

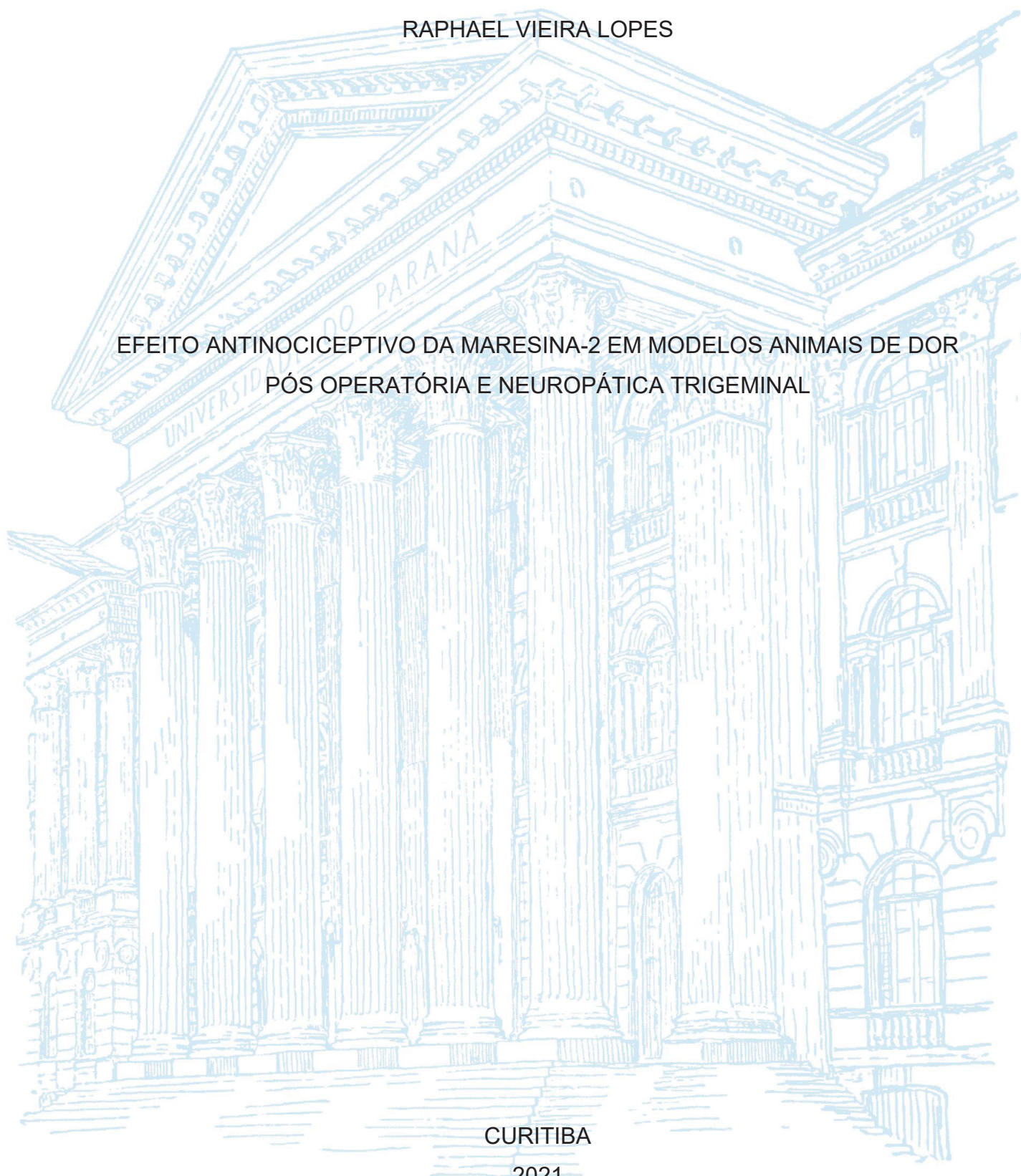
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RAPHAEL VIEIRA LOPES

EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA MARESINA-2 EM MODELOS ANIMAIS DE DOR
PÓS OPERATÓRIA E NEUROPÁTICA TRIGEMINAL

CURITIBA

2021



RAPHAEL VIEIRA LOPES

EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA MARESSINA-2 EM MODELOS ANIMAIS DE DOR
PÓS OPERATÓRIA E NEUROPÁTICA TRIGEMINAL

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Geremias Chichorro

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Lopes, Raphael Vieira

Efeito antinociceptivo da maresina-2 em modelos animais de dor pós-operatória e neuropática trigeminal. / Raphael Vieira Lopes. – Curitiba, 2021.

56 p.: il.

Orientadora: Juliana Geremias Chichorro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Dor pós-operatória. 2. Hiperalgesia. 3. Lipídeos. 4. Atividade antinociceptiva. 5. Medição da dor. I. Título. II. Chichorro, Juliana Geremias, 1975-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (22. ed.) 616.0472



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
40001016038P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **RAPHAEL VIEIRA LOPES** intitulada: **EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA MARESINA-2 EM MODELOS ANIMAIS DE DOR PÓS OPERATÓRIA E NEUROPÁTICA TRIGEMINAL**, sob orientação da Profa. Dra. JULIANA GEREMIAS CHICHORRO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 23 de Setembro de 2021.

Assinatura Eletrônica

23/09/2021 14:05:09.0

JULIANA GEREMIAS CHICHORRO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

23/09/2021 12:56:47.0

JOICE MARIA DA CUNHA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

23/09/2021 14:34:45.0

WALDICEU APARECIDO VERRI JUNIOR

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA)

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531990 - Tel: (0xx41)3361-1693 - E-mail: pgfarmacologia@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 112956

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 112956

À minha família e amigos, que sempre me incentivaram e impulsionaram a ser sempre a melhor versão de mim, acreditando em todo meu potencial e me fazendo enxergá-lo, mesmo quando estava escuro.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Juliana Geremias Chichorro, pela oportunidade, pelos valiosos ensinamentos, pela paciência e carinho que me possibilitaram realizar esse estudo e evoluir muito pessoal e profissionalmente;

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Joice Maria da Cunha e Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Jr por terem aceito o convite, por suas considerações, correções, e sugestões as quais agregaram muito a este trabalho;

Aos meus queridos amigos César, David, Elaine, Eliúde, Kaio, Nicolas, Paola por todo amor e incentivo;

À Dra. Camila Rodriguez Ferraz, por toda a colaboração nos experimentos e correções;

Às estimadas Dras. Érika Araya e Joelle Turnes pelo auxílio em experimentos, assim como no meu aprendizado inicial no laboratório;

À minha querida amiga e irmã científica Vanessa Bordenowsky Pereira Lejeune por todas as mensagens de incentivo, pelo carinho, cumplicidade, parceria, e as ilustrações desse trabalho;

Aos amigos e equipe do grupo Orofacial Pain: Carlos, Darci, Fernanda, Gianna, Laura, Nathalya e Wagner pela boa companhia, momentos de descontração, colaboração do dia a dia e pela paciência nos momentos difíceis;

A todos os amigos, colegas, professores e funcionários do Departamento de Farmacologia da UFPR;

Aos funcionários do biotério, por sempre estarem à disposição para auxiliar no que fosse preciso;

À minha mãe Elaine, pela vida, pela educação, pelo amor e pelo incentivo diário; à família, em especial minha irmã Mariane, pela ajuda, pelo afeto e apoio em todo momento;

Aos ratos e camundongos que serviram à ciência dando sua vida para a realização desse estudo;

Agradecimento ao fomento PRONEX: Programa de Apoio a Grupos de Excelência (PRONEX) e SETI / Fundação Araucária e MCTI / CNPq, Governo do Estado do Paraná (convênio 014/2017, protocolo 46.843) e CAPES.

Central de Central Multiusuários de Laboratórios de Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina (CMLP-UEL) pelas análises com microscopia confocal.

À todos os que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho, assim como na minha evolução pessoal e profissional durante o período de mestrado.

Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?

Fernando Pessoa

RESUMO

A dor é um sintoma comum associado a distúrbios que envolvem as estruturas orofaciais. A maioria das condições dolorosas orofaciais agudas são facilmente reconhecidas, mas o tratamento farmacológico pode ser limitado pelos eventos adversos dos fármacos atualmente disponíveis e/ou pelas características dos pacientes. Além disso, as condições de dor orofacial crônica representam desafios clínicos tanto em termos de diagnóstico quanto de tratamento. Sendo assim, torna-se importante a busca de novas alternativas terapêuticas, as quais contornem as limitações existentes. Nesse sentido, evidenciam-se os lipídeos pró-resolução especializados (do inglês, SPMs, specialized pro-resolving mediators) como uma alternativa promissora de tratamento no controle do processo inflamatório e de outras doenças. Esses mediadores químicos endógenos são biossintetizados na fase de resolução da inflamação, e agem modulando a resposta imune do indivíduo ao interagir com receptores acoplados a proteína G presentes em células de defesa e de neurônios. Além de seus efeitos anti-inflamatórios e pró-resolução, há evidências crescentes de que os SPMs podem atuar reduzindo a severidade de outras condições patológicas, entre elas doenças degenerativas, depressão, infecções, dores inflamatórias e crônicas. Em relação ao seu potencial analgésico, foram relatados potentes e prolongados efeitos antialodínicos e antihiperálgicos para alguns desses lipídeos, em especial para a maresina-1 (MaR-1). Contudo, embora semelhantes quimicamente, não se encontram estudos que descrevam esses efeitos também para a maresina-2 (MaR-2). O presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial antinociceptivo da Maresina-2 (MaR-2) em modelos de dor orofacial. O teste de formalina foi realizado em ratos de acordo com trabalhos anteriores realizados por nosso grupo, com o objetivo de obter um *screening* do efeito analgésico da MaR-2. A cirurgia de incisão intraoral (INC) em ratos e a constrição do nervo infraorbital em ratos e camundongos (CCI-ION) foram realizadas conforme publicações anteriores do nosso grupo. O tratamento com Maresina-2 (10 ng) foi feito em dias alternados após o procedimento cirúrgico, totalizando 2 injeções no modelo de INC e 4 injeções no modelo de CCI-ION, sempre via medular subaracnóidea. Foram avaliadas a hiperálgia térmica e mecânica em dias alternados, até 2 dias após o término dos tratamentos. A atividade neuronal foi avaliada através de imunofluorescência para c-Fos e CGRP em camundongos. Uma única injeção de MaR-2 causou redução significativa do *grooming* facial nas fases I e II do teste de formalina orofacial em ratos. Injeções repetidas de MaR-2 preveniram o desenvolvimento de hiperálgia ao calor e hiperálgia mecânica em um modelo de dor pós-operatória em ratos. Em um modelo de dor neuropática trigeminal (i.e., cirurgia de constrição crônica do nervo infraorbital, CCI-ION), o tratamento repetido com MaR-2 reverteu a hiperálgia térmica e a hiperálgia mecânica em ratos e camundongos. A CCI-ION causou aumento de neurônios c-Fos positivos e dos neurônios ativados por CGRP no gânglio trigeminal (TG), que foram restaurados aos níveis basais pelo tratamento repetido com MaR-2. Em conclusão, a MaR-2 tem efeitos analgésicos potentes e de longa duração na dor inflamatória e neuropática de origem orofacial, e a inibição da atividade de neurônios CGRP-positivos no TG pode contribuir para o efeito analgésico da MaR-2.

Palavras-chave: lipídeos pró-resolução especializados; ratos; camundongos; teste da formalina, incisão intraoral, cirurgia de constrição crônica do nervo infraorbital; hiperálgia; c-Fos; CGRP.

ABSTRACT

Pain is a common symptom associated with disorders involving orofacial structures. Most acute orofacial painful conditions are easily recognized, but pharmacological treatment may be limited by adverse events of currently available drugs and/or patient characteristics. In addition, chronic orofacial pain conditions pose clinical challenges both in terms of diagnosis and treatment. Therefore, it is important to search for new therapeutic alternatives, which overcome the existing limitations. In this sense, specialized pro-resolving lipids (SPMs, specialized pro-resolving mediators) are evidenced as a promising alternative treatment for the control of the inflammatory process and other diseases. These endogenous chemical mediators are biosynthesized in the inflammation resolution phase and act by modulating the individual's immune response by interacting with G protein-coupled receptors present in defense cells and neurons. In addition to their anti-inflammatory and pro-resolution effects, there is growing evidence that PMS can act to reduce the severity of other pathological conditions, including degenerative diseases, depression, infections, inflammatory and chronic pain. Regarding its analgesic potential, potent and prolonged anti allodynic and anti hyperalgesic effects have been reported for some of these lipids, especially for maresin-1 (MaR-1). However, although chemically similar, there are no studies that describe these effects also for maresin-2 (MaR-2). This study aimed to investigate the antinociceptive potential of Maresin-2 (MaR-2) in orofacial pain models. The formalin test was performed in rats by previous work carried out by our group, to obtain a screening of the analgesic effect of MaR-2. Intraoral incision surgery (INC) in rats and constriction of the infraorbital nerve in rats and mice (ICC-ION) were performed according to previous publications from our group. Treatment with Maresin-2 (10 ng) was performed every other day after the surgical procedure, totaling 2 injections in the INC model and 4 injections in the CCI-ION model, always via the spinal cord. Thermal and mechanical hyperalgesia was evaluated on alternate days, up to 2 days after the end of treatments. Neuronal activity was evaluated by immunofluorescence for c-Fos and CGRP in mice. A single MaR-2 injection caused a significant reduction in facial grooming in phases I and II of the orofacial formalin test in rats. Repeated MaR-2 injections prevented the development of heat hyperalgesia and mechanical hyperalgesia in a postoperative pain model in rats. In a model of trigeminal neuropathic pain (i.e., surgery for chronic infraorbital nerve constriction, CCI-ION), repeated treatment with MaR-2 reversed thermal hyperalgesia and mechanical hyperalgesia in rats and mice. CCI-ION caused an increase in c-Fos positive neurons and CGRP-activated neurons in the trigeminal ganglion (TG), which were restored to baseline levels by repeated treatment with MaR-2. In conclusion, MaR-2 has potent and long-lasting analgesic effects on inflammatory and neuropathic pain of orofacial origin, and inhibition of the activity of CGRP-positive neurons in TG may contribute to the analgesic effect of MaR-2.

