p.247-254, abril 2017.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Pain terms. In: **Descriptions of Chronic Pain**. 2. ed. IASP Press, 2011.

MOTAGHINEJAD, M.; MOTAGHINEJAD, O.; HOSSEINI, P. Attenuation of morphine physical dependence and blood levels of cortisol by central and systemic administration of ramelteon in rat. **Iranian journal of medical sciences**. v. 40, n. 3, p. 240, maio 2015.

NARITA, M. *et al.* Neuronal protein kinase C $\gamma$ -dependent proliferation and hypertrophy of spinal cord astrocytes following repeated in vivo administration of morphine. **European Journal of Neuroscience**. v. 19, n. 2, p. 479-484, janeiro 2004.

NAKAMURA, M. *et al.* Investigation of chronic musculoskeletal pain (third report): with special reference to the importance of neuropathic pain and psychogenic pain. **Journal of Orthopaedic Science**. v. 19, n. 4, p. 667–675, julho 2014.

NICOT, R. *et al.* A systematic Review of Rat Models With Temporomandibular Osteoarthritis Suitable for the Study of Emerging Prolonged Intra-Articular Drug Delivery Systems. **Oral and Maxillofacial Surgery**. v. 79,8 p. 1650-1671, agosto 2021.

NIN, M. S. *et al.* Anxiolytic effect of clonazepam in female rats: grooming microstructure and elevated plus maze tests. **European journal of pharmacology**. v. 684, n. 1, p. 95-101, junho 2012.

OLIVIERO, F. *et al.* Anti-inflammatory effects of polyphenols in arthritis. **J Sci Food Agric**. v. 98,5 p. 1653-1659, março 2018.

OKAMOTO, K. *et al.* Persistent monoarthritis of the temporomandibular joint region enhances nocifensive behavior and lumbar spinal Fos expression after noxious stimulation to the hindpaw in rats. **Exp Brain Res**. v. 170, n. 3, p. 358-367, abril 2006.

PAOLETTI, P.; BELLONE, C.; ZHOU Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 6, p. 383–400, 2013.

PHILIPPE, L. *et al.* Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats. **Am J Physiol**. v. 273, n. 4, p. 1550–6, outubro 1997.

RAGHAVENDRA, V.; KULKARNI, S. K. Reversal of morphine tolerance and dependence by melatonin: possible role of central and peripheral benzodiazepine receptors. **Brain research**. v. 834, n. 1-2, p. 178-181, julho 1999.

RAGHAVENDRA, V.; KULKARNI, S. K. Possible mechanisms of action in melatonin reversal of morphine tolerance and dependence in mice. **European journal of pharmacology**. v. 409, n. 3, p. 279-89, dezembro 2000.

RAJA, S. N. *et al.* The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**. v. 161, n. 9, p. 1976-1982, setembro 2020.

ROBIN, D. M. C. Establishment of a rat model of temporomandibular joint osteoarthritis using intraarticular injection of complete Freund's Adjuvant. **Proceeding ICMHS**. p. 190-193, janeiro 2017.

ROECKEL, L-A. *et al.* Morphine-induced hyperalgesia involves mu opioid receptors and the metabolite morphine-3-glucuronide. **Scientific reports**. v. 7,1 10406, setembro 2017.

ROMERO-REYES, M. *et al.* Spontaneous behavioral responses in the orofacial region: a model of trigeminal pain in mouse. **Headache**. v. 53, p. 137-151, janeiro 2013.

ROZISKY, J. R. *et al.* Long-term effect of morphine administration in young rats on the analgesic opioid response in adult life. **International Journal of Developmental Neuroscience**. v. 26, n. 6, p. 561-565, outubro 2008.

ROZISKY, J. R. *et al.* Melatonin as a potential counter-effect of hyperalgesia induced by neonatal morphine exposure. **Neuroscience Letters**. v. 633, p. 77-81, outubro 2016.

SAFFAR, S. *et al.* The effect of epigallocatechin-3-gallate on morphine-induced memory impairments in rat: EGCG effects on morphine neurotoxicity. **Human & experimental toxicology**. v. 39,7, p. 994-1002, julho 2020.