Key words: specialized pro-resolution lipids; rats; mice; formalin test, intraoral incision, surgery for chronic infraorbital nerve constriction; hyperalgesia; c-Fos; CGRP.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS MARESINAS 1 E 2.	24
FIGURA 2. MAR-2 REDUZ O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO INDUZIDO POR FORMALINA	32
FIGURA 3. MAR-2 PREVINE O DESENVOLVIMENTO DE HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA NO MODELO DE DOR OROFACIAL PÓS-OPERATÓRIA EM RATOS.....	34
FIGURA 4. MAR-2 REVERTE A HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA EM UM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL EM RATOS.....	36
FIGURA 5. MAR-2 REVERTE A HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA EM UM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL EM CAMUNDONGOS.....	38
FIGURA 6. MAR-2 REDUZ A ATIVAÇÃO DE C-FOS NO GÂNGLIO DO TRIGÊMEO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A CCI-ION.....	40
FIGURA 7. MAR-2 REDUZ A EXPRESSÃO DE NEURÔNIOS POSITIVOS PARA CGRP NO GÂNGLIO DO TRIGÊMEO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A CCI-ION.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

ATM – Articulação temporomandibular

CBZ - Carbamazepina

CCI-ION - Cirurgia de constrição crônica do nervo infraorbital

CDC - Centros de Controle e Prevenção de Doenças

CEUA / BIO-UFPR - Comitê de Ética para Uso de Animais no Setor de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Paraná

CFA - Adjuvante Completo de Freund

c-Fos – Proteína nuclear c-Fos

CGRP - Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina

CONCEA - Conselho Nacional de Controle Animal e Experimentação

DHA – Ácido docosahexaenóico

DPO – Dor pós-operatória

DRG – Gânglio da raiz dorsal

DTM – Disfunções temporomandibulares

EPA – Ácido eicosapentaenóico

FDA - Food and Drug Administration

GPCR - Receptores acoplados a proteína G

IL-1 β – Interleucina 1 *beta*

IL-6 – Interleucina 6

LTA4 - Leucotrieno LTA4

LTB4 - Leucotrieno LTB4

LTM - Neurônios mecanossensoriais de baixo limiar

MaR-1 – Maresina-1

MaR-2 – Maresina-2

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

Nav - Canais de sódio dependentes de voltagem

NFκB – Fator nuclear *kappa* B

NS - Neurônios nociceptivos específicos

NSP - Núcleo sensorial principal

NT - Neuralgia do trigêmeo

NTE - Núcleo do trato espinhal

PMNs - Leucócitos polimorfonucleares

p-NFκB - Fator nuclear *kappa* B fosforilado

SEM - Erro padrão da média

Sham - Falso operado

SNC – Sistema nervoso central

SP – Substância P

Sp5C - Subnúcleo caudalis

SPMs - Mediadores lipídicos especializados pró-resolução

TG - Gânglio do trigêmeo

TNF-α – Fator de necrose tumoral *alfa*

TRPA1 - Receptor de potencial transitório anquirina 1

TRPV1 - Receptor de potencial transitório vanilóide 1

V – Nervo trigêmeo

V1 – Ramo oftálmico do nervo trigêmeo

V2 - Ramo maxilar do nervo trigêmeo

V3 - Ramo mandibular do nervo trigêmeo

WDR - Neurônios de ampla faixa dinâmica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 DORES OROFACIAIS.....	16
1.2 PROCESSAMENTO DAS DORES OROFACIAIS	16
1.3 DOR PÓS-OPERATÓRIA ORAL	18
1.4 DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL.....	19
1.5 LIPÍDEOS PRÓ-RESOLUÇÃO	21
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 ANIMAIS.....	25
3.2 DROGAS E SOLUÇÕES.....	25
3.3 INJEÇÃO MEDULAR SUBARACNÓIDE.....	26
3.4 MODELOS NOCICEPTIVOS	26
3.4.1 Teste de formalina orofacial	26
3.4.2 Modelo de dor pós-operatória oral	27
3.4.3 Modelo de dor neuropática do trigeminal	27
3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS	27
3.5.1 Avaliação da hiperalgesia ao calor	27
3.5.2 Avaliação da hiperalgesia mecânica	28
3.6 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	28
3.7 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	29
3.7.1 Teste de Formalina Orofacial	29
3.7.2 Hiperalgesia térmica e mecânica no modelo de dor orofacial pós-operatória ..	30
3.7.3 Hiperalgesia térmica e mecânica no modelo de CCI-ION	30
3.7.4 Imunofluorescência no gânglio do trigêmeo	31
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4 RESULTADOS.....	32
4.1 MAR-2 REDUZ O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO INDUZIDO POR FORMALINA.	32

4.2 MAR-2 PREVINE O DESENVOLVIMENTO DE HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA NO MODELO DE DOR OROFACIAL PÓS-OPERATÓRIA EM RATOS.....	33
4.3 MAR-2 REVERTE A HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA EM UM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL EM RATOS.....	35
4.4 MAR-2 REVERTE A HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA EM UM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL EM CAMUNDONGOS.	37
4.5 MAR-2 REDUZ A ATIVAÇÃO DE C-FOS NO GÂGLIO DO TRIGÊMEO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A CCI-ION.....	39
4.6 MAR-2 REDUZ A EXPRESSÃO DE NEURÔNIOS POSITIVOS PARA CGRP ATIVADOS NO GÂGLIO DO TRIGÊMEO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A CCI-ION.....	41
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÃO	47
7 REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 DORES OROFACIAIS

A dor orofacial possui prevalência de 10 a 15% na população adulta, sendo um dos tipos mais comuns de dor, superada apenas por dores nas costas, pescoço e joelhos (BIRGITTA et al., 2020; BREIVIK et al., 2006; VON KORFF et al., 1988). Envolve uma grande quantidade de estruturas da cabeça e pescoço, além de aspectos psicossociais e emocionais da dor, já que pode afetar funções básicas do indivíduo como falar, comer, beber e expressar suas emoções (CHICHORRO et al., 2017), tornando-se assim um fator redutor da qualidade de vida.

Dentre os vários tipos de dor, destacam-se a dor inflamatória e a neuropática. Nesse sentido, a dor inflamatória caracteriza-se pelo papel biológico protetivo, pois alerta o indivíduo por meio de estímulo doloroso sobre uma lesão tecidual, induzindo-o a uma reação de proteção (PERGOLIZZI et al., 2013). Já a dor neuropática é uma forma de dor crônica decorrente de lesão ou disfunção no sistema nervoso somatossensorial central ou periférico (CHRISTOPH et al., 2011). Com relação a esses tipos de dor na região craniofacial, a dor inflamatória geralmente está associada a condições dentárias, e a dor crônica a distúrbios musculoesqueléticos, neurológicos e disfunções temporomandibulares (DTM) (BREIVIK et al., 2006; VON KORFF et al., 1988).

O manejo clínico dessas condições dolorosas é complexo e baseado em vários procedimentos farmacológicos e não farmacológicos, como educação em saúde, cuidados pessoais, terapias complementares, farmacoterapia e cirurgias (MELIS et al., 2019). Os resultados são satisfatórios na maioria dos pacientes que possuem dores odontogênicas e DTM, contudo, nos casos que envolvem neuropatias é difícil prever um desfecho clínico.

1.2 PROCESSAMENTO DAS DORES OROFACIAIS

Em sua maioria, os tecidos craniofaciais são inervados pelos ramos do nervo do trigêmeo, e os corpos celulares dos seus neurônios aferentes primários são localizados no gânglio do trigêmeo (TG) (CHICHORRO et al., 2017). Os principais

ramos que compõe o nervo trigêmeo (V) são o oftálmico (V1), maxilar (V2) e mandibular (V3), sendo que os dois primeiros possuem apenas características sensoriais, e o terceiro sensoriais e motoras (SESSLE, 2006). O ramo V1 está associado aos tecidos supraorbitais, meninges e córnea; o ramo V2 inerva a região infraorbital, lábio superior, mucosa maxilar e dentes da arcada superior; já o ramo V3, está relacionado a região da mandíbula, lábio inferior, mucosa mandibular, músculos da mastigação e dentes da arcada inferior (CHICHORRO et al., 2017).

As fibras aferentes primárias que compõe o nervo trigêmeo compreendem receptores ativados por estímulos proprioceptivos ou ativados por estímulos nocivos. Nas primeiras, os mecanorreceptores de baixo limiar estão associados a fibras de grande tamanho (A-beta), normalmente conduzindo informação não dolorosa. Já nas segundas, os receptores podem funcionar como nociceptores, estando ligados a fibras mielinizadas de pequeno diâmetro (A-delta) ou fibras não mielinizadas (C), que conduzem a informação dolorosa (CHICHORRO et al., 2017). A ativação desses diferentes tipos de fibras pode disparar potenciais de ação que são então conduzidos para o sistema nervoso central (SNC).

Quando ativadas, as fibras aferentes primárias, cujos corpos celulares situam-se no TG, conduzem a informação para neurônios de segunda ordem no complexo nuclear sensorial do tronco cerebral. Esse complexo sensorial é dividido em núcleo sensorial principal (NSP) e núcleo do trato espinhal (NTE), sendo que o último possui três subdivisões: subnúcleo *oralis*, *interpolaris* e *caudalis* (SESSLE, 2005). O subnúcleo *oralis* recebe informações proprioceptivas de fibras A-beta e nociceptivas de fibras A-delta e fibras-C, por meio de interneurônios (SESSLE, 2006). Já o subnúcleo *interpolaris* recebe principalmente informações transmitidas via fibras A-delta. Por fim, o subnúcleo *caudalis* (também denominado Sp5C) é a região que recebe a grande maioria das projeções de fibras de pequeno e médio diâmetro, sendo o principal responsável pela transmissão de estímulos dolorosos. Este subnúcleo é o maior dos núcleos somatossensoriais do complexo, sendo contínuo à medula espinhal, e dividido em lâminas assim como ela. Possui semelhanças anatômicas e fisiológicas com o corno dorsal da medula, sendo responsável pelo processamento e convergência da maioria dos estímulos nociceptivos nas regiões da face (DOSTROVSKY, 2006; SESSLE, 2005).

Os aferentes ativados por estímulos táteis fazem sinapses com neurônios mecanossensoriais de baixo limiar (LTM) em todos os subnúcleos sensoriais, já àqueles ativados por estímulos nocivos terminam predominantemente no subnúcleo *caudalis*, ambos fazendo sinapse com neurônios de segunda ordem. Existem dois tipos principais de neurônios de segunda ordem, os nociceptivos-específicos (NS) e os de ampla faixa dinâmica (WDR). Os primeiros são ativados apenas por estímulos nocivos provenientes da ativação dos aferentes nociceptivos A-delta e C. Já os neurônios WDR são ativados por estímulos não nocivos, bem como estímulos nocivos. Os axônios dos neurônios de segunda ordem que conduzem as informações nociceptivas, cruzam para o lado contralateral e ascendem através do trato trigêmino-talâmico para diferentes regiões do tálamo (DOSTROVCKY, 2006). O tálamo é a estrutura mais importante para a distribuição das informações de dor no SNC, e a partir dele, neurônios de terceira ordem projetam-se para diferentes estruturas cerebrais que serão responsáveis pelo processamento dos aspectos sensoriais, cognitivos e afetivos da dor.

A transmissão da nocicepção ainda pode ser modulada pelas vias descendentes do tronco cerebral, em que regiões, tais como a substância cinzenta periaquedutal e estruturas adjacentes ao bulbo rostral ventromedial fazem conexão entre si e atuam inibindo ou facilitando a transmissão nociceptiva ao nível do complexo sensorial trigeminal (CHICHORRO et al., 2017).

1.3 DOR PÓS-OPERATÓRIA ORAL

A dor pós-operatória (DPO) é decorrente de uma lesão tecidual causada por procedimento cirúrgico, sendo classificada como dor inflamatória. As dores desse tipo são resultantes da síntese e liberação de vários mediadores químicos do processo inflamatório, tais como bradicinina, substância P (SP), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), prostaglandinas (PG), histamina, citocinas e aminas simpatomiméticas, os quais podem agir sobre os nociceptores ativando-os e/ou sensibilizando-os (PERGOLIZZI et al., 2013). A intensidade da dor é dependente de vários fatores como tempo de procedimento, local da incisão, porte e intensidade do trauma cirúrgico, bem como estado físico e emocional do paciente (PEREIRA et al., 2013). O controle da dor e do processo inflamatório são essenciais para um

procedimento ambulatorial bem-sucedido, exigindo planejamento pré-operatório, avaliação da intensidade da dor e sedação pós-operatória, e conhecimento da farmacologia dos analgésicos e anti-inflamatórios (PEREIRA et al., 2013). Ademais, existem evidências de que o tratamento não adequado da dor aguda pós-operatória associado a fatores de risco intrínsecos ao paciente, poderá levar à cronificação da dor, e nesse contexto, a dor perderá a característica biológica e protetiva, para tornar-se uma patologia *per se* (PEREIRA et al., 2013).

Na odontologia, muitos procedimentos são realizados por meio de incisões na cavidade oral, ou ainda causam algum tipo de dano nos tecidos da região, trazendo experiências intensamente dolorosas aos pacientes, caso não seja realizada uma analgesia adequada (PEIXOTO, 2011). Nos procedimentos cirúrgicos orais o processamento da informação dolorosa inicia na ativação dos nociceptores periféricos da mucosa oral a partir da incisão (SESSLE, 2005), e a lesão tecidual ocasionada pelo procedimento leva a um processo inflamatório local, que dependendo da extensão do dano, tende a se resolver dentro de alguns dias ou semanas.

O controle farmacológico da DPO pode ser feito de maneira bastante eficiente por meio da associação de fármacos anti-inflamatórios e analgésicos, respeitando sempre a individualidade de cada paciente (PEIXOTO, 2011). Os principais fármacos utilizados são os anti-inflamatórios não esteroidais, cujo uso é limitado pelos efeitos adversos, principalmente a toxicidade gastrointestinal (ANTMAN et al., 2007; BATLOUNI, 2010). Medidas não farmacológicas podem ser adotadas visando contribuir com a farmacoterapia analgésica.

1.4 DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL

A neuralgia do trigêmeo (NT) é uma das principais condições dolorosas neuropáticas da região craniofacial, sendo considerada como uma das piores dores que um indivíduo pode experimentar (JONES et al., 2019). Afeta anualmente de 3 a 14 pessoas por 100.000/ano, e a dor é descrita como aguda, que lembra um choque elétrico ou queimação, em regiões inervadas pelo nervo trigêmeo (GAMBETA et al., 2020). Estímulos simples como toque, escovar os dentes ou usar a musculatura facial para falar e mastigar podem ser gatilhos para o disparo de uma crise dolorosa.

Com base em sua etiologia, a NT pode ser classificada em idiopática, secundária ou clássica. A primeira é causada por motivos desconhecidos, e mesmo depois de exames e procedimentos cirúrgicos para desvendá-los, permanece assim. Na NT secundária, o quadro se desenvolve como consequência de doenças adjacentes, como tumores ou esclerose múltipla. Já na NT clássica, ocorre uma compressão vascular na raiz do nervo trigeminal, a qual ocasiona desmielinização de fibras nervosas, que começam então a disparar ectopicamente (GAMBETA et al., 2020).

Outra hipótese que pode explicar a neuralgia do trigêmeo foi descrita por Devor e seus colaboradores (2002) e denominada “hipótese da ignição”. Segundo esta hipótese, a NT ocorre devido a uma hiperexcitabilidade dos neurônios lesionados, dando origem a descargas anômalas que desencadeiam um fenômeno de “explosões” de atividade neuronal pós-disparo. Estas explosões podem ser desencadeadas por estímulos externos e perpetuar a duração do estímulo doloroso. São então recrutados neurônios que levam a um rápido acúmulo de atividade elétrica no local, caracterizando então uma “explosão elétrica” responsável pela crise de dor, ou seja, o sintoma positivo da neuralgia (DEVOR et al., 2002). Já o sintoma negativo, seria uma consequência da “explosão elétrica”, devido à hiperpolarização dos neurônios, os quais ficariam menos responsivos e/ou refratários a qualquer tipo de estimulação (DEVOR et al., 2002).

Há evidências que os canais de sódio voltagem-dependentes desempenham um papel chave na geração dos disparos ectópicos, incluindo uma regulação negativa de canais Nav 1.3, uma regulação positiva de canais Nav 1.7, ou ainda uma mutação do gene SCN8A, o qual codifica Nav 1.6 (GAMBETA et al., 2020). Além disso, canais de potássio voltagem-dependentes também parecem desenvolver um papel importante em pacientes com NT, onde uma desregulação da tensão controlada por canal de potássio Kv7.2 foi relatada, e isto parece ser um fator associado com a alodinia/hiperalgesia fria deste modelo (GAMBETA et al., 2020).

No que diz respeito ao tratamento, a monoterapia com carbamazepina (CBZ) é a primeira escolha, sendo ela a única droga aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) para tratamento da NT (VAN KLEEF et al., 2009). A CBZ é capaz de bloquear canais de sódio dependentes de voltagem, inibindo os potenciais de ação,

reduzindo a transmissão do impulso nervoso e estabilizando o potencial de membrana dos neurônios. Contudo, em casos em que a eficácia farmacoterapêutica estiver reduzida, pode-se optar pela substituição ou terapia combinada com outros fármacos, como por exemplo, oxcarbazepina, pregabalina, gabapentina, topiramato e baclofeno (MAARBJERG et al., 2017). Pacientes não responsivos à terapia medicamentosa ou que apresentarem intensos efeitos adversos, podem ser submetidos à procedimento cirúrgico de descompressão do nervo trigêmeo.

Os efeitos adversos decorrentes do uso dos fármacos utilizados no tratamento da NT, tais como tontura, sonolência, náusea, vômito e vertigem podem ocasionar uma falta de adesão farmacoterapêutica. A falta de adesão somada a refratariedade de alguns pacientes à CBZ, tem impulsionado a pesquisa de novas drogas para o controle da dor neuropática trigeminal.

1.5 LIPÍDEOS PRÓ-RESOLUÇÃO

Segundo os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), evidências atuais indicam que a inflamação não controlada é um componente proeminente de muitas doenças, incluindo doenças inflamatórias, tais como artrite, doença periodontal, doença inflamatória intestinal, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas (como Alzheimer e Parkinson), asma, câncer, síndromes metabólicas, diabetes e doenças autoimunes (SERHAN et al., 2018). Nesses casos, os leucócitos polimorfonucleares (PMNs) da resposta inflamatória aguda protetora atingem proliferação excessiva, se aglomeram nos tecidos e estimulam fagocitose e morte celular local, causando danos aos tecidos e amplificando a inflamação até sua cronicidade (SERHAN et al., 2018). Dessa forma, torna-se importante conhecer os mediadores envolvidos no processo de resolução da inflamação e seus mecanismos de ação.

Por muitos anos foi considerado que a resolução da inflamação se tratava de um processo passivo, onde apenas ocorria a dissipação dos mediadores inflamatórios. Atualmente sabe-se que mediadores lipídicos especializados pró-resolução (do inglês, SPMs, specialized pro-resolvig mediators) são produzidos para bloquear o recrutamento de neutrófilos e cessar o processo inflamatório (FATTORI et

al., 2021). Essas substâncias são biossintetizadas a partir dos ácidos araquidônico, eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), dando origem às lipoxinas, resolvinas, protectinas e maresinas.

Dadas suas características químicas e fisiológicas, nos últimos anos cresceu o interesse dos pesquisadores a respeito do potencial farmacológico dos SPMs. Uma revisão de Chiang e Serhan (2020), reuniu as evidências pré-clínicas envolvendo os SPMs nos últimos três anos, mostrando que os lipídeos auxiliaram na resolução da inflamação e reduziram a severidade da doença em diversos modelos pré-clínicos. Nesse estudo, foi demonstrado o efeito dos lipídeos em pelo menos vinte e cinco condições patológicas, como doenças inflamatórias crônicas, doenças degenerativas, dores neuropáticas e inflamatórias.

As maresinas representam os membros mais recentemente descritos da família dos SPMs. Essas substâncias são biossintetizadas pelos macrófagos, células de defesa essenciais na regulação da resposta imune, a partir da lipoxigenação e subsequente epoxigenação do ácido docosahexaenóico (DHA), gerando a 13S, 14S-epóxi-MaR (13S, 14S-eMaR) (DALLI et al., 2019). Este produto é responsável por regular a produção do leucotrieno B4 (LTB4) por meio da inativação direta da hidrolase de LTA4 (DENG et al., 2014). Apresenta ainda um papel importante na resolução, cicatrização e reparação tecidual associadas ao processo inflamatório (DENG et al., 2014). A Maresina-1 (MaR-1) foi a primeira a ser identificada, apresentando potentes ações anti-inflamatórias, antinociceptivas, regenerativas e pró-resolução, além de inibir a infiltração de neutrófilos *in vivo*, e estimular a fagocitose por macrófagos (DENG et al., 2014).

Ainda não se sabe muito sobre os receptores que os SPMs atuam, mas é consenso que eles modulam a resposta imune do indivíduo e promovem seus efeitos ao interagir com receptores acoplados a proteína G (GPCR) presentes em células do sistema imune e neurônios (FATTORI et al., 2021). Segundo a revisão de Fattori e colaboradores (2020), as ações da MaR-1 decorrem de sua interação com receptores LGR6 (receptor 6 acoplado à proteína G contendo repetição rica em leucina), BLT1 (receptor 1 de leucotrieno B4) e TRPV1 (receptor potencial transitório vanilóide 1). O primeiro é expresso por neurônios, células da glia e células do sistema imune periférico, e sua ação está relacionada ao aumento da fagocitose e esferocitose em

macrófagos e neutrófilos (FATTORI et al., 2020). Já o receptor BLT1 humano é um receptor de alta afinidade para o leucotrieno B₄, envolvido na mediação da quimiotaxia e ativação de várias populações de leucócitos, incluindo granulócitos, monócitos, macrófagos e linfócitos (BÄCK et al., 2020). Por fim, o TRPV1 é um receptor de termossensação (calor moderado) e nocicepção, e inúmeros estudos mostram sua participação na hiperalgesia inflamatória (BLAIR et al., 2019).

Segundo Serhan e colaboradores (2012), a MaR-1 demonstrou potente ação de resolução na dor inflamatória induzida por formalina e na dor neuropática induzida por vincristina, por meio do bloqueio do receptor transitório vanilóide 1 (TRPV1) nos neurônios do DRG de camundongos. Posteriormente, Park (2015) evidenciou que a MaR-1 inibe o receptor TRPV1 em neurônios do TG, reduzindo a dor induzida por capsaicina na articulação temporomandibular (ATM). Gao e colaboradores (2018), concluíram que a administração de MaR-1 intratecal no modelo de dor neuropática por ligadura de nervos espinhais inibiu a ativação de micróglia e astrócitos, suprimiu a ativação de NFκB e ainda reduziu a produção e liberação de citocinas inflamatórias, tais como TNF-α, IL-1β e IL-6, reduzindo a hiperalgesia térmica e mecânica nos animais. Por fim, recentemente, Fattori e colaboradores (2019) mostraram que em um modelo de inflamação induzida por adjuvante completo de Freund (CFA), a MaR-1 (10 ng), administrada por via intratecal, inibiu a ativação de micróglia e astrócitos, e reduziu a ativação de NFκB e a produção de citocinas (TNF-α e IL-1β) em medula espinhal de camundongos. Em nível periférico, a MaR-1 reduziu a ativação de neurônios do DRG e o número de leucócitos próximos às fibras CGRP positivas.

A Maresina-2 (MaR-2) apresenta estrutura química semelhante e é biossintetizada a partir do mesmo precursor da MaR-1. Rotas sintéticas distintas fazem com que a diferença química entre MaR-1 e MaR-2 seja a posição de seu carbono quiral. Sabe-se que a MaR-2 também apresenta ações anti-inflamatórias e pró-resolução, reduzindo o recrutamento de neutrófilos na peritonite induzida por zimosan e estimulando a fagocitose por macrófagos (DENG et al., 2014). A semelhança estrutural entre os compostos nos sugere que os mesmos podem ter efeitos biológicos muito parecidos, contudo, não foram encontrados na literatura estudos que mostrassem essa relação, em especial no que diz respeito ao efeito analgésico.

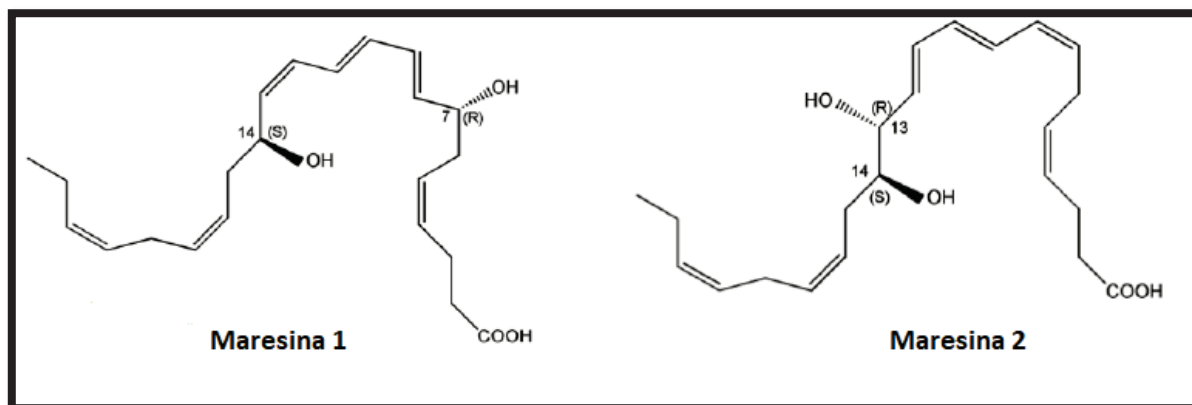


FIGURA 1. ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS MARESINAS 1 E 2.

Fonte: o autor

Tendo em vista essas considerações e os resultados já descritos para a MaR-1, no presente estudo o efeito antinociceptivo da MaR-2 foi investigado em dois diferentes modelos de dor orofacial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito antinociceptivo da MaR-2 em modelos de dor inflamatória e crônica de origem orofacial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito antinociceptivo da MaR-2 na hiperalgesia térmica no modelo de dor pós-operatória em ratos;
- Avaliar o efeito antinociceptivo da MaR-2 na hiperalgesia mecânica no modelo de dor pós-operatória em ratos;
- Avaliar o efeito antinociceptivo da MaR-2 na hiperalgesia térmica no modelo de dor neuropática trigeminal em ratos e camundongos;
- Avaliar o efeito antinociceptivo da MaR-2 na hiperalgesia mecânica no modelo de dor neuropática trigeminal em ratos e camundongos;
- Analisar o efeito da MaR-2 na ativação neuronal induzida por CCI-ION em camundongos;

- Analisar o efeito da MaR-2 na ativação de células CGRP positivas em camundongos submetidos à CCI-ION.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos em ratos *Rattus norvegicus Wistar* machos pesando entre 200-250 g e camundongos *Swiss mus musculus* machos pesando entre 20-25 g, fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal do Paraná, e mantidos em 4 (ratos) ou 10 (camundongos) por gaiola (41 x 32 x 16,5 cm).

Os experimentos foram realizados entre 9h e 17h, após pelo menos dois dias de aclimação prévia dos animais em laboratório. Os animais permaneceram sob condições controladas de temperatura (entre 22 ± 1 °C) e luz (ciclo claro / escuro de 12 horas, luzes acesas às 07: 00h), com livre acesso a ração e água, com troca das maravalhas em dias alternados.

Todos os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA / BIO-UFPR; parecer nº 1118) e seguiram as diretrizes brasileiras do CONCEA (Conselho Nacional de Controle Animal e Experimentação). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento.