SANTOS, B. M. *et al.* The therapeutic potential of cystathionine gamma-lyase in temporomandibular inflammation-induced orofacial hypernociception. **Physiol Behav.** v. 188, p. 128-133, maio 2018.

SANZ, O. *et al.* Expression of 27 kDa heat shock protein (Hsp27) in immature rat brain after a cortical aspiration lesion. **Glia.** v. 36, p. 259-270, dezembro 2001.

SCARABELOT, V. L. *et al.* Melatonin Alters the Mechanical and Thermal Hyperalgesia Induced by Orofacial Pain Model in Rats. **Inflammation.** v. 39, n. 5, p. 1649-1659, outubro 2016.

SCARABELOT, V. L. *et al.* Transcranial direct-current stimulation reduces nociceptive behaviour in an orofacial pain model. **J Oral Rehabil.** v. 46,1 p. 40-50, janeiro 2019.

SHANTHANNA, H. Intravenous therapies in the management of neuropathic pain: a review on the use of ketamine and lidocaine in chronic pain management. In: Chukwunonye Udeagha C, editor. **Neuropathic Pain.** Rijeka: InTech. p. 41–78, 2012.

SIQUEIRA-LIMA, P. S. *et al.* Natural products assessed in animal models for orofacial pain – a systematic review. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 27 p. 124-134, janeiro-fevereiro 2017.

SMITH, W. Responses of laboratory animals to some injectable anaesthetics. **Lab. Anim.** v. 27, p. 30–39, janeiro 1993.

SONG, L.; WU, C.; ZUO, Y. Melatonin prevents morphine-induced hyperalgesia and tolerance in rats: role of protein kinase C and N-methyl-D-aspartate receptors. **BMC Anesthesiology.** v. 15, n. 12, p. 1-8, janeiro 2015.

SOTO-VEGA, E. *et al.* Melatonin stimulates calmodulin phosphorylation by protein kinase C. **Journal of pineal research.** v. 37, n. 2, p. 98-106, setembro 2004.

SPEARS, R. *et al.* Temporal changes in inflammatory mediator concentrations in an adjuvant model of temporomandibular joint inflammation. **J Orofac Pain.** v. 19, n. 1, p. 34-40, 2005.

SU, J. *et al.* Acid-sensing Ion Channels Activation and Hypoxia Upregulate Homer1a Expression. **CNS Neurosci Ther.** v. 20, n. 3, p. 264-274, março 2014.

TORRES, I. *et al.* Long-lasting delayed hyperalgesia after chronic restraint stress in rats-effect of morphine administration. **Neuroscience Research.** v. 45, n. 3, p. 277–283, março 2003.

TOTSCH, S. K.; SORGE, R. E. Immune system involvement in specific pain conditions. **Mol Pain.** v. 13, p. 1–17, janeiro-dezembro 2017.

VAILLANCOURT, C.; BERGER, N.; BOKSA, P. Effects of vaginal birth versus caesarean section birth with general anesthesia on blood gases and brain energy metabolism in neonatal rats. **Exp. Neurol.** v. 160(1) p. 142-150, novembro 1999.

VAN NOORT, J. M. Stress proteins in CNS inflammation. **Journal of Pathology.** v. 214, p.

267-275, janeiro 2008.

VAN RIJN, C. *et al.* Decapitation in rats: Latency to unconsciousness and the “wave of death”. **PLoS ONE**. v. 6, n. 1, p. 1–6, janeiro 2011.

VIVANCOS, G. G. *et al.* An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 37, n. 3, p. 39139–9, março 2004.

VOLKOW, N. D.; MCLELLAN, T. Opioid Abuse in Chronic Pain — Misconceptions and Mitigation Strategies. **The New England Journal of Medicine**. v. 374, p. 1253-1263, março 2016.

VYKLIČKY, V. *et al.* Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. **Physiol Res**. v. 63, p. S191–203, 2014.