3.2 DROGAS E SOLUÇÕES

MaR-2 (Cayman Chemical, Michigan, EUA) foi inicialmente diluída em álcool etílico absoluto 99,8% (Comercial Neon, São Paulo, Brasil) e posteriormente diluída em solução estéril de cloreto de sódio 0,9% (Equiplex Indústria Farmacêutica, Goiânia, Brasil) até as concentrações desejadas (2 ng/ μ L). A dose foi escolhida de acordo com um estudo anterior que demonstrou o efeito analgésico da MaR-1 (FATTORI et al., 2019). A formalina (Alphatec, Paraná, Brasil) foi diluída em solução estéril de cloreto de sódio a 0,9% (Equiplex Indústria Farmacêutica, Goiânia, Brasil). Os anestésicos utilizados foram isoflurano (BioChimico, Rio de Janeiro, Brasil), cloridrato de cetamina (Syntec, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (Syntec, São Paulo, Brasil).

3.3 INJEÇÃO MEDULAR SUBARACNÓIDEA

MaR-2 ou soro fisiológico foram administrados via injeção medular subaracnóidea com o objetivo de atingir o subnúcleo *caudalis* (Sp5C), conforme procedimento descrito por Fischer e colaboradores (2005). Inicialmente, a região da injeção foi tricotomizada seguida de anestesia inalatória com isoflurano. Uma agulha hipodérmica (13 x 0,45 mm), conectada a um cateter de polietileno e a uma seringa Hamilton de 25 μ L, foi inserida entre o osso occipital e a vértebra C1 numa profundidade de cerca de 4 mm e ligeiramente inclinada em direção ao crânio. Após a administração de 5 μ L de solução de MaR-2 (2 ng/ μ L) ou soro fisiológico, a agulha foi lentamente removida e os animais foram monitorados até se recuperarem da anestesia. Animais que apresentavam dificuldade motora após o procedimento foram excluídos dos experimentos.

3.4 MODELOS NOCICEPTIVOS

3.4.1 Teste de formalina orofacial

O teste de formalina orofacial foi realizado conforme descrito anteriormente por nosso grupo (CHICHORRO et al., 2004). Os ratos foram mantidos individualmente nas caixas de observação por um período de aclimação de cerca de 30 min. Em seguida, os animais receberam por via subcutânea uma injeção de formalina (2,5 %, 50 μ L) ou veículo (50 μ L) no lábio superior e foram devolvidos às caixas de observação. O tempo de *grooming* orofacial (isto é, o tempo gasto esfregando a área injetada com as patas dianteiras) foi registrado em intervalos de 3 minutos durante um período de 30 minutos. A primeira e a segunda fases da resposta facial à formalina foram consideradas de 0 a 3 minutos e 12 a 30 minutos após a injeção, respectivamente, enquanto o período entre 3 e 12 minutos foi considerado a fase quiescente.

3.4.2 Modelo de dor pós-operatória oral

Esse modelo consistiu em uma incisão intraoral conforme descrito anteriormente (ARAYA et al., 2020a; URATA et al., 2015). Os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina (50 e 10 mg/kg, respectivamente, i.p.) e uma incisão foi feita no lado direito da mucosa intraoral (cerca de 2 mm de profundidade e 1 mm de comprimento). A incisão foi suturada com fio de seda 4.0. O grupo sham (falso-operado) foi submetido aos mesmos procedimentos, exceto pela incisão.

3.4.3 Modelo de dor neuropática do trigeminal

A cirurgia de constrição crônica do nervo infraorbital (CCI-ION) foi realizada de acordo com o método previamente proposto (VOS et al., 1994) com pequenas modificações (CHICHORRO, 2006). Os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina (50 e 10 mg/kg, respectivamente, i.p.) seguida de assepsia da face com álcool iodado. Após o estabelecimento da anestesia, foi feita uma incisão na pele abaixo do olho direito e cerca de 3 mm após a inserção das vibrissas para expor a porção rostral do nervo infraorbital. O nervo infraorbital foi dissecado dos tecidos adjacentes e duas ligaduras frouxas foram colocadas, com cerca de 2 mm de distância, com fio de seda estéril 4.0 (Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil) ao redor do feixe nervoso. Os tecidos foram suturados com o mesmo fio. Os animais do grupo sham (falso-operado) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, mas o feixe nervoso não foi constrito. Ao final da cirurgia, os animais foram mantidos em sala aquecida até a recuperação completa da anestesia.

3.5 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.5.1 Avaliação da hiperalgesia ao calor

A hiperalgesia ao calor foi avaliada em ratos e camundongos usando o mesmo protocolo, conforme descrito anteriormente (ARAYA et al., 2020a; ARAYA et al., 2020b; LUIZ et al., 2015). Os animais foram contidos com uma das mãos do experimentador e com a outra, uma fonte de calor de aproximadamente 50 °C foi posicionada a cerca de 1 cm da área de inserção das vibrissas, no lado direito da face.

Foi registrado o tempo para cada animal exibir reações para mover vigorosamente a cabeça para longe da fonte de calor ou para mostrar movimentos rápidos e consecutivos das vibrissas. Um tempo limite de 20 segundos foi estipulado para evitar danos aos tecidos.

3.5.2 Avaliação da hiperalgesia mecânica

A hiperalgesia mecânica em ratos foi avaliada conforme descrito anteriormente (CHICHORRO et al., 2006). Os animais foram habituados por pelo menos 2 horas nas caixas de observação, seguido pela aplicação de 8 filamentos de Von Frey em ordem crescente (monofilamentos de Semmes-Weinstein, Stoelting, EUA, 0,04; 0,07; 0,16; 0,4, 1,0, 2,0, 4,0 e 8,0 g) na região inervada pelo nervo infraorbital, do lado ipsilateral à cirurgia. Cada filamento foi aplicado 3 vezes consecutivas com intervalo de 30 s entre cada aplicação. O limiar de resposta dos animais à estimulação mecânica foi considerado a partir do filamento que evocou comportamentos como remoção rápida da cabeça, limpeza facial e reações de ataque/fuga, no mínimo duas vezes. Apenas os animais que obtiveram um limiar de resposta à estimulação mecânica igual ou superior a 8 g antes de qualquer outro procedimento (ou seja, medida basal) foram incluídos nos experimentos.

Em camundongos, a hiperalgesia mecânica facial foi avaliada conforme descrito anteriormente (LUIZ et al., 2015). Os animais foram habituados por 2 h individualmente em caixas de acrílico transparente (9 × 7 × 11 cm) que permitissem o acesso à região periorbital. O teste consistiu na aplicação do filamento de Von Frey (0,04 g) 10 vezes consecutivas em intervalos de ~30 s na região periorbital. As reações de ataque/fuga ou retirada da cabeça foram consideradas respostas positivas à estimulação facial. Apenas camundongos mostrando frequências de resposta positiva abaixo de 25% para as 10 aplicações foram usados em experimentos subsequentes.

3.6 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os camundongos submetidos a CCI-ION ou cirurgia sham foram sacrificados para coleta do TG ipsilateral no dia 5 após a cirurgia. As amostras foram mantidas em 4% de PFA por 24 horas e depois transferidas para uma solução de sacarose a 30% por 72 horas antes de serem incluídas no reagente de corte ideal (Tissue-Tek, OCT

Compound, Sakura Finetek, Torrence, CA, EUA). O TG foi incorporado em OCT e os cortes (15 μ m) processados para imunofluorescência. Para a coloração de células c-Fos positivas, foi usado um anticorpo primário monoclonal c-Fos (1:500, cat # MA1-21190, mouse, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e um anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (1:500, cat # A-11001, goat, anti-mouse, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Os núcleos foram contrastados com DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol [1: 1000, cat # D1306, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA]). Os neurônios positivos para CGRP foram corados com anticorpo primário anti-CGRP (1:500, cat # C8198, rabbit, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) seguido de incubação com um anticorpo Alexa Fluor 488 (1:500, cat # A11008, goat, anti-rabbit, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA]). Os neurônios positivos para fosfo-NF κ B foram corados com anticorpo primário A-8 fosfo-NF κ B p65 (1: 200, cat # SC-166748, mouse, Santa Cruz Biotechnology Inc, Dallas, Texas, EUA) seguido de incubação com um Alexa Fluor 647 (1: 500, cat # 115-605-003, goat, anti-mouse, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EUA). As imagens foram capturadas em microscópio confocal (TCS SP8, Leica Microsystems, Mannheim, Alemanha). Os resultados são expressos em número de células positivas, quantificados por meio da plataforma de software LAS X Life Science (Leica Microsystems, Mannheim, Alemanha).

3.7 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

As ilustrações esquemáticas de cada protocolo experimental podem ser encontradas acima da figura que ilustra o resultado correspondente.

3.7.1 Teste de Formalina Orofacial

No teste de formalina, MaR-2 (1 ou 10 ng) ou Veículo (volume equivalente) foram administrados através de injeção subaracnóidea medular 30 min antes da injeção de formalina (2,5% / 50 μ L) ou Veículo (50 μ L) no lábio superior de ratos e a resposta de *grooming* facial foi registrada durante 30 minutos.

3.7.2 Hiperalgesia térmica e mecânica no modelo de dor orofacial pós-operatória

No modelo de dor orofacial pós-operatória, a responsividade basal dos animais ao calor e a estímulos mecânicos foram avaliadas (dia 0), e no dia 1 após a cirurgia de incisão intraoral, o tratamento com MaR-2 (10 ng) foi iniciado. O tratamento foi repetido no dia 3 e a avaliação da hiperalgesia foi realizada nos dias 3 e 5 de pós-operatório. Os dias do teste foram determinados de acordo com o curso do desenvolvimento da hiperalgesia neste modelo, conforme já publicado pelo nosso grupo (ARAYA et al., 2020).

3.7.3 Hiperalgesia térmica e mecânica no modelo de CCI-ION

No modelo de CCI-ION em ratos e camundongos, a resposta basal dos animais ao calor foi avaliada no dia 0, e no dia 1 após a cirurgia, o tratamento com MaR-2 (10 ng) foi iniciado. O tratamento foi repetido nos dias 03, 05 e 07, e a avaliação da hiperalgesia ao calor foi realizada no dia 01 após a lesão do nervo, antes e uma hora após os tratamentos, e nos dias 03, 05, 07, 09 e 11 após CCI-ION ou sham, uma hora após os tratamentos. Da mesma forma, a responsividade basal dos animais aos estímulos mecânicos foi avaliada no dia 0, e o tratamento foi iniciado no dia 10 após a lesão do nervo, sendo repetido nos dias 12, 14 e 16.

A avaliação da hiperalgesia mecânica em ratos foi realizada no dia 10 após o nervo lesão, antes e uma hora após o tratamento, e nos dias 12, 14, 16, 18 e 20 após CCI-ION ou cirurgia sham, uma hora após os tratamentos.

Em camundongos, o limiar mecânico basal foi avaliado no dia 0, e o tratamento foi iniciado no dia 3 após CCI-ION ou procedimento sham, sendo repetido nos dias 5, 7 e 9. A avaliação da hiperalgesia mecânica em camundongos foi realizada no dia 03 após o nervo lesão, antes e uma hora após os tratamentos, e nos dias 05, 07, 09, 11, 12 e 13 após CCI-ION ou cirurgia sham, uma hora após os tratamentos.

Grupos independentes de animais foram usados para cada estímulo. Os dias de teste foram determinados de acordo com a evolução temporal do desenvolvimento de hiperalgesia térmica e mecânica em ratos e camundongos neste modelo, conforme já publicado por nosso grupo (CHICHORRO et al., 2006, 2009; LUIZ et al., 2015).

3.7.4 Imunofluorescência no gânglio do trigêmeo

Este ensaio foi realizado em amostras de gânglio trigeminal de camundongos. Todos os animais foram avaliados quanto ao desenvolvimento de hiperalgesia antes do início dos tratamentos. Após o início dos tratamentos os animais continuaram sendo testados até o dia 5 para verificação do efeito da MaR-2 nos limiares térmicos e mecânicos. Para essas análises, os camundongos receberam injeções medulares subaracnóideas repetidas de MaR-2 (10 ng) ou veículo nos dias 1, 3 e 5 após sham ou CCI-ION, e 2 horas após o último tratamento, e então foram sacrificados para coleta do TG.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste post hoc de Bonferroni foi usada para analisar o decurso temporal de *grooming* e a hiperalgesia aos estímulos térmicos e mecânicos, segundo a condição (i.e. sham / grupo operado), e / ou tratamento (solução salina / MaR-2) e / ou tempo, como fatores independentes. ANOVA de uma via seguida do teste de post hoc *Bonferroni* foi realizada para analisar o número de células c-Fos positivas e CGRP positivas. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (SEM) para grupos de 8 animais para os experimentos comportamentais e 6 animais para as análises de imunofluorescência. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism (versão 8, San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 MAR-2 REDUZ O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO INDUZIDO POR FORMALINA.

A injeção subcutânea de formalina (2,5%/50 μ L) induziu uma resposta nociceptiva bifásica, que foi significativamente diferente em ratos injetados com veículo. A resposta foi dividida em fase I (0-3 min) e fase II (12-30 min), conforme ilustrado na **Figura 2**. A resposta de *grooming* facial evocada pela formalina foi significativamente diferente do grupo controle na fase I e na fase II. Uma única injeção subaracnóidea de MaR-2 na dose de 1 ng não alterou o tempo de *grooming* facial. Por outro lado, a MaR-2 na dose de 10 ng causou uma redução significativa da fase I e da fase II do comportamento nociceptivo induzido pela formalina. Além disso, a MaR-2 na dose mais alta não alterou o tempo de *grooming* dos ratos do grupo controle.

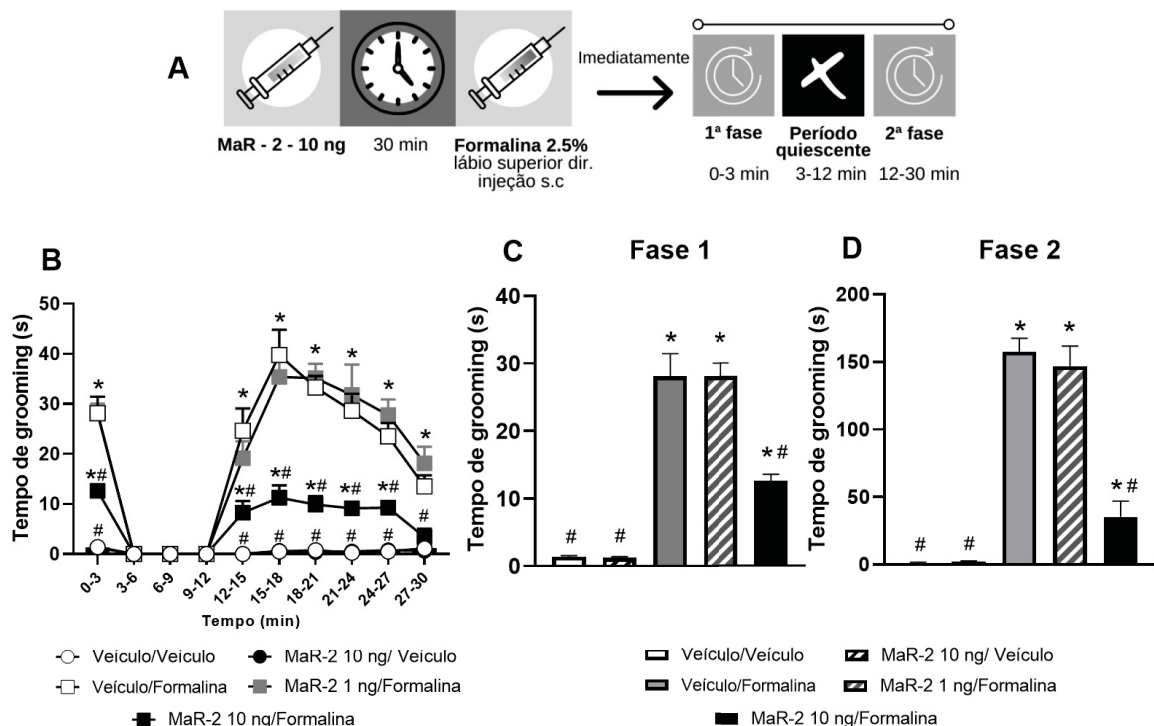


FIGURA 2. MAR-2 REDUZ O COMPORTAMENTO NOCICEPTIVO INDUZIDO POR FORMALINA. (A) Representação esquemática do protocolo experimental. (B) Comportamento de *grooming* facial ao longo de 30 minutos. *Grooming* facial cumulativo na fase 1 (C) e fase 2 (D). Os dados são expressos como média $\pm$ SEM (n = 8), ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. * $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo Veículo/Veículo e # $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo Veículo/Formalina.

4.2 MAR-2 PREVINE O DESENVOLVIMENTO DE HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA NO MODELO DE DOR OROFACIAL PÓS-OPERATÓRIA EM RATOS.

Conforme mostrado na **Figura 3**, no modelo de dor pós-operatória devido à incisão intraoral, há uma diminuição na latência de resposta ao calor do animal no grupo que passou pela cirurgia (**Painel B**). Após a incisão, também é observada uma redução do limiar mecânico dos animais à aplicação dos filamentos de Von Frey (**Painel D**). Esses dados apontam para o desenvolvimento de hiperalgesia térmica e mecânica nos animais que passaram pelo procedimento cirúrgico, o qual não foi constatado nos animais sham. Tanto a hiperalgesia térmica quanto a mecânica tiveram início no primeiro dia após a cirurgia e persistiram até o terceiro dia. Administrações repetidas de MaR-2 (10 ng) nos dias pós-operatórios 1 e 3 evitaram o desenvolvimento da hiperalgesia térmica e mecânica. Animais do grupo sham que receberam injeções medulares subaracnóideas repetidas de MaR-2 não mostraram mudanças na latência de resposta ao calor ou no limiar mecânico durante o período de avaliação.

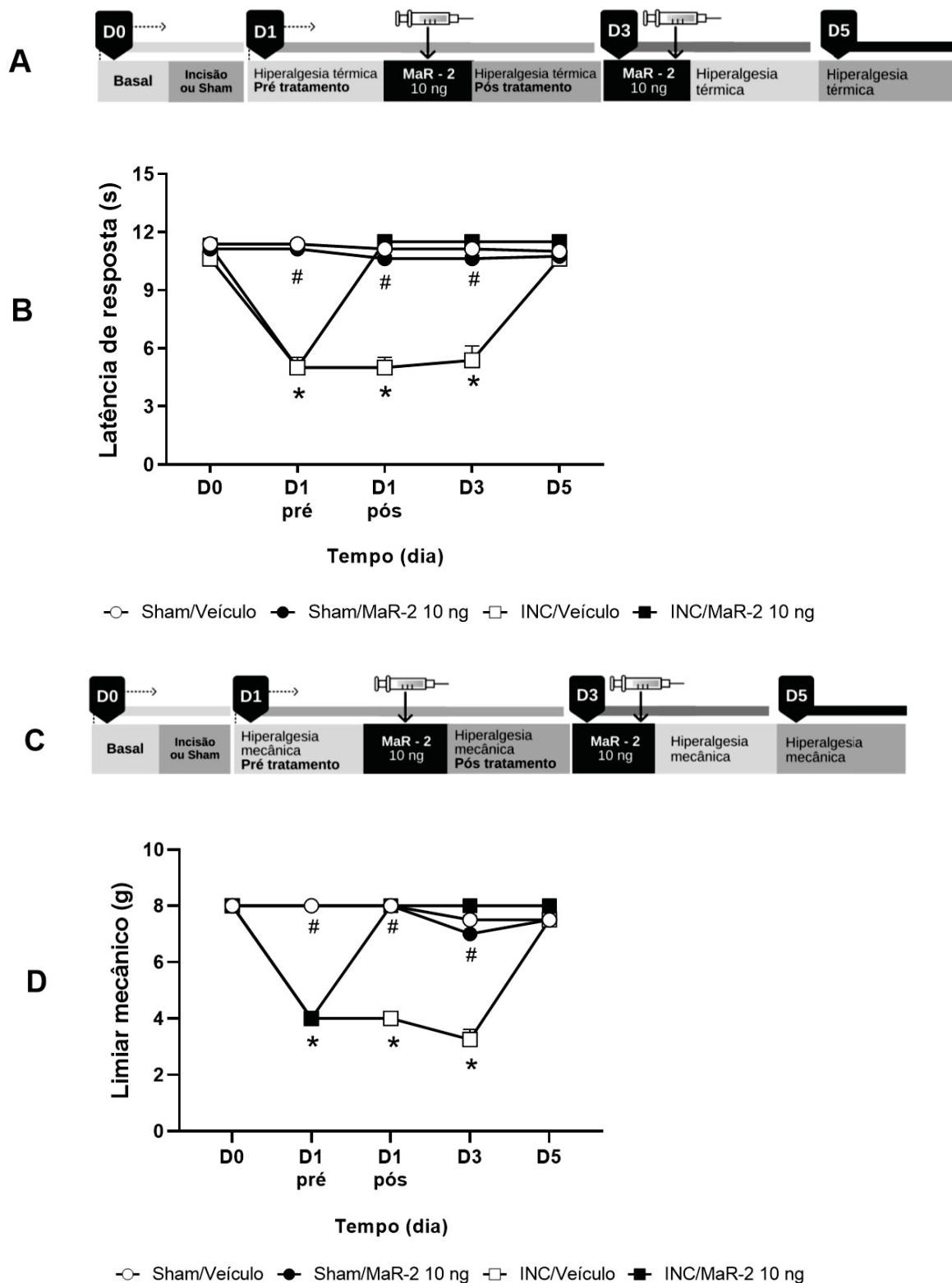


FIGURA 3. MAR-2 PREVINE O DESENVOLVIMENTO DE HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA NO MODELO DE DOR OROFACIAL PÓS-OPERATÓRIA EM RATOS. (A) e (C) Representação esquemática dos protocolos experimentais. (B) Efeito da MaR-2 (10 ng) na latência de resposta à aplicação do calor e (D) Efeito da MaR-2 (10 ng) no limiar mecânico no modelo de incisão intraoral (INC). Os dados são expressos como média $\pm$ SEM (n = 8). * $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo Sham/Veículo e # $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo INC/Veículo. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de teste posthoc de Bonferroni.

4.3 MAR-2 REVERTE A HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA EM UM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL EM RATOS.

Conforme ilustrado na **Figura 4**, no modelo CCI-ION em ratos, há uma diminuição na latência de resposta ao calor do animal no grupo que passou pela cirurgia (**Painel B**). Após a CCI-ION, também é observada uma redução do limiar mecânico dos animais à aplicação dos filamentos de Von Frey (**Painel D**). Esses dados apontam para o desenvolvimento de hiperalgesia térmica e mecânica nos animais que passaram pelo procedimento cirúrgico, o qual não foi constatado nos animais sham. A injeção medular subaracnóidea de MaR-2 (10 ng) em dias alternados, começando no dia 1 até o dia 7, evitou o desenvolvimento de hiperalgesia ao calor. Da mesma forma, o tratamento de MaR-2 (10 ng, uma vez ao dia, nos dias 10, 12, 14 e 16) evitou o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica. O efeito da última injeção de MaR-2 ainda foi detectado no dia 18 após a cirurgia, mas no dia 20 não houve diferença significativa entre ratos CCI-ION injetados com veículo ou MaR-2. Animais do grupo sham que receberam injeções medulares subaracnóideas repetidas de MaR-2 não mostraram alterações na latência para a resposta ao calor ou no limiar mecânico durante todo o período de avaliação.

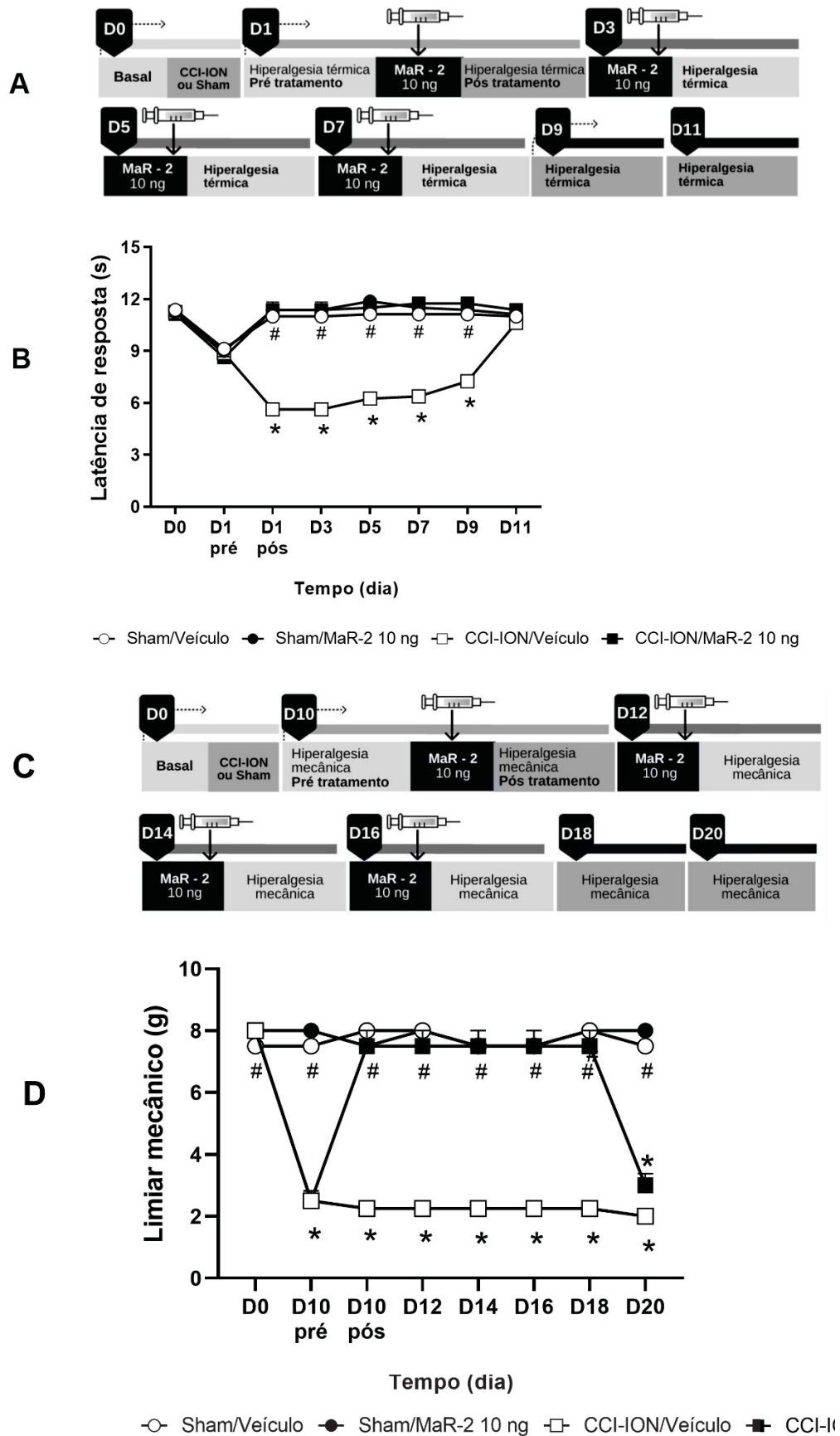


FIGURA 4. MAR-2 REVERTE A HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA EM UM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL EM RATOS. (A) e (C) Representação esquemática dos protocolos

experimentais. (B) Efeito do tratamento repetido com MaR-2 (10 ng) na latência de resposta dos animais à aplicação do calor, e (D) Efeito do tratamento repetido com MaR-2 (10 ng) no limiar mecânico no modelo de CCI-ION. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM ($n = 8$). * $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo Sham/Veículo e # $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo CCI-ION/Veículo. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de teste posthoc de Bonferroni. (CCI-ION, cirurgia de constrição crônica do nervo infraorbital).

4.4 MAR-2 REVERTE A HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA EM UM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL EM CAMUNDONGOS.