WANG, S. *et al.* Exacerbated mechanical hyperalgesia in rats with genetically predisposed depressive behavior: role of melatonin and NMDA receptors. **Pain**. v. 153, n. 12, p. 2448-57, dezembro 2012.

WANG, D. *et al.* Response of the temporomandibular joint tissue of rats to rheumatoid arthritis induction methods. **Journal of Dental Science**. v. 12, n. 1, p. 1-8, março 2017.

WEI, Y. M.; XU, Y.; YU, C. X. Effect of melatonin on the content of beta-endorphin in the hypothalamic arcuate nucleus and periaqueductal grey of midbrain in morphine withdrawal mice. **Acta physiologica Sinica**. v. 59, n. 6, p. 765-769, dezembro 2007.

WIDDIFIELD, J. *et al.* The epidemiology of rheumatoid arthritis in Ontario, Canada. **Arthritis Rheumatol**. v. 66, n. 4, p. 786–793, abril 2014.

WOOD, A. K. *et al.* Prolonged general anesthesia in MR studies of rats. **Acad. Radiol**. v. 8(11) p. 1136-1140, novembro 2001.

WOOLF, C. J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**. v. 152, p. S2–15, 2011.

WONG, R. H.; FARHAT, H. I. Charcot–Marie–Tooth and trigeminal neuralgia. **Clin. Neurol. Neurosurg**. v. 115, p. 2234–2235, outubro 2013.

WU, S. *et al.* Dorsal root ganglion transcriptome analysis following peripheral nerve injury in mice. **Mol Pain**. v. 12, n. 1-14, março 2016.

YOUSAF, F. *et al.* Efficacy and safety of melatonin as an anxiolytic and analgesic in the perioperative period: a qualitative systematic review of randomized trials. **Anesthesiology**. v. 113, n. 4, p. 968–976, outubro 2010.

ZAHN, P. K. *et al.* Gene expression and functional characterization of melatonin receptors in the spinal cord of the rat: implications for pain modulation. **Journal of pineal research**. v. 35, n. 1, p. 24-31, agosto 2003.

ZAMANILLO, D. *et al.* Sigma 1 receptor: a new therapeutic target for pain. **Eur J Pharmacol.** v. 716, n. 1-3, p. 78–93, setembro 2013.

ZHAO, J. *et al.* Molecular and cellular mechanisms of the age-dependency of opioid analgesia and tolerance. **Molecular pain.** v. 8, n. 38, maio 2012.

ZHOU, Y. H.; HUO, Z. Y.; QIU, X. C. Inhibitory effect of melatonin on morphine withdrawal syndromes and the content of NO in plasma and brain tissue in morphine dependent mice. **Acta pharmaceutica Sinica.** v. 37, n. 3, p. 175-177, março 2002.

ZÚÑIGA-ROMERO, A. *et al.* Combination of diacerhein and antiepileptic drugs after local peripheral, and oral administration in the rat formalin test. **Drug Dev Res.** v. 75, p. 510–520, dezembro 2014.

## ANEXOS/APÊNDICES

### Carta de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



**HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**  
**Grupo de Pesquisa e Pós Graduação**

**Carta de Aprovação**

Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

**Projeto:** 2020/0689

**Título:** EFEITO DA MELATONINA NA HIPERALGESIA E TOLERANCIA INDUZIDAS PELA MORFINA EM RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE DOR CRÔNICA OROFACIAL: PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS

**Pesquisador Responsável:** IRACI LUCENA DA SILVA TORRES

**Equipe de Pesquisa:**

DIRSON JOAO STEIN

CRISTINA BALENSIEFER VICENZI

**Data de Aprovação:** 14/07/2021

**Data de Término:** 31/12/2022

Espécie/Linhagem	Sexo/Idade	Quantidade	Data Reunião	Documento
RATO HETEROGÊNICO	M/60 Dia(s)	98	13/07/2021	Projeto

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.



Assinado digitalmente por:  
PATRICIA ASHTON PROLLA  
Grupo de Pesquisa e Pós-graduação  
19/07/2021 09:41:32