Conforme evidenciado na **Figura 5**, nos camundongos submetidos a CCI-ION há uma diminuição na latência de resposta ao calor do animal na região orofacial (**Painel B**). Após a CCI-ION, também é observada uma redução do limiar mecânico dos animais à aplicação dos filamentos de Von Frey (**Painel D**). Esses dados apontam para o desenvolvimento de hiperalgesia térmica e mecânica nos animais que passaram pelo procedimento cirúrgico, o qual não foi constatado nos animais sham. A injeção medular subaracnóidea de MaR-2 (10 ng) em dias alternados, começando no dia 1 até o dia 7, reduziu significativamente a hiperalgesia por calor. O efeito ainda era significativo no dia 9 após a cirurgia (ou seja, 48 h após a última injeção), mas não foi observado no dia 10. Além disso, o tratamento com MaR-2 (10 ng, uma vez por dia, nos dias 3, 5, 7 e 9) evitou o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica. O efeito da última injeção de MaR-2 ainda foi detectado no dia 11 após a cirurgia, mas nos dias 12 e 13 não houve diferença significativa entre os camundongos CCI-ION injetado com veículo ou MaR-2. Os animais do grupo sham que receberam injeções medulares subaracnóideas repetidas de MaR-2 (10 ng) não mostraram alterações na latência para a resposta ao calor ou no limiar mecânico ao longo de todo o período de avaliação.

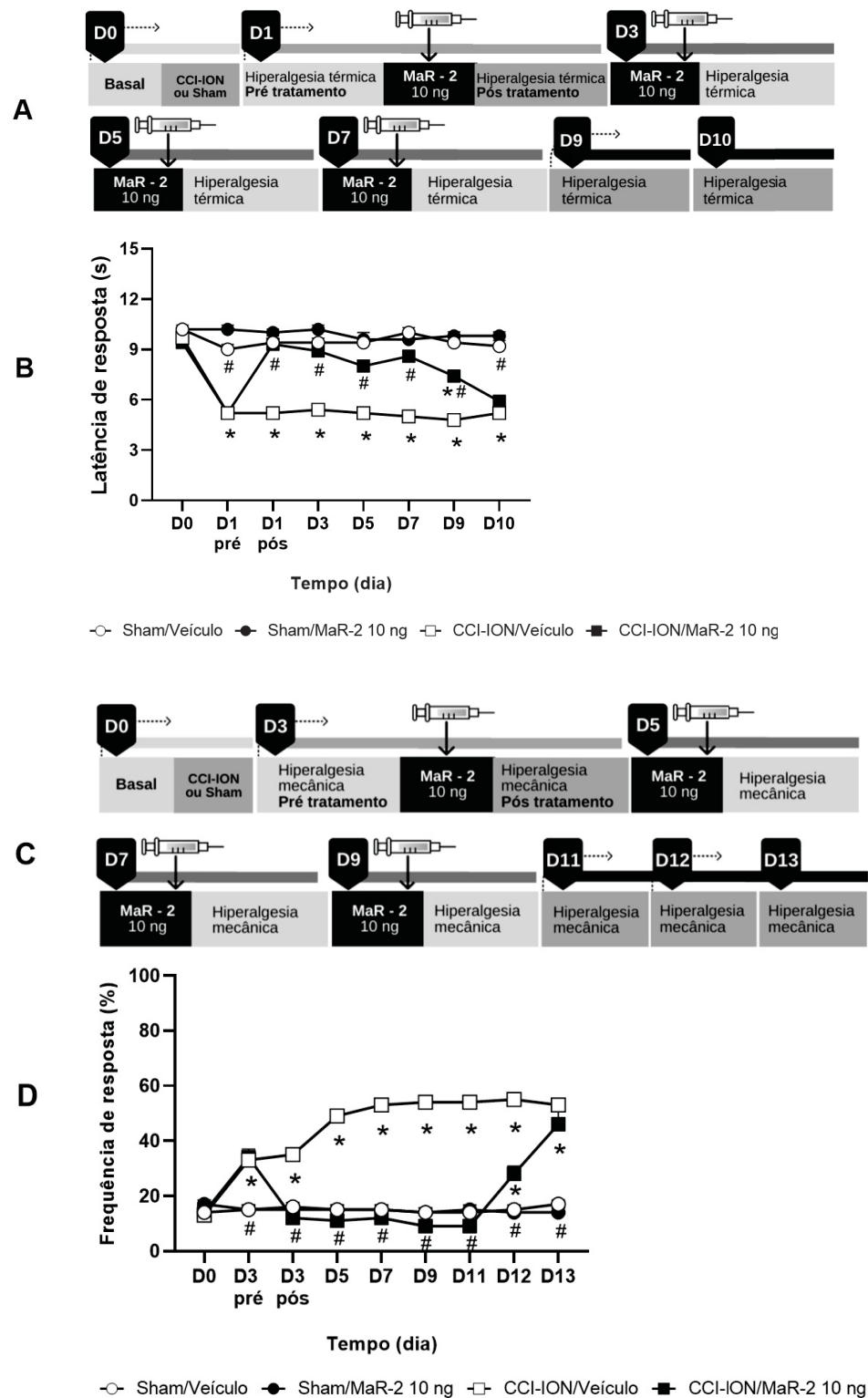


FIGURA 5. MAR-2 REVERTE A HIPERALGESIA TÉRMICA E MECÂNICA EM UM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA TRIGEMINAL EM CAMUNDONGOS. (A) e (C) Representação esquemática dos protocolos experimentais. (B) Efeito do tratamento repetido com MaR-2 (10 ng) na latência de resposta dos animais à aplicação do calor e (D) Efeito do tratamento repetido com MaR-2 (10 ng) no limiar mecânico no modelo de CCI-ION. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM ($n = 8$). * $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo Sham/Veículo e # $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo CCI-ION/Veículo. ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida de teste posthoc de Bonferroni. (CCI-ION, lesão de constrição crônica do nervo infraorbital).

4.5 MAR-2 REDUZ A ATIVAÇÃO DE C-FOS NO GÂGLIO DO TRIGÊMEO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A CCI-ION

A **Figura 6**, mostra que os camundongos submetidos a CCI-ION apresentam um aumento significativo na ativação de c-Fos no TG em comparação com o grupo sham (**Painel B**). A MaR-2 (10 ng) foi capaz de reduzir significativamente o número de células c-Fos positivas nos animais CCI-ION, indicando uma menor ativação de fibras nervosas que transmitem a informação dolorosa. O **Painel C** mostra imagens representativas de imunofluorescência de c-Fos em camundongos sham tratados com veículo e CCI-ION que receberam veículo ou MaR-2.

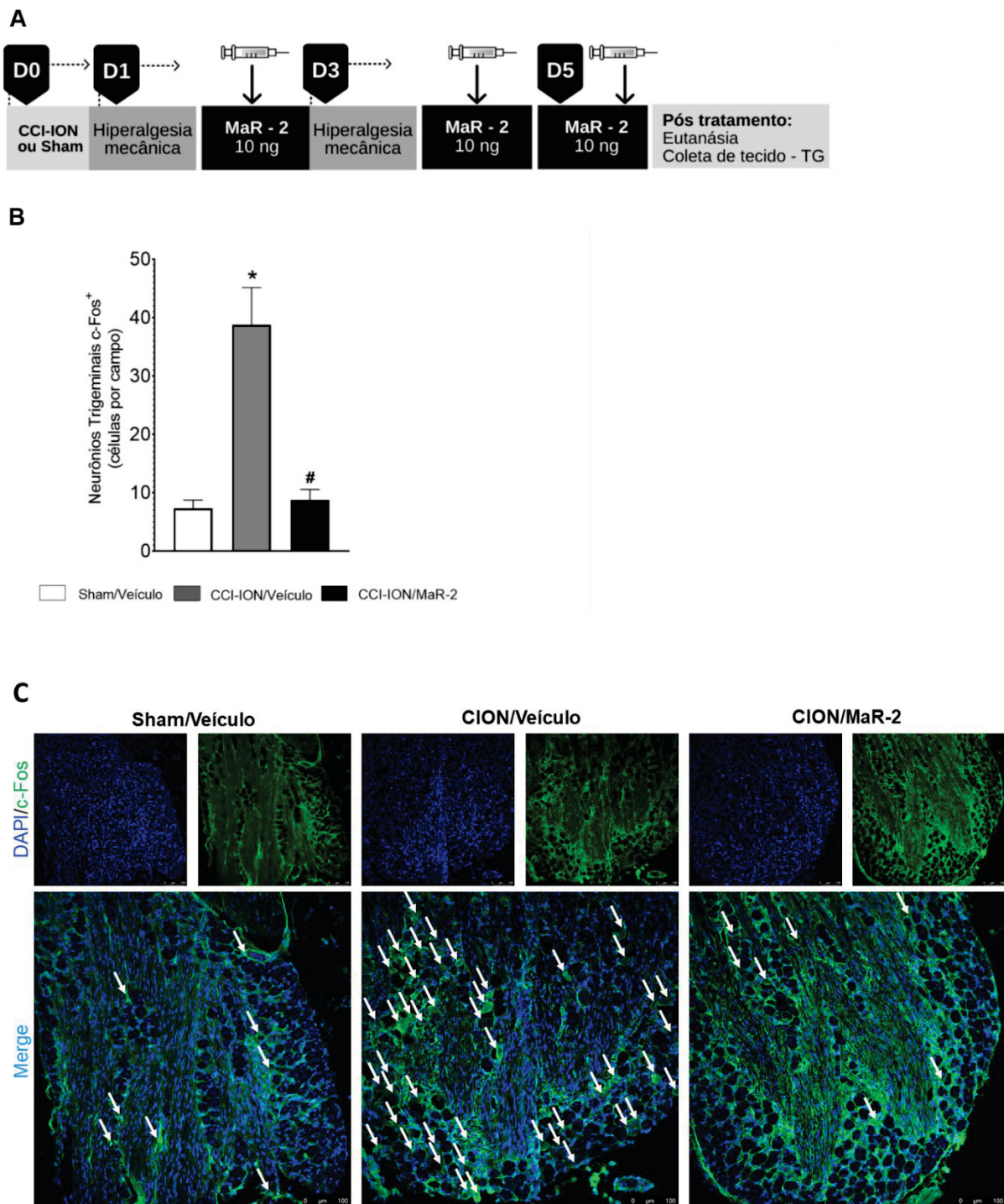


FIGURA 6. MAR-2 REDUZ A ATIVAÇÃO DE C-FOS NO GÂNGLIO DO TRIGÊMEO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A CCI-ION. (A) Representação esquemática dos procedimentos experimentais. (B) Quantificação de células c-Fos positivas no TG de camundongos sham tratados com veículo e CCI-ION tratados com veículo ou MaR-2. (C) Imagens representativas de microscopia confocal do TG de camundongos sham tratados com veículo e CCI-ION tratados com veículo ou MaR-2, imunomarcados para DAPI (azul), c-Fos (verde). Escala de 100 μ m. Os dados são expressos como média $\pm$ SEM de células c-Fos positivas (B) ($n = 6$). * $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo Sham/Veículo e # $P \leq 0,05$ quando comparado ao grupo CCI-ION/Veículo, ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Bonferroni. (TG, gânglio do trigêmeo; CCI-ION, cirurgia de constrição crônica do nervo infraorbital).

4.6 MAR-2 REDUZ A ATIVAÇÃO DE NEURÔNIOS CGRP+ NO GÂGLIO DO TRIGÊMIO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A CCI-ION

A **Figura 7** mostra que camundongos submetidos a CCI-ION apresentam um aumento significativo no número de neurônios positivos para CGRP e NFκB fosforilado (p-NFκB) no TG em comparação com o grupo sham (**Painel B**). A MaR-2 foi capaz de reduzir o número de neurônios CGRP+, que também foram imunorreativos para p-NFκB, a níveis semelhantes àqueles encontrados no grupo sham. O **Painel C** mostra imagens representativas de neurônios CGRP+ colocalizados com p-NFκB em camundongos sham tratados com veículo e CCI-ION tratados com veículo ou MaR-2.

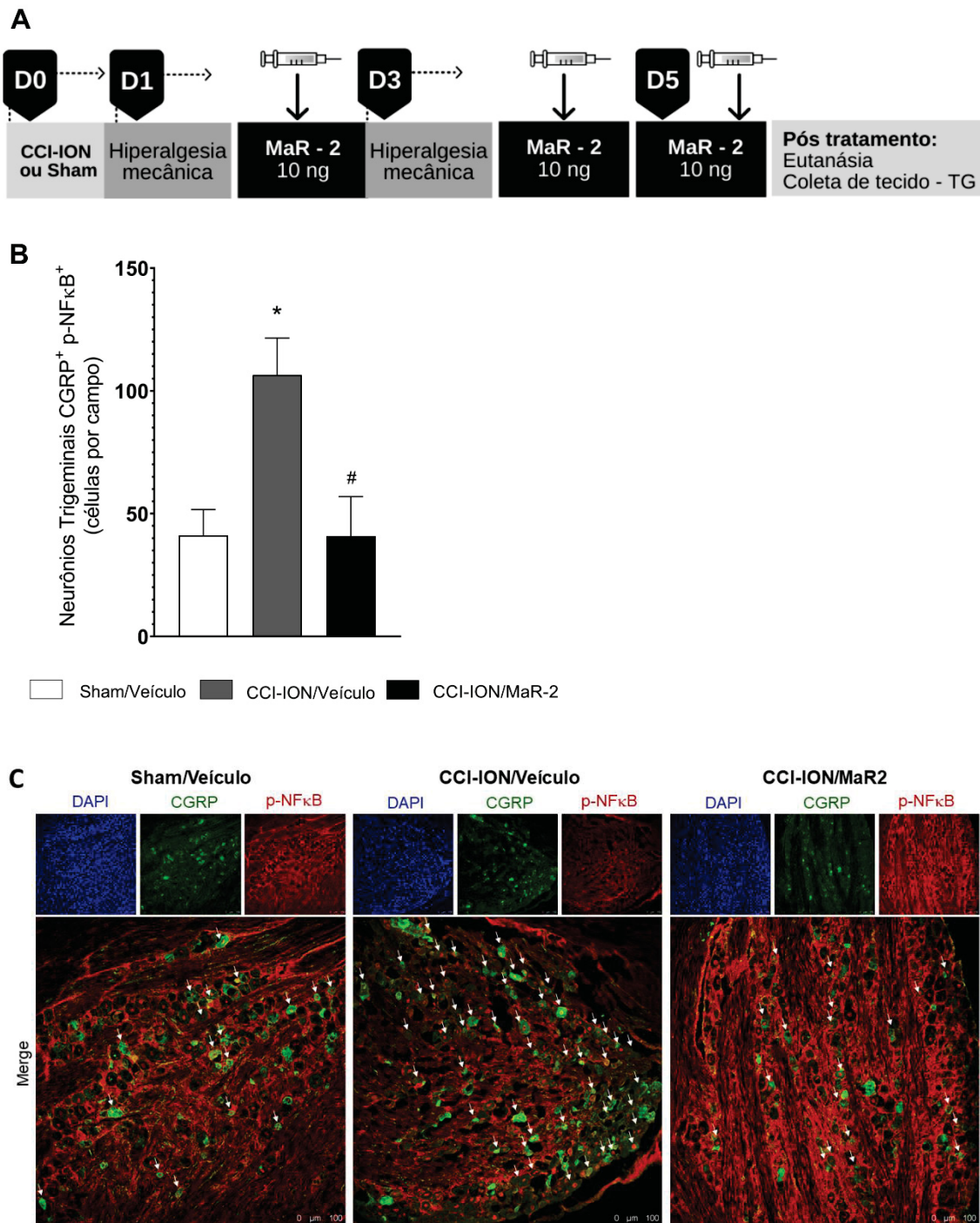


FIGURA 7. MAR-2 REDUZ A ATIVAÇÃO DE NEURÔNIOS CGRP+ NO GÂNGLIO DO TRIGÊMIO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A CCI-ION E MARCADOS COM p-NFκB. (A) Representação esquemática dos procedimentos experimentais. (B) Quantificação de células CGRP e p-NFκB positivas no TG de camundongos sham tratados com veículo e CCI-ION tratados com veículo ou MaR-2. (C) Imagens representativas de microscopia confocal do TG de camundongos sham tratados com veículo e CCI-ION tratados com veículo ou MaR-2, imunomarcados para DAPI (azul), CGRP (verde) e p-NFκB (vermelho). A co-localização dos painéis inferiores (CGRP + p-NFκB) é indicada pelas setas. Escala de 100 μm. Os dados são expressos como média ± SEM de células positivas para CGRP e p-NFκB (B) (n = 6). * P ≤ 0,05 quando comparado ao grupo Sham/Veículo e #P ≤ 0,05 quando comparado ao grupo CCI-ION/Veículo, ANOVA de uma via seguida de teste post-hoc de Bonferroni. (TG, gânglio do trigêmeo; CCI-ION, cirurgia de constrição crônica do nervo infraorbital).

5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram, pela primeira vez, que a injeção medular subaracnóidea de MaR-2 resulta em potentes efeitos antinociceptivos e anti-hiperalgésicos em diferentes modelos de dor orofacial. No teste de formalina orofacial, a MaR-2 reduziu significativamente as fases I e II do comportamento nociceptivo em ratos. Ademais, em um modelo de dor pós-operatória em ratos, a MaR-2 impediu o desenvolvimento da hiperalgesia térmica e mecânica, avaliada na face de ratos. Por fim, em um modelo de dor neuropática trigeminal, a MaR-2 reverteu a hiperalgesia ao calor e a hiperalgesia mecânica, tanto em ratos quanto em camundongos. Nossos dados indicam que um possível mecanismo envolvido nas ações analgésicas do MaR-2 é a redução da ativação neuronal, mais especificamente de neurônios CGRP-positivos no TG.

A grande maioria dos estudos que avaliam as ações anti-inflamatórias e analgésicas dos SPMs tem usado a via intratecal e doses em nanogramas (para revisão ver FATTORI et al., 2020). Vários estudos reportaram efeitos analgésicos da MaR-1 empregada na faixa de dose de 1-20 ng, injetada por via intratecal (SERHAN 2012, GAO, 2009; FATTORI, 2019).

Como não haviam estudos anteriores avaliando os efeitos *in vivo* da MaR-2, baseamos nosso estudo nos resultados anteriormente obtidos com o isômero MaR-1, que é quimicamente semelhante, mas relatado mais potente em alguns parâmetros anti-inflamatórios *in vitro* (SERHAN et al., 2009). Embora as evidências relacionadas ao mecanismo de ação da MaR-2 sejam escassas, sabe-se que ela possui importante efeito anti-inflamatório, pró-resolução e regenerativo (DENG et al., 2014; HWANG et al., 2019), e tendo em vista as semelhanças químicas com a MaR-1, é possível que seus efeitos sejam ao menos similares ao deste isômero. Sendo assim, no presente estudo utilizamos as doses de 1 e 10 ng, bem como a administração medular subaracnóidea, que corresponde à administração intratecal (FISCHER et al., 2005). Este método de injeção tem sido usado por nosso grupo para administração de drogas no complexo do núcleo trigeminal, mais especificamente no Sp5C (ARAYA et al., 2017; LUIZ et al., 2015).

O teste da formalina é amplamente utilizado para o *screening* de drogas com potencial analgésico. A injeção de formalina na pata traseira ou lábio superior de

roedores induz uma resposta nociceptiva bifásica, consistindo em uma primeira fase de curta duração, devido à ativação dos nociceptores, seguida de um período quiescente, e uma segunda fase, mais prolongada e com características inflamatórias (CHICHORRO et al., 2004; CLAVELOU et al., 1989; DUBUISSON et al., 1977; TJØLSEN et al., 1992). No presente estudo, uma única injeção de MaR-2 (10 ng) causou uma redução acentuada da fase I e da fase II da nocicepção induzida por formalina. Em consonância com esta observação, animais que receberam capsaicina intraplantar e foram tratados com MaR-1 na dose de 10 ng intratecal apresentaram redução nos movimentos nociceptivos na pata (SERHAN et al., 2012). A MaR-1 também demonstrou inibir as correntes induzidas por ativação de receptores TRPV1, mas não receptores TRPA1, em neurônios do DGR, de uma forma sensível à toxina *pertussis* (SERHAN et al., 2012). Em relação à dor inflamatória, a injeção intraplantar de MaR-1 (10 ng) reduziu as respostas nociceptivas induzidas por carragenina, bem como reduziu a hiperalgesia mecânica e térmica induzida por CFA, quando injetada na mesma dose, porém por via intratecal (FATTORI et al., 2019). Em conjunto, esses resultados sugerem que as maresinas são capazes de bloquear a ativação e sensibilização dos nociceptores.

Ainda com relação à dor inflamatória, os resultados do presente estudo mostram o efeito da MaR-2 em um modelo de dor pós-operatória induzida por incisão intraoral. Esse modelo foi proposto por Urata e colaboradores (2015) e posteriormente caracterizado por nosso grupo (ARAYA et al., 2020a; ARAYA et al., 2020b) e foi utilizado devido ao aspecto translacional para a clínica. A MaR-2 (duas administrações em dias alternados) preveniu o desenvolvimento de hiperalgesia ao calor e hiperalgesia inflamatória mecânica induzida por incisão intraoral. Esses achados vão de encontro com observações anteriores de que a MaR-1 (10 ng, intratecal) causou uma redução significativa da hiperalgesia térmica e mecânica induzidas por carragenina na pata traseira de camundongos (FATTORI et al., 2019). Com o mesmo tratamento, mas no modelo de inflamação por Adjuvante Completo de Freund (CFA) injetado na pata traseira de camundongos (FATTORI et al., 2019), a MaR-1 também causou uma redução significativa da dor espontânea, hiperalgesia térmica e mecânica induzidas pelo composto.

Vários mecanismos periféricos e centrais parecem contribuir para o efeito da MaR-1, incluindo a inibição do recrutamento de neutrófilos e macrófagos próximos às

fibras positivas para CGRP na pele da pata, inibição da ativação de NF- κ B com consequente inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, e inibição da ativação de células gliais na medula espinhal (FATTORI et al., 2019). Os mecanismos subjacentes aos efeitos da MaR-2 ainda precisam ser elucidados, mas é possível que alguns deles se assemelhem com àqueles já descritos para a MaR-1 também na dor inflamatória. Em conjunto com nossos dados, esses resultados indicam um efeito analgésico potente e duradouro das maresinas, os quais atuam através de mecanismos diferentes das terapias atualmente disponíveis e, portanto, podem ser úteis no tratamento da dor de origem inflamatória.

Adicionalmente, nossos resultados demonstraram que a MaR-2 causou uma redução acentuada e duradoura da hiperalgesia térmica e mecânica em um modelo de dor neuropática trigeminal. Esses achados corroboram observações anteriores de que a MaR-1 (10 - 100 ng, 3 injeções intratecais em dias consecutivos) foi capaz de reduzir significativamente a hiperalgesia térmica e mecânica em um modelo de dor radicular em ratos (WANG et al., 2020). De maneira similar, a MaR-1 na dose de 100 ng, via intratecal, reduziu a alodinia mecânica e hiperalgesia térmica em modelo de lesão de nervo espinhal (GAO et al., 2009). Além disso, a MaR-1 reduziu a alodinia induzida por vincristina (um modelo de dor neuropática induzida por quimioterapia) quando administrado sistemicamente (40 ng) em camundongos (SERHAN et al., 2012). Uma vez que os dados sobre dor neuropática são mais limitados, estendemos nosso achados para ratos e camundongos, e a MaR-2 mostrou efeitos semelhantes em ambas as espécies.

Ainda nesse sentido, o tratamento repetido com MaR-2 em camundongos reduziu a níveis basais a ativação de neurônios TG demonstrada pela análise de células c-Fos positivas. O TG é uma estrutura chave no processamento nociceptivo trigeminal. Contém os corpos celulares neuronais de todas as aferências do trigêmeo, que são envolvidas por células gliais satélites. Os neurônios TG expressam e liberam vários neuropeptídeos que sinalizam para neurônios vizinhos ou células gliais satélites, e modula a transmissão sensorial. Além disso, o TG está fora da barreira hematoencefálica, o que permite a distribuição dos mediadores para locais periféricos e/ou para o complexo do núcleo trigeminal (para revisão ver MESSLINGER et al., 2020). Assim, drogas que modulam a sinalização de TG podem ter um efeito inibitório tanto na sensibilização periférica quanto no núcleo sensorial trigeminal. A expressão da proteína c-Fos é comumente usada como um marcador indireto de neurônios

nociceptivos (BURITOVA, et al.,2002) pois em mamíferos, estímulos nocivos periféricos aumentam a concentração de mRNA da proteína c-Fos nesses neurônios (HUNTER et al.,1995), os quais aumentam rapidamente o número neurônios c-Fos positivos após estimulação (COGGESHALL, 2005). No caso das lesões periféricas propriamente ditas, sabe-se que elas, além de causar aumento na expressão de proteínas, também aumentam o número de neurônios imunorreativos para c-Fos (MUNGLANI et al.,1995). Assim, fica evidente a importância da marcação de células c-Fos positivas no estudo dos processos que envolvem a nocicepção. Nossos dados demonstram ainda que o modelo de CCI-ION aumenta a ativação desses neurônios e que o tratamento com MaR-2 reduz drasticamente esse efeito, sugerindo que o seu efeito analgésico pode estar associado a redução da atividade neuronal no TG.

O mecanismo preciso da MaR-2 no TG ainda não foi elucidado, mas de acordo com nossos dados, ele é capaz de reduzir a ativação de neurônios positivos para CGRP. A nocicepção é um processo complexo que envolve amplo processamento de sinais no sistema nervoso central e periférico, por meio de várias substâncias e receptores. Entre as substâncias envolvidas nesse processo está o CGRP, que nos últimos anos tem se destacado fortemente como um dos principais componentes envolvidos na fisiopatologia da enxaqueca (HO et al., 2010). Além das dores de cabeça, sabe-se atualmente que o CGRP está altamente envolvido no processamento e modulação de outros tipos de dor orofacial (LIANG et al., 2021), pois causa ativação e sensibilização dos neurônios aferentes primários do nervo trigêmeo, bem como participa do processo de sensibilização central (Messlinger 2020). Nossos dados demonstram que no modelo CCI-ION, os camundongos apresentam aumento da ativação de células CGRP positivas e que o tratamento com MaR-2 reduz drasticamente esse efeito, mostrando que este SPM diminui a transmissão dolorosa realizada por esse tipo de célula neuronal. Em consonância com essa observação, no estudo de Fattori e colaboradores (2019) foi demonstrado que a MaR-1 inibiu marcadamente a liberação de CGRP induzida pela capsaicina. Juntos, esses resultados sugerem que os neurônios do DRG e TG são responsivos às maresinas, as quais podem reduzir a atividade desses neurônios, o que pode contribuir para seu efeito analgésico.

É bastante provável que mecanismos adicionais estejam envolvidos na ação analgésica da MaR-2, os quais ainda precisam ser investigados. Dentre as possibilidades, é válido mencionar que o bloqueio de receptores TRPV1 pode estar

associado aos efeitos observados para a MaR-2 no presente estudo. Isso corroboraria os dados de Park et al. (2015), que demonstraram que a MaR-1 bloqueia o influxo de cálcio nos receptores TRPV1 induzido por capsaicina em neurônios do TG. Ainda segundo Serhan e colaboradores (2012), a MaR-1 bloqueia completamente o influxo de cálcio induzido por capsaicina em neurônios do DRG. Por fim, Fattori e colaboradores (2019) evidenciam que a MaR-1 reduziu a ativação de receptores TRPV1 em neurônios do DRG em modelo de CFA, com uma única administração de 10 ng. Em conjunto, esses dados podem nos indicar um possível mecanismo de ação a ser investigado para a MaR-2.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados do presente estudo demonstram que a MaR-2 tem um efeito analgésico potente e duradouro na dor inflamatória e neuropática de origem orofacial. A inibição da ativação de neurônios CGRP-positivos pode contribuir para o efeito analgésico da MaR-2, mas este e outros mecanismos precisam ser melhor investigados. Levando em consideração a potência da MaR-2, podemos sugerir que, assim como outros SPMs, esse lipídeo pode trazer vários benefícios no tratamento de condições de dor aguda e crônica.

7 REFERÊNCIAS

ALEXANDER SP; BATTEY J; BENSON HE; et al. **Class A Orphans (version 2020.5) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database**. IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE. 2020; 2020(5). Disponível em: <<https://doi.org/10.2218/gtopdb/F16/2020.5>>.

ANTMAN, E. M.; BENNETT, J. S.; DAUGHERTY, A.; et al. Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs: An update for clinicians: A scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**, v. 115, n. 12, p. 1634–1642, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.181424>>.

ARAYA, E. I.; BAGGIO, D. F.; KOREN, L. DE O.; et al. Acute orofacial pain leads to prolonged changes in behavioral and affective pain components. **Pain**, v. 161, n. 12, p. 2830–2840, 2020a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001970>>.

ARAYA, E. I.; BARROSO, A. R.; TURNES, J. DE M.; et al. Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling in the trigeminal ganglion mediates facial mechanical and thermal hyperalgesia in rats. **Physiology and Behavior**, v. 226, n. June, p. 113-127, 2020b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113127>>.

BÄCK M; BRINK C; CHIANG N, et al. **Leukotriene receptors (version 2020.3) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database**. IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE. 2020; 2020(3). Disponível em: <<https://doi.org/10.2218/gtopdb/F35/2020.3>>.

BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cerebrovasculares e renais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 556–563, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0066-782X2010000400019>>.

BIRGITTA H., et al. **Increasing gender differences in the prevalence and chronification of orofacial pain in the population**, PAIN: Agosto 2020 - Volume 161 - Edição 8 - p.1768-1775. Disponível em: <[https://doi:10.1097/j.pain.0000000000001872](https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001872)>.

BLAIR NT; CARVACHO I; CHAUDHURI D; et al. **Transient Receptor Potential channels (TRP) (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database**. IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE. 2019; 2019(4). Disponível em: <<https://doi.org/10.2218/gtopdb/F78/2019.4>>.

BREIVIK, H.; COLLETT, B.; VENTAFRIDDA, V.; COHEN, R.; GALLACHER, D. Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment. **European Journal of Pain**, v. 10, n. 4, p. 287-333, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2005.06.009>>.

BURITOVA, J.; BESSON, J. M. Effects of nefopam on the spinal nociceptive processes: A c-Fos protein study in the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 441, n. 1–2, p. 67–74, 2002. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(02\)01418-8](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(02)01418-8)>.

CHIANG N, SERHAN CN. Specialized pro-resolving mediator network: an update on production and actions. **Essays Biochem**. 2020 Sep 23;64(3):443-462. Disponível em: <<https://doi.org/10.1042/EBC20200018>>.

CHICHORRO, J. Neuralgia do Trigêmeo : estudo de mecanismos e avaliação da participação das endotelinas em um modelo experimental. , p. 1–74, 2006. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/88606>>.

CHICHORRO, J. G.; LORENZETTI, B. B.; ZAMPRONIO, A. R. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, n. 7, p. 1175–1184, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705724>>.

CHICHORRO, J. G.; PORRECA, F.; SESSLE, B. Mechanisms of craniofacial pain. **Cephalalgia**, v. 37, n. 7, p. 613–626, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0333102417704187>>.

CHICHORRO, J. G.; ZAMPRONIO, A. R.; RAE, G. A. Endothelin ETB receptor antagonist reduces mechanical allodynia in rats with trigeminal neuropathic pain. **Experimental Biology and Medicine**, v. 231, n. 6, p. 1136–1140, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.npep.2008.12.001>>.

CHRISTOPH, T.; DE VRY, J.; SCHIENE, K.; TALLARIDA, R. J.; TZSCHENTKE, T. M. Synergistic antihypersensitive effects of pregabalin and tapentadol in a rat model of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 666, n. 1–3, p. 72–79, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.05.029>>.

CLAVELOU, P.; PAJOT, J.; DALLEL, R.; RABOISSON, P. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 103, n. 3, p. 349–353, 1989. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0304-3940\(89\)90125-0](https://doi.org/10.1016/0304-3940(89)90125-0)>.

COGGESHALL, R. E. Fos, nociception and the dorsal horn. **Progress in Neurobiology**, v. 77, n. 5, p. 299–352, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.11.002>>.

DALLI, J.; SERHAN, C. N. Identification and structure elucidation of the pro-resolving mediators provides novel leads for resolution pharmacology. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n. 8, p. 1024–1037, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/bph.14336>>.

DENG, B.; WANG, C. W.; ARNARDOTTIR, H. H.; et al. Maresin biosynthesis and identification of maresin 2, a new anti-inflammatory and pro-resolving mediator from human macrophages. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1-9, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102362>>.

DEVOR, M.; AMIR, R.; RAPPAPORT, Z. H. Pathophysiology of trigeminal neuralgia: The ignition hypothesis. **Clinical Journal of Pain**, v. 18, n. 1, p. 4–13, 2002. Disponível em: <[https://doi.org/ 10.1097/00002508-200201000-00002](https://doi.org/10.1097/00002508-200201000-00002)>.

DOSTROVSKY, J. O. Chapter 10 Brainstem and thalamic relays. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 81, p. 127–139, 2006. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0072-9752\(06\)80014-X](https://doi.org/10.1016/S0072-9752(06)80014-X)>.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, n. C, p. 161–174, 1977. Disponível em: <[https://doi.org/ 10.1016/0304-3959\(77\)90130-0](https://doi.org/10.1016/0304-3959(77)90130-0)>.

FATTORI, V.; FERRAZ, C. R.; RASQUEL-OLIVEIRA, F. S.; VERRI, W. A. Neuroimmune communication in infection and pain: Friends or foes? **Immunology Letters**, v. 229, n. October 2020, p. 32–43, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.11.009>>.

FATTORI, V.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; STAURENGO-FERRARI, L.; et al. The specialised pro-resolving lipid mediator maresin 1 reduces inflammatory pain with a long-lasting analgesic effect. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n. 11, p. 1728–1744, 2019. Disponível em: <[https://doi.org/ 10.1111/bph.14647](https://doi.org/10.1111/bph.14647)>.

FATTORI, V.; ZANINELLI, T. H.; RASQUEL-OLIVEIRA, F. S.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A. Specialized pro-resolving lipid mediators: A new class of non-immunosuppressive and non-opioid analgesic drugs. **Pharmacological Research**, v. 151, n. September 2020, p. 104549, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104549>>.

FISCHER, L.; PARADA, C. A.; TAMBELI, C. H. A novel method for subarachnoid drug delivery in the medullary region of rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 148, n. 2, p. 108–112, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.04.021>>.

GAMBETA, E.; CHICHORRO, J. G.; W. ZAMPONI, G. Trigeminal neuralgia: An overview from pathophysiology to pharmacological treatments. **Molecular Pain**, v. 16, p. 1-18, 2020. Disponível em: <[https://doi.org/ 10.1016/j.jneumeth.2005.04.021](https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.04.021)>.

GAO, J.; TANG, C.; TAI, L. W.; et al. Pro-resolving mediator maresin 1 ameliorates pain hypersensitivity in a rat spinal nerve ligation model of neuropathic pain. **Journal of Pain Research**, v. 11, p. 1511–1519, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.2147/JPR.S160779>>.

GAO, Y. J.; ZHANG, L.; SAMAD, O. A.; et al. JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 13, p. 4096–4108, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3623-08.2009>>.

HO, T. W.; EDVINSSON, L.; GOADSBY, P. J. CGRP and its receptors provide new insights into migraine pathophysiology. **Nature Reviews Neurology**, v. 6, n. 10, p. 573–582, 2010. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2010.127>>.

HUNTER, J. C.; WOODBURN, V. L.; DURIEUX, C.; et al. C-fos antisense oligodeoxynucleotide increases formalin-induced nociception and regulates preprodynorphin expression. **Neuroscience**, v. 65, n. 2, p. 485–492, 1995. Disponível em: <[https://doi.org/ 10.1016/0306-4522\(94\)00500-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00500-5)>.

JONES, M. R.; URITS, I.; EHRHARDT, K. P.; et al. A Comprehensive Review of Trigeminal Neuralgia. **Current Pain and Headache Reports**, v. 23, n. 10, p. 1–7, 2019. Current Pain and Headache Reports. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11916-019-0810-0>>.

HWANG, S. M.; CHUNG, G.; KIM, Y. H.; PARK, C. K. The role of maresins in inflammatory pain: Function of macrophages in wound regeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijms20235849>>.

LIANG, H.; HU, H.; SHAN, D.; et al. CGRP Modulates Orofacial Pain through Mediating Neuron-Glia Crosstalk. **Journal of Dental Research**, v. 100, n. 1, p. 98–105, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0022034520950296>>.

LUIZ, A. P.; SCHROEDER, S. D.; RAE, G. A.; CALIXTO, J. B.; CHICHORRO, J. G. Contribution and interaction of kinin receptors and dynorphin A in a model of trigeminal neuropathic pain in mice. **Neuroscience**, v. 300, p. 189–200, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.015>>.

LUO, X.; GU, Y.; TAO, X.; SERHAN, C. N.; JI, R.-R. Resolvin D5 Inhibits Neuropathic and Inflammatory Pain in Male But Not Female Mice: Distinct Actions of D-Series Resolvins in Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. July, p. 1–9, 2019>.

MAARBJERG, S.; DI STEFANO, G.; BENDTSEN, L.; CRUCCU, G. Trigeminal neuralgia - Diagnosis and treatment. **Cephalalgia**, v. 37, n. 7, p. 648–657, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0333102416687280>>.

MELIS, M.; GIOSIA, M. DI; COLLOCA, L.; Ancillary factors in the treatment of orofacial pain: A topical narrative review. , v. 46, n. 2, p. 200–207, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/joor.12736>>.

MESSLINGER, K.; BALCZIAK, L. K.; RUSSO, A. F. Cross-talk signaling in the trigeminal ganglion: role of neuropeptides and other mediators. **Journal of Neural Transmission**, v. 127, n. 4, p. 431–444, 2020. Springer Vienna. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00702-020-02161-7>>.

MIAO, G.; LIU, Z.; WEI, S.; et al. Lipoxin A4 attenuates radicular pain possibly by inhibiting spinal ERK, JNK and NF- κ B/P65 and cytokine signals, but not P38, in a rat model of non-compressive lumbar disc herniation. **Neuroscience**, v. 300, p. 10–18, 2015>.

MUNGLANI, R.; HUNT, S. P. Molecular biology of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 75, n. 2, p. 186–192, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/>

10.1093/bja/75.2.186>.

PARK, C. K. Maresin 1 Inhibits TRPV1 in Temporomandibular Joint-Related Trigeminal Nociceptive Neurons and TMJ Inflammation-Induced Synaptic Plasticity in the Trigeminal Nucleus. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1-9, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2015/275126>>.

PEIXOTO, R. F. Controle da Dor Pós-Operatória em Cirurgia Oral: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 4, p. 465–470, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.4034/RBCS.2011.15.04.13>>.

PEREIRA, R. J.; MUNECHIKA, M.; SAKATA, R. K. Tratamento da dor após procedimento cirúrgico ambulatorial. **Revista Dor**, v. 14, n. 1, p. 61–67, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1806-00132013000100015>>.

PERGOLIZZI, J.; AHLBECK, K.; ALDINGTON, D.; et al. The development of chronic pain: Physiological CHANGE necessitates a multidisciplinary approach to treatment. **Current Medical Research and Opinion**, v. 29, n. 9, p. 1127–1135, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1185/03007995.2013.810615>>.

SERHAN, C. N.; DALLI, J.; KARAMNOV, S.; CHOI, A.; PARK, C.; et al. Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 4, p. 1755–1765, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1096/fj.11-201442>>.

SERHAN, C. N.; LEVY, B. D. Resolvins in inflammation: Emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. **Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 7, p. 2657–2669, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1172/JCI97943>>.

SERHAN, C. N.; YANG, R.; MARTINOD, K.; et al. Maresins: Novel macrophage mediators with potent antiinflammatory and proresolving actions. **Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 1, p. 15–23, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1084/jem.20081880>>.

SESSLE, B. J. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. **Minerva Anestesiologica**, v. 71, n. 4, p. 117–136, 2005. Disponível em: <<https://www.minervamedica.it/en/journals/minerva-anestesiologica/article.php?cod=R02Y2005N04A0117>>.

SESSLE, B. J. Mechanisms of oral somatosensory and motor functions and their clinical correlates. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 33, n. 4, p. 243–261, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2006.01623.x>>.

SIQUEIRA, S. R. D. T.; ALVES, B.; MALPARTIDA, H. M. G.; TEIXEIRA, M. J.; SIQUEIRA, J. T. T. Abnormal expression of voltage-gated sodium channels Nav1.7, Nav1.3 and Nav1.8 in trigeminal neuralgia. **Neuroscience**, v. 164, n. 2, p. 573–577, 2009. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.08.037>>.

TJØLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5–17, 1992. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0304-3959\(92\)90003-T](https://doi.org/10.1016/0304-3959(92)90003-T)>.

URATA, K.; SHINODA, M.; HONDA, K.; et al. Involvement of TRPV1 and TRPA1 in incisional intraoral and extraoral pain. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 3, p. 446–454, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0022034514565645>>.

VAN KLEEF, M.; LATASTER, A.; NAROUZE, S.; et al. 2. Cluster headache. **Pain Practice**, v. 9, n. 6, p. 435–442, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1533-2500.2009.00331.x>>.

VON KORFF, M.; DWORKIN, S. F.; LE RESCHE, L.; KRUGER, A. An epidemiologic comparison of pain complaints. **Pain**, v. 32, n. 2, p. 173–183, 1988. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90066-8](https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90066-8)>.

VOS, B. P.; STRASSMAN, A. M.; MACIEWICZ, R. J. Behavioral Evidence of Trigeminal Neuropathic Pain Following Chronic Constriction Injury to the Rat's Infraorbital Nerve. **Journal of Neuroscience**, 1994 May;14(5 Pt 1):2708-2723, 1994.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-05-02708.1994>>.

ZHANG, L. YU; LIU, Z. HUA; ZHU, Q.; et al. Resolvin D2 Relieving Radicular Pain is Associated with Regulation of Inflammatory Mediators, Akt/GSK-3 β Signal Pathway and GPR18. **Neurochemical Research**, v. 43, n. 12, p. 2384–2392, 2018. Springer US. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11064-018-2666-9>>.

WANG, Y. HAO; LI, Y.; WANG, J. NAN; et al. A Novel Mechanism of Specialized Proresolving Lipid Mediators Mitigating Radicular Pain: The Negative Interaction with NLRP3 Inflammasome. **Neurochemical Research**, v. 45, n. 8, p. 1860–1869, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11064-020-03050-x>>.